

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Microbiología III



**TESIS DOCTORAL**

**Actividad de plazomicina frente a aislados clínicos de  
Escherichia coli resistentes a cefalosporinas de tercera  
generación. Caracterización de sus mecanismos de  
resistencia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**María del Carmen López Díaz**

Directoras

**Carmen Rodríguez-Avial López-Doriga**  
**Esther Culebras López**  
**Iciar Rodríguez-Avial Infante**

**Madrid, 2018**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Ciencias Biológicas**



**Actividad de Plazomicina frente a Aislados Clínicos de  
*Escherichia coli* Resistentes a Cefalosporinas de Tercera  
Generación. Caracterización de sus Mecanismos de Resistencia**

**María del Carmen López Díaz**

**Tesis Doctoral**

Madrid, 2017

**Directoras**

Carmen Rodríguez-Avial López-Doriga

Esther Culebras López e Iciar Rodríguez-Avial Infante

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ACTIVIDAD DE PLAZOMICINA FRENTE A AISLADOS  
CLÍNICOS DE *Escherichia coli* RESISTENTES A  
CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN.  
CARACTERIZACIÓN DE SUS MECANISMOS DE RESISTENCIA**

**MARÍA DEL CARMEN LÓPEZ DÍAZ**

**Tesis Doctoral**

**Madrid, 2017**



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera dejar constancia de mi agradecimiento a todas las personas que de una forma u otra han contribuido en la realización de este trabajo.

Al Dr. Juan J. Picazo por haberme permitido trabajar en su Servicio y haberme dado la oportunidad de poder realizar mi tesis doctoral en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

A la Dra. Carmen Rodríguez-Avial, directora de esta tesis, por haber confiado en mí, por su apoyo y ayuda en la elaboración de este trabajo, y sobre todo por su constante dedicación y el cariño que me ha demostrado en todo momento.

A la Dra. Esther Culebras, directora de esta tesis, por su comprensión, su permanente disponibilidad para ayudarme, su dedicación en todo momento, así como por sus consejos y sugerencias, y por todas sus enseñanzas a lo largo de estos años.

A la Dra. Iciar Rodríguez-Avial, directora de esta tesis, por su apoyo y guía en la codirección de este trabajo, por su ayuda y buena disposición, así como por transmitirme su entusiasmo por la investigación.

A la Dra. Esther Ríos por su enorme paciencia y dedicación, por ayudarme y ser mi guía en el laboratorio, por su apoyo, y por todo lo que me ha enseñado.

A José Manuel Viñuela Prieto por su ayuda en la realización de los análisis estadísticos.

A todas las personas del servicio de Microbiología del HCSC, por su apoyo, su ayuda en algún momento, y por compartir conmigo su conocimiento y experiencia.

A la Dra. M<sup>a</sup> José Valderrama, tutora de esta tesis, por su buena disposición y asesoramiento.

A mis padres, por su ayuda y los sacrificios que han hecho por mí, por la ilusión que manifiestan en todo lo que hago, por sus muestras de ánimo, comprensión y su apoyo incondicional. Gracias por todo.

A mis hermanos, que tanto significan en mi vida, por su apoyo y sus palabras de ánimo.

Al resto de mi familia y amigos, y a todas las personas que de una forma u otra han contribuido en la realización de este proyecto.

Y por último, pero no menos importante, a mi marido Miguel, por su paciencia, sus ánimos, su optimismo y su apoyo moral. Gracias por creer en mí.



*A mis padres*

*A mis hermanos*

*A Miguel*





## ÍNDICE

---



<b>RESUMEN</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>17</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>21</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>27</b>
1. <i>Escherichia coli</i> .....	29
1.1 Características bioquímicas y microbiológicas .....	29
1.2 Características antigénicas y factores de virulencia .....	29
1.3 Infección del tracto urinario .....	32
2. Antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	34
2.1 Clasificación y estructura química .....	34
2.2 Mecanismo de acción .....	39
2.3 Espectro antibacteriano.....	39
3. Mecanismos de resistencia bacteriana a $\beta$ -lactámicos.....	40
3.1 Producción de $\beta$ -lactamasas .....	41
3.1.1 Clasificación .....	41
4. Antibióticos aminoglucósidos .....	53
4.1 Estructura química.....	53
4.2 Mecanismo de acción .....	56
4.3 Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos aminoglucósidos .....	56
4.3.1 Enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs).....	58
5. Plazomicina .....	64
6. Otros antibióticos no $\beta$ -lactámicos .....	65
6.1 Fosfomicina .....	65
6.2 Nitrofurantoína .....	66
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>67</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>71</b>
1. Aislados clínicos.....	73
2. Métodos de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.....	74
2.1 Método de dilución en agar .....	74
2.2 Método de Épsilon-test (E-test).....	76

3. Detección fenotípica de enzimas de resistencia .....	77
3.1 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) .....	77
3.1.1 Prueba confirmatoria para BLEE según el CLSI.....	78
3.2 $\beta$ -lactamasas AmpC.....	78
3.3 Detección fenotípica de cepas productoras de AmpC y BLEE .....	79
3.4 Detección fenotípica de carbapenemasas: Test de Hodge .....	80
3.4.1 Test de sinergia con EDTA y PBA.....	81
4. Estudios moleculares .....	81
4.1 Extracción del material genético .....	81
4.1.1. Extracción con detergente no-iónico .....	81
4.1.2. Extracción de ADN mediante el sistema NucliSens <sup>®</sup> easyMAG <sup>®</sup> .....	82
4.2 Detección y caracterización molecular de BLEEs .....	82
4.3 Detección y caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas AmpC.....	86
4.4 Detección y caracterización molecular de carbapenemasas .....	88
4.5 Detección y caracterización molecular de enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs).....	89
4.6 Detección de los amplificados por electroforesis en geles de agarosa y visualización del producto de PCR.....	91
4.7 Secuenciación de los productos amplificados por PCR .....	92
5. Análisis estadístico .....	93
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>95</b>
1. Aislados clínicos incluidos en el estudio.....	97
2. Pruebas fenotípicas de detección de BLEE y AmpC .....	97
2.1 Confirmación fenotípica de BLEE .....	97
2.2 Confirmación fenotípica de AmpC .....	99
2.3 Confirmación fenotípica de BLEE y AmpC .....	99
3. Sensibilidad a los antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	101
3.1 Cepas productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	101
3.2 Cepas productoras de $\beta$ -lactamasas tipo AmpC .....	103
3.3 Cepas productoras de BLEE + AmpC y BLEE + OXA-48.....	104
3.4 Comparación de los resultados de sensibilidad a $\beta$ -lactámicos entre las cepas productoras de BLEE y las de AmpC.....	105
4. Caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas.....	111

4.1 Caracterización molecular de las BLEE.....	111
4.1.1 Distribución de las CMIs obtenidas para cada tipo de BLEE.....	113
4.2 Caracterización molecular de las AmpC .....	116
4.3 $\beta$ -lactamasas detectadas en las 347 cepas de <i>E. coli</i> estudiadas.....	117
5. Antibióticos aminoglucósidos .....	119
5.1 Estudios de sensibilidad a aminoglucósidos.....	119
5.2 Sensibilidad a los aminoglucósidos en función del tipo de $\beta$ -lactamasa.....	123
5.3 Caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos	125
6. Estudios de sensibilidad de otros antibióticos no $\beta$ -lactámicos.....	132
6.1 Distribución en función del tipo de BLEE .....	134
7. Datos epidemiológicos .....	136
7.1 Relación entre el inicio de la infección y el tipo de $\beta$ -lactamasa .....	137
7.2 Relación entre el inicio de la infección y el tipo de enzima modificante de aminoglucósido.....	138
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>139</b>
1. Mecanismos de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en <i>E. coli</i> .....	141
2. Resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	143
3. Origen y epidemiología de la infección del tracto urinario .....	146
4. Resistencia a antibióticos aminoglucósidos .....	147
5. Producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs) .....	147
5.1 Plazomicina.....	150
6. Resistencia a otros antibióticos no $\beta$ -lactámicos .....	151
6.1 Resistencia a fosfomicina .....	151
6.2 Resistencia a nitrofurantoína .....	152
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>181</b>



## **RESUMEN**

---





*Escherichia coli* es el principal agente uropatógeno, siendo responsable de la mayoría de las infecciones del tracto urinario (ITU) que afectan al ser humano. La resistencia a cefalosporinas de tercera generación, mediada por las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y de  $\beta$ -lactamasas AmpC, es un problema creciente en todo el mundo, que frecuentemente se asocia con la resistencia a otras familias de antimicrobianos. La presencia de aislados *E. coli* productores de estas enzimas limita las opciones de tratamiento, indicando la necesidad de nuevas opciones terapéuticas.

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar los mecanismos de resistencia tanto a  $\beta$ -lactámicos como a los aminoglucósidos más utilizados en la clínica en 347 aislados de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación, procedentes de infecciones urinarias diagnosticadas durante el año 2013 en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid y evaluar la actividad *in vitro* de un nuevo aminoglucósido, plazomicina, en desarrollo clínico para ITUs complicadas, frente a esos aislados. Además estudiamos la actividad de dos antibióticos clásicos para el tratamiento de las ITUs no complicadas: fosfomicina y nitrofurantoína.

En el presente estudio se determinaron las CMI's a distintos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, así como a fosfomicina y nitrofurantoína mediante el método de dilución en agar. Se diferenciaron fenotípicamente las cepas productoras de BLEE de las de AmpC. Se realizó la detección genotípica por PCR de los principales tipos de BLEE y AmpC plasmídica (p-AmpC). Además, en los aislados que presentaron resistencia a alguno de los aminoglucósidos ensayados, se realizó la caracterización molecular de los genes que codifican las enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs) más comunes en *E. coli*: *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* y *aph(3')-Ia*.

Se confirmó la producción de BLEE en 303 (87,3%) de los aislados frente a 44 que resultaron tener fenotipo AmpC (12,7%). El principal tipo de BLEE fue CTX-M (229 aislados), siendo el 50,2% productores de CTX-M-15. Entre los aislados AmpC, el 70,5% resultaron productores de p-AmpC del tipo CMY.

De las 347 cepas, 144 fueron resistentes al menos a uno de los aminoglucósidos incluidos en nuestro estudio. Las tasas de resistencia a tobramicina, gentamicina y amikacina fueron 39,2%, 27,9% y 1,5%, respectivamente. Se observó una notable diversidad de EMAs, con 12 patrones diferentes. El gen de EMA más común fue *aac(6')-Ib*. Todas las cepas con *aac(6')-Ib* fueron resistentes a tobramicina y el 29% presentaron valores de CMIs > 8 mg/L de amikacina. A su vez, todas las cepas que presentaron el gen *aac(3)-IIa* fueron resistentes a gentamicina. El gen *aac(6')-Ib* se asoció con la presencia de CTX-M-15 [64/73; 87,7% (P < 0,01)] mientras que el 60% (18/30) de las cepas productoras de CTX-M-grupo 9 portaban el gen *aac(3)-IIa* (P < 0,01), y el gen *ant(2'')-Ia* se asoció con la presencia de p-AmpC [3/6; 50% (P = 0,03)].

Plazomicina fue muy activa frente a los aislados urinarios de *E. coli* productores de BLEE y/o AmpC incluidos en nuestro estudio, con unas CMIs que oscilaron entre 0,25 y 4 mg/L y que fueron independientes del tipo de EMA presente. Plazomicina representa una buena alternativa para el tratamiento de estas cepas multirresistentes.

Fosfomicina y nitrofurantoína conservan buena actividad para el tratamiento de las cistitis no complicadas, pero se necesita un seguimiento de su resistencia.

## **ABSTRACT**

---



*Escherichia coli* is the most important uropathogen, being the most frequent cause of from human urinary tract infections (UTIs). Resistance to third-generation cephalosporins, mediated by extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and AmpC  $\beta$ -lactamases is an increasing problem worldwide, which is often associated with co-resistance to other antimicrobial families. As a result, therapeutic options against these  $\beta$ -lactam-resistant *E. coli* infections are extremely limited, indicating the need for new therapeutic options.

The general objective of this work was to characterize the resistance mechanisms to  $\beta$ -lactam agents and to aminoglycosides, in 347 ESBL/AmpC-producers *E. coli* urinary isolates, collected during 2013 at the Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain) and to determine the activity of a novel aminoglycoside, plazomicin. The compound is currently under clinical development for the treatment of complicated urinary tract infections (cUTIs) and acute pyelonephritis as a single agent. We also studied the activity of two classical antibiotics for the treatment of uncomplicated UTIs: fosfomycin and nitrofurantoin.

In this study, MICs of different  $\beta$ -lactam antibiotics, aminoglycosides, fosfomycin and nitrofurantoin were determined by the agar dilution method. Genes encoding ESBLs and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases (p-AmpC) were detected by PCR. The presence of four AME genes: *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib*, *ant(2'')-Ia* and *aph(3')-Ia*, was also investigated in the aminoglycoside-resistant isolates and the relationship between AME genes detected and the resistance phenotype founded was determined.

Three hundred three *E. coli* were confirmed as ESBL- and 44 as AmpC-producers. CTX-M was the main ESBL (229 isolates), being 50.7% CTX-M-15. Among AmpC-producers CMY type was detected in 70.5%.

Of the 347 isolates, 144 were aminoglycoside-resistant. Tobramycin, gentamicin and amikacin resistance rates were 39.2%, 27.9% and 1.5%, respectively.

Remarkable AMEs diversity, with 12 different AME patterns, was detected. The most common AME gene was *aac(6')-Ib*. All strains with *aac(6')-Ib* were tobramycin-resistant and 29% showed amikacin MICs > 8 mg/L. All strains with *aac(3)-IIa* gene were gentamicin-resistant. The *aac(6')-Ib* was associated with CTX-M-15 [64/73; 87.7% (P < 0.01)] whilst 18/30 (60%) strains producing CTX-M-9-group had the *aac(3)-IIa* gene (P < 0.01) and *ant(2'')-Ia* was associated with p-AmpCs [3/6; 50% (P=0.03)].

Data showed that plazomicin was very active against all ESBL/AmpC-producing *E. coli* urinary isolates, with MICs ranged from 0.25 to 4 mg/L, regardless of the type of AME present. Plazomicin represents a good alternative for the treatment of these multiresistant strains.

Fosfomicin and nitrofurantoin retain good activity for the treatment of uncomplicated cystitis, but a follow-up of their resistance is required.

## **ABREVIATURAS**

---





<b>A/C</b>	Amoxicilina/ácido clavulánico
<b>AACs</b>	Aminoglicósido <i>N</i> -acetiltransferasas
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Ak</b>	Amikacina
<b>AmpC</b>	$\beta$ -lactamasas AmpC
<b>c-AmpC</b>	AmpC cromosómica
<b>p-AmpC</b>	AmpC plasmídica
<b>ANTs</b>	Aminoglicósido <i>O</i> -nucleotidiltransferasas
<b>APHs</b>	Aminoglicósido <i>O</i> -fosfotransferasas
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARNr</b>	ARN ribosómico
<b><i>bla</i></b>	$\beta$ -lactamasa
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BLEE</b>	$\beta$ -lactamasa de espectro extendido
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CLA</b>	Ácido clavulánico
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CMI<sub>50</sub></b>	Concentración mínima inhibitoria capaz de inhibir al 50% de la población bacteriana
<b>CMI<sub>90</sub></b>	Concentración mínima inhibitoria capaz de inhibir al 90% de la población bacteriana
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>CTX/C</b>	Cefotaxima/clavulánico

<b>dNTP</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>ECDC</b>	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EMAs</b>	Enzimas modificantes de antibióticos aminoglucósidos
<b>EPC</b>	Enterobacterias productoras de carbapenemasas
<b>ERT</b>	Ertapenem
<b>EUCAST</b>	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FEP</b>	Cefepima
<b>FOX</b>	Cefoxitina
<b>GEIH</b>	<i>The Spanish Group for Nosocomial Infections</i>
<b>Gm</b>	Gentamicina
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HCSC</b>	Hospital Clínico San Carlos
<b>IMI</b>	Imipenem
<b>IRT</b>	<i>Inhibitor resistant TEM</i>
<b>ITU</b>	Infección del tracto urinario
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>M</b>	Molar
<b>MBL</b>	Metalo-β-lactamasas
<b>MDR</b>	<i>Multiple drug resistance</i>
<b>mg</b>	Miligramo
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>MH</b>	<i>Mueller-Hinton</i>
<b>mM</b>	Milimolar

<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBA</b>	Ácido fenilborónico
<b>PBP</b>	<i>Penicillin binding proteins</i> (Proteínas fijadoras de penicilinas)
<b>PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
<b>SMART</b>	<i>Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends</i>
<b>THM</b>	Test de Hodge modificado
<b>T<sup>a</sup></b>	Temperatura
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>To</b>	Tobramicina
<b>UCI</b>	unidad de cuidados intensivos
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UPEC</b>	<i>E. coli</i> uropatógeno
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar



## **INTRODUCCIÓN**

---



## 1. *Escherichia coli*

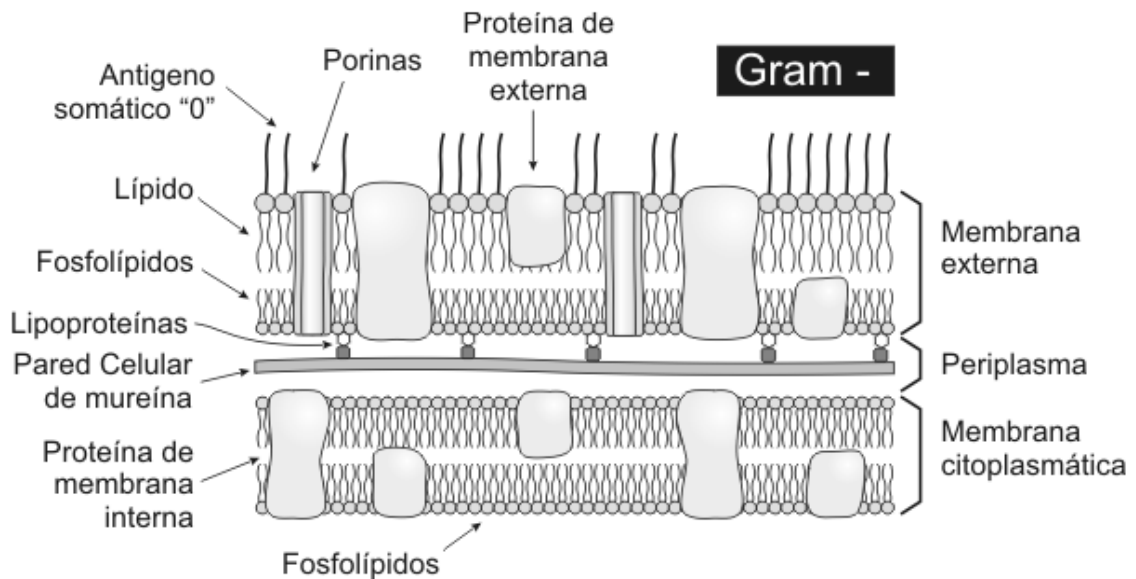
### 1.1 Características bioquímicas y microbiológicas

*Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros de esta familia causan una amplia variedad de infecciones en el ser humano, tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario. El género *Escherichia* se compone de seis especies: *E. alberti*, *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* y *E. vulneris*. De ellas, *E. coli* es la enterobacteria más frecuente y la más importante desde el punto de vista clínico, siendo la más descrita como causa de patología en el ser humano. Entre las características bioquímicas más relevantes para su identificación se puede destacar que es una bacteria catalasa positiva, reduce los nitratos a nitritos, no produce oxidasa, ureasa ni fenilalanina desaminasa, produce indol a partir del triptófano, fermenta la glucosa, la lactosa y el D-manitol, siendo negativa la reacción de Voges-Proskauer. Además, es una enterobacteria que puede ser móvil por flagelos peritricos o inmóvil [1, 2].

### 1.2 Características antigénicas y factores de virulencia

La envoltura celular de *E. coli*, como en otras bacterias gramnegativas, se caracteriza por una estructura multilaminar. Esta estructura presenta una membrana interna o citoplasmática, formada por una capa de fosfolípidos con proteínas intercaladas. La capa siguiente consiste en un peptidoglicano delgado (también conocido como mureína), y entre ambas se encuentra el espacio periplásmico o periplasma que contiene una elevada concentración de proteínas. Por encima se sitúa la membrana externa constituida por una bicapa de fosfolípidos intercalada con distintos componentes como lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas, proteínas porinas multiméricas y otras proteínas

de la membrana externa. Entre estas proteínas hay algunas organelas complejas que irradian hacia el exterior: flagelos, fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y los pili sexuales [1]. En la figura 1 se esquematiza la estructura de la cubierta celular de bacterias gramnegativas.



**Figura 1:** Cubierta celular de una bacteria gramnegativa.

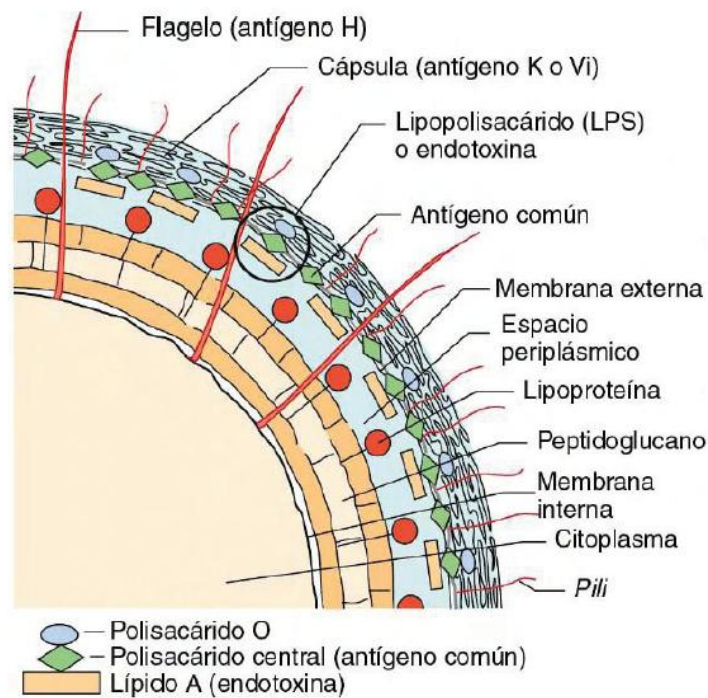
Disponible en: (<http://www.genomasur.com/lecturas/Guia01.htm>).

El LPS es el principal antígeno de la cubierta celular de las enterobacterias y está formado por tres componentes: el polisacárido O somático más externo, un polisacárido central (antígeno común en todas las enterobacterias) y el lípido A. El polisacárido O es importante para la clasificación epidemiológica de las cepas dentro de una especie y el componente lipídico A del LPS es responsable de la actividad de la endotoxina, un importante factor de virulencia [3].

*E. coli* presenta una estructura antigénica formada por tres clases de antígenos (Figura 2).



- Antígeno somático o antígeno O: procedente del LPS de la membrana de la pared celular presente en todas las bacterias gramnegativas. Confiere la especificidad serológica.
- Antígeno flagelar o antígeno H: Tiene naturaleza proteica y se localiza en los flagelos.
- Antígeno capsular o antígeno K: Tiene naturaleza polisacárida y está presente en cepas capsuladas. Constituye una barrera defensiva disminuyendo la capacidad de los anticuerpos para unirse a la bacteria. Impide la fagocitosis [3].



**Figura 2:** Estructura antigénica de las enterobacterias [3].

Los factores de virulencia son las estructuras o productos bacterianos que intervienen en el proceso infeccioso. *E. coli* posee una amplia variedad de factores de virulencia, entre otros la endotoxina, cápsula, variación de fase antigénica (expresión o no de los antígenos somáticos O, antígenos capsulares K o antígenos flagelares H), resistencia al

efecto bactericida del suero, sideróforos y hemolisinas. Las cepas de *E. coli* poseen además adhesinas y fimbrias, imprescindibles para unirse a las mucosas, y exotoxinas [3].

Los plásmidos, que juegan un papel fundamental en la transmisión de la resistencia a los antimicrobianos, también codifican información para diferentes factores de virulencia (islas de patogenicidad) [1, 3].

### **1.3 Infección del tracto urinario**

La infección del tracto urinario (ITU) es la infección bacteriana más frecuente observada en el ámbito ambulatorio, siendo mucho más frecuente en el género femenino que en los varones: 1 de cada 3 mujeres desarrollara una infección urinaria que requerirá tratamiento con antibióticos antes de los 24 años y al menos el 50% una ITU durante su vida [4]. La ITU produce una respuesta inflamatoria y abarca un espectro de cuadros clínicos que afectan tanto al tracto urinario superior como al inferior. Las ITU se clasifican como complicadas o no complicadas basándose en si hay alteraciones o no en la anatomía del tracto urinario, las enfermedades de base del paciente y su gravedad. Por otra parte dependiendo de la localización se diferencian distintos síndromes como pielonefritis, cistitis y prostatitis. También se pueden considerar la bacteriuria asintomática y el síndrome uretral agudo. Todo ello presenta diferencias en relación a la clínica, a la gravedad y al diagnóstico del cuadro que producen [4, 5].

La etiología de la ITU depende de la localización anatómica de la infección, del ámbito de adquisición (comunitario u hospitalario) y de la presencia de determinados factores, como el tratamiento antibiótico previo, la manipulación del tracto urinario, la edad y el sexo [4]. La principal vía de infección es la ascendente y, por ello, los microorganismos más frecuentemente causantes de las ITU provienen del tracto gastrointestinal del

propio paciente, siendo los más importantes las enterobacterias, predominando *E. coli* como agente causal [6]. La mayoría de estos microorganismos se originan en el colon, contaminan la uretra, ascienden hasta la vejiga y pueden migrar hasta el riñón o la próstata [3]. Más del 95% de las ITU son monobacterianas [5, 6], siendo *E. coli* uropatógeno (UPEC) el microorganismo más frecuentemente aislado en cualquier tipo de ITU, implicado en más del 80% de las infecciones comunitarias y del 50-70% de las ITU complicadas de origen nosocomial [7, 8]; seguido en frecuencia por *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., y *Pseudomonas aeruginosa*. Otros uropatógenos bacterianos que aparecen en menor medida son *Corynebacterium urealyticum* (reconocido como patógeno nosocomial importante), levaduras del género *Candida*, *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus saprophyticus* relacionado con casos de cistitis en mujeres jóvenes sexualmente activas. También se han asociado como patógenos implicados en ITU a especies como *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Gardnerella vaginalis* [5].

Las cepas UPEC presentan una serie de características que les permiten colonizar/infectar el tracto urinario de forma exitosa. La mayoría acumulan genes que codifican diversos factores de virulencia. Entre estos destaca la producción de adhesinas (principalmente *pili* P, AAF/I, AAF/II y Dr) y hemolisina HlyA. Otros factores de virulencia son la producción de toxinas, invasinas y sistemas de captación de hierro [3, 9].

El urocultivo sigue siendo el método de referencia para un **diagnóstico** correcto de la ITU. Normalmente, se considera como bacteriuria significativa un recuento  $\geq 10^5$  UFC/mL. Sin embargo, hay estudios que demuestran la existencia de infección sintomática del tracto urinario inferior con recuentos más bajos ( $10^2$ - $10^4$  UFC/mL) [5, 10].

El **tratamiento antibiótico** en las ITU debe cumplir entre otros los siguientes objetivos: obtener una respuesta rápida y efectiva, prevenir las recurrencias y evitar la aparición de resistencia a los antimicrobianos. En la mayoría de los casos, cualquiera de los numerosos antibióticos disponibles son satisfactorios para tratar la ITU. Algunos de los más utilizados son:  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, fosfomicina y nitrofurantoína. No obstante, en la elección del tratamiento hay que tener en cuenta el síndrome clínico que presente el paciente así como su situación clínica y los factores de riesgo. Los fármacos de elección deben presentar escasa toxicidad y probabilidad de afectar a la microbiota de la vagina y el tubo digestivo [5].

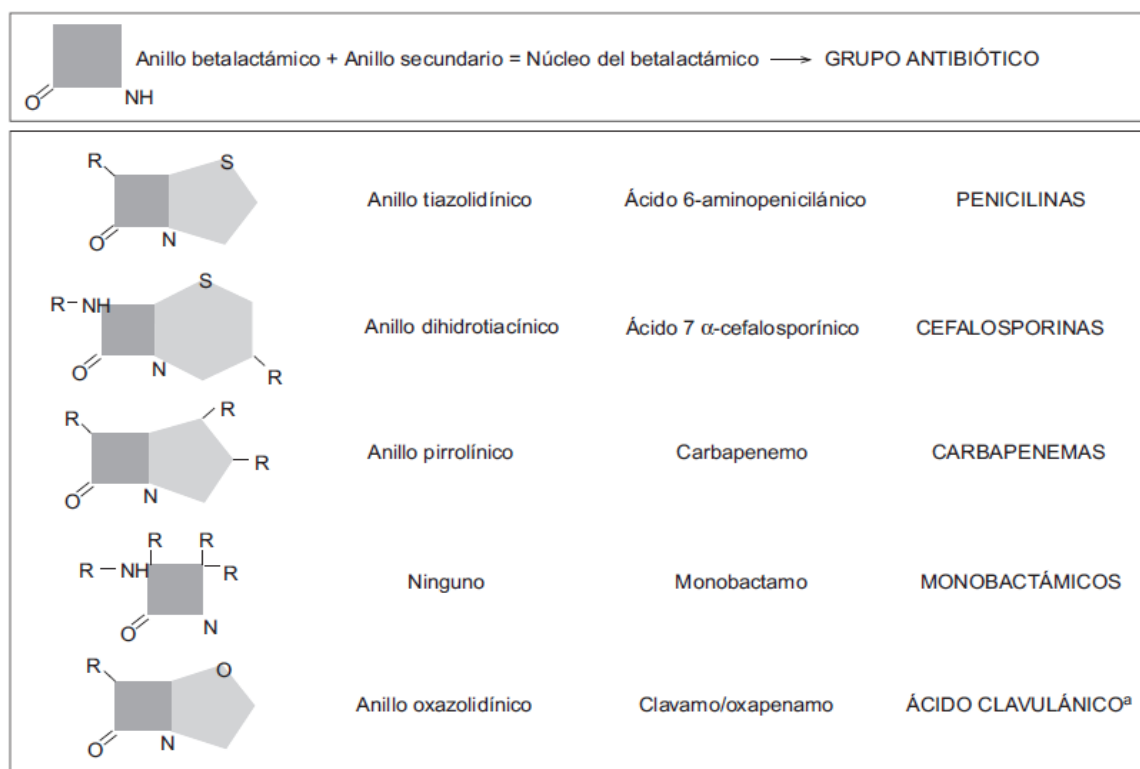
## 2. Antibióticos $\beta$ -lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son los antimicrobianos más utilizados en la práctica clínica, tanto en atención primaria como en el ámbito hospitalario [11]. En 1928, un científico británico llamado Alexander Fleming, descubrió la penicilina, el primer representante de esta familia de antibióticos. Fleming observó la inhibición del crecimiento bacteriano de estafilococos provocada por la acción del hongo filamentoso, *Penicillium notatum*. Sin embargo, no fue hasta la década de los 40 cuando se consiguió la producción industrial de la penicilina gracias a los estudios de Florey y Chain [12].

### 2.1 Clasificación y estructura química

La estructura química básica de este grupo de antibióticos consiste en la presencia de un anillo  $\beta$ -lactámico, responsable del mecanismo de acción, la escasa toxicidad directa y del principal mecanismo de resistencia (las  $\beta$ -lactamasas). Este anillo  $\beta$ -lactámico se

asocia a un anillo secundario formando un núcleo, que junto a su unión a diferentes tipos de cadenas lineales han originado los diversos grupos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos: Penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas. En la figura 3 se representa de forma esquemática la estructura básica de los diferentes grupos de  $\beta$ -lactámicos. Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química determinan las diferencias en cuanto al espectro antibacteriano, la afinidad por determinados receptores, las características farmacocinéticas y la resistencia a las  $\beta$ -lactamasas [13].



<sup>a</sup>Al igual que el ácido clavulánico, otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasas utilizados en la práctica (sulbactam y tazobactam) también tienen estructura  $\beta$ -lactámica. Ambos son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

**Figura 3:** Estructura química de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos [13].

### 2.1.1 Penicilinas

Las penicilinas pueden dividirse en cinco clases en función de su actividad antibacteriana:

- Penicilinas naturales como la penicilina G: son activas frente a bacterias grampositivas no productoras de  $\beta$ -lactamasas, microorganismos anaerobios, así como espiroquetas y determinados cocos gramnegativos, como *Neisseria*.
- Penicilinas semisintéticas resistentes a penicilinasas, como por ejemplo la meticilina, oxacilina y cloxacilina: son los fármacos de elección para el tratamiento de las bacterias del género *Staphylococcus*, aunque también son activas frente a estreptococos pero no frente a enterococos.
- Aminopenicilinas, como la ampicilina y la amoxicilina: poseen el mismo espectro que la penicilina G, siendo activas frente a cocos gramnegativos y a enterobacterias no productores de  $\beta$ -lactamasas.
- Las carboxipenicilinas (como la carbenicilina y la ticarcilina) y las ureidopenicilinas (como la piperacilina), presentan mayor resistencia a las  $\beta$ -lactamasas y mayor actividad frente a bacilos aerobios gramnegativos como *P. aeruginosa* [14].

### 2.1.2 Cefalosporinas

Las cefalosporinas se clasifican en cuatro generaciones según su orden de aparición:

- Las cefalosporinas de primera generación (cefazolina, cefalotina, cefapirina, cefradina, cefadroxilo, cefalexina, cefradina) son más activas fundamentalmente frente a bacterias grampositivas.
- Las de segunda generación (cefamandol, cefonidid, cefuroxima, cefaclor, cefprozilo, cefmetazol) amplían su espectro frente a bacilos gramnegativos como

*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y algunas enterobacterias.

Mantienen cierta actividad frente a los cocos grampositivos. La cefoxitina y el cefotetan son un tipo especial de cefalosporinas de segunda generación pertenecientes a las cefamicinas, que destacan por su actividad adicional frente a las bacterias anaerobias gramnegativas, como especies de *Bacteroides*.

- Las de tercera generación (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, moxalactam, cefdinir, cefditoreno, cefixima, cefpodoxima, ceftibuteno, ceftizoxima) presentan un espectro ampliado frente a gramnegativos. Cefotaxima y ceftriaxona son muy activas también frente a *Streptococcus pneumoniae*.
- Las de cuarta generación (cefepima y cefpiroma) tienen el mayor espectro de actividad de todos los grupos de cefalosporinas, son activos frente a *Pseudomonas spp.* y mantienen su potencia frente a cocos grampositivos.

Todas estas cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, *Listeria monocytogenes* y estafilococos resistentes a meticilina. En conjunto, las cefalosporinas de tercera y cuarta generación también se denominan cefalosporinas de amplio espectro [13, 15].

Ceftobiprol y ceftarolina son dos nuevas cefalosporinas que presentan buena actividad frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) [16].

### **2.1.3 Carbapenémicos**

Los carbapenémicos como imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem, son los  $\beta$ -lactámicos de más amplio espectro antibacteriano. Imipenem es más activo frente a patógenos grampositivos, mientras que meropenem, ertapenem y doripenem son más activos frente a gramnegativos. Ertapenem es poco activo frente a *P. aeruginosa*. Estos

antibióticos carecen de actividad frente a estafilococos resistentes a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina, algunas especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y además, son poco activos frente a *Clostridium difficile* [11].

#### **2.1.4 Monobactámicos**

Aztreonam es el único representante de este grupo disponible actualmente para uso clínico. Presenta buena actividad frente a bacterias gramnegativas aerobias y facultativas. Por el contrario, carece de actividad frente a grampositivos y bacterias anaerobias [11].

#### **2.1.5 Inhibidores de $\beta$ -lactamasas**

Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas son moléculas con una gran afinidad por las  $\beta$ -lactamasas, a las que se unen de forma irreversible, evitando la inactivación del antibiótico  $\beta$ -lactámico. De esta manera se restaura la actividad original del antibiótico sobre los patógenos que se han hecho resistentes a él por la producción de  $\beta$ -lactamasas, y se amplía su espectro a bacterias que no eran sensibles intrínsecamente por producción natural de estas enzimas [13].

Actualmente, todos los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas empleados en clínica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura  $\beta$ -lactámica, pero poseen una actividad antibacteriana mínima, con excepción del sulbactam frente a *Acinetobacter baumannii* y a otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Las combinaciones más frecuentes de  $\beta$ -lactámico/inhibidor de  $\beta$ -lactamasas son amoxicilina/ácido clavulánico (A/C), ampicilina/sulbactam y piperacilina/tazobactam [11].



## 2.2 Mecanismo de acción

Los  $\beta$ -lactámicos presentan acción bactericida. Producen su efecto a través de la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la última etapa de biosíntesis del peptidoglicano, un componente básico de la pared celular que confiere rigidez y estabilidad a la bacteria.

Estos antimicrobianos ejercen su acción mediante su unión a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), unas proteínas con actividad enzimática (transpeptidasas y carboxipeptidasas), impidiendo la catalización de una serie de reacciones de transpeptidación necesarias para la formación del peptidoglicano de la pared celular. Los  $\beta$ -lactámicos también son capaces de actuar activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano.

Para que actúen estos antibióticos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular [11].

## 2.3 Espectro antibacteriano

El espectro antibacteriano de los  $\beta$ -lactámicos incluye bacterias grampositivas, gramnegativas y espiroquetas. No son activos frente a micoplasmas (porque carecen de pared celular) ni bacterias intracelulares como las clamidias o las rickettsias, ya que tienen escasa capacidad de penetración dentro de las células. La resistencia natural de las micobacterias se debe a la producción de  $\beta$ -lactamasas, probablemente unida a una penetración lenta debida a las características de la pared [13].

### 3. Mecanismos de resistencia bacteriana a $\beta$ -lactámicos

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos principalmente por cuatro mecanismos diferentes [17], que en ocasiones, pueden ir asociados a otros mecanismos causantes de la resistencia a otras familias de antibióticos [18].

- **Alteración en la permeabilidad de la membrana:** La membrana externa de las bacterias gramnegativas dificulta la entrada de sustancias hidrofílicas, como es el caso de los  $\beta$ -lactámicos que son compuestos hidrófilos. Por este motivo, estos antibióticos realizan el paso a través de poros o canales proteicos llamados porinas. La pérdida o alteración de las porinas impide que el antibiótico atraviese la membrana externa de las bacterias gramnegativas para unirse a las PBP [13].
- **Expresión de bombas de eliminación activa:** Son bombas de flujo, dependientes de energía, que bombean al antimicrobiano al exterior. Están situadas en la membrana interna de las bacterias. Este mecanismo se ha estudiado sobre todo en bacilos gramnegativos, especialmente en *P. aeruginosa* [19, 20].
- **Modificación de la diana en las PBP:** Mutaciones o hiperexpresión de estas proteínas implican una pérdida de afinidad del antibiótico por ellas, dificultando su unión, y por tanto, generando la disminución de su actividad. Este es el mecanismo principal de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de las bacterias grampositivas [13].
- **Producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas:** Es el mecanismo más frecuente de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, fundamentalmente en bacilos gramnegativos. Son

enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico, de forma que inactivan al antibiótico antes de unirse a las PBP para ejercer su acción [17, 21, 22].

El control genético de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias por transformación, conjugación y transducción [23].

### **3.1 Producción de $\beta$ -lactamasas**

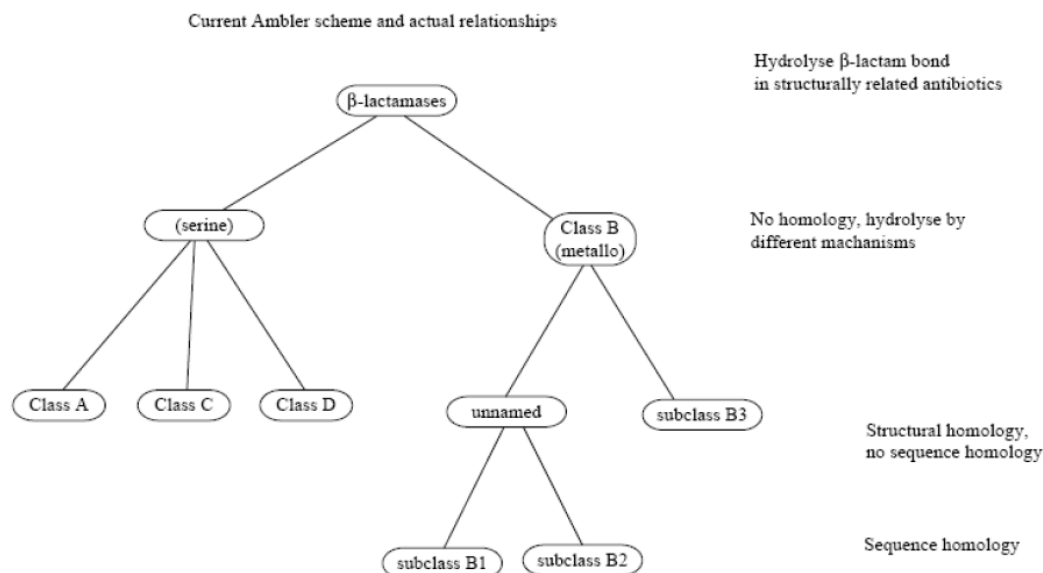
En las enterobacterias, la producción de  $\beta$ -lactamasas es el mecanismo más importante de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, tanto por su frecuencia como por su eficacia [24]. Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas de naturaleza proteica cuya producción puede estar mediada por genes cromosómicos o plasmídicos [25]. La producción de estas enzimas puede ser constitutiva o inducible por la presencia de un  $\beta$ -lactámico [26].

Las enterobacterias de mayor relevancia clínica, como es el caso de *E. coli*, presentan resistencia a  $\beta$ -lactámicos en relación, fundamentalmente, con la producción de distintos tipos de  $\beta$ -lactamasas [27].

#### **3.1.1 Clasificación**

En el año 1980, Ambler propuso una clasificación en función de la estructura molecular de las  $\beta$ -lactamasas teniendo en cuenta las características de su punto isoeléctrico, masa molecular, secuencia de aminoácidos, estructura tridimensional y los mecanismos de interacción enzima-sustrato. De esta forma, estableció cuatro clases (Figura 4): clase A (serin-penicilinasas), B (metalo- $\beta$ -lactamasas), C (serin-cefalosporinasas) y

D (serin-oxacilinasas). Las enzimas de los grupos A, C y D contienen una serina en su centro activo, mientras que las del grupo B son metaloenzimas [28].



**Figura 4:** Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas según Ambler [29].

Posteriormente, Bush propuso una clasificación basada en la especificidad de las enzimas por los distintos sustratos, su estructura molecular y sus perfiles de inhibición [30]. Esta clasificación se revisó en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros [31] y se actualizó por Bush y Jacoby en el año 2010 [24]. Ambas clasificaciones están relacionadas y son las que se utilizan actualmente (Tabla 1):

- **Grupo 1:** Las  $\beta$ -lactamasas de este grupo se correlacionan con la clase molecular C de Ambler. Pertenecen a este grupo cefalosporinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico. La mayor parte de ellas están codificadas en los cromosomas de muchas enterobacterias y otros patógenos como

*P. aeruginosa*, aunque también pertenecen a este grupo algunas enzimas de origen plasmídico.

- **Grupo 2:** Este grupo incluye un gran número de enzimas que se correlacionan con las clases A y D de Ambler. La mayoría son sensibles a la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Dentro de este grupo se incluyen varios subgrupos en función de la variedad de sustratos que hidrolizan.
  
- **Grupo 3:** Este grupo se constituye por las enzimas de la clase B de Ambler. Son metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) dependientes de la unión de zinc en su centro activo. Estas  $\beta$ -lactamasas son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA y, por el contrario, no se inhiben por el ácido clavulánico o por tazobactam. Mayoritariamente son enzimas cromosómicas capaces de hidrolizar diferentes sustratos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos).
  
- **Grupo 4:** Incluye las penicilinasas que no se inhiben por el ácido clavulánico. Es muy probable que estas enzimas puedan ser incluidas en los grupos existentes debido a que hasta ahora no han sido caracterizadas completamente. Todas ellas están codificadas en el cromosoma y sin clasificación, según los criterios de Ambler. (Este grupo se incluyó en la clasificación de 1995, aunque no aparece en la actualización de Bush y Jacoby de 2010).

**Tabla 1:** Clasificación actual de las  $\beta$ -lactamasas: correlación entre la clasificación de Ambler y la de Bush-Jacoby [24].

Bush-Jacoby (2010)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Ambler (1980)	Sustrato(s) preferido	Inhibidos por:		Características	Enzimas representativas
				CLA	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de bencilpenicilinas. Hidrólisis de cefamicinas.	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis elevada de ceftazidima y de otros oxiiimino- $\beta$ -lactámicos	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	Sí	No	Mayor hidrólisis de bencilpenicilinas que de cefalosporinas.	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de 1ª generación	Sí	No	Hidrólisis similar de bencilpenicilinas y de cefalosporinas.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de 1ª-4ª generación, monobactámicos	Sí	No	Hidrólisis elevada de oxiiimino- $\beta$ -lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam).	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	Resistencia a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de 1ª-4ª generación, monobactámicos	No	No	Hidrólisis elevada de oxiiimino- $\beta$ -lactámicos y resistencia a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Sí	No	Hidrólisis elevada de carbenicilina.	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilina, cefepima	Sí	No	Hidrólisis elevada de carbenicilina, cefepima y cefpiroma.	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis elevada de cloxacilina y oxacilina.	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de 1ª-4ª generación	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y oxiiimino- $\beta$ -lactámicos.	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenémicos	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y carbapenémicos.	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de 1ª-4ª generación	Sí	No	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibición por ácido clavulánico, pero no por aztreonam.	CepA
2f	2f	A	Carbapenémicos	Variable	No	Hidrólisis elevada de carbapenémicos, oxiiimino- $\beta$ -lactámicos y cefamicinas.	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (subgrupos B1 y B3)	Carbapenémicos	No	Sí	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenémicos pero no monobactámicos.	IMP-1, VIM-1, Ccr-A, IND-1, LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (subgrupo B2)	Carbapenémicos	No	Sí	Hidrólisis de carbapenémicos	Cph A, Sfh-1
NI	4	Desconocido					

Las principales  $\beta$ -lactamasas de interés clínico detectadas en bacterias gramnegativas son:

- **$\beta$ -lactamasas de amplio espectro o penicilinasas**

En este grupo están incluidas TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Estas  $\beta$ -lactamasas pertenecen a la clase molecular A y grupo 2b de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros. Presentan actividad hidrolítica frente a amino y carboxipenicilinas, una sensibilidad disminuida a ureidopenicilinas y son inhibidas por el ácido clavulánico. Ninguna de estas  $\beta$ -lactamasas hidroliza cefalosporinas de tercera y cuarta generación, cefamicinas, monobactámicos y carbapenémicos. La resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación (excepto ceftazidima), y a la combinación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas solo se observa cuando este tipo de enzima se hiperproduce. En el caso de hiperproducción de SHV-1, puede observarse resistencia de bajo nivel a ceftazidima [32, 33]. TEM-1 y TEM-2 están en la actualidad ampliamente distribuidas, siendo las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas más frecuentes en gramnegativos [24].

- **$\beta$ -lactamasas de espectro extendido**

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son unas de las  $\beta$ -lactamasas más importantes desde el punto de vista clínico. Desde su aparición a principios de 1980 han sido descritas a nivel mundial. En Europa destaca su presencia en aislados de enterobacterias en casi todos los países europeos no sólo en el ámbito hospitalario sino también en el entorno de la comunidad. Su importancia se debe fundamentalmente a su capacidad de conferir resistencia bacteriana a penicilinas, cefalosporinas de cualquier generación (excepto cefamicinas) y a monobactámicos mediante hidrólisis de estos antibióticos. Por el contrario, no confieren resistencia a los carbapenémicos y son

inhibidas por el ácido clavulánico y otros inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el sulbactam o el tazobactam [21, 34].

Las primeras BLEE que se describieron derivaban de las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2 y SHV-1) y pertenecían al grupo 2be (clase molecular A). Además de las TEM y SHV, las cefotaximasas o CTX-M son otro tipo de BLEE que también pertenecen a la clase A, al igual que otras BLEE menos prevalentes, como PER, VEB, BES, TLA, GES, SFO o IBC. Algunas enzimas tipo OXA u oxacilinasas (por ejemplo OXA-11 y OXA-16) pertenecientes a la clase D (grupo funcional 2de) también son BLEE. Las OXA confieren resistencia a cloxacilina, oxacilina, ureido y aminopenicilinas y son débilmente inhibidas por el ácido clavulánico, a excepción de la OXA-18. En general, las oxacilinasas no hidrolizan cefalosporinas, no obstante, algunas como OXA-10 hidroliza débilmente a cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam. Mientras que muchas BLEE han sido descritas en *E. coli*, *K. pneumoniae* y otras enterobacterias, las BLEE tipo OXA han sido descritas principalmente en *P. aeruginosa* [34, 35].

### **Principales tipos de BLEE:**

#### **➤ BLEE tipo TEM**

Estas BLEE derivan de las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 y TEM-2 por alguna modificación en la secuencia de aminoácidos. La primera  $\beta$ -lactamasa plasmídica (TEM-1) se describió en 1965 en una cepa de *E. coli* aislada de un paciente en Atenas. La nomenclatura de las TEM deriva del nombre de la paciente de la que se aisló la  $\beta$ -lactamasa por primera vez, Temoniera [34].

Se han reconocido más de 160 variantes de  $\beta$ -lactamasas tipo TEM, la mayoría de las cuales son BLEE (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) [21].



➤ **BLEE tipo SHV**

Estas BLEE derivan de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 (SHV se refiere a la variable sulfhídrica) que se describió por primera vez en el género *Klebsiella* como  $\beta$ -lactamasa cromosómica. La primera BLEE fue detectada en Alemania, en 1983, en una cepa de *Klebsiella ozaenae* aislada de pacientes en la unidad de cuidados intensivos (UCI). Se describió como una variante de la SHV-1 que fue nombrada como SHV-2 [21, 34].

Actualmente estas enzimas están distribuidas por todo el mundo. Se han descrito más de 100 variantes de  $\beta$ -lactamasas SHV, fundamentalmente detectadas en enterobacterias, mayoritariamente en el género *Klebsiella*. No obstante, más recientemente han sido aisladas en especies como *P. aeruginosa* y *A. Baumannii* [21, 36, 37].

➤ **BLEE tipo CTX-M**

Estas enzimas son transferidas en plásmidos y derivan de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de especies del género *Kluyvera* [38]. El nombre CTX hace referencia a la actividad hidrolítica de estas  $\beta$ -lactamasas frente a cefotaxima. Los microorganismos que producen este tipo de BLEE suelen tener CMI (concentración mínima inhibitoria) para cefotaxima  $> 64$  mg/L y para ceftazidima en el rango de sensibilidad 2 - 8 mg/L; pero en algunos casos las CMI para ceftazidima alcanzan valores de 256 mg/L. Asimismo, estas enzimas son más activas frente a cefepime que el resto de las BLEE [34].

Estas enzimas se han dividido en 5 grupos según la homología de la secuencia de aminoácidos: grupos 1, 2, 8, 9 y 25/26, y, hasta la fecha, se han reconocido más de 65 variantes de estas  $\beta$ -lactamasas. El grupo CTX-M-1 incluye los tipos (CTX-M-1, -3, -10, -12, -15 y FEC-1), el grupo CTX-M-2 incluye 8 tipos (CTX-M- 2, -4, -4L, -5, -6, -7, -20 y Toho-1), el grupo CTX-M-8 incluye una sola enzima, el grupo CTX-M-9 incluye

9 (CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -19, -21, -27 y Toho-2) y por último, el grupo CTX-M-25 incluye CTX-M-25 y CTX-M-26 [39, 40].

En la actualidad, las  $\beta$ -lactamasas CTX-M son las enzimas más generalizadas, y se han convertido en las BLEEs más frecuentes en bacterias gramnegativas expandiéndose en gran parte del mundo [40, 41]. Aislados de *E. coli* productores de CTX-M se han convertido en los principales patógenos a nivel mundial, principalmente asociados con ITU [42]. En los últimos años, CTX-M-15 ha sido la variante más extendida, aumentando su porcentaje fundamentalmente en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* responsables de infecciones tanto nosocomiales como comunitarias [43].

- **$\beta$ -lactamasas tipo AmpC**

Las  $\beta$ -lactamasas AmpC son serin- $\beta$ -lactamasas pertenecientes a la clase molecular C y grupo 1 en la clasificación de Bush [31, 44]. Se caracterizan por hidrolizar las penicilinas y las cefalosporinas de primera y segunda generación, incluyendo las cefamicinas (cefoxitina, cefotetán). En menor medida pueden hidrolizar a cefalosporinas de tercera generación, y, generalmente, son resistentes a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, y no hidrolizan a las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima) ni a los carbapenémicos [45, 46]. El ácido fenilborónico y la cloxacilina se utilizan en la identificación fenotípica de las AmpC por ser estas  $\beta$ -lactamasas sensibles a la acción de estos dos compuestos [45].

Las AmpC pueden ser de origen plasmídico o cromosómico, y a su vez, las AmpC cromosómicas (c-AmpC) pueden ser constitutivas o inducibles. Ciertas enterobacterias, como *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii* y *Hafnia alvei* presentan  $\beta$ -lactamasas AmpC de naturaleza cromosómica inducible. Estas  $\beta$ -lactamasas se producen a bajos niveles de manera natural y aumentan su síntesis en

presencia de inductores ( $\beta$ -lactámicos). No obstante, pueden desreprimirse por la presencia de mutaciones en los genes reguladores, perdiendo así la característica de inducción y generando la hiperproducción de c-AmpC [47, 48]. *E. coli* y *Shigella* spp., también poseen  $\beta$ -lactamasas AmpC cromosómicas pero constitutivas (se expresan en ausencia de genes reguladores a niveles muy bajos). En este caso, la hiperproducción de c-AmpC se debe a mutaciones en el promotor del gen *bla*<sub>AmpC</sub>, siendo las más comunes en las posiciones -42, -32 y -11 [47, 49].

Las cepas desreprimidas o hiperproductoras, presentan resistencia a todas las penicilinas, combinaciones con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> (incluidas las cefamicinas) y 3<sup>a</sup> generación, y monobactámicos. Únicamente no se ven afectadas las cefalosporinas de 4<sup>a</sup> generación y carbapenémicos, a menos que los microorganismos posean, de forma concomitante, otros mecanismos de resistencia como: pérdida de porinas, BLEEs, o carbapenemasas, entre otros [45].

Las  $\beta$ -lactamasas AmpC de origen plasmídico (p-AmpC) derivan de los genes AmpC cromosómicos que poseen de forma natural algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, entre los que se incluyen *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* y *Hafnia alvei*. Se han descrito más de 20 familias de p-AmpC, siendo las seis más importantes: ACC, FOX, CIT (incluye tipo CMY), MOX, DHA y EBC [46]. Estas  $\beta$ -lactamasas plasmídicas se han descrito principalmente en aislados de *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella* spp [48]. Las enzimas p-AmpC presentan el mismo perfil fenotípico de resistencia que las cepas hiperproductoras de  $\beta$ -lactamasas c-AmpC, siendo necesaria su caracterización molecular para su detección [45]. En la actualidad, la prevalencia de las  $\beta$ -lactamasas AmpC está aumentando, siendo detectadas tanto en aislados intrahospitalarios como en

comunitarios [45, 48]. Desde el punto de vista epidemiológico, presentan mayor relevancia las p-AmpC, dada su capacidad para transferirse de unas bacterias a otras.

- **Carbapenemasas**

Las carbapenemasas son  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, capaces de hidrolizar prácticamente a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluidos los carbapenémicos [50, 51]. Los carbapenémicos constituyen el tratamiento de última elección en muchas de las infecciones causadas por enterobacterias multirresistentes, sin embargo, durante los últimos años, la aparición y dispersión de las carbapenemasas limita de manera importante el arsenal terapéutico frente a estas bacterias [52].

Estas enzimas han sido principalmente aisladas en la familia *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Dentro de las enterobacterias, las carbapenemasas se aíslan principalmente en *K. pneumoniae* y en menor medida en *E. coli* y otras especies, con una prevalencia más alta en el sur de Europa y Asia que en otras partes del mundo [53].

En 1988, las carbapenemasas fueron incluidas por primera vez en la clasificación funcional propuesta por Bush [26]. Según la clasificación molecular de Ambler, estas enzimas se agrupan en tres clases: clase A (penicilinasas), clase B (metaloenzimas) y clase D (oxacilinasas).

- **Carbapenemasas de clase A**

Las carbapenemasas de clase A, que pertenecen al grupo funcional 2f, se pueden dividir en cinco grupos principales en función de su filogenética: GES, KPC, SME, IMI y NMC-A [51, 54, 55], siendo clínicamente más importantes las del tipo KPC, cada vez más emergentes [56]. Estas carbapenemasas tienen la capacidad de hidrolizar una gran

variedad de  $\beta$ -lactámicos, incluyendo carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam; y son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam [51].

➤ **Carbapenemasas de clase B o metalo- $\beta$ -lactamasas**

Las MBL pertenecen al grupo funcional 3a de la clasificación de Bush-Jacoby. Se caracterizan por su capacidad de hidrolizar a todos los  $\beta$ -lactámicos, exceptuando el aztreonam. Presentan resistencia a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, aunque pueden ser inhibidas por agentes quelantes como el EDTA [51]. Las MBL más frecuentes en la actualidad son las de tipo IMP, VIM y NDM [57]. La primera descripción de carbapenemasas en enterobacterias en España fue una MBL del tipo VIM-1 en el año 2005 [58].

➤ **Carbapenemasas de clase D**

Las carbapenemasas de la clase D pertenecen al grupo 2df de Bush-Jacoby. Se dividen en varios grupos, siendo principalmente descrita en enterobacterias la OXA-48. El primer caso de OXA-48 en España se describió en abril de 2009, desde entonces se han descrito varios brotes y casos aislados de enterobacterias, fundamentalmente *K. pneumoniae*, productores de OXA-48 a lo largo de la geografía española [59, 60]. La actividad hidrolítica de las carbapenemasas OXA es bastante más débil en comparación con la de las MBL. La enzima OXA-48 tiene una mayor actividad carbapenemasa que el resto de las OXA, con las cuales comparte menos de un 50% de homología en su secuencia de aminoácidos. Se caracteriza por hidrolizar las penicilinas y las primeras cefalosporinas, pero su actividad contra las oximino-cefalosporinas es débil [61].

La resistencia a los carbapenémicos no siempre es debida a la producción de carbapenemasas, ya que existen otros mecanismos que pueden afectar a su actividad, como son: pérdida de porinas específicas, modificaciones en las PBP y bombeo o expulsión del antibiótico [61]. Este hecho indica que, además de las carbapenemasas como tal, las  $\beta$ -lactamasas con actividad carbapenemasa más débil pueden conferir resistencia a los carbapenémicos en cepas con captación reducida o hiperexpresión de bombas de expulsión [62]. El ertapenem es el carbapenémico más afectado por estos mecanismos [52].

- **$\beta$ -lactamasas derivadas de TEM resistentes a inhibidores (IRT)**

Las  $\beta$ -lactamasas IRT se originan por mutaciones puntuales en la región de los genes *bla*<sub>TEM</sub> responsables de la producción de TEM-1 y TEM-2. Este tipo de mutaciones es frecuente en cepas de *E. coli* aunque también ocurre en *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Las IRT pertenecen a la clase molecular A (2br) y se caracterizan por ser resistentes a la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, conferir resistencia a amino-, carboxi- y ureidopenicilinasas, y presentar sensibilidad a cefalosporinas [63].

## 4. Antibióticos aminoglucósidos

Los aminoglucósidos han sido una parte esencial del conjunto de antibacterianos utilizados en clínica durante varias décadas. Son fármacos de amplio espectro que presentan actividad bactericida, una farmacocinética predecible y actúan en sinergia con otros antibióticos [64]. Estos antimicrobianos se aislaron por primera vez en la década de los 40 a partir de actinomicetos encontrados en muestras de suelo [65]. En el año 1944 se descubrió el primer aminoglucósido, la estreptomicina, producida por cepas de *Streptomyces griseus*. Desde entonces, se produjo la introducción de otros aminoglucósidos que derivaban de especies del mismo género o bien de *Micromonospora sp.*, como la neomicina (1949), paromomicina (1956), kanamicina (1957), gentamicina (1963), tobramicina (1967) y sisomicina (1970), hecho que marcó la utilidad de esta familia de antibióticos para el tratamiento de infecciones producidas por bacilos gramnegativos. Los aminoglucósidos semisintéticos: amikacina (derivado de la kanamicina A), dibekacina (derivado de la kanamicina B), isepamicina (derivado de la gentamicina B) y netilmicina (derivado de la sisomicina) se introdujeron durante la década de los 70 con el fin de evitar los problemas de resistencia bacteriana originados por el uso de los correspondientes antibióticos naturales [65, 66]. Actualmente existe un nuevo aminoglucósido en fase de estudio, la plazomicina, un derivado de la sisomicina que se presenta como útil para el tratamiento de bacilos gramnegativos multirresistentes [67].

### 4.1 Estructura química

Los aminoglucósidos poseen un esqueleto estructural formado por un anillo esencial de seis elementos con radicales del grupo amino llamado aminociclitol. La diferencia entre

unos aminoglucósidos u otros radica en la unión de diferentes enlaces glucosídicos entre el aminociclicol y dos o más glúcidos con o sin grupo amino. En general, el aminociclitol central de la mayoría de los aminoglucósidos utilizados en clínica es la 2-desoxiestreptamina, excepto en el caso de la estreptomina cuyo aminociclitol es la estreptidina. Un compuesto peculiar es la espectinomicina, cuya estructura se diferencia en que tiene un anillo aminociclitol, pero no tiene glúcidos aminados ni enlaces glucosídicos [65, 66, 68]. La 2-desoxiestreptamina puede ser doblemente sustituida en las posiciones 4, 5 o en 4, 6 según el aminoglucósido del que se trate (Tabla 2). En la nomenclatura actual, el anillo I (generalmente un anillo de glucosamina común a la mayoría de los aminoglucósidos) es el que está unido a la posición 4 de la 2-desoxiestreptamina, que se nombra como anillo II, y el anillo III es el otro aminoazúcar unido a la posición 5 o 6 del anillo II. El resto de anillos (IV, V...) se corresponden con anillos adicionales que se unen a partir del anillo III (Figura 5) [69].

**Tabla 2:** Clasificación de los aminoglucósidos [65, 70].

---

**Aminoglucósido según el aminociclitol central**

- Aminociclitol estreptidina  
Estreptomina
- Aminociclitol desoxiestreptamina
  - Disustituidos 4,6
    - Familia Kanamicina
      - Kanamicina
      - Amikacina
      - Tobramicina
      - Dibekacina
    - Familia Gentamicina
      - Gentamicina
      - Sisomicina
      - Netilmicina
      - Isepamicina
  - Disustituidos 4,5
    - Familia Kanamicina
      - Neomicina
      - Paromomicina
      - Ribostamicina

**Aminociclitol sin enlaces glucosídicos**

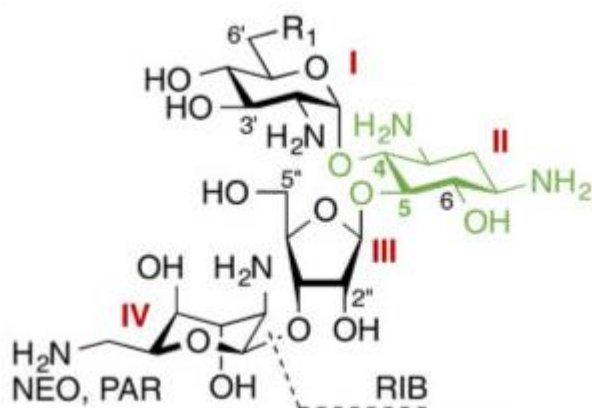
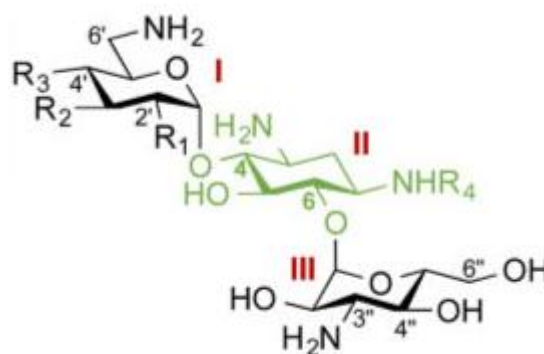
Espectinomicina

---



Aminoglucósidos 4,6-disustituidos:

	R1	R2	R3	R4
Dibekacina	NH2	H	H	H
Kanamicina A	OH	OH	OH	H
Kanamicina B	NH2	OH	OH	H
Tobramicina	NH2	H	OH	H



Aminoglucósidos 4,5-disustituidos:

	R1
Neomicina B (NEO)	NH2
Paromomicina (PAR)	OH
Ribostamicina (RIB)	NH2

**Figura 5:** Estructuras de aminoglucósidos con sus respectivos anillos [71].

Los aminoglucósidos son compuestos catiónicos con peso molecular entre 445 y 600 daltons. Son muy solubles en agua y relativamente insolubles en lípidos. Debido a su carga positiva, son capaces de unirse a los LPS de la pared celular de bacterias gramnegativas, a los fosfolípidos de la membrana plasmática y a otras moléculas aniónicas intracelulares como el ADN y el ARN. La carga positiva de estos compuestos contribuye tanto a su actividad antimicrobiana como a su toxicidad (neurotoxicidad, ototoxicidad y, más raramente, bloqueo neuromuscular) [65, 68, 72].

## 4.2 Mecanismo de acción

Los aminoglucósidos son bactericidas rápidos. Su actividad antimicrobiana consiste en inhibir la síntesis proteica. Ejercen su acción mediante una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, seguida de un transporte a través de la membrana interna dependiente de energía y, finalmente, se unen a los ribosomas inhibiendo la síntesis de proteínas.

Estos fármacos tienen una gran afinidad por ciertas regiones del ARN, especialmente el ARN mensajero (ARNm) de células procariotas. De tal forma que, son capaces de inactivar la síntesis proteica bacteriana principalmente por:

- Unión directa sobre la subunidad 30S de los ribosomas.
- Interferir en la unión del ARNm al ribosoma en el inicio de la síntesis proteica.
- Producir fallos en la lectura del código genético y, por tanto, provocar una disminución o una síntesis proteica anormal [64, 66, 68].

## 4.3 Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos aminoglucósidos

La resistencia a los antibióticos puede clasificarse en tres categorías principales: intrínseca, adaptativa y resistencia adquirida [73]. Existen tres mecanismos principales que confieren resistencia bacteriana intrínseca o adquirida frente a los aminoglucósidos [68, 74].

### ➤ **Disminución de la concentración intracelular de aminoglucósido:**

La concentración de aminoglucósido en el interior celular puede disminuir debido a alteraciones de la permeabilidad de la membrana que impidan su paso hacia el interior, a la activación de transportadores que lo expulsen hacia el exterior, o a la acción de ambos [75]. La entrada y/o salida de los aminoglucósidos en una bacteria son procesos

dependientes de energía, por tanto, las bacterias anaerobias poseen una resistencia intrínseca a los aminoglucósidos [65].

Se han identificado varios sistemas de expulsión activa como mecanismos de resistencia natural a los aminoglucósidos en bacterias gramnegativas como *P. aeruginosa* [76], *A. baumannii* [77] y *E. coli*. El genoma de *E. coli* contiene varios genes que codifican para transportadores de la familia RND (“Resistance-Nodulation-cell Division”) [78].

➤ **Modificación de la diana ribosomal:**

Entre las modificaciones que producen resistencia a aminoglucósidos se incluyen la metilación enzimática del ARN ribosómico (ARNr) 16S y las mutaciones ribosómicas que originan una menor afinidad por la subunidad 30S. El mejor ejemplo conocido es la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a la estreptomicina, como consecuencia de las mutaciones puntuales en la proteína ribosómica S12 y en el ARNr 16S [65, 68, 74, 79].

➤ **Modificación del aminoglucósido mediante la producción de enzimas:**

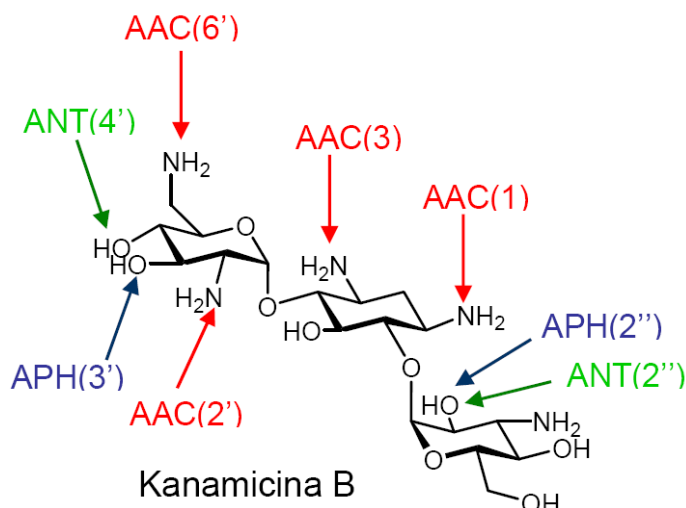
La modificación enzimática es el principal mecanismo de resistencia a aminoglucósidos [64, 71]. Su importancia se debe a que es el mecanismo más frecuentemente encontrado en bacterias gramnegativas y grampositivas [74]. Los antibióticos aminoglucósidos son modificados covalentemente en varios grupos amino (-NH<sub>2</sub>) e hidroxilo (-OH) específicos, de tal forma que disminuye su afinidad por su diana ribosomal y, por lo tanto, se generan elevados niveles de resistencia bacteriana [66, 74].

### 4.3.1 Enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs)

La mayoría de los genes de las enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs) están codificados en plásmidos, integrones o transposones. Este hecho facilita la rápida diseminación de fenotipos resistentes a estos antibióticos dentro de la misma especie bacteriana y de unas especies a otras [66, 71, 74].

Esta gran familia de EMAs se divide en tres subclases en función del tipo de modificación química que realizan en cada uno de sus sustratos (aminoglucósidos): las *N*-acetiltransferasas (AAC) que modifican los grupos amino y utilizan como donante a la acetil coenzima A; las *O*-nucleotidiltransferasas (ANT) que modifican al aminoglucósido por transferencia de un AMP y las *O*-fosfotransferasas (APH) que catalizan la transferencia de un grupo fosfato, ambas actúan modificando los grupos hidroxilo y utilizan el ATP como donante (Figura 6). También existen enzimas bifuncionales que amplían el espectro de resistencia combinando a la vez distintos tipos de modificación [66, 71, 74, 80]. El nivel de resistencia producido por cada EMA difiere significativamente entre microorganismos y cepas, y depende de varios factores como la cantidad de enzima producida, su eficacia catalítica y el tipo de aminoglucósido [74].

El análisis fenotípico de resistencia a aminoglucósidos para detectar la presencia de EMAs es difícil porque generalmente hay más de una enzima presente y por lo general, en el laboratorio se prueba un número limitado de sustratos. Por tanto, se necesitan técnicas moleculares para confirmar los resultados fenotípicos [81]. Hasta la fecha se han identificado más de 100 EMAs [71, 80].

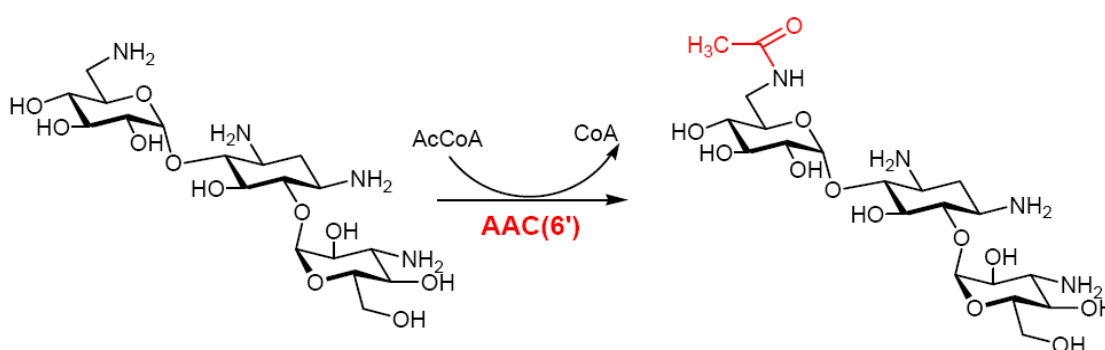


**Figura 6:** Sitios de modificación de la kanamicina B por varias enzimas modificantes de aminoglucósidos [74].

Las EMAs se clasifican mediante una nomenclatura publicada por *Shaw et al.* [82]. Cada enzima se describe por su clase (AAC, ANT o APH) seguida de un número entre paréntesis que indica el sitio de modificación del aminoglucósido (Figura 6). Además, se subdividen en tipos designados por números romanos que indican el perfil de resistencia específico que confieren. Finalmente, en las enzimas de una misma clase y tipo que producen una resistencia idéntica pero están codificadas por genes distintos, éstos aparecen indicados mediante una letra minúscula tras el número romano. Por ejemplo, las enzimas AAC(6′)-Ia, AAC(6′)-Ib, etc., son aminoglucósido *N*-acetiltransferasas que catalizan la acetilación en la posición 6′ del antibiótico y confieren el mismo perfil de resistencia (modificación de tobramicina, amikacina, netilmicina, kanamicina y dibekacina) pero están codificadas por genes diferentes [74, 80].

➤ ***N*-acetiltransferasas**

Las aminoglucósido *N*-acetiltransferasas (AACs) catalizan la acetilación de grupos amino ( $-NH_2$ ) presentes en el aminoglucósido utilizando acetil coenzima A como donante del grupo acetilo (Figura 7). Existen cuatro clases de AACs: AAC(1), AAC(3), AAC(2') y AAC(6'). Estas enzimas acetilan los grupos amino en las posiciones 1 y 3 del anillo de la 2-desoxiestreptamina y en las posiciones 2' y 6' del anillo de la glucosamina [74, 80].



**Figura 7:** Acetilación de la kanamicina A llevada a cabo por la AAC(6') [74].

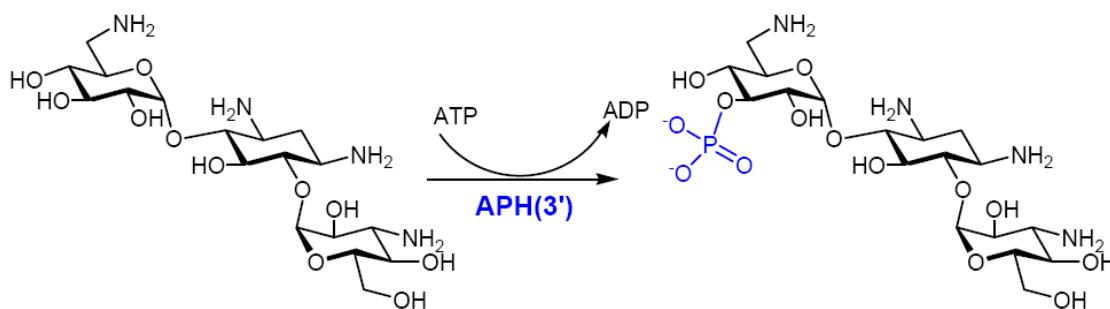
Las aminoglucósido 6'-acetiltransferasas (AAC(6')) son enzimas de amplio espectro capaces de modificar a la mayoría de los aminoglucósidos utilizados en clínica. AAC(6')-I produce resistencia a amikacina, tobramicina, netilmicina, kanamicina, isepamicina, dibekacina y sisomicina. Hasta la fecha han sido identificados genes codificantes de al menos 24 enzimas AAC(6')-I en microorganismos gramnegativos y grampositivos [74]. De entre todos los tipos, la AAC(6')-Ib es la EMA más prevalente y relevante en clínica. Existen aproximadamente cincuenta variantes de esta enzima en numerosas especies de microorganismos gramnegativos [71, 74, 83]. El gen *aac(6')-Ib* se localiza en elementos genéticos móviles como transposones o integrones; hecho que ha facilitado su rápida diseminación bajo la presión antibiótica selectiva entre una

amplia gama de microorganismos. No obstante, varios genes codificantes de algunas enzimas AAC(6')-I se han identificado en los cromosomas de bacterias gramnegativas. Las aminoglucósido 3-acetiltransferasas (AAC(3)) se distribuyen ampliamente entre diferentes géneros bacterianos. Constituyen el segundo grupo mayoritario de AACs y el segundo mecanismo de resistencia más común dentro de esta clase de EMAs después de las enzimas AAC(6')-I. El tipo de acetiltransferasa AAC(3)-II produce resistencia a gentamicina, tobramicina, sisomicina, netilmicina y dibekacina y se encuentra comúnmente en bacterias gramnegativas. Se han identificado tres genes *aac(3)-II* codificantes de las enzimas AAC(3)-IIa, -IIb y -IIc [74].

#### ➤ **O-fosfotransferasas**

Las aminoglucósido O-fosfotransferasas (APHs) catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a grupos hidroxilo específicos en los antibióticos aminoglucósidos, realizando su fosforilación (Figura 8). Existen siete clases de APHs según la posición del grupo hidroxilo que modifican: APH(3'), APH(2''), APH(3''), APH(4), APH(7''), APH(6) y APH(9). Entre ellas, la clase mayoritaria incluye enzimas que modifican a los aminoglucósidos que presentan un grupo hidroxilo en posición 3'. En bacterias gramnegativas y grampositivas se han identificado siete tipos diferentes de APH(3') que van desde APH(3')-I hasta APH(3')-VII [74, 80]. Estas enzimas APH(3') se caracterizan por aportar resistencia a kanamicina y neomicina [82].

El tipo APH(3')-I, el más común encontrado en *E. coli* productoras de BLEE [84, 85], produce resistencia a kanamicina, neomicina, lividomicina, paromomicina y ribostamicina. El gen *aph(3')-Ia* codificante de la primera enzima APH(3')-I se descubrió en el transposón Tn903 en *E. coli*. Posteriormente, se identificó en plásmidos y transposones de muchas otras bacterias gramnegativas [74].

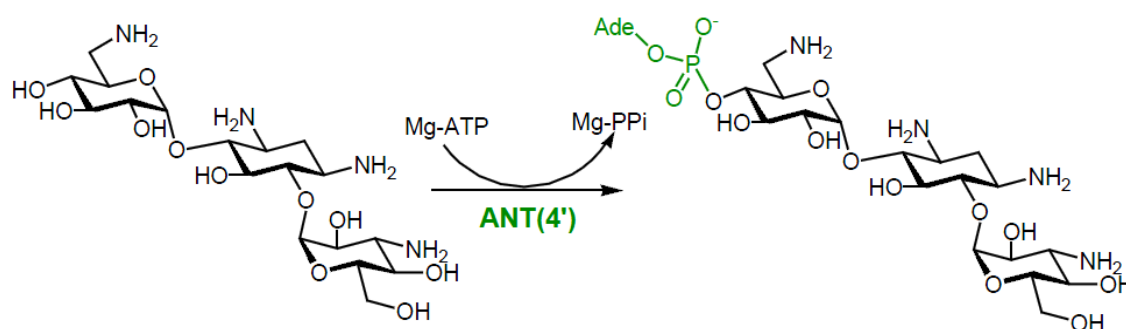


**Figura 8:** Fosforilación de la kanamicina A llevada a cabo por la APH(3') [74].

### ➤ *O*-nucleotidiltransferasas

Las *O*-nucleotidiltransferasas (ANTs) comprenden cinco clases, ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6) y ANT(9), y sólo la ANT(4') incluye dos subclases, I y II. Estas enzimas modifican a los aminoglucósidos mediante la transferencia de un AMP (que resulta de la reacción catalizada entre Mg-ATP y un aminoglucósido, formándose el AMP-aminoglucósido y quelato magnésico del pirofosfato inorgánico) a su grupo hidroxilo en las posiciones 2'', 3'', 4', 6, y 9, respectivamente [69, 74, 80]. Desde el punto de vista clínico, las reacciones catalizadas por la ANT(2'')-I y ANT(4') son las más significativas y las más estudiadas. En la figura 9 se representa la reacción catalizada por la enzima ANT(4') en la kanamicina A [69].





**Figura 9:** Reacción catalizada por las *O*-nucleotidiltransferasas. La reacción que se muestra es la que catalizada por la ANT(4') sobre la kanamicina A. (Ade=Grupo adenilo) [69].

La ANT(2'')-Ia se encuentra comúnmente en plásmidos y transposones. Produce resistencia a la gentamicina, tobramicina, sisomicina, dibekacina, y kanamicina. Esta enzima, codificada por el gen *ant(2'')-Ia* o más comúnmente conocido como *aadB*, está presente entre todas las especies de enterobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores, pero la frecuencia de su detección varía de un país a otro [74, 80].

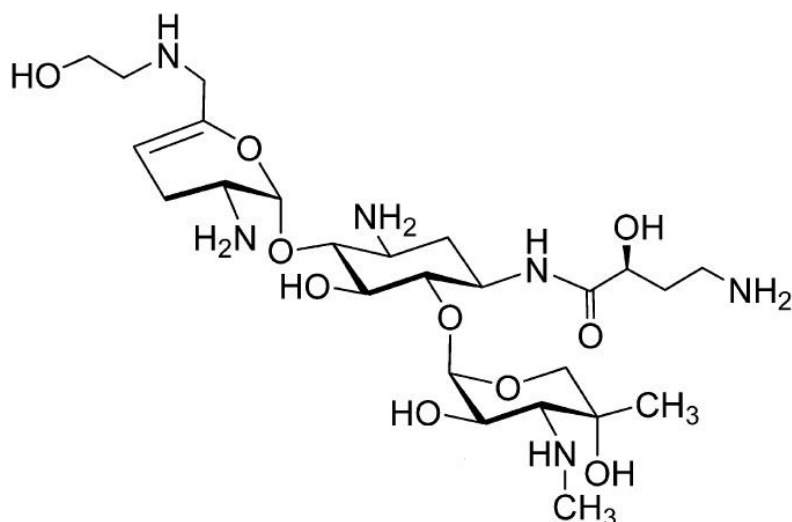
### ➤ Enzimas bifuncionales

Hasta la fecha, se han descrito varias enzimas bifuncionales que confieren resistencia a antibióticos aminoglucósidos. Se ha propuesto que el origen de estas enzimas sea la fusión génica. Algunos ejemplos son: AAC(6')-Ie/APH(2'')-Ia presente en cepas de *S. aureus* y *Enterococcus faecalis*, ANT(3'')-Ii/AAC(6')-IId de *Serratia marcescens*, AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' y AAC(6')-30/AAC(6')-Ib, ambas presentes en aislados de *P. aeruginosa* [71, 74].

## 5. Plazomicina

La plazomicina (ACHN-490) (Achaogen, San Francisco, CA, USA) es un nuevo aminoglucósido, que se encuentra actualmente en fase de desarrollo clínico (FDA, <http://clinicaltrials.gov/>). La estructura química de este fármaco se representa en la figura 10. La fórmula molecular de la plazomicina sin carga es  $C_{25}H_{48}N_6O_{10}$  y su peso molecular es 592,68 daltons. Es un derivado de la sisomicina que no se afecta por las enzimas modificantes de aminoglucósidos más comunes, excepto por la enzima AAC(2 $\prime$ )-Ia, -Ib y -Ic (encontrada sólo en el género *Providencia*). Presenta buena actividad *in vitro* frente a muchas bacterias gramnegativas multirresistentes (MDR), incluyendo cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos y frente a *S. aureus* (incluyendo SARM) [68, 86-90].

Sin embargo, no es eficaz frente a bacterias productoras de metilasas del ARNr 16S, las cuales son frecuentemente coproducidas con metalo- $\beta$ -lactamasas NDM [89, 91]. El antibiótico se presenta para ser utilizado en el tratamiento de infecciones complicadas del tracto urinario y pielonefritis aguda [89]. Hasta el momento, los estudios en fases I y II en humanos no han reportado nefrotoxicidad ni ototoxicidad [67, 68].



**Figura 10:** Estructura química de la plazomicina (ACHN-490) [92].

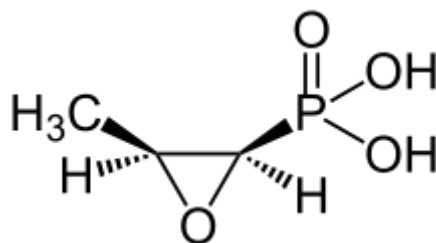
## 6. Otros antibióticos no $\beta$ -lactámicos

### 6.1 Fosfomicina

La fosfomicina ( $C_3H_7O_4P$ ) es un antibiótico de amplio espectro, con efecto bactericida, de bajo peso molecular (138.059 g/mol), obtenido inicialmente a partir de especies de *Streptomyces* spp. La estructura química de este antimicrobiano se representa en la figura 11. Se trata de un antibiótico que actúa en la primera etapa de la biosíntesis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de MurA (UDP-*N*-acetilglucosamina-3-*O*-enolpiruvil transferasa), enzima que cataliza la primera etapa de la biosíntesis del peptidoglicano, específicamente la unión del fosfoenolpiruvato (PEP) al grupo hidroxilo 3' de la uridin-*N*-acetilglucosamina para originar el ácido uridin-difosfo-*N*-acetil-murámico.

La resistencia *in vitro* a la fosfomicina se ha asociado fundamentalmente con mutaciones cromosómicas en los principales sistemas de transporte del antibiótico

(GlpT y UhpT), con la modificación de la diana (MurA), y con la inactivación del antibiótico mediante enzimas plasmídicas como FosA, FosB, Fos C y Fos X [93, 94].

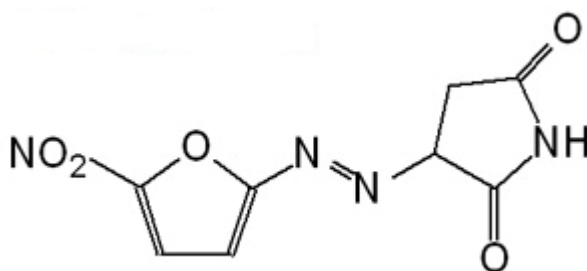


**Figura 11:** Estructura de la fosfomicina (ácido 1,2-epoxipropilfosfónico) [94].

## 6.2 Nitrofurantoína

La nitrofurantoína es una molécula con propiedades de ácido débil que pertenece a un grupo de compuestos nitrofuranos sintéticos (Figura 12). Su mecanismo de acción no ha sido bien establecido, pero su actividad parece requerir una previa reducción enzimática en la célula bacteriana. Los derivados reducidos se unen a los ribosomas bacterianos e inhiben enzimas implicadas en la síntesis del ADN, ARN y otras enzimas metabólicas.

Las cepas resistentes de *E. coli*, con resistencia cromosómica o mediada por plásmidos, se han relacionado con la inhibición de la actividad de enzimas nitrofurano reductasas y con la consiguiente disminución de la producción de uno o más derivados activos. La nitrofurantoína sólo está indicada para el tratamiento de las infecciones urinarias no complicadas [95, 96].



**Figura 12:** Estructura de la nitrofurantoína [95].

## **OBJETIVOS**

---



La infección del tracto urinario es una de las patologías bacterianas más frecuentes en el ser humano, predominando *E. coli* como agente causal, tanto en las infecciones nosocomiales como en las de origen comunitario, donde se aísla aún en mayor porcentaje. La resistencia a cefalosporinas de tercera generación se encuentra en aumento, debido fundamentalmente a cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y a  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC.

El objetivo general de esta tesis fue estudiar 347 aislados de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación, procedentes de infecciones urinarias diagnosticadas durante el año 2013 en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Caracterizar sus mecanismos de resistencia tanto a  $\beta$ -lactámicos como a los aminoglucósidos más utilizados en la clínica, y evaluar la actividad *in vitro* de un nuevo aminoglucósido, plazomicina, en desarrollo clínico para ITUs complicadas, frente a esos aislados. Además estudiamos la actividad de dos antibióticos clásicos para el tratamiento de las ITUs no complicadas: fosfomicina y nitrofurantoina.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Recoger las cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación entre los aislados procedentes de los urocultivos realizados durante el año 2013 en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos.
2. Diferenciar los fenotipos que indican aislados productores de BLEEs de los productores de AmpC.
3. Determinar los perfiles de resistencia de los aislados de *E. coli* a antibióticos  $\beta$ -lactámicos utilizando los puntos de corte de EUCAST.

4. Caracterizar a nivel molecular la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos mediante la determinación de las enzimas BLEEs y AmpC y relacionarlas con los fenotipos de resistencia.
5. Evaluar la actividad *in vitro* de aminoglucósidos clínicamente relevantes frente a cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación.
6. Investigar la prevalencia de los genes más comunes en *E. coli* de diferentes enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs) y relacionar los genes detectados con los fenotipos de resistencia a aminoglucósidos.
7. Establecer las relaciones entre la presencia de los genes de EMAs y los mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de nuestras cepas de *E. coli*.
8. Relacionar el origen de los aislados, la edad y sexo de los pacientes con los diferentes tipos de  $\beta$ -lactamasas y EMAs.
9. Evaluar la actividad *in vitro* de un nuevo aminoglucósido, plazomicina, en desarrollo clínico para ITUs complicadas y pielonefritis.
10. Estudiar la actividad de dos antibióticos clásicos para el tratamiento de las ITUs no complicadas: fosfomicina y nitrofurantoína.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## 1. Aislados clínicos

Inicialmente se incluyeron en el estudio 406 cepas de *E. coli* procedentes de la rutina del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos (HCSC). Todos los aislados procedían de muestras de urocultivo procesadas durante el año 2013. Se incluyó sólo el primer aislamiento por paciente.

Los aislados clínicos se identificaron usando los paneles del sistema automatizado Wider (Soria Melguizo, S.A. Madrid). Se seleccionaron aquellos que presentaban una CMI igual o superior a 2 mg/L para cefotaxima (CTX) y/o ceftazidima (CAZ) que el sistema Wider identificaba como “Posible producción de BLEE”. A todos los aislados de *E. coli* obtenidos con este procedimiento se les realizaron pruebas fenotípicas de confirmación de BLEE. Además, en aquellos con una CMI de cefoxitina igual o mayor a 16 mg/L (ECOFF de cefoxitina = 8 mg/L según EUCAST), se comprobó la posible producción de AmpC mediante el método de inhibición con ácido fenilborónico (PBA) [97, 98]. Se seleccionaron 347 cepas con estas características, lo que equivale a un 85,5% de las cepas detectadas como “posible productora de BLEE” por el sistema Wider. Estas cepas se conservaron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para su posterior estudio.

Se recopilaron los datos epidemiológicos correspondientes al origen de la muestra (comunitaria u hospitalaria), servicio de procedencia (en las muestras pertenecientes a pacientes ingresados en el hospital), género y edad del paciente, además de la fecha y el número de aislamiento en el Servicio de Microbiología.

Se consideró infección nosocomial la que se produjo al menos 48 horas después del ingreso del paciente en el hospital, y de origen comunitario aquella que se produjo en la comunidad o durante las primeras 48 horas de ingreso hospitalario.

## 2. Métodos de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos

### 2.1 Método de dilución en agar

Esta técnica se utilizó para la determinación de la CMI de antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, así como de fosfomicina y nitrofurantoína en las cepas aisladas siguiendo las directrices del CLSI [99].

Para su realización se prepararon 12 diluciones al doble para cada uno de los antibióticos estudiados que se incorporaron al agar Mueller-Hinton (MH) fundido y estéril (BioMerieux, Marcy - l'Etoile. Francia) en la proporción 1/9 y se vertieron en placas Petri. A partir de un cultivo en medio agar sangre de cada cepa incubada durante 20-24 horas a 37°C, se preparó el inóculo de cada una de las cepas en una suspensión en solución salina (NaCl 0,9%) de una turbidez de 0,5 de la escala de McFarland (equivalente a  $10^8$  UFC/ml), y se diluyó para obtener un inóculo final de  $10^5$  UFC/ml. La inoculación se realizó mediante el replicador de Steers. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C antes de su lectura. Se definió la CMI como la concentración más baja de antibiótico a la que se inhibía el crecimiento bacteriano, no considerando crecimiento la aparición de colonias aisladas ni de una turbidez o velo débil. Las cepas control utilizadas fueron:

- *E. coli* ATCC 25922
- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Los antibióticos utilizados en este estudio de sensibilidad, así como los solventes, diluyentes y casa comercial de la que provienen aparecen detallados en la tabla 3.

**Tabla 3:** Solventes, diluyentes y casa comercial de los antibióticos utilizados en el estudio de sensibilidad por dilución en agar.

	<b>Antibióticos</b>	<b>Solvente</b>	<b>Diluyente</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>β-lactámicos</b>	Amoxicilina/clavulánico	Buffer fosfato pH 6 0,1 M	Buffer fosfato pH 6 0,1 M	GSK
	Cefotaxima	Agua	Agua	Aventis
	Ceftazidima	Carbonato sódico	Agua	Sigma
	Cefepime	Buffer fosfato pH 6 0,1M	Buffer fosfato pH 6 0,1M	Merck
	Ertapenem	Buffer fosfato pH 7,2 0,01M	Buffer fosfato pH 7,2 0,01M	Merck
<b>Aminoglucósidos</b>	Amikacina	Agua	Agua	Sigma
	Gentamicina	Agua	Agua	Sigma
	Tobramicina	Agua	Agua	Sigma
	Plazomicina	Agua	Agua	Achaogen
<b>Otros</b>	Fosfomicina*	Agua	Agua	ERN
	Nitrofurantoína	Buffer fosfato pH 8 0,1M	Buffer fosfato pH 8 0,1M	Sigma

\*El medio se suplementó con glucosa-6-fosfato (25 mg/L)

Las concentraciones críticas para definir las categorías de sensibilidad se establecieron según las normas del EUCAST para enterobacterias [100]. Los datos se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4:** Antibióticos ensayados en el estudio de sensibilidad con sus respectivos puntos de corte (EUCAST 2015).

	<b>Antibióticos</b>	<b>Sensible</b>	<b>Resistente</b>
<b><math>\beta</math>-lactámicos</b>	Amoxicilina/Clavulánico	$\leq 8/4$	$> 8/4$
	Cefotaxima	$\leq 1$	$> 2$
	Ceftazidima	$\leq 1$	$> 4$
	Cefepima	$\leq 1$	$> 4$
	Ertapenem	$\leq 0,5$	$> 1$
<b>Aminoglucósidos</b>	Amikacina	$\leq 8$	$> 16$
	Gentamicina	$\leq 2$	$> 4$
	Tobramicina	$\leq 2$	$> 4$
	Plazomicina*	-	-
<b>Otros</b>	Fosfomicina	$\leq 32$	$> 32$
	Nitrofurantoína	$\leq 64$	$> 64$

\* No se han establecido puntos de corte hasta el momento

## 2.2 Método de Épsilon-Test (E-test)

La resistencia a cefoxitina de aquellas cepas que por Wider presentaban una CMI  $\geq 16$  mg/L y un test de sinergia positivo ó resistencia a cefepima se comprobó mediante la técnica de difusión en placa con tiras de Épsilon-Test (E-test) (AB Biodisk, Solna, Suecia) [101]. También se determinó por este método la CMI de ertapenem en aquellos aislados de nuestro estudio cuyos valores de CMIs obtenidos por el sistema Wider y comprobadas por dilución en agar fueron  $\geq 1$  mg/L.

Para este análisis se utilizaron placas de agar MH que se inocularon con torunda estéril a partir de una solución de microorganismo de 0,5 de la escala de McFarland. La

siembra se realizó siguiendo las instrucciones del CLSI [99] para el método de difusión en disco. A continuación, se colocó la tira con antibiótico sobre la superficie del agar. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C. Se consideró la CMI en el punto de intersección entre el halo de inhibición del crecimiento bacteriano con la tira de E-Test.

### **3. Detección fenotípica de enzimas de resistencia**

#### **3.1 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)**

La comprobación de la presencia de BLEE se realizó en los aislamientos con alguna discrepancia entre los resultados obtenidos con el sistema Wider y el perfil fenotípico esperado en una cepa productora de BLEE [resistencia a penicilinas, cefalosporinas de cualquier generación excepto cefamicinas (cefoxitina) y sensibles a carbapenémicos y a combinaciones con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico] [102].

Esta comprobación se llevó a cabo realizando la técnica de difusión con discos, una variante del test de sinergia de doble disco [103]. En esta técnica se utilizan discos combinados de cefalosporinas con ácido clavulánico. Se trata de un método que se basa en la actividad inhibitoria del ácido clavulánico al igual que el test de sinergia de doble disco [97]. Para su realización se utilizó una placa de agar MH sobre la cual se inoculó una suspensión bacteriana ajustada al patrón 0,5 de la escala de turbidez de McFarland, como en un antibiograma convencional. Sobre ella se colocaron dos discos (Becton Dickinson) uno de CAZ (30  $\mu$ g), otro de CTX (30  $\mu$ g), y otros dos discos combinados de cada una de las cefalosporinas con ácido clavulánico (10  $\mu$ g). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. El test se consideró positivo cuando se observó una diferencia en el diámetro de los halos  $\geq 5$ mm entre los discos de las cefalosporinas solas y sus correspondientes con clavulánico.

### 3.1.1 Prueba confirmatoria para BLEE según el CLSI

Con el fin de confirmar la producción de BLEE, también se determinaron las CMI de cefotaxima en combinación con 4 mg/L de ácido clavulánico mediante el método de dilución en agar. De acuerdo con la prueba confirmatoria del CLSI, se consideraron productoras de BLEE las cepas que presentaron una disminución de la CMI igual o mayor a 3 concentraciones al doble para cefotaxima en combinación con ácido clavulánico con respecto a la CMI de la cefalosporina sola [99].

### 3.2 $\beta$ -lactamasas AmpC

La comprobación por pruebas fenotípicas de la presencia de  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC se realizó en todos los aislamientos que presentaban en el antibiograma, obtenido a través del sistema Wider, un perfil fenotípico compatible con la producción de este tipo de enzimas [resistencia a penicilinas, amoxicilina/clavulánico, cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> (incluida cefoxitina) y 3<sup>a</sup> generación, y sensibilidad a las cefalosporinas de 4<sup>a</sup> generación (cefepima) y a los carbapenémicos]. Se llevó a cabo mediante el método de inhibición de la enzima con PBA.

La técnica consiste en utilizar discos de carga estándar (Becton Dickinson) de CAZ y CTX solos y suplementados con 10  $\mu$ l de PBA (40  $\mu$ g/ $\mu$ l). Tras la realización de un antibiograma convencional con los dos tipos de discos y una incubación de 24 horas a 37 °C, se consideró el test positivo cuando se observaba un incremento del diámetro del halo de inhibición de CAZ y/o CTX en presencia de PBA  $\geq$  5 mm respecto al de la cefalosporina sin inhibidor [97, 98].



### 3.3 Detección fenotípica de cepas productoras de AmpC y BLEE

Dado que la producción conjunta de AmpC y BLEE puede alterar el perfil de resistencia característico de cada enzima por separado, se procedió a analizar todas las cepas de *E. coli* que en el antibiograma mostraban resistencia a amoxicilina/clavulánico, cefoxitina y cefepima para detectar la posible producción simultánea de ambas  $\beta$ -lactamasas (BLEE y AmpC). Este estudio se realizó con una variante de la técnica recomendada por el CLSI para la detección de BLEE, previamente descrita por Song *et al.* [104]. El proceso consiste en añadir 20  $\mu$ l de PBA (40 $\mu$ g/ $\mu$ l) a discos de CTX (y/o CAZ) de 30  $\mu$ g y de CTX (y/o CAZ) con ácido clavulánico (10 $\mu$ g).

En primer lugar, se inoculan las placas de agar MH tal y como se ha descrito en los apartados anteriores, se coloca un disco de CTX, otro disco de CTX+PBA, un tercer disco de CTX-ácido clavulánico y un cuarto disco de CTX-ácido clavulánico+PBA. Tras una incubación de las placas a 37°C durante 18-24 horas, se miden los diámetros de los halos obtenidos. Un incremento de 5 mm o más en el diámetro del halo del disco de CTX+PBA o del disco de CTX-ácido clavulánico frente al disco de CTX, se considera marcador de la producción de AmpC o BLEE, respectivamente. Asimismo, un incremento de 3 mm o más en el diámetro del halo de CTX-ácido clavulánico+PBA en comparación con el disco de CTX+PBA indicaría la coexistencia de producción de BLEE y AmpC.

En estas cepas la detección de BLEE se estudió también mediante la técnica de difusión en gradiente de concentración de antibiótico con tiras combinadas de cefalosporinas con y sin ácido clavulánico MIC Test Strip (Liofilchem, Italia). Esta técnica se basa en la inhibición de la enzima por la presencia del inhibidor. Las tiras de gradiente de antibiótico utilizadas (ceftazidima-ceftazidima/ácido clavulánico, cefotaxima-cefotaxima/ácido clavulánico y cefepima-cefepima/ácido clavulánico) demostraron la

presencia de BLEE cuando la CMI de la correspondiente cefalosporina con ácido clavulánico fue al menos tres diluciones inferior a la CMI de la misma sin el inhibidor [97].

### **3.4 Detección fenotípica de carbapenemasas: Test de Hodge**

En las cepas en cuyo antibiograma se observó la expresión de un fenotipo compatible con la posible presencia de una carbapenemasa se realizó el test de Hodge modificado (THM). Para la realización de esta prueba se preparó una suspensión bacteriana de la cepa control *E. coli* ATCC 25922 (sensible a los carbapenémicos) en suero salino (NaCl 0,9%) ajustada al patrón 0,5 de la escala de turbidez de McFarland, se diluyó 1:10 y se inoculó en una placa de agar MH. A continuación, se colocó un disco de imipenem (10µg) en el centro de la placa y se realizaron estrías con un asa de siembra desde 2 – 3 mm del disco de imipenem hacia el borde de la placa tanto con la cepa control como con las cepas a estudio, hasta un total de 4 aislados diferentes [105, 106]. Se incubó a 37°C durante 24 horas.

Un resultado negativo (halo de inhibición perfecto alrededor del disco) indicaba ausencia de carbapenemasa. Sin embargo, un resultado positivo se manifestaba cuando el halo de la cepa ATCC se distorsionaba debajo de las estrías realizadas con las cepas a estudio, formándose así una hendidura en la parte próxima al disco.

Cuando el THM fue positivo se realizó la comprobación de la clase molecular a la que pertenecían dichas enzimas.

### **3.4.1 Test de sinergia con EDTA y PBA.**

Esta prueba se realizó para la detección fenotípica de las carbapenemasas de la clase B o MBL y de las carbapenemasas de la clase A, como por ejemplo KPC.

Cada cepa seleccionada se inoculó en una placa de agar MH con una dilución en suero salino hasta conseguir una turbidez de 0,5 McFarland. A continuación, se colocaron 3 discos de imipenem (10 µg): uno suplementado con 10 µl de PBA (40 µg/µl), un segundo disco suplementado con 10 µl de EDTA (0,1 M) y un tercer disco sin suplementar. Un incremento de 5 mm o más en el diámetro del halo del disco de imipenem (IMI) en combinación con EDTA (IMI+EDTA) o ácido fenilborónico (IMI+PBA) frente al disco de IMI, indicaría producción de MBL o KPC, respectivamente.

Además, en los casos en los que el THM era positivo pero no existía sinergia con EDTA ni PBA, se realizó la PCR para comprobar la posible presencia de OXA-48.

## **4. Estudios moleculares**

### **4.1 Extracción del material genético**

#### **4.1.1. Extracción con detergente no-iónico**

El material genético de los 347 aislados de *E. coli* incluidos en el estudio se realizó mediante el método de lisis con *buffer* Tritón (100mM NaCl, 10mM Tris HCl pH 8.3, 1mM EDTA pH 8, 1% Tritón X-100). Se recogieron con un asa de siembra 2 ó 3 colonias procedentes de un cultivo puro de 18-24 horas y se resuspendieron en 300 µl del *buffer* Tritón preparado previamente. Estas suspensiones bacterianas se calentaron durante 10 minutos a 100°C y seguidamente se enfriaron en hielo. A continuación se centrifugaron durante 2 minutos a 14000 rpm para separar el ADN (sobrenadante) de

los restos celulares. Los sobrenadantes así obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

#### **4.1.2. Extracción de ADN mediante el sistema NucliSens® easyMAG®**

Este método de extracción de ADN se llevo a cabo con aquellas cepas en las que la caracterización molecular no mostró ningún resultado cuando se utilizaba el material genético extraído mediante el método de lisis con Tritón.

La extracción del ácido nucleico se realizó con el sistema automático NucliSens® easyMAG® de bioMérieux, basado en la tecnología de extracción con sílice magnética. El volumen de muestra puede variar desde 10 a 1000 µl, y el volumen de elución desde 25 a 110 µl. El tiempo total del proceso oscila entre 40 y 60 minutos en función del número de muestras que se estén procesando (<http://www.biomerieux.com.mx/microbiologia-industrial/nuclisensreasyagr>).

## **4.2 Detección y caracterización molecular de BLEEs**

Los genes que codifican enzimas BLEE se estudiaron en todos los aislamientos en los que se había confirmado la presencia de estas enzimas por pruebas fenotípicas. Mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo la detección molecular de las BLEE tipo TEM, SHV y CTX-M (CTX-M-Universal, CTX-M-15 y CTX-M-grupo 9). Para la amplificación de los genes *bla*<sub>-CTX-M</sub>, *bla*<sub>-TEM</sub> y *bla*<sub>-SHV</sub> se utilizaron los cebadores y condiciones especificados en la tabla 6.

**Tabla 6:** Secuencia de los cebadores utilizados para la PCR de enzimas BLEE.

Genes	Cebadores	Secuencia (5' — 3')	Tamaño amplicón	T <sup>a</sup> (°C)	Fuente
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	BLAT- A	ATAAAATTCTTGAAGAC	1076 pb	40	[107]
	BLAT- B	TTACCAATGCTTAATCA			
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV- 1	ATGCGTTATATTGCGCTGTGT	870 pb	58	[107]
	SHV- 2	TTAGCGTTGCCAGTGCTC			
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	CTX-M-Universal F	SCSATGTGCAGYACCAGTAA*	543 pb	50	[108]
	CTX-M-Universal R	CCGCRATATGRITGGTGGTG *			
	CTX-M-grupo 9 F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	856 pb	62	[107]
	CTX-M-grupo 9 R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			
	CTX-M-15 F	TCGTATCTTCCAGAATAAGG	904 pb	60	[109]
	CTX-M-15 R	TACCTATTACAAACCGTCGGTG			

\*S= G o C; Y=C o T; R= A o G

T<sup>a</sup>: Temperatura de alineación o hibridación

Para cada reacción de amplificación se utilizaron las siguientes concentraciones finales: 1X de *buffer* 10X (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs (desoxinucleótido trifosfato), 2,5U de *Taq* polimerasa, 0,5 μM de cada cebador y 5 μl de extracto de ADN. El resto de volumen, hasta 25 μl se completó con agua destilada estéril.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador de Peltier Thermal Cycler (PTC-100<sup>TM</sup>). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

<b>Genes</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	93 °C	3 minutos	1 ciclo
	93 °C	1 minuto	30 ciclos
	40 °C	1 minuto	
	72 °C	1 minuto	
	72 °C	5 minutos	1 ciclo
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	93 °C	3 minutos	1 ciclo
	93 °C	1 minuto	35 ciclos
	58 °C	90 segundos	
	72 °C	1 minuto	
	72 °C	5 minutos	1 ciclo
<i>bla<sub>CTX-M-Universal</sub></i>	94 °C	4 minutos	1 ciclo
	94 °C	1 minuto	35 ciclos
	50 °C	1 minuto	
	72 °C	1 minuto	
	72 °C	5 minutos	1 ciclo
<i>bla<sub>CTX-M-grupo 9</sub></i>	94 °C	4 minutos	1 ciclo
	94 °C	1 minuto	35 ciclos
	62 °C	1 minuto	
	72 °C	1 minuto	
	72 °C	5 minutos	1 ciclo
<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	94 °C	4 minutos	1 ciclo
	94 °C	1 minuto	35 ciclos
	60 °C	1 minuto	
	72 °C	1 minuto	
	72 °C	5 minutos	1 ciclo

Además, en determinados aislados (se detallan en el apartado de resultados) se llevó a cabo la realización de una PCR *Multiplex* para la amplificación de diferentes grupos de genes *bla<sub>CTX-M</sub>* (grupo 1; grupo 2; grupo 8; grupo 25/26 y grupo 9). Los cebadores utilizados para cada grupo se detallan en la tabla 7 [110].

**Tabla 7:** PCR *Multiplex* de los subgrupos de CTX-M.

Gen <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Cebadores	Secuencia (5' — 3')	Tamaño amplicón (pb)
Grupo 1	CTXM7	GCGTGATACCACTTCACCTC	260
	CTXM8	TGAAGTAAGTGACCAGAATC	
Grupo 2	CTXM17	TGATACCACCACGCCGCTC	341
	CTXM18	TATTGCATCAGAAACCGTGGG	
Grupo 8 y 25/26	CTXM19	CAATCTGACGTTGGGCAATG	207
	CTXM20	ATAACCGTCGGTGACAATT	
Grupo 9	CTXM11	ATCAAGCCTGCCGATCTGGTTA	293
	CTXM12	GTAAGCTGACGCAACGTCTGC	

Las concentraciones finales en la mezcla de reacción para un volumen final de 50 µl fueron: 1X de *buffer* 10X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 2,5U de Taq polimerasa, concentraciones variadas de cada uno de los cebadores (10 pmol de los cebadores CTXM7 y CTXM8; 20 pmol de los cebadores CTXM17, CTXM18, CTXM19 y CTXM20; 40 pmol de los cebadores CTXM11 y CTXM12) y 5 µl de extracto de ADN. El volumen, hasta 50 µl, se completó con agua destilada estéril.

La reacción de PCR *Multiplex* se realizó en un termociclador de Peltier Thermal Cycler (PTC-100<sup>TM</sup>). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	
95 °C	2 minutos	1 ciclo
95 °C	1 minuto	30 ciclos
55 °C	1 minuto	
72 °C	1 minuto	
72 °C	10 minutos	1 ciclo

### 4.3 Detección y caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas AmpC

Se estudió la presencia de los genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas AmpC de las familias MOX, CIT, DHA, ACC, EBC y FOX, mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos que se detallan en la tabla 8 [46]. La detección molecular de dichos genes se llevó a cabo en todos los aislamientos positivos en las pruebas fenotípicas de detección de AmpC.

**Tabla 8:** Cebadores utilizados para la PCR de amplificación AmpC.

PCR	Cebadores	Secuencia (5' — 3')	Tamaño amplicón (pb)
<i>bla<sub>AmpC</sub></i>	MOX F	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	520
	MOX R	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	
	CIT F	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	462
	CIT R	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	
	DHA F	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	405
	DHA R	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	
	ACC F	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	346
	ACC R	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	
	EBC F	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	302
	EBC R	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	
	FOX F	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	190
	FOX R	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	

Se realizó una amplificación mediante PCR *Multiplex*, utilizando como temperatura de *annealing* 64°C. En la reacción de amplificación se utilizaron las siguientes concentraciones finales: 1X de *buffer* 10X (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de dNTPs, 2,5U de *Taq* polimerasa, 0,6  $\mu$ M de los cebadores MOXMF, MOXMR, CITMF, CITMR, DHAMF y DHAMR; 0,5  $\mu$ M de los cebadores ACCMF, ACCMR, EBCMF y EBCMR; 0,4  $\mu$ M de los cebadores FOXMF y FOXMR; y 5  $\mu$ l de extracto de ADN. El resto de volumen, hasta 50  $\mu$ l se completó con agua destilada estéril.



La reacción de PCR *Multiplex* se realizó en un termociclador de Peltier Thermal Cycler (PTC-100<sup>TM</sup>). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	
94 °C	3 minutos	1 ciclo
94 °C	30 segundos	
64 °C	30 segundos	25 ciclos
72 °C	1 minuto	
72 °C	7 minutos	1 ciclo

La presencia de los genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas AmpC de las familias FOX y MOX, se estudió también utilizando una temperatura de *annealing* de 54 °C [111].

Además, en aquellos aislados que resultaron ser positivos para la familia CIT de las p-AmpC se realizó la PCR y posterior secuenciación del grupo CMY (incluido en la familia CIT). Se utilizaron los cebadores previamente descritos CMY-F (5'-CTGATTGCGTCTGACGG-3') y CMY-R (5'-TTGCAGCTTTTCAAGAATGCCG-3') [112] que dan lugar a un fragmento de 1100 pb.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes [113]:

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	
94 °C	90 segundos	1 ciclo
94 °C	90 segundos	
61 °C	30 segundos	30 ciclos
72 °C	1 minuto	
72 °C	10 minutos	1 ciclo

Los aislamientos con un resultado positivo en las pruebas fenotípicas de detección de AmpC, y negativos en la PCR para la detección del gen *bla*<sub>AmpC</sub> plasmídica, se consideraron hiperproductores de AmpC cromosómica.

#### 4.4 Detección y caracterización molecular de carbapenemasas

En la cepa resistente a ertapenem se estudió la presencia de los genes *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>OXA-48</sub>, mediante amplificación por PCR. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9:** Cebadores utilizados para la amplificación de enzimas carbapenemasas.

Gen	Cebadores	Secuencia (5' — 3')	Tamaño amplicón	T <sup>a</sup> (°C)	Fuente
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	VIM A	5'ATGGTGTTTGGTCGCATATC 3'	510 pb	52	[114]
	VIM B	5'TGGGCCATTCAGCCACATC 3'			
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	IMP A	5'CTACCGCAGCAGAGTCTTTG 3'	587 pb	52	[114]
	IMP B	5'AACCAGTTTTGCCTTACCAT 3'			
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	KPC F	5'ATG TCACTGTATGGCCGTCT 3'	893 pb	58	[115]
	KPC R	5'TTTTCAGAGCCTTACTGCCC 3'			
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	OXA-48 F	5'GCGTGGTTAAGGATGAACAC 3'	438 pb	55	[116]
	OXA-48 R	5'CATCAAGTTCAACCCAACCG 3'			

La PCR se realizó en el termociclador Peltier Thermal Cycler (PTC-100™) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Genes	Temperatura	Tiempo	
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	94 °C	5 minutos	1 ciclo
	94 °C	25 segundos	30 ciclos
	52 °C	40 segundos	
	72 °C	50 segundos	
	72 °C	6 minutos	1 ciclo
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	94 °C	2 minutos	1 ciclo
	94 °C	10 segundos	30 ciclos
	52 °C	30 segundos	
	72 °C	30 segundos	
	72 °C	7 minutos	1 ciclo
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	94 °C	5 minutos	1 ciclo
	94 °C	25 segundos	30 ciclos
	58 °C	40 segundos	
	72 °C	50 segundos	
	72 °C	6 minutos	1 ciclo
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	94 °C	1 minuto	1 ciclo
	94 °C	30 segundos	30 ciclos
	55 °C	30 segundos	
	72 °C	1 minuto	
	72 °C	2 minutos	1 ciclo

#### 4.5 Detección y caracterización molecular de enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs)

La amplificación de los genes implicados en la resistencia a aminoglucósidos (genes codificantes de EMAs) se analizaron en todos los aislados que mostraron resistencia al menos a uno de los aminoglucósidos ensayados (tobramicina, gentamicina y/o amikacina) en el sistema automatizado Wider y/o en el método de dilución en agar.

Mediante PCR se estudió la presencia de los genes de las EMAs más frecuentes en *E. coli*. Los cebadores utilizados así como el tamaño del fragmento amplificado en cada

caso se muestran en la tabla 10. Para cada reacción de amplificación las concentraciones finales de la mezcla de reacción fueron las siguientes: 1X de *buffer* 10X (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM de KCl), 0,2  $\mu$ M de cada uno de los *primers*, 200  $\mu$ M de los dNTPs y 2,5U de Taq polimerasa. La concentración final de MgCl<sub>2</sub> fue de 3 mM para la amplificación del gen *ant(2'')Ia*, 1,5 mM para los genes *acc(3)IIa* y *acc(6')-Ib* y 2mM para el gen *aph(3')-Ia*. En todas las PCRs se añadieron 5  $\mu$ l del ADN extraído. El volumen hasta 25  $\mu$ l se completó con agua destilada estéril.

**Tabla 10:** Cebadores utilizados para la detección molecular de los genes de EMAs.

Genes	Cebadores	Secuencia (5' — 3')	Tamaño amplicón	T <sup>a</sup> (°C)	Fuente
<i>aac(3)-IIa</i>	aac(3)-II-F	TGAAACGCTGACGGAGCCTC	370 pb	62	[117]
	aac(3)-II-R	GTCGAACAGGTAGCACTGAG			
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-Ib_F	TATGAGTGGCTAAATCGAT	395 pb	50	[118]
	aac(6')-Ib_R	CCCGCTTTCTCGTAGCA			
<i>ant(2'')-Ia</i>	ant(2'')-Ia_F	ATGGACACAACGCAGGTCGC	535 pb	55	[119]
	ant(2'')-Ia_R	TTAGGCCGCATATCGCGACC			
<i>aph(3')-Ia</i>	aph(3')-Ia F	CGAGCATCAAATGAAACTGC	623 pb	53	[118]
	aph(3')-Ia R	GCGTTGCCAATGATGTTACAG			

F: *forward primer*; R: *reverse primer*.

T<sup>a</sup>: Temperatura de alineación o hibridación

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador de Peltier Thermal Cycler (PTC-100<sup>TM</sup>) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

<b>Genes</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	
<i>aac(3)-IIa</i>	95 °C	3 minutos	1 ciclo
	95 °C	30 segundos	30 ciclos
	62 °C	1 minuto	
	72 °C	1 minuto	
	72 °C	10 minutos	1 ciclo
<i>aac(6')-Ib</i>	95 °C	5 minutos	1 ciclo
	95 °C	20 segundos	30 ciclos
	50 °C	1 minuto	
	72 °C	1 minuto	
	72 °C	5 minutos	1 ciclo
<i>ant(2'')-Ia</i>	95 °C	3 minutos	1 ciclo
	95 °C	30 segundos	30 ciclos
	55 °C	1 minuto	
	72 °C	1 minuto	
	72 °C	10 minutos	1 ciclo
<i>aph(3')-Ia</i>	95 °C	5 minutos	1 ciclo
	95 °C	20 segundos	30 ciclos
	53 °C	1 minuto	
	72 °C	1 minuto	
		72 °C	5 minutos

#### **4.6 Detección de los amplificados por electroforesis en geles de agarosa y visualización del producto de PCR**

Se tomaron 10 µl del producto de la amplificación, y se sometieron a electroforesis convencional en geles de agarosa (Sigma-Aldrich, USA) al 1,5% en TAE 1X (tampón Tris-acetato-EDTA) con 5 µl de agente intercalante *Real Safe* o Bromuro de Etidio. Los

geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (300 nm de longitud de onda), obteniendo su fotografía. En cada reacción de PCR se incluyeron un control positivo de amplificación y un control negativo. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb ADN Ladder (Biotools).

#### 4.7 Secuenciación de los productos amplificados por PCR

Todos los productos de PCR se purificaron con el *kit* comercial “SPEEDTOOLS PCR Clean-up kit” (Biotools B & M Labs, S.A.), como paso previo a la secuenciación.

Una vez purificados se llevo a cabo la reacción de secuenciación utilizando los mismos cebadores empleados en las reacciones de PCR, mediante el método de Sanger o secuenciación de terminación de la cadena, con el kit comercial *BigDye® terminator v1.1* (Applied Biosystems). La secuenciación se realizó en ambas cadenas de ADN. La amplificación para la reacción de secuenciación se realizó en el termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) y las condiciones fueron las siguientes:

96 °C	1 minuto	1 ciclo
96 °C	10 segundos	} 25 ciclos
T <sup>a</sup> hibridación	5 segundos	
60 °C	1 minuto	

Posteriormente, se realizó el correspondiente lavado y precipitado de las secuencias. Las muestras se secuenciaron en un secuenciador ABI PRISM BIO system automático (Perkin-Elmer). Para analizar las secuencias obtenidas se utilizó el programa informático *Sequence Scanner*. Tras el análisis, las secuencias se compararon con las disponibles en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology*

*Information*), utilizando el sistema de alineamiento BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

## **5. Análisis estadístico**

Mediante un análisis estadístico se evaluó la asociación entre variables cuantitativas (CMI y sensibilidad/resistencia teniendo en cuenta los puntos de corte de EUCAST) aplicando el test de  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher con un intervalo de confianza del 95%. El paquete informático utilizado para el análisis fue el programa Epi Info.

La comparación de las CMI de los aminoglucósidos, entre las cepas sensibles y resistentes para cada uno de ellos, se realizó mediante el test U de Mann-Whitney. Las asociaciones entre dos variables se calcularon mediante la prueba de correlación de rangos de Spearman. El nivel de significación se consideró como  $P \leq 0,05$ . El análisis estadístico se realizó utilizando IBM SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL).





## **RESULTADOS**

---



## 1. Aislados clínicos incluidos en el estudio

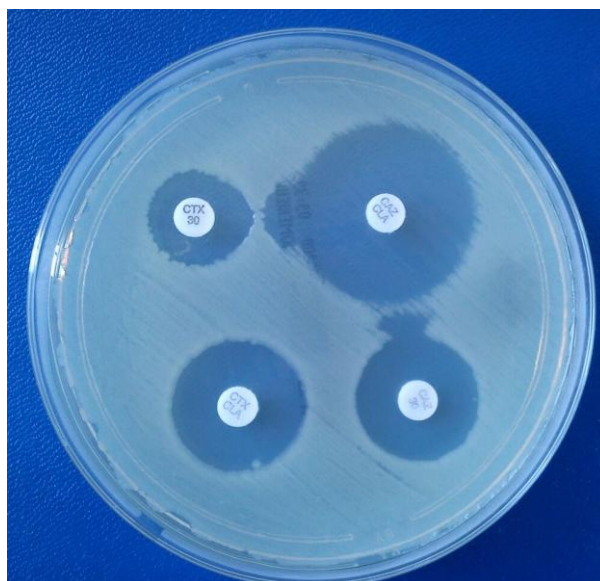
Se estudiaron un total de 347 cepas de *E. coli* productoras de BLEE y/o AmpC procedentes de muestras de orina recogidas durante el año 2013 en el laboratorio de Microbiología del HCSC. Todas ellas cumplían los requisitos establecidos en el apartado de Material y Métodos.

De estas 347 cepas se confirmó la producción de BLEE en 303 cepas (87,3%) y AmpC en 44 cepas (12,7%). Además, de las 303 BLEEs, un aislado resultó ser positivo para la producción de AmpC y otro aislado para la producción de carbapenemasa.

## 2. Pruebas fenotípicas de detección de BLEE y AmpC

### 2.1 Confirmación fenotípica de BLEE

Para confirmar de forma fenotípica la presencia de BLEE utilizamos el test de difusión con discos. Dicho test fue positivo en el 87,3% de las cepas estudiadas (303/347). En las figuras 13 y 14 se muestran los test de sinergia de tres de estas cepas.



CTX: cefotaxima; CTX/CLA: cefotaxima con ácido clavulánico; CAZ: ceftazidima; CAZ/CLA: ceftazidima con ácido clavulánico.

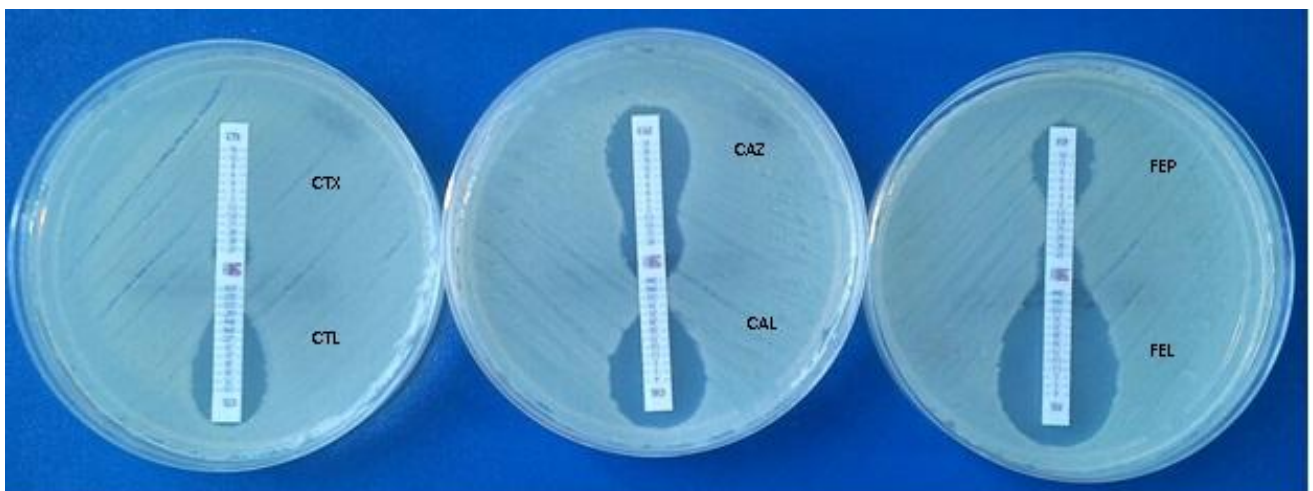
**Figura 13:** Test de sinergia positivo de la cepa HCSC 319.



CTX: cefotaxima; CTX/CLA: cefotaxima con ácido clavulánico; CAZ: ceftazidima; CAZ/CLA: ceftazidima con ácido clavulánico.

**Figura 14:** Test de sinergia de las cepas HCSC 65 y HCSC 365.

En la figura 15 se representan las CMI de cefalosporinas con o sin inhibidor de una cepa productora de BLEE mediante la técnica de difusión en gradiente de concentración de antibiótico con las tiras MIC Test Strip (Liofilchem, Italia).



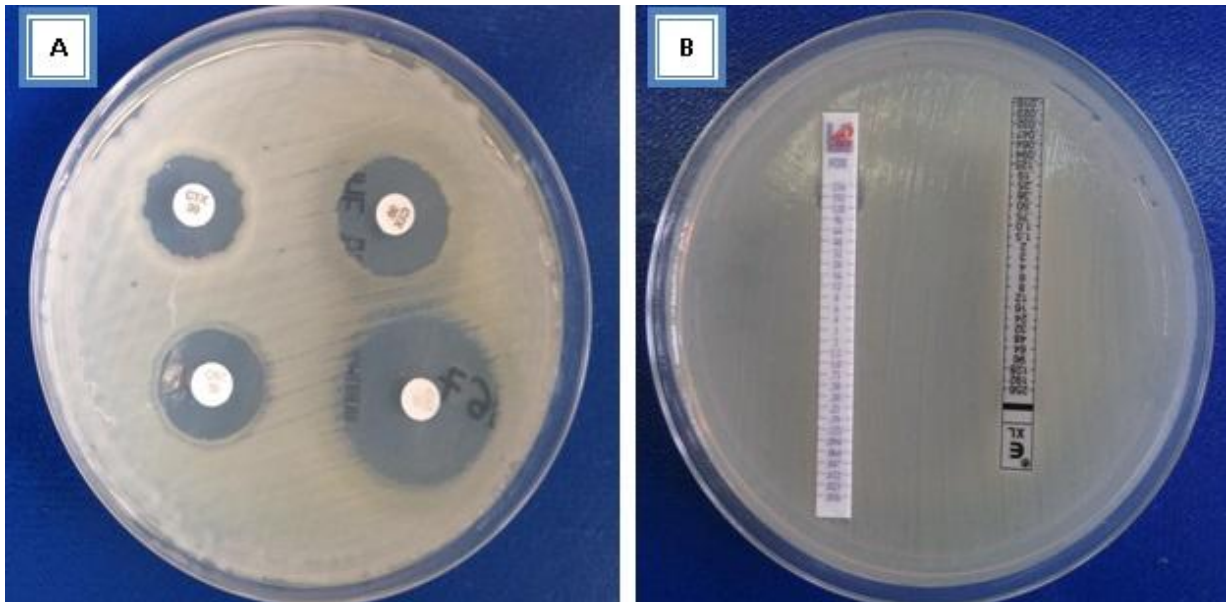
CTX, cefotaxima; CTL, cefotaxima con ácido clavulánico; CAZ, ceftazidima; CAL, ceftazidima con ácido clavulánico; FEP, cefepima; FEL, cefepima con ácido clavulánico.

**Figura 15:** Concentraciones mínimas inhibitorias representativas de una cepa productora de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido con y sin ácido clavulánico.

## 2.2 Confirmación fenotípica de AmpC

Para confirmar de forma fenotípica la presencia de AmpC utilizamos el método de inhibición con PBA. Dicho test fue positivo en el 13% de las cepas estudiadas (45/347).

En la figura 16 A se muestra el resultado positivo de este método en una de las cepas.



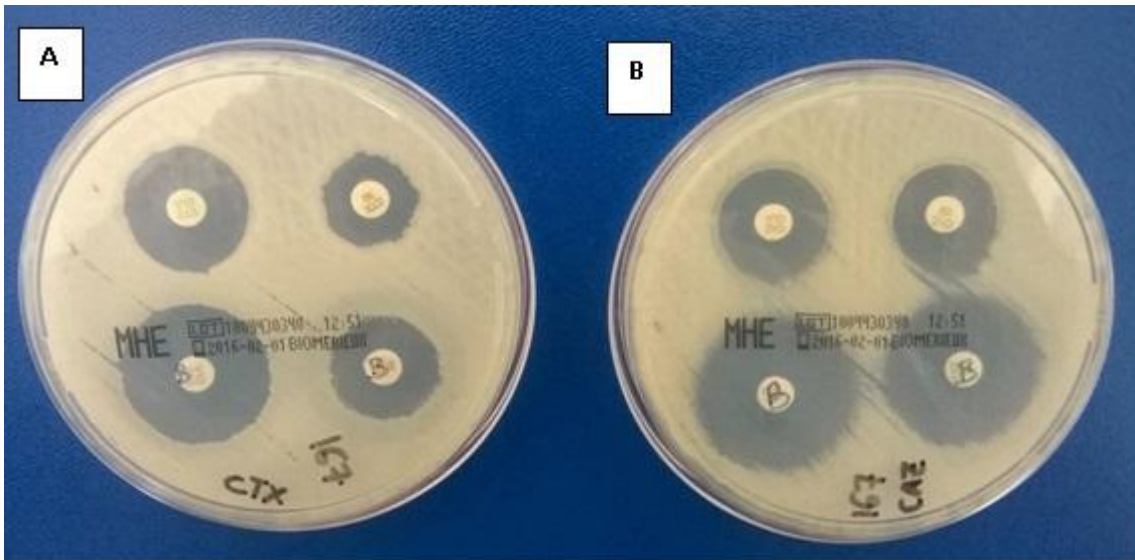
CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; PBA, ácido fenilborónico; FOX, cefoxitina; XL, amoxicilina/ácido clavulánico.

**Figura 16:** Test de inhibición con ácido fenilborónico (imagen A) y CMI a cefoxitina (128 mg/L) y amoxicilina/clavulánico (CMI > 256 mg/L) (imagen B).

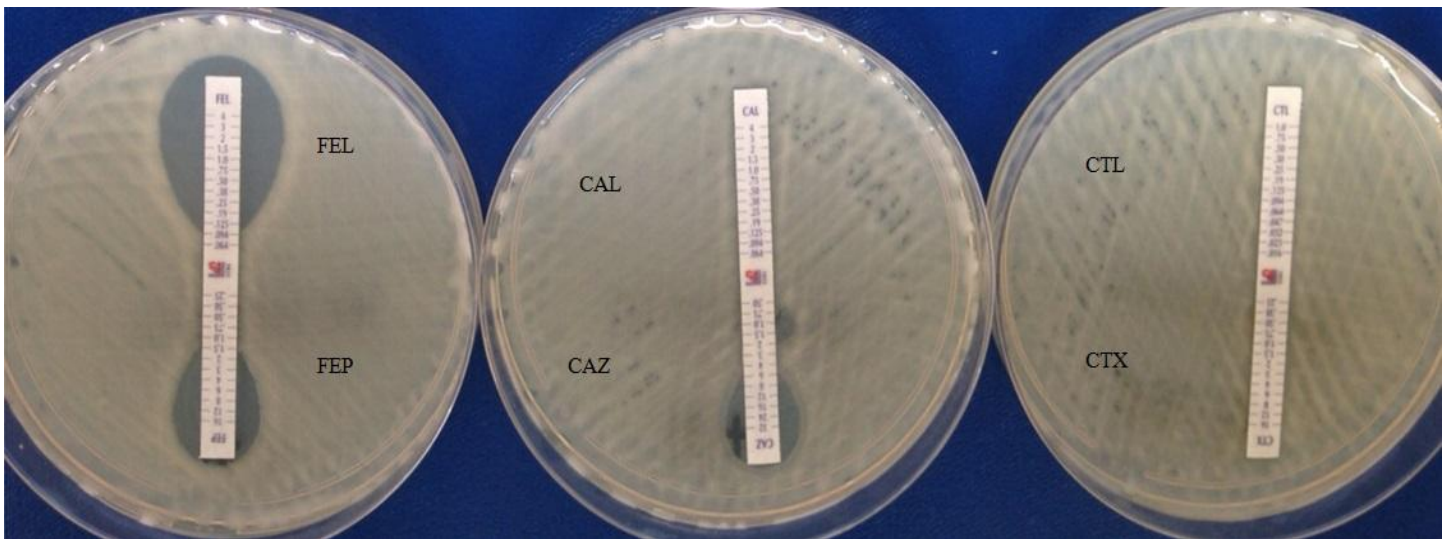
## 2.3 Confirmación fenotípica de BLEE y AmpC

La detección de forma fenotípica de la presencia conjunta de BLEE y AmpC se realizó mediante una variante de la técnica recomendada por el CLSI para la detección de BLEE, descrita por *Song et al.* [104]. Este test resultó positivo en una de las cepas de nuestro estudio (Figura 17). En la figura 18 se observan los valores de CMI de cefotaxima, ceftazidima y cefepima, con y sin inhibidor de esta cepa.





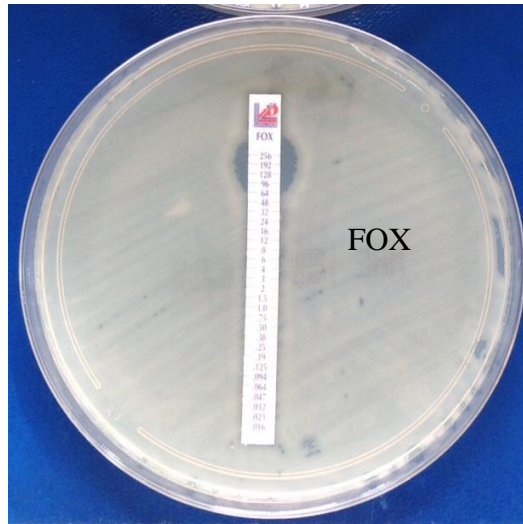
**Figura 17:** Test de inhibición con ácido fenilborónico y/o ácido clavulánico para cefotaxima (A) y ceftazidima (B) de la cepa HCSC 167 (productora de BLEE y  $\beta$ -lactamasa tipo AmpC).



FEP, cefepima; FEL, cefepima con ácido clavulánico; CAZ, ceftazidima; CAL, ceftazidima con ácido clavulánico; CTX, cefotaxima; CTL, cefotaxima con ácido clavulánico.

**Figura 18:** Concentraciones mínimas inhibitorias representativas de la cepa HCSC 167 con y sin inhibidor, con las tiras MIC Test Strip (Liofilchem, Italia).

En la siguiente figura (Figura 19) se representa la CMI de cefoxitina de la cepa HCSC 167 obtenida por E-test.



**Figura 19:** CMI a cefoxitina (FOX = 64 mg/L) de la cepa HCSC 167.

### **3. Sensibilidad a los antibióticos $\beta$ -lactámicos**

#### **3.1 Cepas productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)**

En la tabla 11 se muestran los resultados de las CMI 50 y 90, el rango de CMI y el porcentaje de cepas resistentes para cada uno de los cinco antibióticos  $\beta$ -lactámicos estudiados en las 301 cepas productoras únicamente de BLEE. También se detallan los valores de CMI de cefotaxima en combinación con 4 mg/L de ácido clavulánico como prueba confirmatoria de BLEE del CLSI. Los porcentajes de resistencia se calcularon teniendo en cuenta los puntos de corte establecidos por EUCAST.

**Tabla 11:** CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, rango de CMIs y porcentaje de cepas BLEEs resistentes a cada uno de los antimicrobianos β-lactámicos.

Antibióticos β-lactámicos	BLEE			
	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango	Resistencia (%)
A/C	8	16	2 - 128	63 (20,9%)
CTX	32	128	0,5 - >128	278 (92,4%)
CTX/C	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125 - 2	-
CAZ	8	64	≤ 0,25 - >128	152 (50,5%)
FEP	4	16	≤ 0,06 – 64	104 (34,5%)
ERT	≤ 0,06	0,125	≤ 0,06 – 0,5	0

A/C, amoxicilina/clavulánico; CTX, cefotaxima; CTX/C, cefotaxima/clavulánico; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; ERT, ertapenem.

El 20,9% de las cepas BLEE fue resistente a amoxicilina/clavulánico, mientras que el porcentaje restante (79,1%) fue sensible con una CMI ≤ 8/4 mg/L.

La resistencia a cefotaxima fue del 92,4% y a ceftazidima del 50,5%. Por tanto, pese a hidrolizar estas cefalosporinas, dependiendo del tipo de BLEE, las CMIs obtenidas no siempre se encuentran por encima del punto de corte de resistencia.

Al relacionar los resultados obtenidos para cefotaxima y ceftazidima, se encontraron cuatro fenotipos de resistencia diferentes: Un 44,2% (133/301) de las cepas fueron resistentes a ambas cefalosporinas. Un 49,1% de las cepas fueron resistentes a cefotaxima y no resistentes (intermedias o sensibles) a ceftazidima. El 6,3% (19/301) de las cepas fueron resistentes a ceftazidima y no resistentes a cefotaxima. Dos cepas fueron intermedias a cefotaxima (CMI = 2mg/L) y sensibles a ceftazidima.

Los valores de las CMIs de cefotaxima en combinación con 4 mg/L de ácido clavulánico fueron en todos los casos 3 o más diluciones inferiores a los



correspondientes de cefotaxima sola. Un 34,5% de las cepas fueron resistentes a cefepima. Todas las cepas fueron sensibles a ertapenem.

Por otra parte no hubo ninguna cepa resistente a ceftazidima. Diez cepas con sensibilidad intermedia por Wider, se comprobaron por E-test, resultando 4 de ellas intermedias y 6 cepas sensibles con una CMI de 4 mg/L.

### 3.2 Cepas productoras de $\beta$ -lactamasas tipo AmpC

La tabla 12 muestra los resultados de la CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, el rango de CMI y el porcentaje de cepas resistentes para cada uno de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos estudiados, de las 44 cepas productoras únicamente de  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC.

**Tabla 12:** CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, rango de CMIs y porcentaje de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas AmpC resistentes a cada uno de los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos.

Antibióticos $\beta$ -lactámicos	AmpC			
	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango	Resistencia (%)
A/C	32	32	16 - >128	44 (100%)
CTX	8	16	1 - 64	38 (86,4%)
CTX/C	4	8	0,5 - 16	-
CAZ	32	64	4 - 128	41 (93,2%)
FEP	0,125	0,5	$\leq 0,06$ - 2	0
ERT	$\leq 0,06$	0,125	$\leq 0,06$ - 1	0

A/C, amoxicilina/clavulánico; CTX, cefotaxima; CTX/C, cefotaxima/clavulánico; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; ERT, ertapenem.

El 100% de las cepas AmpC fueron resistentes a amoxicilina/clavulánico. El 97,7% con CMI  $\geq 32$  mg/L. El 93,2% de los aislados fueron resistentes a ceftazidima y el 100%

mostraron valores de CMI  $\geq 4$  mg/L. El 86,4% de las cepas fueron resistentes a cefotaxima, el 11,4% intermedias y solo 1 cepa fue sensible. Por el contrario, el 100% de los aislados productores de  $\beta$ -lactamasa tipo AmpC fueron sensibles a cefepima. Todas las cepas fueron sensibles a ertapenem.

Los resultados del Wider mostraron que el 100% de las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC eran resistentes a ceftaxina con una CMI  $\geq 32$  mg/L.

### **3.3 Cepas productoras de BLEE + AmpC y BLEE + OXA-48**

En un aislamiento (HCSC 167) se detectó la coexistencia de BLEE y AmpC y en otro aislamiento (HCSC 397) se detectó la presencia de BLEE y carbapenemasa OXA-48. Estas dos cepas presentaron valores de CMIs resistentes para amoxicilina/clavulánico, cefotaxima y ceftazidima. Además, fueron resistentes a ceftaxina con una CMI  $\geq 16$  mg/L por E-test, y la cepa HCSC 397 resultó ser resistente a ertapenem con una CMI de 4 mg/L. Estos datos se detallan en la tabla 13.

Se realizó el THM de la cepa HCSC 397 para comprobar la posible presencia de carbapenemasas, obteniendo un resultado dudoso. Posteriormente se realizaron los test de sinergia con EDTA y PBA que resultaron ser negativos. Por tanto, se realizó la detección molecular de los genes de carbapenemasas por PCR, detectándose el gen *bla*<sub>OXA-48</sub>.

### **3.4 Comparación de los resultados de sensibilidad a $\beta$ -lactámicos entre las cepas productoras de BLEE y las de AmpC**

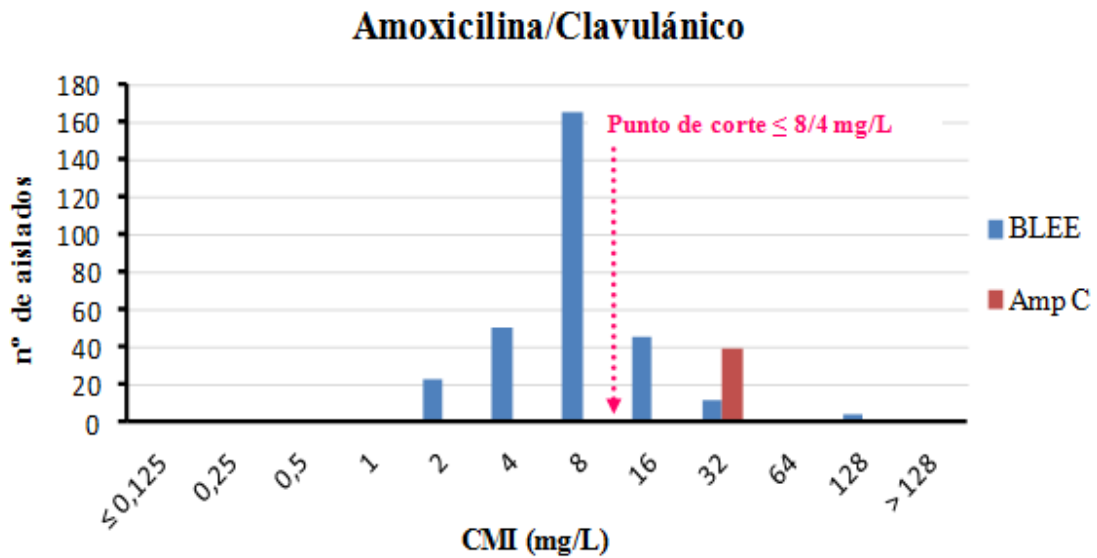
En la tabla 13 se comparan los resultados de sensibilidad *in vitro* a los diferentes  $\beta$ -lactámicos ensayados de las 347 cepas de *E. coli* en función del tipo de  $\beta$ -lactamasa producido (BLEE o AmpC). Basándonos en los puntos de corte de EUCAST, el número de cepas resistentes a amoxicilina/clavulánico y a ceftazidima fue significativamente ( $P < 0,01$ ) mayor en las cepas productoras de AmpC y en el caso de cefepima lo fue entre las cepas productoras de BLEE. En general, todos los aislamientos se caracterizaron por presentar un alto grado de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos.

**Tabla 13:** Sensibilidad *in vitro* de los diferentes  $\beta$ -lactámicos ensayados en las 347 cepas de *E. coli* según el tipo de  $\beta$ -lactamasa producido.

Agentes antimicrobianos	BLEE (301)				AmpC (44)				P valor	CMI (mg/L)	
	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	Resistentes* (%)	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	Resistentes* (%)		BLEE+AmpC HCSC 167	BLEE+OXA 48 HCSC 397
<b><math>\beta</math>- lactámicos</b>											
Amoxicilina-ácido clavulánico	8	16	2 - 128	63 (20,9)	32	32	16 - >128	44 (100)	<0,01	32/16	128/64
Cefotaxima	32	128	0,5 - >128	278 (92,4)	8	16	1 - 64	38 (86,4)	0,18	16	> 128
Cefotaxima-clavulánico	≤0,125	≤0,125	≤ 0,125 - 2	NA	4	8	0,5 - 16	NA	NA	1	64
Ceftazidima	8	64	≤ 0,12 - >128	152 (50,5)	32	64	4 - 128	41 (93,2)	<0,01	8	8
Cefepima	4	16	≤ 0,06 – 64	104 (34,5)	0,125	0,5	≤ 0,06 -2	0	<0,01	4	128
Ertapenem	≤ 0,06	0,125	≤ 0,06 – 0,5	0	≤ 0,06	0,125	≤ 0,06 -1	0	NA	≤ 0,06	4

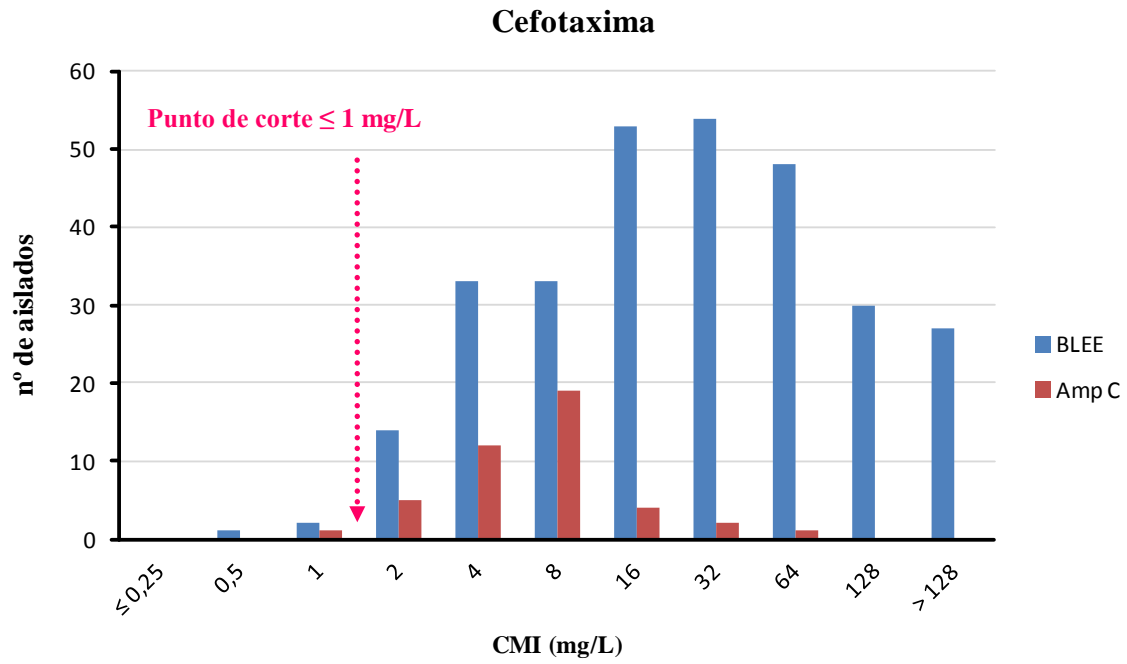
NA: no aplicable; \* CMIs en mg/L

La distribución de los valores de CMI de amoxicilina/clavulánico, cefotaxima, cefotaxima/clavulánico, ceftazidima, cefepima y ertapenem de las cepas BLEE y AmpC se refleja en las figuras 20, 21, 22, 23, 24 y 25.

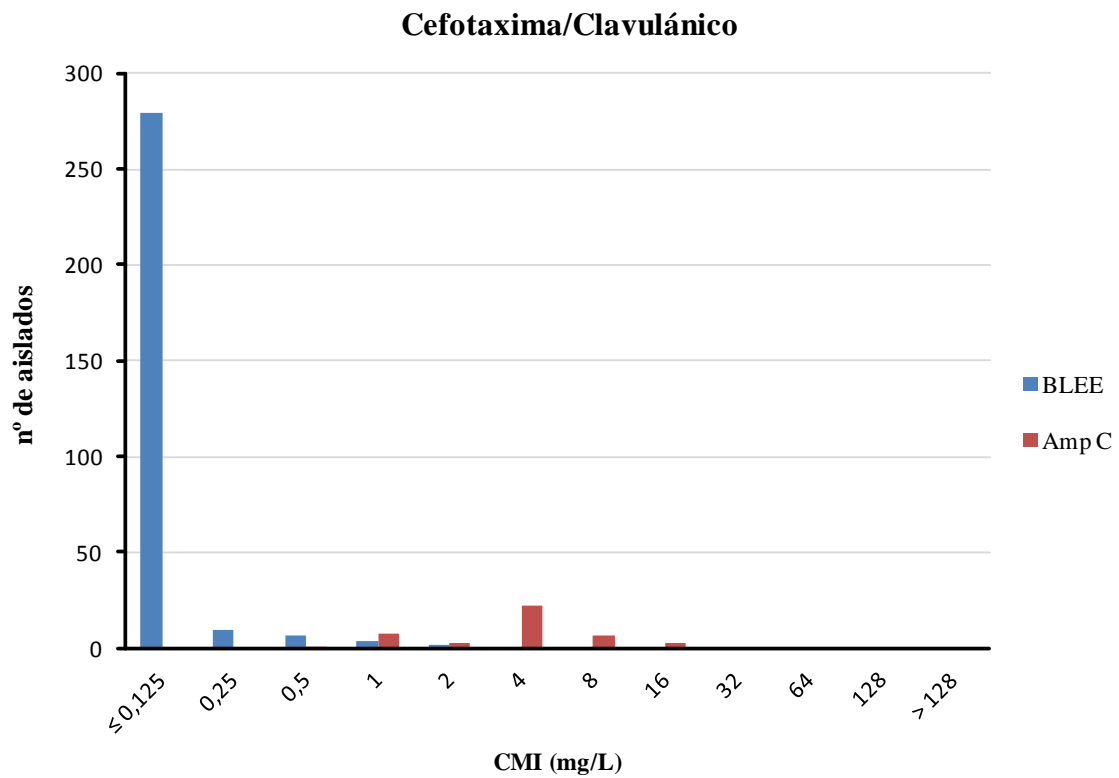


**Figura 20:** Distribución de CMIs de amoxicilina/clavulánico.

Las cepas productoras de AmpC fueron todas resistentes. Las productoras de BLEE mostraron una distribución unimodal para amoxicilina/clavulánico en torno a 8 mg/L.

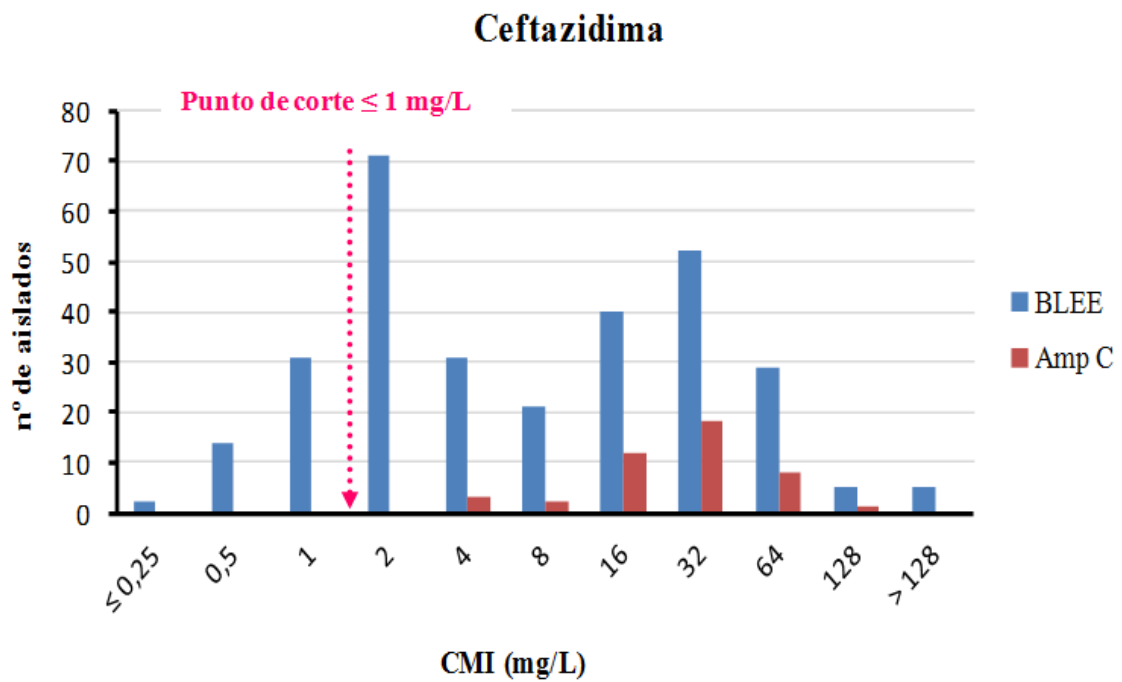


**Figura 21:** Distribución de CMIs de cefotaxima.



**Figura 22:** Distribución de CMIs de cefotaxima/clavulánico.

En el 100% de las cepas BLEE las CMI de cefotaxima con clavulánico disminuyeron en tres o más diluciones respecto a las de cefotaxima sola, siendo el test confirmatorio de sinergia positivo. Mientras que el 95,5% (42/44) de las cepas AmpC lo dieron negativo.



**Figura 23:** Distribución de CMIs de ceftazidima.

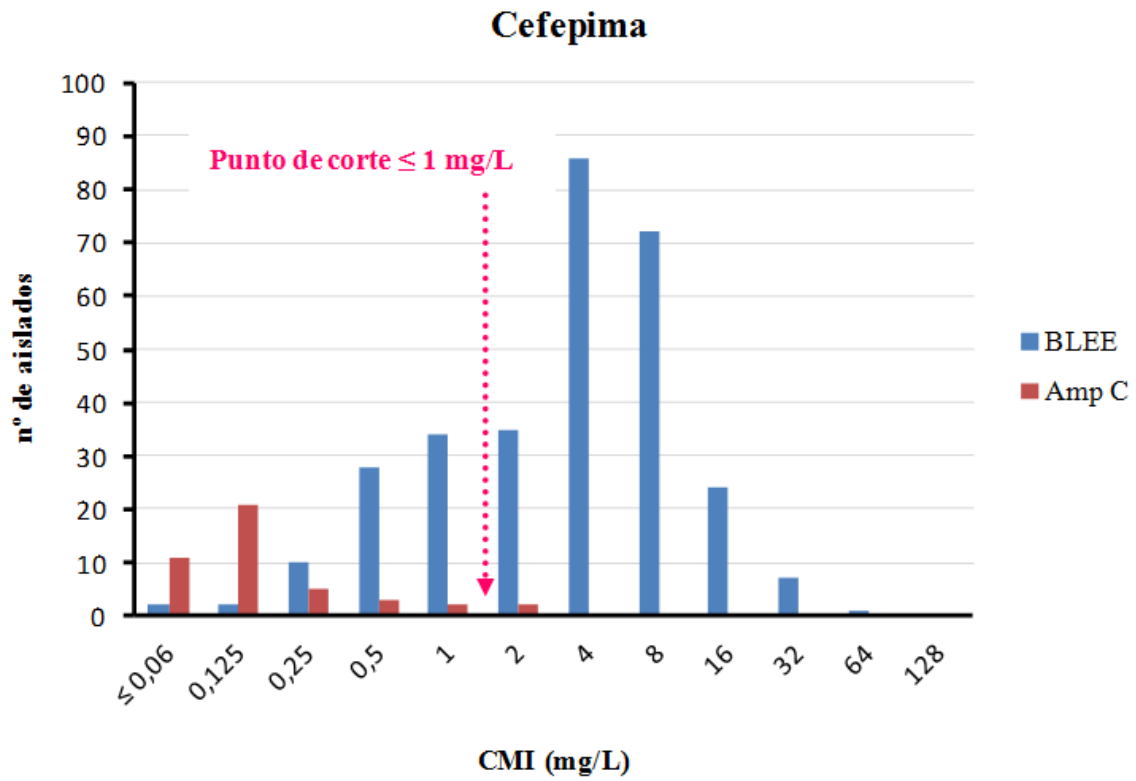


Figura 24: Distribución de CMI de cefepima.

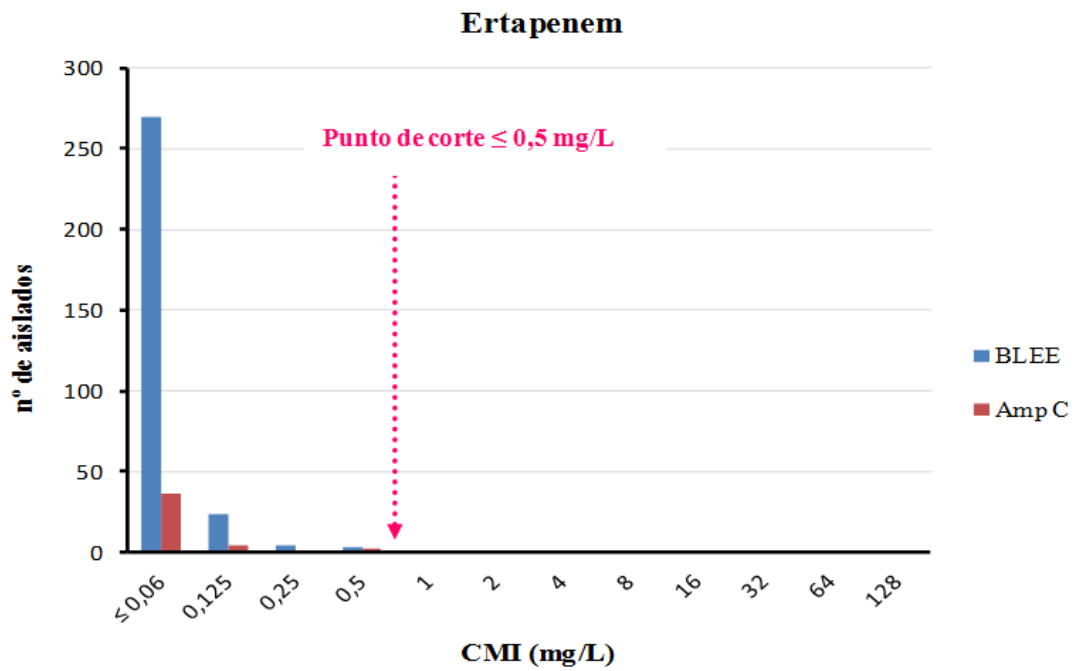


Figura 25: Distribución de CMI de ertapenem.



En las cepas productoras de BLEE, cefotaxima presentó una distribución unimodal en torno a 32 mg/L, al igual que cefepima que se distribuyó en torno a 4 mg/L. Por el contrario, ceftazidima presentó una distribución bimodal con dos picos uno en 2 mg/L y otro en 32 mg/L.

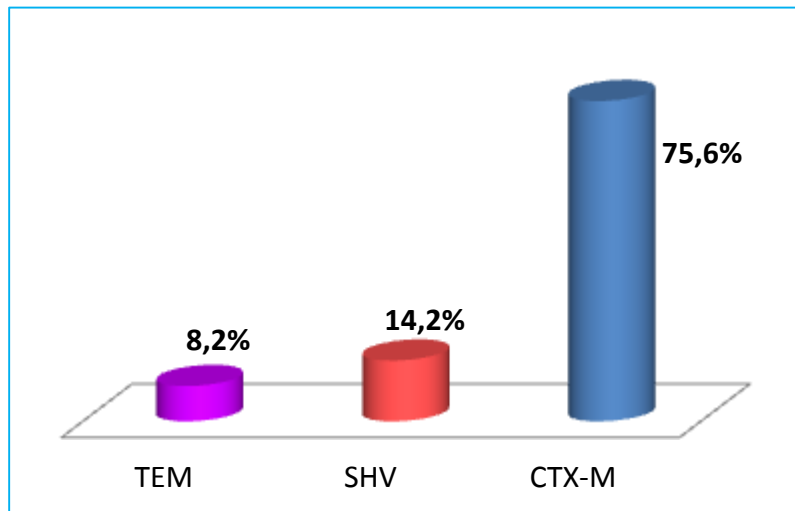
En las cepas productoras de AmpC, las tres cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima y cefepima) mostraron una distribución unimodal en torno a 8 mg/L, 32 mg/L y 0,125 mg/L, respectivamente.

## **4. Caracterización molecular de $\beta$ -lactamasas**

### **4.1 Caracterización molecular de las BLEE**

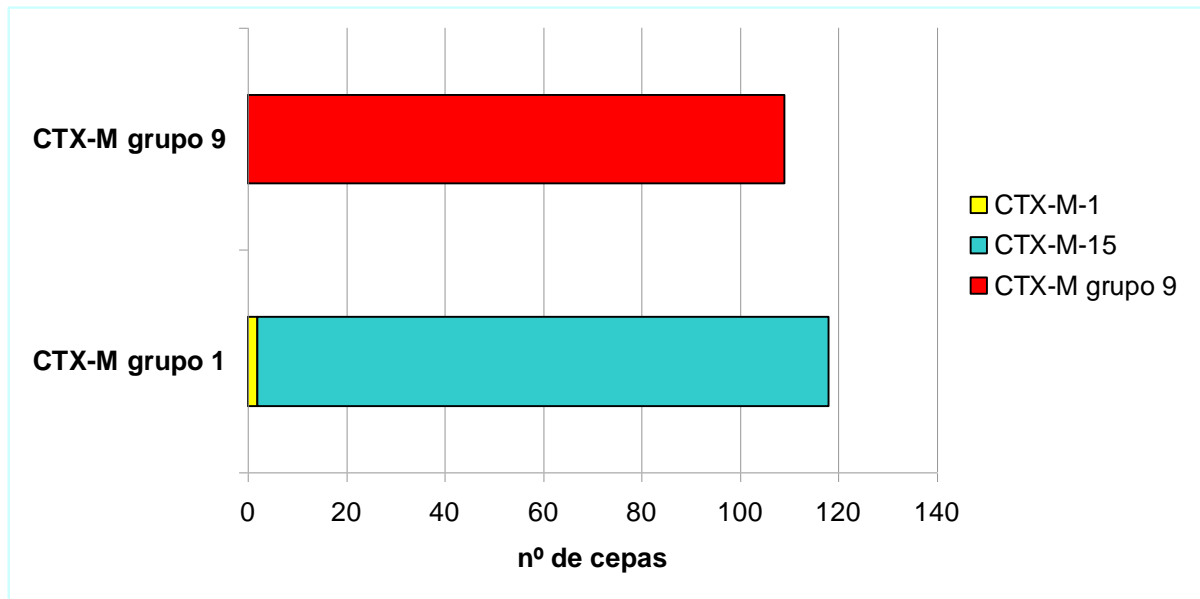
Los 303 aislados con test de sinergia positivo, fueron caracterizados por PCR para la detección de los distintos tipos de BLEE utilizando los primers específicos para la amplificación de los genes *bla-TEM*, *bla-SHV* y *bla-CTX-M*.

Las BLEE mayoritarias resultaron ser de tipo CTX-M 75,6% (229/303), seguida de SHV 14,2% (43/303) y TEM 8,2% (25/303). Seis cepas no amplificaron con ninguno de los tipos de BLEE estudiados. Los resultados se muestran en la figura 26.



**Figura 26:** Genes de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido caracterizados por PCR.

Los aislados productores de BLEE tipo CTX-M-Universal mostraron que el 48,9% (112/229) pertenecían al grupo 9, mientras que el 50,2% (115/229) fueron productores del tipo CTX-M-15, incluido en el grupo 1. Dos aislados productores de CTX-M-Universal no se caracterizaron dentro del grupo 9 ni como CTX-M-15. Estas dos cepas fueron analizadas por PCR *Multiplex* para determinar en primer lugar a qué grupo concreto pertenecían (grupo 1; grupo 2; grupo 8; grupo 25/26 y grupo 9), y resultaron ser del grupo 1. En la figura 27 se reflejan los datos obtenidos.

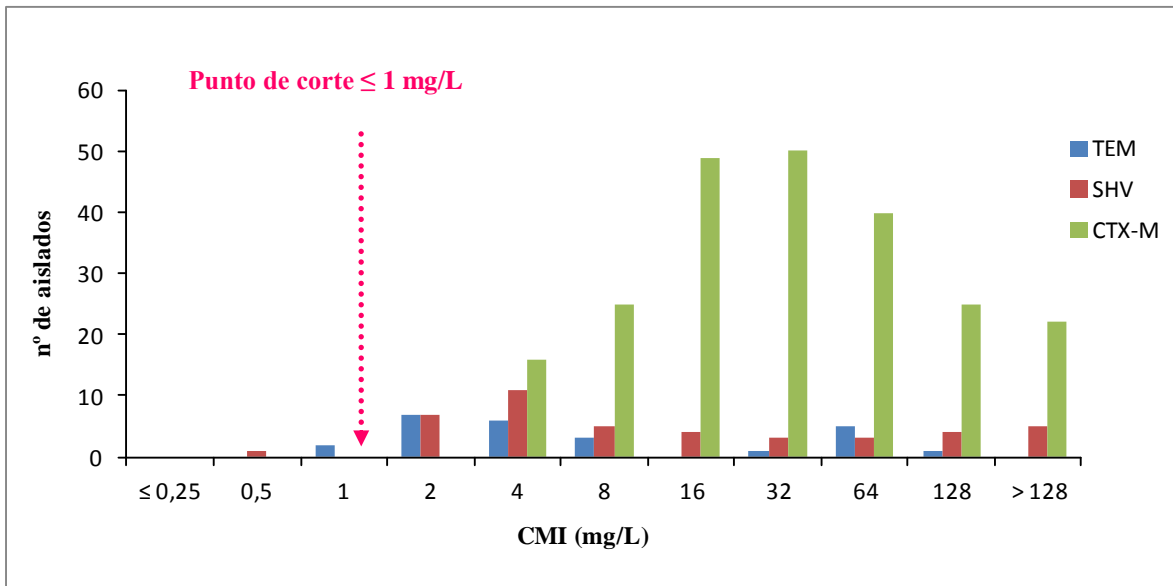


**Figura 27:** Grupos de CTX-M detectados en nuestros aislados de *E. coli*.

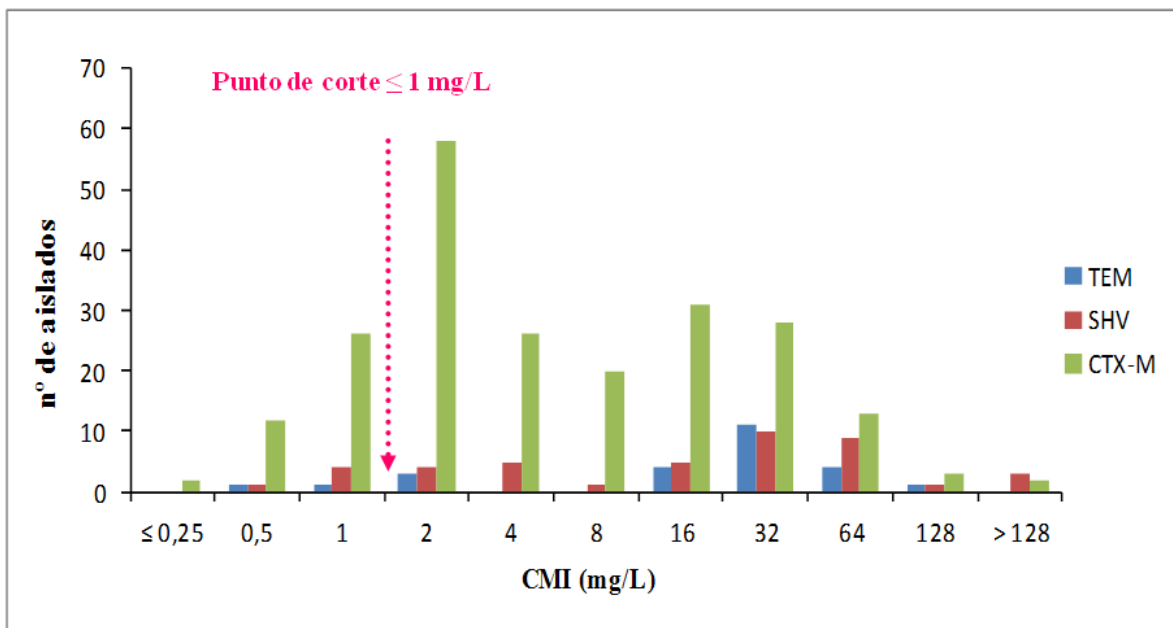
Se secuenciaron un 10% de las cepas productoras de CTX-M. Los 9 aislados pertenecientes al grupo CTX-M-9 secuenciados fueron del tipo CTX-M-14. De los aislados pertenecientes al grupo CTX-M-1 los dos que no eran CTX-M-15 resultaron ser productores del tipo concreto CTX-M-1.

#### 4.1.1 Distribución de las CMIs obtenidas para cada tipo de BLEE

Se relacionaron las CMIs de cefotaxima y ceftazidima con los distintos tipos de BLEEs determinados (Figuras 28 y 29).



**Figura 28:** CMI de cefotaxima en función del tipo de BLEE.



**Figura 29:** CMI de ceftazidima en función del tipo de BLEE.

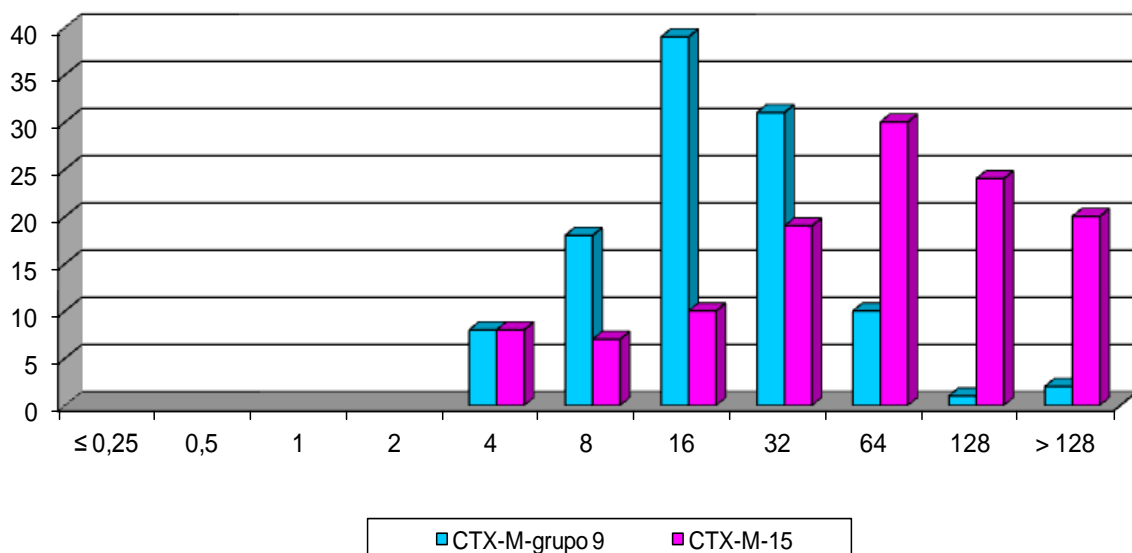
El 64% de las cepas productoras de BLEE tipo TEM fueron resistentes a cefotaxima (CMI > 2 mg/L) y el 80% a ceftazidima (CMI > 4 mg/L), siendo ceftazidima la cefalosporina que presentó el porcentaje de resistencia más elevado.

Las cepas productoras de BLEE tipo SHV presentaron un porcentaje de resistencia de 81,4% y 67,4% para cefotaxima y ceftazidima, respectivamente, siendo cefotaxima la cefalosporina que presentó el porcentaje de resistencia más elevado en este grupo de BLEEs.

El 100% de las cepas productoras de BLEE tipo CTX-M fueron resistentes a cefotaxima y el 42,7% a ceftazidima.

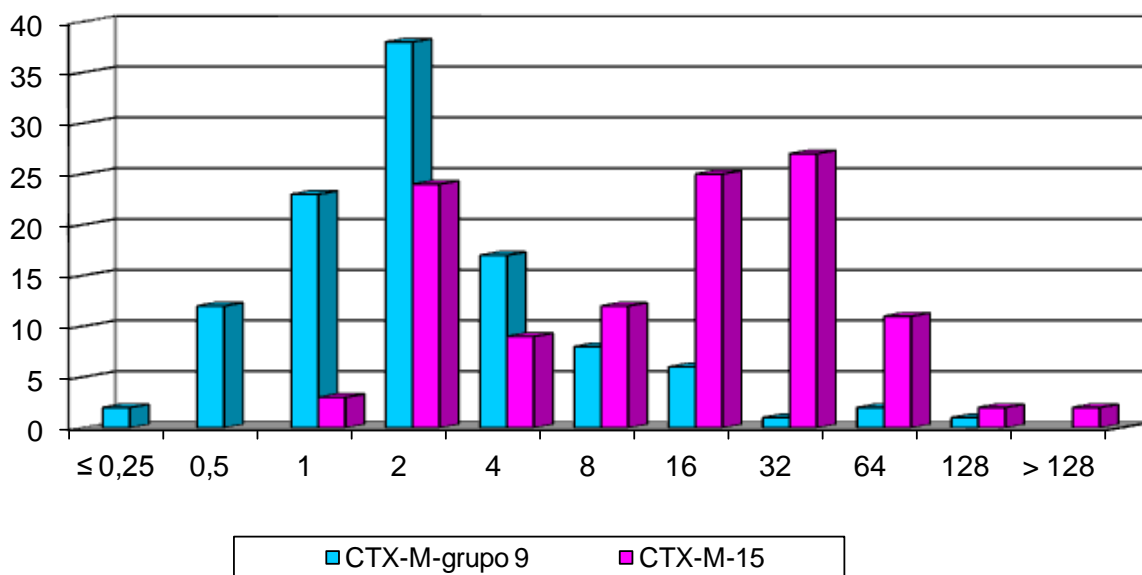
Las figuras 30 y 31 muestran los valores de CMIs de cefotaxima y ceftazidima de las cepas productoras de CTX-M-grupo 9 y CTX-M-15.

En el gráfico 30 se observa que la resistencia a cefotaxima fue del 100% en ambos grupos. Las cepas productoras de CTX-M-grupo 9 presentan una distribución unimodal, en torno a 16 mg/L de cefotaxima. Mientras que las cepas productoras de CTX-M-15 tienen unas CMIs más elevadas de esta cefalosporina con una distribución en torno a 64 mg/L.



**Figura 30:** CMI de cefotaxima de las cepas productoras de CTX-M-grupo 9 y CTX-M-15.

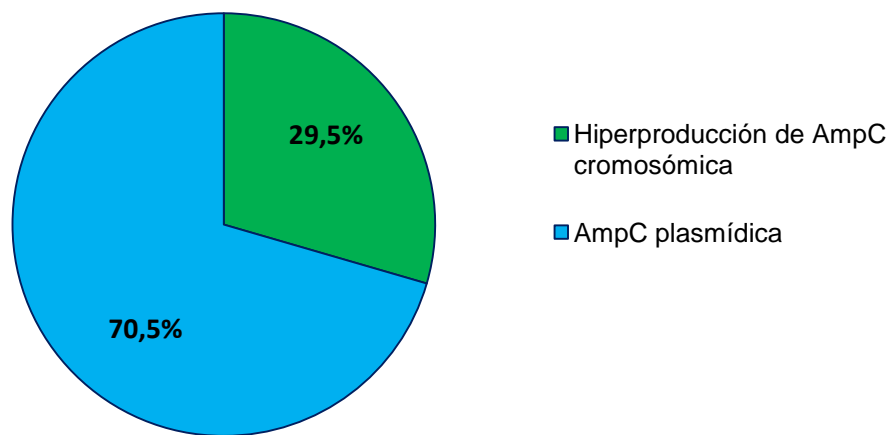
En la figura 31 se observa que las cepas productoras de CTX-M-grupo 9 fueron más sensibles a ceftazidima con una distribución unimodal en torno a 2 mg/L, siendo resistentes sólo el 16,7%. Las CMI's más elevadas a esta cefalosporina se observaron en las cepas productoras de CTX-M-15, donde vemos una distribución bimodal, cepas en torno a 2 mg/L y las resistentes, el 67%, en torno a 32 mg/L.



**Figura 31:** CMI de ceftazidima de las cepas productoras de CTX-M-grupo 9 y CTX-M-15.

#### 4.2 Caracterización molecular de las AmpC

El 12,7% (44/347) de los aislados incluidos en nuestro estudio resultaron ser productores exclusivamente de  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC. En la Figura 32 vemos que de los 44 aislamientos productores de AmpC, 31 (70,5%) fueron positivos en la detección de AmpC plasmídica por PCR, y 13 (29,5%) se consideraron hiperproductores de AmpC cromosómica, según los criterios señalados en el apartado de material y métodos.

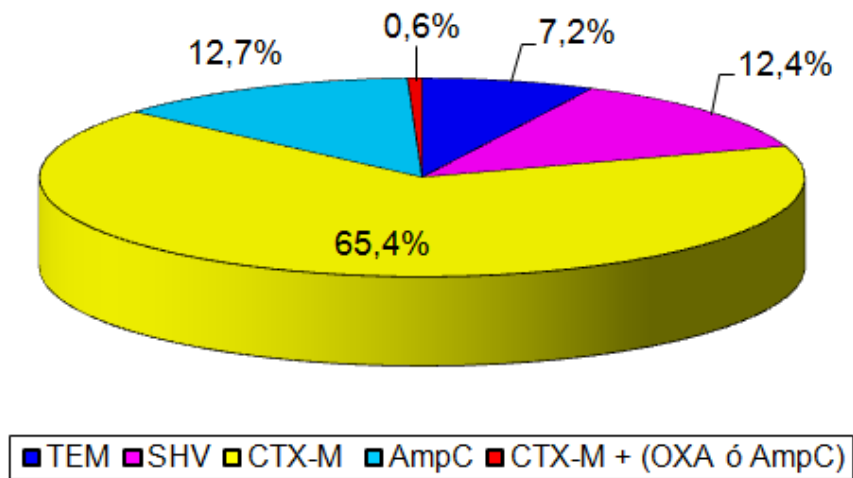


**Figura 32:** Tipos de β-lactamasas AmpC detectadas en 44 aislamientos de *E. coli*.

En cuanto a las AmpC plasmídicas, el 100% pertenecían a la familia CIT y en concreto al grupo CMY. De ellas, se secuenciaron un 35% (11/31) y en todos los casos resultaron ser CMY-2.

#### 4.3 β-lactamasas detectadas en las 347 cepas de *E. coli* estudiadas

Respecto al total de nuestros aislados, en la figura 33 se representan los porcentajes obtenidos de β-lactamasas AmpC, de los distintos tipos de BLEE y de las cepas HCSC 167 (productora de BLEE (CTX-M-grupo 9) y AmpC) y HCSC 397 (resistente a ertapenem y productora de BLEE (CTX-M-grupo 9) y OXA-48).

**Tipos de  $\beta$ -lactamasas caracterizadas por PCR**

**Figura 33:** Tipos de  $\beta$ -lactamasas determinados en las 347 cepas de *E. coli* estudiadas.

Las  $\beta$ -lactamasas mayoritarias resultaron ser de tipo BLEE (85%). El porcentaje restante incluye los 44 aislamientos (12,7%) productores de AmpC, las cepas HCSC 167 y HCSC 397 (0,6%) y los seis aislados (1,7%) con test de sinergia positivo que no amplificaron con ninguno de los genes BLEE estudiados.



## 5. Antibióticos aminoglucósidos

### 5.1 Estudios de sensibilidad a aminoglucósidos

De los 347 aislados de *E. coli* incluidos en nuestro estudio, 144 (41,5%) fueron resistentes al menos a uno de los aminoglucósidos ensayados. El porcentaje de resistencia a los diferentes aminoglucósidos estudiados se muestra en la tabla 14. Del total de aislamientos incluidos en nuestro estudio, el 26,2% (91/347) fueron resistentes a dos o más de los aminoglucósidos ensayados.

**Tabla 14:** Actividad *in vitro* de los aminoglucósidos estudiados frente a 347 cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de 3ª generación.

Aminoglucósidos	CMI (mg/L)		Puntos de corte (mg/L)		Resistencia (%)
	Intervalo	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	EUCAST*	
<b>Gentamicina</b>	<0,125 - > 64	1	64	> 4	97 (27,9%)
<b>Tobramicina</b>	<0,125 - > 64	1	32	> 4	136 (39,2%)
<b>Amikacina</b>	0,5 - > 64	4	8	> 16	5 (1,5%)
<b>Plazomicina</b>	0,25 - 4	1	1	-	-

\*EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

Utilizando los puntos de corte del EUCAST el porcentaje de resistencia más alto se observó para tobramicina (39,2%), seguido por gentamicina (27,9%) y amikacina (1,5%). Plazomicina mostró la mejor actividad siendo el valor de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de 1 mg/L.

Se observaron cinco fenotipos de resistencia diferentes entre los 144 aislados de *E. coli* resistentes a alguno de los aminoglucósidos estudiados (Tabla 15).

**Tabla 15:** Perfil fenotípico de resistencia a los aminoglucósidos ensayados en los 144 aislados de *E. coli* resistentes según EUCAST.

Nº de aislados	Perfil fenotípico
86	Gm, To
45	To
8	Gm
3	Gm, To, Ak
2	To, Ak

Ak, amikacina; Gm, gentamicina; To, tobramicina

El fenotipo de resistencia más frecuente fue gentamicina/tobramicina ( $n = 86$ ; 59,7%), seguido por tobramicina ( $n = 45$ ; 31,3%). Sólo tres (2,1%) de los 144 aislados fueron resistentes a los tres aminoglucósidos (Gm, To, Ak). Tobramicina fue el aminoglucósido menos activo, con un 94,4% (136/144) de cepas resistentes. A su vez, todas las cepas resistentes a amikacina lo fueron también a tobramicina.

En la Tabla 16 se observa que, si se dividen los aislados según su resistencia a tobramicina, gentamicina y amikacina, las medianas de las CMI de los otros tres aminoglucósidos fueron significativamente mayores, es decir, los valores de CMI fueron más elevados entre las cepas resistentes a cada uno que entre las cepas sensibles, con la excepción de gentamicina y la resistencia a amikacina. Es destacable que las CMI de plazomicina fueron también más altas en los aislados resistentes a tobramicina ( $P = 0,018$ ), gentamicina ( $P = 0,031$ ) y amikacina ( $P = 0,003$ ) que entre los sensibles. Estos datos se calcularon utilizando el test U de Mann-Whitney.

La correlación, establecida mediante la prueba de rangos de Spearman, entre las CMI de plazomicina y amikacina fue mayor ( $r = 0,600$ ,  $P < 0,001$ ) que la correlación entre las CMI de plazomicina y tobramicina ( $r = 0,271$ ,  $P < 0,001$ ) y gentamicina ( $r = 0,112$ ;  $P = 0,038$ ), respectivamente. Siendo  $r$  el coeficiente de correlación.

**Tabla 16:** Sensibilidad *in vitro* a varios aminoglucósidos, en función de la resistencia o sensibilidad a tobramicina, gentamicina y amikacina, respectivamente.

Aminoglucósidos	CMI (mg/L)				CMI (mg/L)				P-valor <sup>b</sup>
	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	Resistencia <sup>a</sup>	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	Resistencia <sup>a</sup>	
	<b>Sensibles a tobramicina (n=211)</b>				<b>Resistentes a tobramicina (n=136)</b>				
<b>Gentamicina</b>	1	2	≤ 0,12 - 64	3,7 %	64	> 64	0,5 - >64	64,7 %	< 0,001
<b>Amikacina</b>	4	4	1 - 8	0 %	8	16	2 - >64	3,7 %	< 0,001
<b>Plazomicina</b>	1	1	0,25 - 2	NA	1	1	0,25 - 4	NA	0,018
	<b>Sensibles a gentamicina (n=250)</b>				<b>Resistentes a gentamicina (n=97)</b>				
<b>Tobramicina</b>	1	16	≤ 0,12 - 32	18,8 %	16	32	1 - >64	89,6 %	< 0,001
<b>Amikacina</b>	4	8	1 - 64	0,8 %	4	8	2 - >64	3,1 %	0,001
<b>Plazomicina</b>	1	1	0,25 - 4	NA	1	1	0,25 - 4	NA	0,031
	<b>Amikacina CMI ≤ 8 mg/L<sup>c</sup> (n=321)</b>				<b>Amikacina CMI &gt; 8 mg/L<sup>c</sup> (n=26)</b>				
<b>Tobramicina</b>	1	16	≤ 0,12 - 32	33,4 %	32	64	8 - >64	100 %	< 0,001
<b>Gentamicina</b>	1	64	≤ 0,12 - 64	27,4 %	2	> 64	1 - >64	34,6 %	0,742
<b>Plazomicina</b>	1	1	0,25 - 4	NA	1	2	0,5 - 4	NA	0,003

<sup>a</sup> Puntos de corte de EUCAST; NA: no aplicable

<sup>b</sup> El P-valor indica la diferencia entre el valor de la mediana de la CMI de los respectivos aminoglucósidos entre los aislamientos sensibles y resistentes a tobramicina, gentamicina y amikacina. Este dato se calculó utilizando el test U de Mann-Whitney.

<sup>c</sup> Para esta comparación, se consideró el valor del epidemiological cut-off (ECOFF, punto de corte epidemiológico) de la amikacina (CMI > 8 mg/L)

## 5.2 Sensibilidad a los aminoglucósidos en función del tipo de $\beta$ -lactamasa

En la tabla 17 se resumen los resultados de la sensibilidad a los aminoglucósidos en relación con el tipo de  $\beta$ -lactamasa producida por los aislados de *E. coli*. De las 347 cepas 301 eran productoras de BLEE y 44 de AmpC. En ambos grupos plazomicina fue el antibiótico más activo, presentando una CMI 50 y 90 de 1 mg/L y un intervalo de 0,25 – 4 mg/L o 0,5 – 2 mg/L. Al comparar los resultados de sensibilidad de tobramicina, gentamicina, amikacina y plazomicina solo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el caso de amikacina (P= 0,02), donde las cepas productoras de BLEE fueron más resistentes que las cepas productoras de AmpC. Todos los aislados productores de AmpC fueron sensibles a amikacina con CMIs  $\leq$  8 mg/L.

**Tabla 17:** Sensibilidad *in vitro* de los aminoglucósidos ensayados por dilución en agar en las 347 cepas de *E. coli* según el tipo de  $\beta$ -lactamasa producido.

Aminoglucósidos	BLEE (301)				AmpC (44)				P valor	CMI (mg/L)	
	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	Resistentes* (%)	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	Resistentes* (%)		BLEE+AmpC	BLEE+OXA 48
										HCSC 167	HCSC 397
Gentamicina	1	64	≤ 0,125 - >64	85 (28,2)	1	64	0,5 - >64	11 (25)	0,62	64	1
Tobramicina	1	32	≤ 0,125 - >64	123 (40,9)	1	8	0,5-32	12 (27,3)	0,08	8	1
Amikacina	4	8	0,5 - >64	5 (1,7)	2	4	2 - 8	0	0,02	4	4
Plazomicina	1	1	0,25 - 4	NA	1	1	0,5 - 2	NA	0,75	1	2

\*CMIs en mg/L; Los puntos de corte fueron definidos por EUCAST

### 5.3 Caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos

Al menos un gen EMA se detectó en el 94,5% de las 144 cepas resistentes ensayadas. No se detectó ninguno de los genes estudiados en 8 aislados (5,5%), cuatro de ellos resistentes a gentamicina y tobramicina ( $\text{CMI} \geq 8 \text{ mg/L}$ ).

El gen más común fue *aac(6')-Ib* (90 cepas; 62,5%), seguido por *aac(3)-IIa* (37 cepas; 25,7%), *aph(3')-Ia* (30 cepas; 20,8%) y *ant(2'')-Ia* (19 cepas; 13,2%). En total, 98 aislados (68%) presentaron un único gen de EMAs; 36 aislados (25%) presentaron dos de los genes codificantes de EMAs estudiados, siendo *aac(6')-Ib* + *aph(3')-Ia* (13 cepas) y *aac(6')-Ib* + *ant(2'')-Ia* (7 cepas) las combinaciones más frecuentes observadas. Dos aislados (1,4%) presentaron tres genes EMAs simultáneamente.

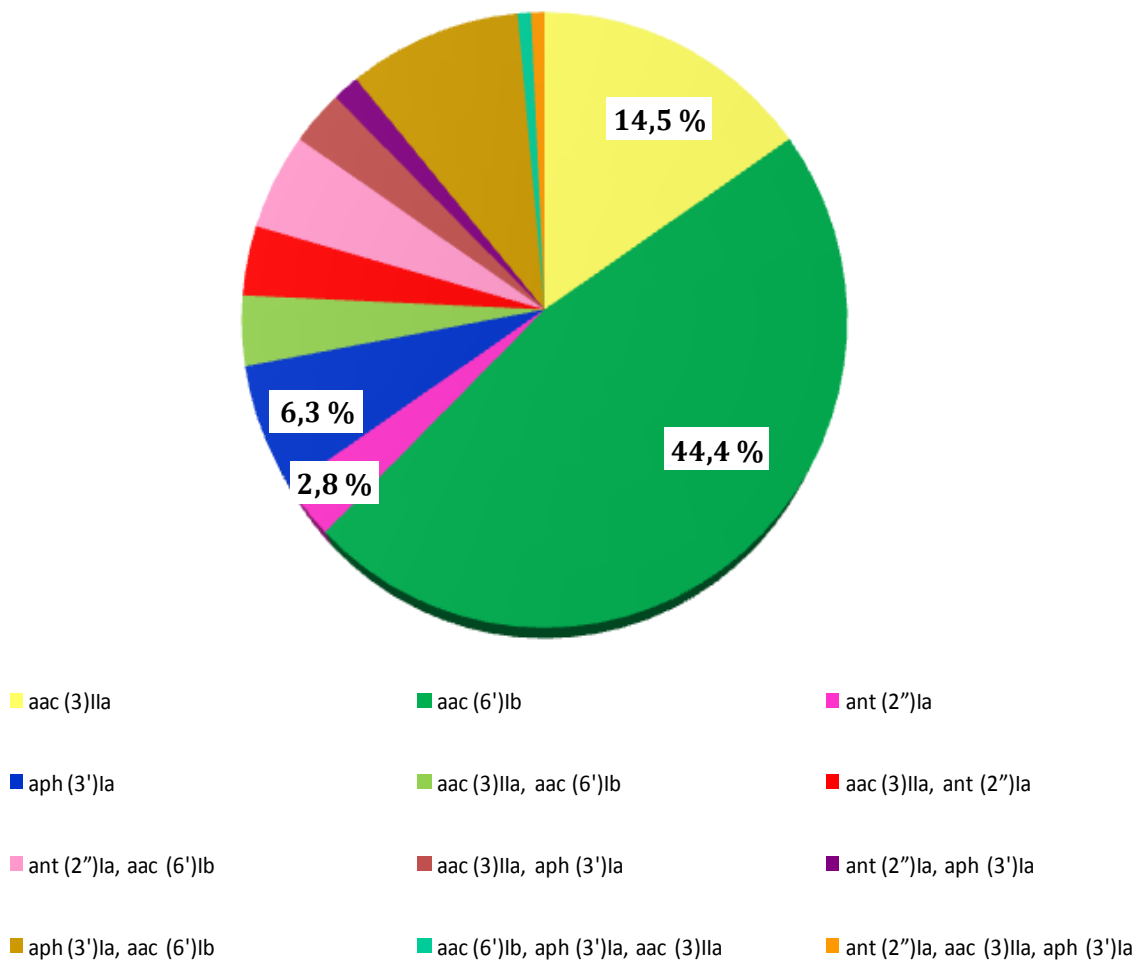
La prevalencia de los genes que codifican EMAs y sus combinaciones en los 144 aislados de *E. coli* resistentes a aminoglucósidos se muestran en la Tabla 18 y en la Figura 34.

**Tabla 18:** Prevalencia de genes de enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs) entre las 144 cepas de *E. coli* resistentes a los aminoglucósidos en relación a su CMI.

Genes EMAs	N° de aislados (%)	CMI <sub>50</sub> / CMI <sub>90</sub> (mg/L)				Intervalo (mg/L)				Resistentes* (%)			
		Ak	Gm	To	Plz	Ak	Gm	To	Plz	Ak	Gm	To	Plz
<i>aac(6')-Ib</i>	64 (44,4)	8/16	2/>64	16/32	1/1	2-64	0,5->64	8-64	0,25-4	2(3,1)	24(37,5)	64(100)	NA
<i>aac(3)-IIa</i>	21 (14,5)	4/4	>64/>64	8/8	1/1	2-8	64->64	4-32	0,5-2	0	21(100)	19(90.5)	NA
<i>aph(3')-Ia</i>	9 (6,3)	4/8	64/64	8/32	0,5/2	2-8	2-64	4-32	0,5-2	0	8(88,9)	7(77.8)	NA
<i>ant(2'')-Ia</i>	4 (2,8)	2/4	64/64	8/32	0,5/1	2-4	64-64	8-32	0,5-1	0	4(100)	4(100)	NA
<i>aac(6')-Ib + aph(3')-Ia</i>	13 (9,02)	8/16	64/64	32/32	1/1	4-64	0,5->64	16-32	0,5-1	1(7,7)	8(61,5)	13(100)	NA
<i>aac(6')-Ib + ant(2'')-Ia</i>	7 (4,9)	8/32	32/64	32/64	1/4	2-32	8-64	8-64	0,5-4	1(14,3)	7(100)	7(100)	NA
<i>aac(6')-Ib + aac(3)-IIa</i>	5 (3,5)	8/>64	>64/>64	32/>64	0,5/1	2->64	64->64	16->64	0,5-1	1(20)	5(100)	5(100)	NA
<i>aac(3)-IIa + ant(2'')-Ia</i>	5 (3,5)	4/4	64/64	8/8	1/1	2-4	64-64	4-8	0,5-1	0	5(100)	4(80)	NA
<i>aac(3)-IIa + aph(3')-Ia</i>	4 (2,8)	2/4	64/>64	8/8	0,5/1	2-4	64->64	8-8	0,5-1	0	4(100)	4(100)	NA
<i>ant(2'')-Ia + aph(3')-Ia</i>	2 (1,4)	2/4	64/>64	16/16	0,5/1	2-4	64->64	16-16	0,5-1	0	2(100)	2(100)	NA
<i>aac(6')Ib+aac(3)-IIa+aph(3')-Ia</i>	1 (0,7)	8/8	32/32	16/16	1/1	8-8	32-32	16-16	1-1	0	1(100)	1(100)	NA
<i>aac(3)IIa+ant(2'')Ia+ aph(3)-Ia</i>	1 (0,7)	8/8	>64/>64	16/16	2/2	8-8	>64->64	16-16	2-2	0	1(100)	1(100)	NA
Ningún gen	8 (5,5)	4/8	32/64	8/32	0,5/2	2-8	1-64	1-32	0,5-2	0	7(87.5)	5(62.5)	NA

Ak, amikacina; Gm, gentamicina; Plz, plazomicina; To, tobramicina; NA: no aplicable; Puntos de corte establecidos por EUCAST

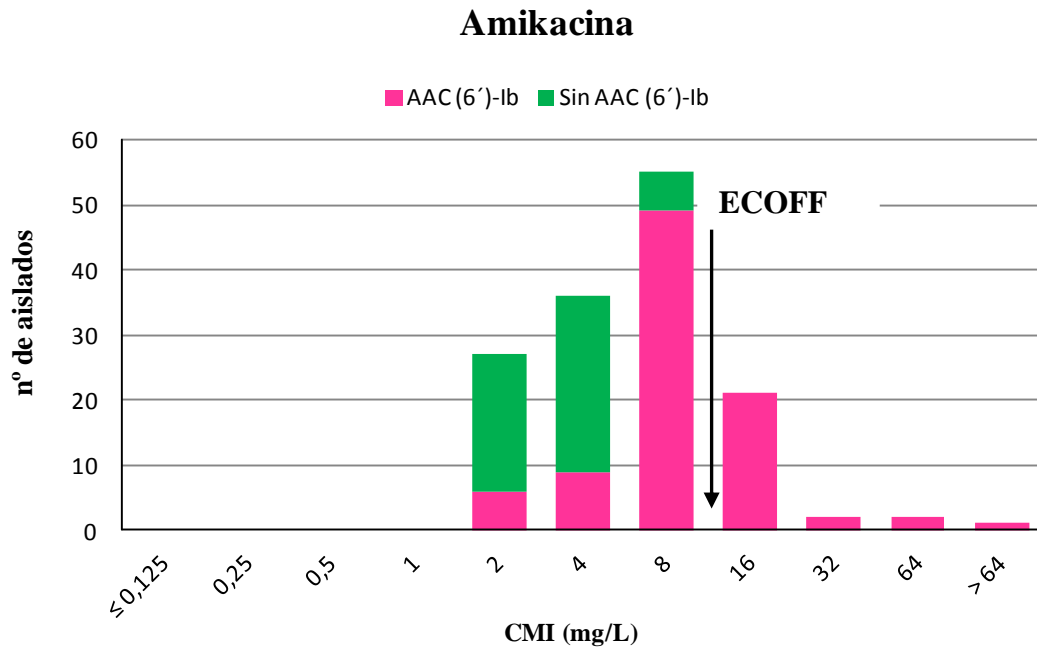




**Figura 34:** Genes EMAs y sus combinaciones presentes en 144 aislados de *E. coli* resistentes a aminoglucósidos.

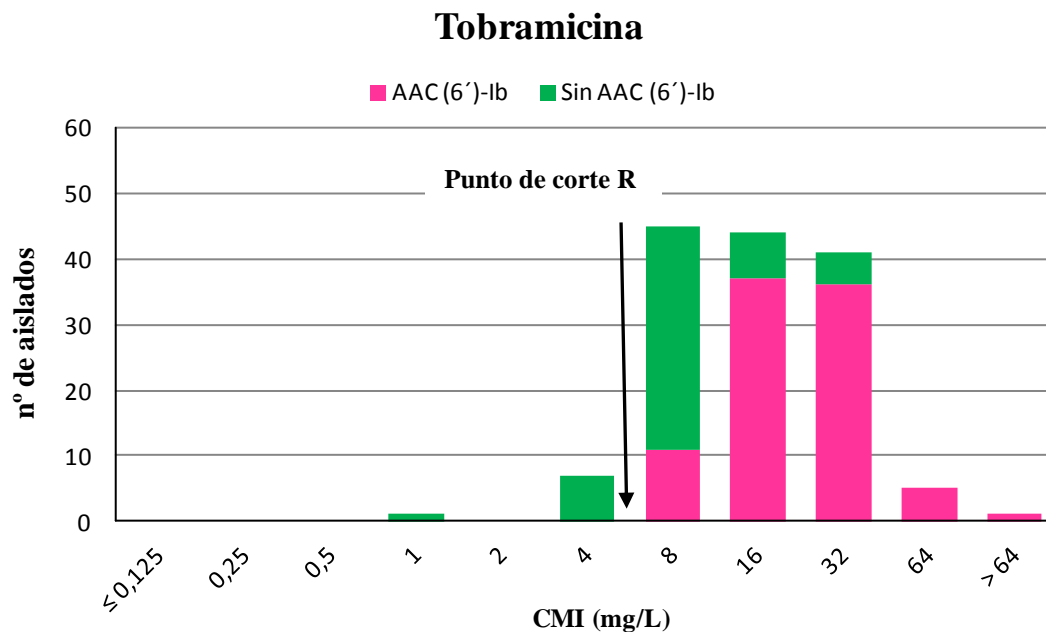
El gen *aac(6')-Ib* fue el más prevalente detectándose como gen único en 64 cepas. Todas mostraron resistencia a tobramicina, 23 a gentamicina y sólo dos a amikacina. Con respecto a este antibiótico cabe resaltar que en los 5 aislados resistentes se detectó el gen *aac(6')-Ib*, sólo o asociado con otros genes, además, si consideramos el punto de corte epidemiológico (ECOFF) de EUCAST, todos los aislados con una CMI > 8 mg/L para amikacina presentaron el gen (Figura 35) y la relación entre presencia del gen

*aac(6')-Ib* y valores de CMI > 8 mg/L de amikacina fue estadísticamente significativa ( $P < 0,01$ ).



**Figura 35:** Distribución de CMIs de amikacina en los 144 aislados resistentes a aminoglucósidos en función de la presencia o no del gen *aac(6')-Ib*.

Todas las cepas en las que se detectó el gen *aac(6')-Ib* sólo o en combinación con otros genes EMAs fueron a resistentes a tobramicina ( $P < 0,01$ ). Este dato aparece representado en la figura 36.



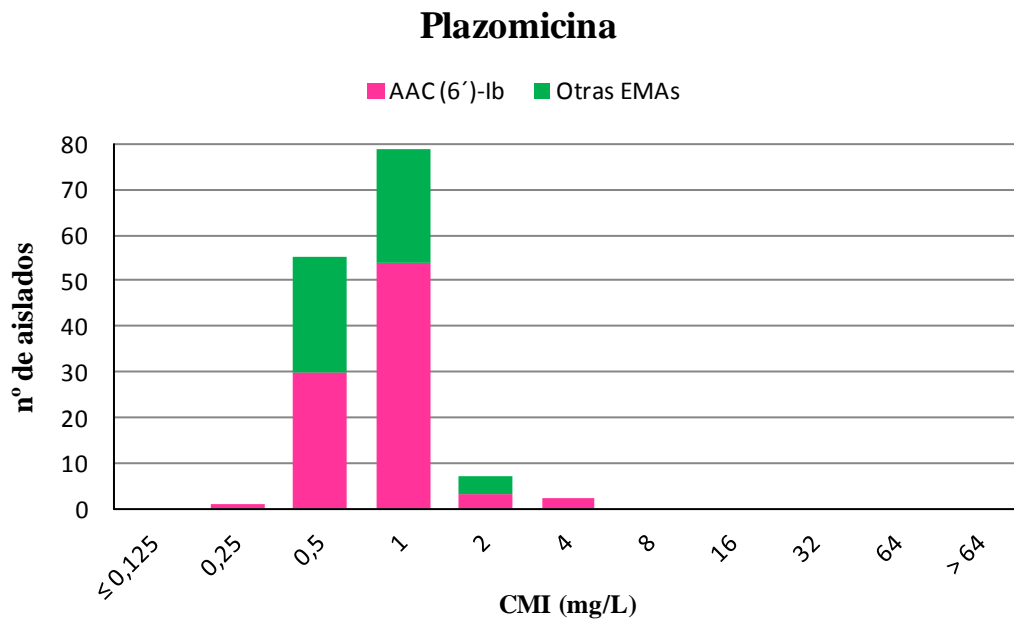
**Figura 36:** Distribución de CMI de tobramicina en los 144 aislados resistentes a aminoglucósidos en función de la presencia o no del gen *aac(6')-Ib*.

El segundo gen más frecuente fue *aac(3)-IIa*. En 21 aislados se detectó este único gen, siendo todas estas cepas resistentes a gentamicina con CMI > 32 mg/L. Diecinueve de estos aislados presentaban resistencia específica para gentamicina y tobramicina, coincidiendo el fenotipo de resistencia observado con el esperado. La presencia del gen *aac(3)-IIa* sólo o en combinación con otros genes EMA se asoció con la resistencia a gentamicina ( $P < 0,01$ ), pero no con la resistencia a tobramicina.

El gen *aph(3')-Ia* se encontró en 30 aislados (20,8%), 9 de los cuales fueron positivos sólo para este gen. No se asoció con resistencia a ninguno de los antimicrobianos ensayados.

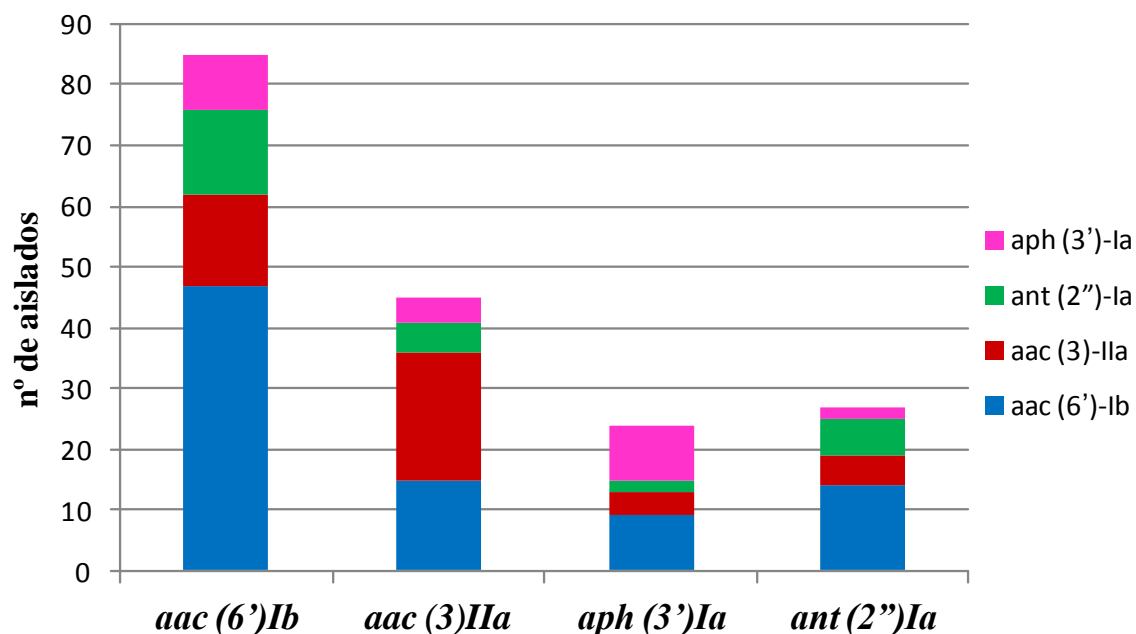
El gen detectado en menor frecuencia fue *ant(2'')-Ia*. Dicho gen fue positivo en 19 aislados, 4 de ellos presentaron este único gen. Las 19 cepas fueron resistentes a gentamicina. La presencia de *ant(2'')-Ia* en cualquier combinación se asoció con la resistencia a gentamicina ( $P < 0,01$ ) pero no con la resistencia a tobramicina.

La actividad de plazomicina no se asoció con la presencia de ninguno de los genes estudiados, independientemente de la presencia del gen *aac(6′)-Ib* (Figura 37).



**Figura 37:** Distribución de CMI de plazomicina en los 144 aislados resistentes a aminoglucósidos en función de la presencia o no del gen *aac(6′)-Ib*.

Las cepas mostraron una notable diversidad de EMAs, identificándose 12 patrones diferentes (Figura 38).



**Figura 38:** Genes EMAs y sus combinaciones presentes en los aislados de *E. coli* resistentes a aminoglucósidos.

Cuando los genes de EMAs se correlacionaron con los diferentes tipos de BLEEs y AmpC (Tabla 19), se encontró que la presencia del gen *aac(6')-Ib* se asoció con la producción de CTX-M-15 ( $P < 0,01$ ). El gen *aac(3)-IIa* se asoció con la presencia de BLEE distinta de CTX-M-15, en concreto con el grupo CTX-M-9 ( $P < 0,01$ ) y el gen *ant(2'')-Ia* se asoció con la presencia de p-AmpC ( $P = 0,03$ ).

**Tabla 19:** Prevalencia de genes de enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs) en los aislados de *E. coli* resistentes al menos a uno de los aminoglucósidos ensayados y su correlación con el tipo de  $\beta$ -lactamasa caracterizada.

Genes EMAs	N° de aislados (%)				N° total de aislados (144)
	BLEE (128)		AmpC (16)		
	CTX-M-15	Otras BLEE	CMY-2	c-AmpC	
	73 isolates	55 isolates	6 isolates	10 isolates	
<i>aac(6')-Ib</i>	64 (87,7) <sup>a</sup>	19 (34,5)	2 (33,3)	5 (50)	90 (62,5)
<i>aac(3)-IIa</i>	5 (6,8)	29 (52,7) <sup>b</sup>	2 (33,3)	1 (10)	37 (25,7)
<i>aph(3')-Ia</i>	15 (20,5)	12 (21,8)	1 (16,7)	2 (20)	30 (20,8)
<i>ant(2'')-Ia</i>	7 (9,6)	6 (10,9)	3 (50) <sup>c</sup>	3 (30)	19 (13,2)

<sup>a</sup>P-valor < 0,01; <sup>b</sup>P-valor < 0,01; <sup>c</sup>P-valor = 0,03 (test exacto de Fisher)

## 6. Estudios de sensibilidad de otros antibióticos no $\beta$ -lactámicos

En el presente trabajo, además de evaluar la sensibilidad de las 347 cepas *E. coli* frente a los aminoglucósidos, se analizó la sensibilidad frente a otros antimicrobianos no  $\beta$ -lactámicos (fosfomicina y nitrofurantoína). Los datos obtenidos se muestran en la tabla 20.

Si comparamos los resultados en función de la  $\beta$ -lactamasa detectada, encontramos que, en cuanto a la fosfomicina, el porcentaje de cepas BLEE resistentes a este antibiótico (15,3%) fue mayor que el de las cepas AmpC (4,5%). No obstante, la diferencia no fue significativa (P = 0,09). Por el contrario, los datos obtenidos del ensayo de sensibilidad con nitrofurantoína revelaron que independientemente de la producción de una u otra  $\beta$ -lactamasa no se observaron diferencias en ningún caso.

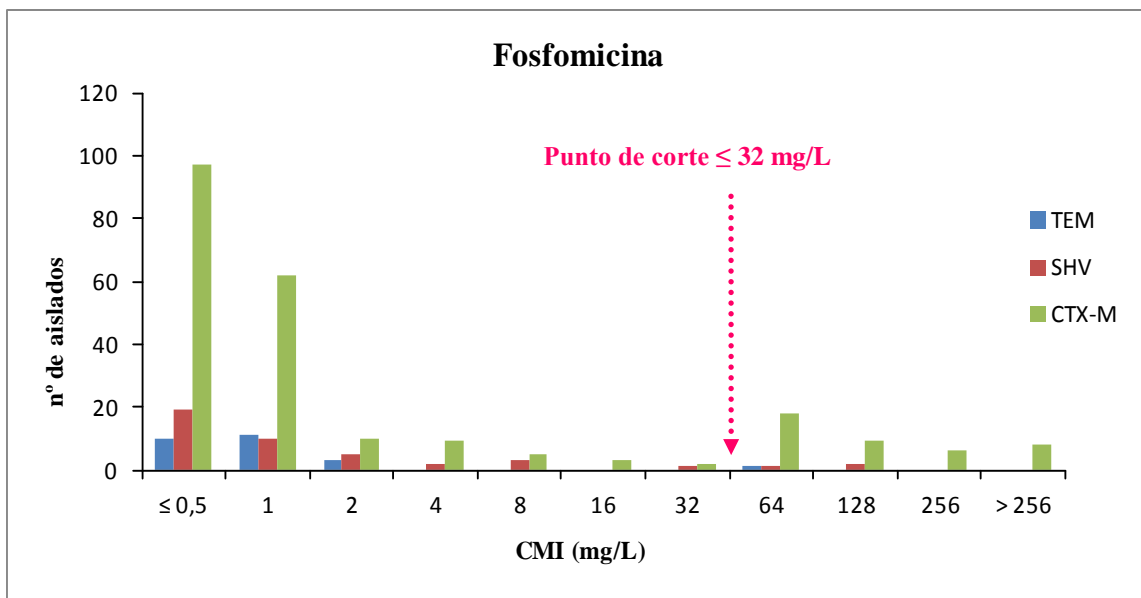
**Tabla 20:** Sensibilidad *in vitro* de otros antibióticos no  $\beta$ -lactámicos ensayados en las 347 cepas de *E. coli* según el tipo de  $\beta$ -lactamasa producido.

Agentes antimicrobianos	BLEE (301)				AmpC (44)				P valor	CMI (mg/L)	
	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	Resistentes* (%)	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Intervalo	Resistentes (%)		BLEE+AmpC HCSC 167	BLEE+ OXA 48 HCSC 397
<b>No <math>\beta</math>-lactámicos</b>											
Fosfomicina	1	64	$\leq 0,5 - >256$	46 (15,3)	1	8	$\leq 0,5 - >256$	2 (4,5)	0,09	64	8
Nitrofurantoína	16	64	1 - 128	14 (4,7)	16	64	8 - > 128	2 (4,5)	0,72	64	32

\*CMIs en mg/L; Los puntos de corte fueron definidos por EUCAST

## 6.1 Distribución en función del tipo de BLEE

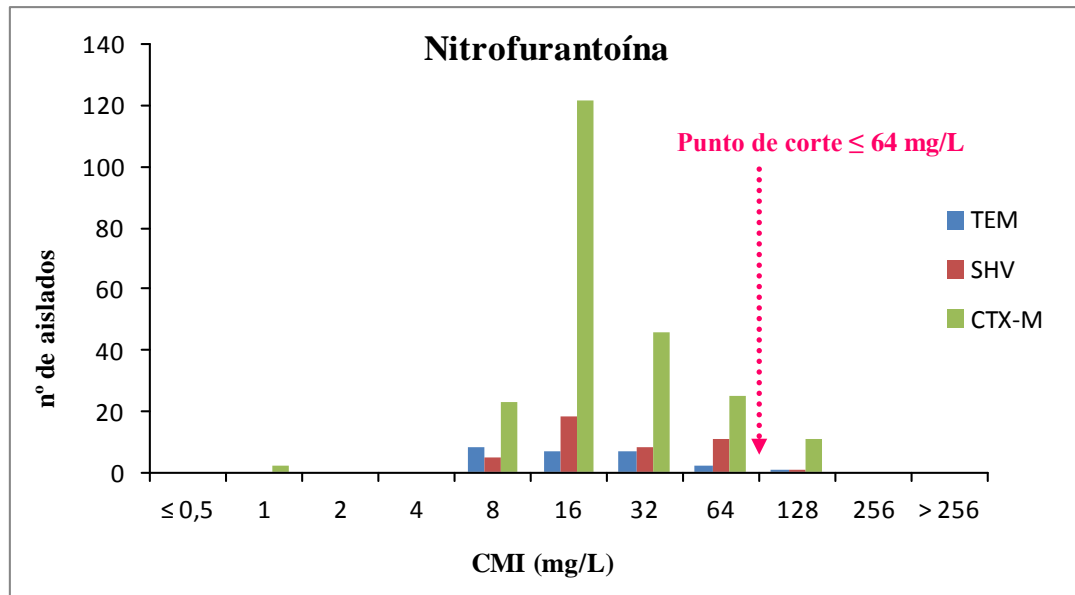
Se estudió la asociación entre la sensibilidad de nuestras cepas a fosfomicina y nitrofurantoína según el tipo de BLEE caracterizado (Figuras 39 y 40).



**Figura 39:** CMIs de fosfomicina en función de los tipos de BLEE.

El 18% (41/229), 7% (3/43) y 4% (1/25) de las cepas BLEE presentaron valores de CMIs > 32 mg/L para *bla*-CTX-M, *bla*-SHV y *bla*-TEM, respectivamente, siendo *bla*-CTX-M el tipo de BLEE que presentó mayor porcentaje de resistencia. Sin embargo, la resistencia a fosfomicina no se asoció significativamente a ningún tipo de BLEE.



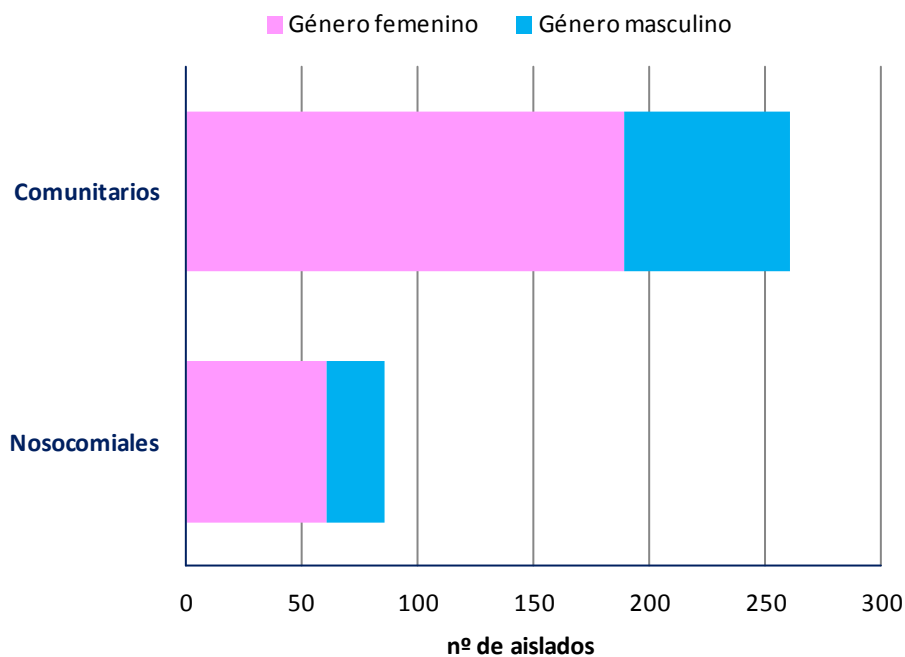


**Figura 40:** CMIs de nitrofurantoína en función de los tipos de BLEE.

En cuanto a los tipos de BLEE resistentes a nitrofurantoína, el tipo *bla*-CTX-M presentó el mayor porcentaje de resistencia (5%), *bla*-TEM 4% y *bla*-SHV 2%. Aunque la resistencia a nitrofurantoína no se asoció a ningún tipo de BLEE.

## 7. Datos epidemiológicos

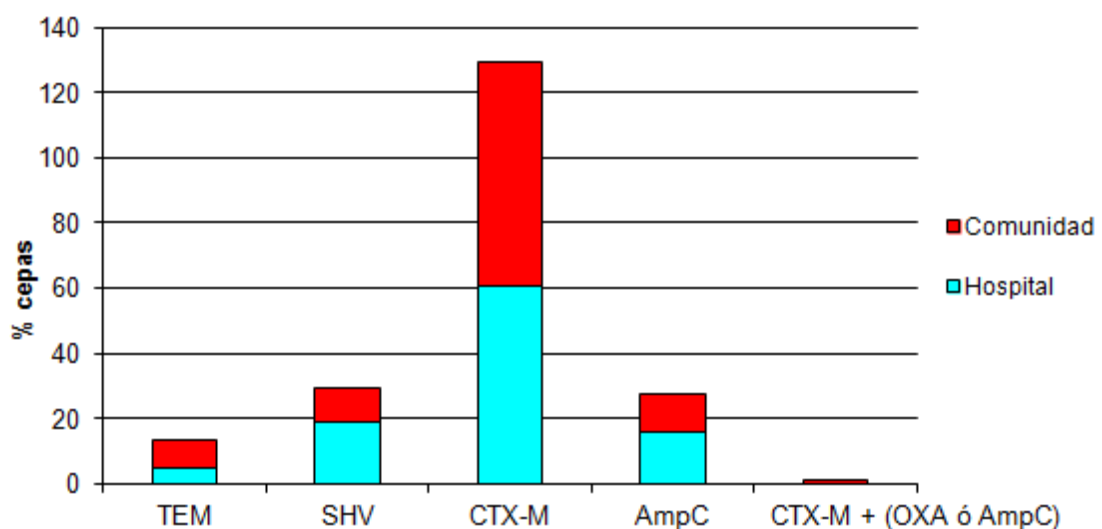
Respecto a los datos epidemiológicos de los 347 aislamientos clínicos de *E. coli* recogidos durante el periodo de estudio, el 25% de ellos (86 cepas) produjeron infecciones nosocomiales y el 75% (261 cepas) comunitarias. El 72% de los pacientes fueron mujeres y el 28% hombres (Figura 41). El 25,8% de los hombres y el 24,4% de las mujeres presentaron infección nosocomial, es decir, el porcentaje de infecciones nosocomiales fue similar en ambos géneros. La edad media de los pacientes de género masculino fue de 69 años (rango de edad de 22 a 100 años), y la de los pacientes de género femenino fue 70 años (rango de edad de 1 a 100 años) siendo el 70,4% mayor de 65 años, y el 0,8% menor de 18 años, tratándose de dos pacientes de edad pediátrica.



**Figura 41:** Número de cepas *E. coli* aisladas de pacientes de género femenino y masculino en función del origen de aislamiento.

### 7.1 Relación entre el inicio de la infección y el tipo de $\beta$ -lactamasa

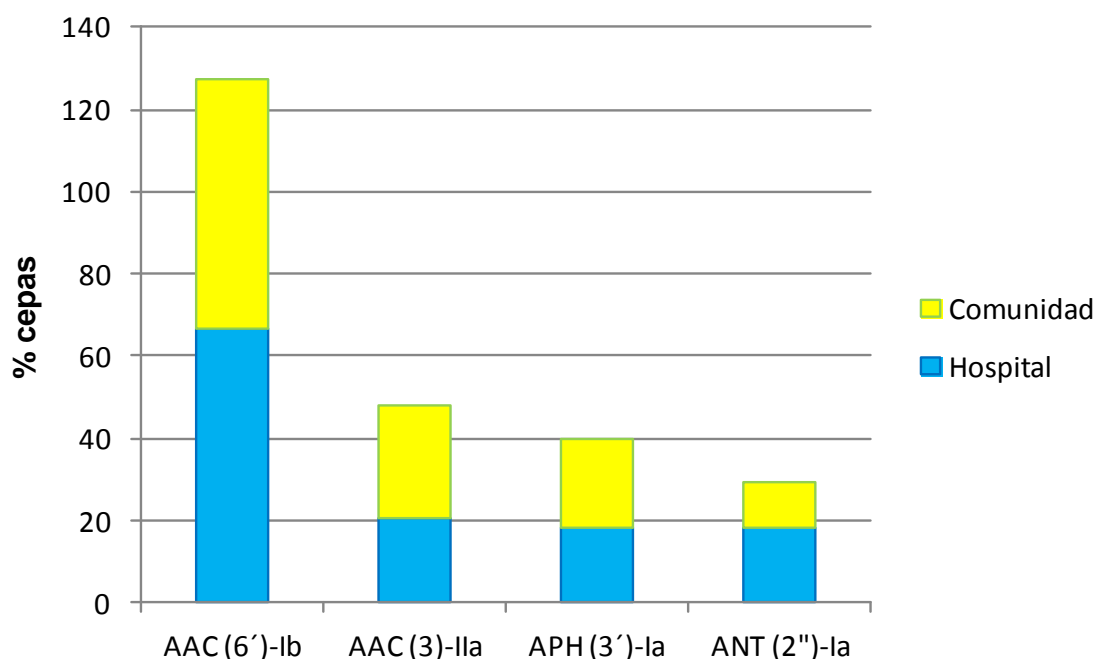
En la figura 42 se reflejan los datos obtenidos al relacionar el lugar de inicio de la infección con la  $\beta$ -lactamasa caracterizada. Las  $\beta$ -lactamasas mayoritarias resultaron ser de tipo BLEE, siendo el grupo más prevalente CTX-M tanto en la comunidad (68,5%) como en el hospital (60,7%). Las BLEE del tipo TEM resultaron porcentualmente más frecuentes en la comunidad y las SHV en el hospital. Por otro lado, en el hospital la presencia  $\beta$ -lactamasas AmpC resultó algo superior (15,5%) a la encontrada entre los aislados de la comunidad (12%), aunque la diferencia no fue significativa ( $P = 0,4$ ).



**Figura 42:** Distribución de las  $\beta$ -lactamasas identificadas según el lugar de inicio de la infección.

## 7.2 Relación entre el inicio de la infección y el tipo de enzima modificante de aminoglucósido

En cuanto al origen de las 144 cepas de *E. coli* resistentes a aminoglucósidos, 39 (27,1%) produjeron infecciones nosocomiales y 105 (72,9%) comunitarias. En la figura 43 se reflejan los datos obtenidos al relacionar el lugar de inicio de la infección con la EMA caracterizada. El gen *aac(6')-Ib* fue el más prevalente tanto en los aislados nosocomiales (26/39; 66,7%) como en los de origen comunitario (64/105; 60,9%). Los genes *aac(3)-IIa* y *aph(3')-Ia* se detectaron con una frecuencia porcentualmente mayor en la comunidad que en el hospital. Por el contrario, en el hospital el gen *ant(2'')-Ia* se detectó en un porcentaje superior (17,9%) que entre los aislados de la comunidad (11,4%).



**Figura 43:** Distribución de las EMAs identificadas según el lugar de inicio de la infección.

## **DISCUSIÓN**

---



## 1. Mecanismos de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *E. coli*

El principal mecanismo de resistencia a cefalosporinas de tercera generación entre los aislados de *E. coli* de nuestro estudio fue la producción de BLEEs (87,3%), mientras que la producción de  $\beta$ -lactamasas AmpC fue el restante 12,7%. Efectivamente, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en aislados clínicos de *E. coli* en Europa ha ido en aumento [120, 121] siendo la producción de BLEEs el mecanismo de resistencia más importante; en *E. coli*, esta resistencia también puede estar mediada por  $\beta$ -lactamasas AmpC [48, 49, 122, 123]. En Europa, las enterobacterias productoras de BLEE se han extendido a un ritmo alarmante. Se ha demostrado consistentemente que la tasa de BLEE en el continente europeo es más alta que en los EE.UU., aunque menor que en América y Asia [124].

Entre los aislados productores de BLEEs, el tipo CTX-M ha sido el principal (75,6%) y en porcentajes menores las BLEE tipo SHV (14,2%) y las TEM (8,2%). En una reciente revisión, los autores afirman que las  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M se han convertido en las BLEE más prevalentes en todo el mundo [42]. La diseminación mundial de CTX-M es uno de los ejemplos más sorprendentes de una difusión rápida y global de resistencia mediada por plásmidos entre bacterias patógenas. Las BLEE de tipo CTX-M ahora son las BLEE más comunes en *E. coli* [120].

En nuestro estudio hemos caracterizado las CTX-M, y hay que resaltar la alta prevalencia de CTX-M-15, el 50,2% de todas las CTX-M. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, que resaltan también CTX-M-15 [125-129]. A destacar un estudio realizado en el hospital más grande de Roma donde el 93% de las cepas *E. coli* productoras de BLEE resultaron ser CTX-M-15 [130].

Identificamos 2 aislados del tipo CTX-M-1 y el 48,9% restante pertenecía a CTX-M-grupo 9. En el continente europeo el grupo 1 de las CTX-M es el más prevalente, destacando dentro de este grupo el tipo CTX-M-15. Sin embargo, en el sureste de Europa, incluyendo España y Portugal, es también muy frecuente el grupo 9 de las CTX-M, representado principalmente por los tipos CTX-M-9 y CTX-M-14 [131]. Los datos reflejados en nuestro estudio son similares a otros trabajos realizados en España [125, 132].

Otras enzimas que dan resistencia a cefalosporinas de tercera generación son las  $\beta$ -lactamasas AmpC, en nuestro trabajo hemos encontrado que 44 cepas producían este tipo de enzima. Algunos autores [121] consideran que van en aumento en nuestro medio, no obstante, la presencia de estas  $\beta$ -lactamasas en *E. coli* sigue siendo menor en Europa que en Estados Unidos [120]. El fenotipo AmpC puede resultar de la adquisición de plásmidos: las p-AmpC, que se han descrito en todo el mundo [45, 123, 133], y su prevalencia, aunque sigue siendo relativamente baja, ha ido aumentando en los últimos años entre los aislados productores de AmpC. En nuestro trabajo, el 70,5% de las cepas con fenotipo AmpC resultaron portadoras de genes de AmpC plasmídica, todos de la familia CIT, y todas las secuencias realizadas resultaron ser CMY-2. Esta es la p-AmpC más generalizada [48]. El resultado de nuestro trabajo es similar a lo encontrado en varios estudios previos realizados en América y Europa en los cuales el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> fue el gen de p-AmpC predominante en *E. coli* [45, 121, 122, 134]. Sin embargo, en China es DHA-1 la variante detectada con más frecuencia [135]. En un reciente estudio multicéntrico realizado en nuestro país, la prevalencia de p-AmpC en aislamientos de *E. coli* aislados de muestras clínicas fue del 0,69%. Al igual que en el resto de Europa, la variante plasmídica CMY-2 fue la enzima encontrada con mayor frecuencia en este estudio (87,1%) [136].



## 2. Resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos

En nuestras cepas de *E. coli* productoras de BLEE encontramos un alto porcentaje de resistencia a **cefotaxima** (92,4%) que concuerda con la alta resistencia a esta cefalosporina detectada en estudios previos [137, 138]. En el estudio SMART (2009-2010) con pacientes hospitalizados, la resistencia a cefotaxima llegó al 99,3% [139].

En cuanto a la resistencia a **ceftazidima** en aislados *E. coli* BLEE, los datos publicados son más variados. En nuestro trabajo, el 50,5% de las cepas resultaron ser resistentes, porcentaje semejante al encontrado en Grecia [137]. En otro estudio español [138] el porcentaje de resistencia detectado en este tipo de cepas fue menor (23%), mientras que en el estudio SMART [139] la resistencia fue superior (66,8%).

La resistencia a **cefepima** entre los *E. coli* productores de BLEE de este estudio (34,5%) se encuentra entre las más bajas encontradas, en Grecia [137] publicaron un 47,3% y en el estudio SMART presentaron resistencia el 82,4% del total de aislamientos [139]. En un estudio español previo el porcentaje de resistencia fue incluso mayor, con un 96% [138].

Respecto a la resistencia a **amoxicilina/clavulánico**, en este trabajo, el 20,9% del total de nuestras cepas *E. coli* productoras de BLEE fueron resistentes. Se ha observado una resistencia similar en otros estudios. En el segundo estudio nacional en el que participaron 44 hospitales españoles se observó un 30,7% de cepas *E. coli* BLEE resistentes a A/C [125] y en otro trabajo realizado en España la resistencia fue del 41% [138].

En relación a **cefoxitina**, en este estudio se ha obtenido que el 96,7% de los aislados productores de BLEE fueron sensibles, y el 3,3% restante presentaron sensibilidad intermedia. Lo que corresponde al perfil esperado. En el segundo estudio nacional de BLEEs realizado en España, el 88,2% de las cepas presentaron sensibilidad a cefoxitina [125]. En el estudio SMART (2009-2010) se detectó sensibilidad a cefoxitina en el 79% de

los *E. coli* BLEE positivos [139]. La resistencia a cefoxitina en estas cepas se puede explicar por otros mecanismos adicionales [129].

En referencia a los aislados *E. coli* productores de  $\beta$ -lactamasas **AmpC** de este estudio, observamos una alta resistencia a **cefotaxima** (86,4%) similar a la encontrada en otros estudios [121, 134, 135].

El 93,2% de nuestras cepas *E. coli* productoras de **AmpC** fueron resistentes a ceftazidima. Esta elevada resistencia es similar a la publicada en otros trabajos [121, 135]. En un estudio reciente realizado en España se detectó que el 88,3% de los aislados *E. coli* AmpC presentaron resistencia a esta cefalosporina [134].

Todas las cepas **AmpC** del presente trabajo resultaron ser sensibles a **cefepima**, como era de esperar ya que esta cefalosporina es débilmente hidrolizada por este tipo de  $\beta$ -lactamasas [45]. Nuestros datos coinciden con otros autores cuyas cepas AmpC expresaron bajos valores de CMIs para cefepima [122]. No obstante, en *E. coli*, se ha descrito la existencia de  $\beta$ -lactamasas AmpC que presentan una actividad hidrolítica incrementada frente a cefepima debida a modificaciones estructurales en su centro activo [140]. En un trabajo publicado recientemente en España el 7,5% de los aislados *E. coli* productores de AmpC fueron resistentes a cefepima [134]. En otro estudio realizado en Dinamarca, todos los aislamientos fueron sensibles a cefepima, excepto tres de ellos, que contenían a su vez una BLEE (CTX-M-15) [141]. Es el mismo resultado obtenido en nuestro trabajo en la cepa HCSC 167 productora de c-AmpC y BLEE (CTX-M-grupo 9) que resultó tener una sensibilidad intermedia a cefepima.

Todos los aislados *E. coli* productores de  $\beta$ -lactamasas **AmpC** de este estudio fueron resistentes a **amoxicilina/clavulánico**. Este dato concuerda con lo descrito en la literatura

científica en la que se señala que la producción de AmpC es uno de los mecanismos de resistencia a A/C más frecuentes [135, 142, 143].

En cuanto a cefoxitina, todas las cepas **AmpC** de nuestro estudio fueron resistentes, lo que coincide con lo descrito y publicado por otros autores [122, 135] debido a la actividad hidrolítica de este tipo de  $\beta$ -lactamasas.

Todas las cepas (BLEE ó AmpC) fueron sensibles a **ertapenem**, excepto una que resultó ser productora de CTX-M y OXA-48. Estos datos coinciden con los descritos por otros autores que consideran a los carbapenémicos los antimicrobianos más activos frente a este tipo de aislados [125, 126, 138].

A partir del año 2000 aparecen las primeras cepas no sensibles a carbapenémicos, estas cepas presentaban alteraciones en las proteínas de la membrana externa asociadas con la producción de  $\beta$ -lactamasas BLEE o AmpC y afectaban fundamentalmente a ertapenem [52]. Más tarde aparecieron las carbapenemasas [57] a veces asociadas a BLEEs [144], y a otras  $\beta$ -lactamasas, lo que dificulta cada vez más la detección del tipo de  $\beta$ -lactamasa implicado mediante el análisis del fenotipo de resistencia [57].

*Hoban et al.* encontraron que un 1,4% de las cepas estudiadas fueron resistentes a ertapenem en *E. coli* productores de BLEE [139], en nuestro estudio tuvimos, un 0,3% (la cepa HCSC 397 productora de CTX-M-grupo 9 y OXA-48).

Una forma rápida de detectar las EPC es a través de los métodos fenotípicos, capaces de detectar la producción de carbapenemasas por la hidrólisis de un carbapenémico. Un método recomendado por el CLSI es el THM; el resultado de este test en la cepa de nuestro estudio HCSC 397 fue dudoso, al igual que los test de detección de MBL (inhibición con EDTA) y de las KPC (inhibición con PBA). Por lo que tuvimos que realizar las PCRs, debido a que la presencia simultánea de otros mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos,

como la producción de BLEE o la pérdida de porinas, dificulta enormemente la interpretación de las pruebas fenotípicas [97]. Aunque la resistencia a carbapenémicos en *E. coli* sigue siendo rara en Europa, con porcentajes de resistencia menores del 0,1%, el centro europeo para la prevención y el control de enfermedades (ECDC) considera que el aumento de la resistencia en *E. coli* junto con la alta frecuencia de aislados productores de BLEE podría conducir a un mayor uso de los carbapenémicos, favoreciendo así una mayor difusión de EPC [120].

### **3. Origen y epidemiología de la infección del tracto urinario**

En nuestro estudio la ITU causada por *E. coli* resultó más frecuente entre las mujeres (72%) que entre los hombres (28%), siendo la edad media en ambos casos elevada. Estos datos son similares a los informados por otros autores [145, 146].

En nuestro trabajo encontramos un porcentaje mayor de pacientes de origen comunitario (75%) que de pacientes hospitalizados (25%). La distribución de los tipos de BLEE fue semejante en ambos grupos un 4,8%, 19% y 60,7% de TEM, SHV y CTX-M en el hospital y un 8,2%, 10,5%, 68,5% de TEM, SHV y CTX-M en la comunidad. Lo que pone de manifiesto lo comentado por otros autores, una creciente prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en la comunidad [40]. Con respecto a las  $\beta$ -lactamasas AmpC, obtuvimos porcentajes similares en el ámbito hospitalario (15,5%) y comunitario (12%). Los resultados observados ponen de manifiesto que la presencia de aislados productores de AmpC representan una amenaza epidemiológica emergente en infecciones tanto dentro como fuera del entorno hospitalario [48, 122, 128, 147, 148].

#### 4. Resistencia a antibióticos aminoglucósidos

En general, las tasas de resistencia a tobramicina (39,2%) y gentamicina (27,9%) encontradas en este estudio fueron superiores a las encontradas anteriormente en cepas de *E. coli* [85, 149], lo que puede reflejar nuestra selección de cepas productoras de BLEE y AmpC. De hecho, en un estudio realizado en Noruega, las tasas de resistencia a gentamicina, tobramicina y amikacina fueron más elevadas en el grupo de las cepas *E. coli* productoras de BLEE que en los aislados de *E. coli* en general [127], indicando que el aumento de la prevalencia de resistencia a aminoglucósidos en enterobacterias se asocia en parte con la propagación de las BLEE. Otros autores encuentran esta co-resistencia [150]. En nuestro estudio la amikacina fue el aminoglucósido más activo con porcentajes de resistencia de 1,7% y 0% entre los aislados productores de BLEE y AmpC, respectivamente. Datos similares se obtuvieron en otros estudios previos con cepas *E. coli* productoras de BLEE [125, 127].

#### 5. Producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs)

En cuanto a la caracterización de las EMAs, al menos un gen fue encontrado en el 94,5% de las cepas, que mostraron también una notable diversidad de enzimas. Se identificaron 12 patrones distintos de EMAs, los cuales mostraron diferentes fenotipos de resistencia a aminoglucósidos. Además, utilizando los puntos de corte de EUCAST [100] fueron frecuentes las discrepancias entre el genotipo y el fenotipo de resistencia observado según la EMA presente. Los mismos resultados han sido publicados en aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* [84-86].

La caracterización molecular por PCR mostró que *aac(6')-Ib* fue el gen encontrado con mayor frecuencia al igual que otros autores [84, 86]. La alta prevalencia de la enzima

AAC(6')-Ib probablemente se explica por el hecho de que la gran mayoría de nuestras cepas *E. coli* eran productoras de BLEE, y se ha descrito que los genes que codifican esta enzima y las BLEEs se localizan en el mismo plásmido [151, 152]. De los 58 aislados productores de BLEE que presentaron únicamente este gen, todos expresaron resistencia a tobramicina y sólo dos a amikacina, aunque se ha descrito que dicho gen confiere resistencia a ambos antibióticos [80]. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos en estudios previos en los cuales a pesar de la presencia del gen *aac(6')-Ib* en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, estos aislados presentaron valores de CMI's bajos de amikacina [86, 127]. *Lindemann et al.* indican que la explicación a este hecho podría ser bien una expresión génica alterada o que la amikacina es un mal sustrato para esta enzima [150]. Sin embargo, es importante tener en cuenta que en nuestro estudio hubo una relación estadísticamente significativa entre la presencia de *aac(6')-Ib* y tener una CMI de amikacina > 8 mg/L. Y por tanto, consideramos la posibilidad de disminuir el punto de corte hasta el valor de ECOFF (> 8 mg/L). Estos datos muestran que la presencia de *aac(6')-Ib* es necesaria para la expresión de CMI's de amikacina por encima del punto de corte epidemiológico (ECOFF), sugiriendo que la presencia de dicha enzima es un mecanismo necesario aunque no suficiente para conferir resistencia a amikacina.

El segundo gen más común en este estudio fue *aac(3)-IIa*, aunque en otros trabajos este gen fue el más prevalente seguido por *aac(6')-Ib* [127, 150, 153]. Las 21 cepas que presentaban sólo el gen *aac(3)-IIa*, fueron resistentes a gentamicina con una CMI > 32 mg/L. La presencia de este gen, en cualquiera de sus combinaciones, se asoció ( $P < 0,01$ ) con resistencia a gentamicina. Por tanto en nuestro estudio la resistencia a gentamicina se debe principalmente a la presencia del gen *aac(3)-IIa*, al igual que en otros estudios previamente publicados [84, 149].

El gen *aph(3')-Ia* también fue común entre nuestras cepas, siendo el tercer gen más frecuentemente encontrado, presente en el 20,8% de los aislados, al igual que otros autores [85]. Su presencia no se relacionó con ninguno de los aminoglucósidos ensayados.

El gen *ant(2'')-Ia* fue detectado en el 13,2% de nuestros aislados, frecuentemente asociado con otros genes de EMAs. En otros estudios este gen también fue el menos frecuente y siempre asociado con otros [85, 86]. Su presencia se relacionó con resistencia a gentamicina, todos los aislamientos en los que se detectó esta enzima presentaron resistencia a gentamicina. Vakulenko y Mobashery encontraron que, efectivamente, esta enzima está más presente en los países que utilizan con más frecuencia la gentamicina que la amikacina [74].

Cuando los genes de EMAs se correlacionaron con los diferentes tipos de BLEEs y AmpC caracterizados, se encontró que la presencia del gen *aac(6')-Ib* se asoció con la producción de la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 ( $P < 0,01$ ). Estos datos coinciden con los de otros autores [84, 154] y es debido a que los plásmidos que contienen el gen *bla*.CTX-M-15 frecuentemente contienen genes de resistencia a aminoglucósidos, en particular *aac(6')-Ib* [155, 156]. También encontramos que el gen *aac(3)-IIa* se asoció con las BLEEs CTX-M-grupo 9 ( $P < 0,01$ ). Se ha determinado que los diferentes plásmidos que codifican los genes de las BLEEs tipo CTX-M llevan este gen [156]. Y finalmente, en nuestro estudio el gen *ant(2'')-Ia* se asoció con las  $\beta$ -lactamasas AmpC plasmídicas ( $P = 0,03$ ), mientras que en el estudio llevado a cabo por *Fernández-Martínez et al.* [84] encontraron que dicho gen se asoció generalmente con OXA-1, estos datos indican asociaciones debidas a que este gen es comúnmente codificado por plásmidos y transposones [80].

## 5.1 Plazomicina

La plazomicina demostró una excelente actividad *in vitro* frente a todas las cepas *E. coli* productoras de BLEE y AmpC, con valores de CMIs desde 0,25 hasta 4 mg/L. Nuestros resultados coinciden con estudios previos que mostraron que la plazomicina es un aminoglucósido muy activo frente a aislados clínicos de enterobacterias resistentes a múltiples fármacos, incluyendo aislamientos de *E. coli* productores de BLEE [89, 157]. En la revisión de *Zhanel et al.* plazomicina demostró tener una potente actividad *in vitro* frente a cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas, con CMIs entre 1-2 mg/L y ocasionalmente 4 mg/L [68]. La actividad de la plazomicina resultó ser buena e independiente del patrón de EMAs presente, al igual que los datos reflejados por otros autores [68, 92]. Sin embargo en nuestro trabajo encontramos una correlación entre las CMIs de plazomicina con las de amikacina (P=0,003), gentamicina (P=0,031) y tobramicina (P=0,018). Esta es la primera descripción de una correlación entre las CMIs de plazomicina y las de amikacina, gentamicina y tobramicina en aislados de *E. coli*. Una correlación entre las CMIs de plazomicina y las de gentamicina se ha publicado en cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas [86]. Según el test de rangos de Spearman la correlación de las CMIs fue mayor entre plazomicina y amikacina que entre plazomicina y tobramicina o gentamicina.

La plazomicina resultó ser activa en cepas que expresan EMAs conocidas, incluyendo las tres más comunes encontradas en enterobacterias: AAC(3)-II, AAC(6')-I, y ANT(2'')-I [92].



## 6. Resistencia a otros antibióticos no $\beta$ -lactámicos

### 6.1 Resistencia a fosfomicina

La resistencia a fosfomicina entre nuestras cepas productoras de BLEE fue del 15,3%, mientras que los aislados de *E. coli* productores de  $\beta$ -lactamasas AmpC, presentaron un 4,5% de resistencia. Esta diferencia no fue significativa, pero nos hace pensar en el interés de estudiar los mecanismos de resistencia que puedan estar presentes en elementos genéticos móviles.

En un estudio multicéntrico español [158] se observó un aumento significativo de la resistencia a fosfomicina entre 2005 (4,4%) y 2009 (11,4%) en las cepas *E. coli* BLEE aisladas de ITU. Efectivamente los porcentajes de resistencia más elevados (hasta un 14,4%) se han obtenido en cepas *E. coli* productoras de BLEE de Corea del Sur y España [158-160]. Uno de los factores relacionados con el aumento de la resistencia a fosfomicina en estos aislados causantes de ITU en España puede ser el aumento del uso de fosfomicina en nuestro país en los últimos años [158].

Falagas y col, en una revisión de 17 trabajos, encontraron que el 96,8% de los aislados de *E. coli* productores de BLEE fueron sensibles a este antibiótico. En 11 de los 17 estudios incluidos en esta revisión el porcentaje de cepas sensibles a fosfomicina se estableció según los criterios del CLSI (Punto de corte de sensibilidad CMI  $\leq$  64 mg/L).

Según este criterio, el porcentaje de nuestras cepas BLEE resistentes a este antimicrobiano disminuye al 8,3% [161]. En otro trabajo publicado recientemente en Taiwan, identificaron un 6% de cepas *E. coli* productoras de BLEE resistentes a fosfomicina [93]. En un amplio estudio de vigilancia nacional canadiense “CANWARD” durante los años 2010 - 2013, el 100% de los aislados *E. coli* productores de BLEE y/o AmpC aislados de pacientes con ITU fueron sensibles a fosfomicina [162]. Este antibiótico ha sido recientemente

reintroducido en Canadá [94]. En general, en estudios realizados en diversos países se han detectado bajas tasas de resistencia a fosfomicina en aislados de *E. coli* [163-165].

## **6.2 Resistencia a nitrofurantoína**

En nuestro trabajo se detectaron bajas tasas de resistencia a nitrofurantoína, siendo resistentes a este antibiótico un 4,7% y un 4,5% de nuestras cepas *E. coli* BLEE y *E. coli* AmpC, respectivamente. En el estudio de vigilancia nacional canadiense “CANWARD” se han descrito tasas de resistencia a nitrofurantoína de 4,8% y 0% en los aislados *E. coli* productores de BLEE y AmpC, respectivamente [162].

En un estudio realizado en Estados Unidos sobre sensibilidad de cepas *E. coli* aisladas de urocultivos desde el año 2000 al 2010, se detectó un leve incremento en la resistencia a nitrofurantoína (0,8% al 1,6%) [166].

Al igual que en estudios europeos previos [163, 165], en esta tesis se pudo observar una tasa de sensibilidad a nitrofurantoína superior al 95%. El bajo grado de resistencia a este antimicrobiano observado es también comparable con el obtenido en otros estudios realizados en España [160, 167] y en Grecia [168].

En general, estudios que evaluaron la sensibilidad de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE a la nitrofurantoína han publicado tasas de resistencia inferiores al 10% [125, 160, 169]. Con algunas excepciones en España 28,7% y en USA 26,1% [170, 171].

## **CONCLUSIONES**

---



1. En general, todos los aislamientos se caracterizaron por presentar un alto grado de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos. Ertapenem fue el antimicrobiano más activo, sólo una cepa productora de BLEE y OXA-48 mostró resistencia a este antibiótico con una CMI de 4 mg/L.
2. El test confirmatorio de producción de BLEE (CLSI), fue positivo en el 100% de los casos utilizando cefotaxima/clavulánico. Por tanto, aconsejamos su inclusión, además de tener en cuenta el punto de corte, para detectar la producción de BLEE.
3. Las  $\beta$ -lactamasas mayoritarias en los aislados *E. coli* de nuestro estudio resultaron ser de tipo BLEE (87,3%), siendo CTX-M el tipo más prevalente (75,6%), seguido de SHV (14,2%) y TEM (8,2%). El análisis molecular de las BLEE tipo CTX-M mostró que el 50,2% resultaron ser CTX-M-15, confirmando el éxito de su diseminación mundial.
4. La prevalencia de  $\beta$ -lactamasas AmpC entre nuestros aislamientos fue del 12,7%, de los cuales, el 70,5% resultaron ser portadores de genes AmpC plasmídicos, siendo todos del grupo CMY. Todas las secuencias realizadas resultaron ser CMY-2, de acuerdo con su predominancia actual en todo el mundo.
5. La mayoría de los pacientes procedían de la comunidad (75%) y fueron mujeres (72%). La media de edad fue de 69,5 años, destacando que en la comunidad hubo 2 pacientes de pediatría. Tanto en hombres como en mujeres la infección nosocomial se produjo en el 25% de los casos.

6. Las BLEE CTX-M fueron el grupo más prevalente tanto en la comunidad como en el hospital. La presencia de  $\beta$ -lactamasas AmpC resultó algo superior en los aislados del hospital que en los de la comunidad, aunque la diferencia no fue significativa.
7. La prevalencia de resistencia a aminoglucósidos entre los 347 aislados *E. coli* productores de BLEE y/o AmpC del estudio, resultó ser elevada, siendo el 41,5% resistentes al menos a uno de los aminoglucósidos ensayados. Las tasas de resistencia más altas se han observado para tobramicina y gentamicina.
8. Las cepas exhibieron una notable diversidad de EMAs, detectándose 12 patrones genotípicos diferentes. La resistencia a los aminoglucósidos en nuestro estudio es predominantemente causada por los genes *aac(6')-Ib* y *aac(3)-IIa*, responsables de las resistencias a tobramicina, gentamicina y amikacina encontradas.
9. En nuestro estudio se ha determinado una relación estadísticamente significativa entre la presencia de *aac(6')-Ib* y valores de CMI de amikacina  $> 8$  mg/L. Estos datos sugieren que la presencia del gen es un mecanismo necesario aunque no suficiente para conferir resistencia a amikacina, y consideramos la posibilidad de disminuir el punto de corte hasta el valor de ECOFF ( $>8$  mg/L).
10. El gen *aac(6')-Ib* fue el más prevalente y se asoció con CTX-M-15. El gen *aac(3)-IIa* se asoció con CTX-M del grupo 9 y el gen *ant(2'')-Ia* con las  $\beta$ -lactamasas p-AmpC tipo CMY-2.

- 11.** Plazomicina mostró una excelente actividad *in vitro* frente a nuestros aislados independientemente del patrón de EMAs detectado, y no se asoció con ninguno de los genes EMAs estudiados. El intervalo de CMIs para este antibiótico fue de 0,25 a 4 mg/L, con valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de 1 mg/L. Estos datos indican que la plazomicina puede llegar a ser una nueva opción terapéutica para el tratamiento de ITUs complicadas.
  
- 12.** Fosfomicina y Nitrofurantoína son buenas alternativas de tratamiento oral en las infecciones producidas por *E. coli* productor de BLEE, aunque el aumento de resistencia a fosfomicina detectado en los últimos años indica la necesidad de un seguimiento.





## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- [1] **Donnenberg MS.** Enterobacteriaceae. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone; **2005**:p.2567–86.
- [2] **Nataro J, Bopp C, Fields P, Kaper J, Strockbine N.** *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of clinical microbiology*. 9<sup>th</sup> ed. Washington D.C.: ASM Press; **2007**:p.670-7.
- [3] **Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.** Enterobacteriaceae. In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, eds. *Medical microbiology*. 7<sup>th</sup> ed: Elsevier; **2013**:p.258-64.
- [4] **Dielubanza EJ, Schaeffer AJ.** Urinary tract infections in women. *Med Clin North Am.* **2011**;95(1):27-41.
- [5] **Sobel JD, Kaye D.** Urinary tract infections. In: Mandell GB, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone; **2005**:p.875-905.
- [6] **Sorlozano A, Jimenez-Pacheco A, Luna Del Castillo JD, Sampedro A, Martinez-Brocal A, Miranda-Casas C, et al.** Evolution of the resistance to antibiotics of bacteria involved in urinary tract infections: a 7-year surveillance study. *Am J Infect Control.* **2014**;42(10):1033-8.
- [7] **Andreu A, Planells I, Grupo Cooperativo Español para el Estudio de la Sensibilidad Antimicrobiana de los Patógenos Urinario.** [Etiology of community-acquired lower urinary infections and antimicrobial resistance of *Escherichia coli*: a national surveillance study]. *Med Clin (Barc).* **2008**;130(13):481-6.
- [8] **Ochoa C, Eiros JM, Pérez C, Inglada L, Spanish Study Group on Antibiotic Treatments.** [The etiology of urinary tract infections and the antimicrobial susceptibility of urinary pathogens]. *Rev Esp Quimioter.* **2005**;18(2):124-35.
- [9] **Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirliff ME.** Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev.* **2008**;21(1):26-59.

- [10] **Wilson ML, Gaido L.** Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis.* **2004**;38(8):1150-8.
- [11] **Marin M, Gudiol F.** [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2003**;21(1):42-55.
- [12] **Joklik WK.** The story of penicillin: the view from Oxford in the early 1950s. *Faseb J.* **1996**;10(4):525-8.
- [13] **Suarez C, Gudiol F.** [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2009**;27(2):116-29.
- [14] **Chambers HF.** Penicillins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone **2005**:281-93.
- [15] **Andes DR, Craig WA.** Cephalosporins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone; **2005**:p.294-311.
- [16] **Chan LC, Basuino L, Diep B, Hamilton S, Chatterjee SS, Chambers HF.** Ceftobiprole- and ceftaroline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2015**;59(5):2960-3.
- [17] **Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC.**  $\beta$ -lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* **2005**;8(5):525-33.
- [18] **Poole K.** Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **2001**;4(5):500-8.
- [19] **Li XZ, Nikaido H.** Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs.* **2009**;69(12):1555-623.
- [20] **Poole K.** Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* **2005**;56(1):20-51.

- [21] **Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al.** Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* **2008**;14:144-53.
- [22] **Livermore DM, Brown DF.** Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother.* **2001**;48 Suppl 1:59-64.
- [23] **Navarro F, Miro E, Mirelis B.** [Interpretive reading of enterobacteria antibiograms]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2010**;28(9):638-45.
- [24] **Bush K, Jacoby GA.** Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**;54(3):969-76.
- [25] **Livermore DM.** Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Clin Microbiol Infect.* **2008**;14 Suppl 1:3-10.
- [26] **Bush K.** Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin Microbiol Rev.* **1988**;1(1):109-23.
- [27] **Martínez-Martínez L, Calvo J.** [The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2010**;28 Suppl 2:25-31.
- [28] **Ambler RP.** The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **1980**;289(1036):321-31.
- [29] **Frère J-M, Galleni M, Bush K, Dideberg O.** Is it necessary to change the classification of  $\beta$ -lactamases? *J Antimicrob Chemother.* **2005**;55(6):1051-3.
- [30] **Bush K.** Characterization of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **1989**;33(3):259-63.
- [31] **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**;39(6):1211-33.
- [32] **Jacoby GA, Munoz-Price LS.** The new  $\beta$ -lactamases. *N Engl J Med.* **2005**;352(4):380-91.

- [33] **Miró E, del Cuerpo M, Navarro F, Sabaté M, Mirelis B, Prats G.** Emergence of clinical *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. *J Antimicrob Chemother.* **1998**;42(4):535-8.
- [34] **Paterson DL, Bonomo RA.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* **2005**;18(4):657-86.
- [35] **Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordmann P.** OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1997**;41(10):2188-95.
- [36] **Naas T, Namdari F, Réglier-Poupet H, Poyart C, Nordmann P.** Panresistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. *J Antimicrob Chemother.* **2007**;60(5):1174-6.
- [37] **Poirel L, Lebessi E, Castro M, Fèvre C, Foustoukou M, Nordmann P.** Nosocomial outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**;48(6):2277-9.
- [38] **Walther-Rasmussen J, Høiby N.** Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Can J Microbiol.* **2004**;50(3):137-65.
- [39] **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**;48(1):1-14.
- [40] **Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al.** CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* **2007**;59(2):165-74.
- [41] **Cantón R, Coque TM.** The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* **2006**;9(5):466-75.
- [42] **D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM.** CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* **2013**;303(6-7):305-17.

- [43] **Meško Meglič K, Koren S, Palepou MFI, Karisik E, Livermore DM, Pike R, et al.** Nationwide survey of CTX-M-Type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Klebsiella pneumoniae* isolates in Slovenian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**;53(1):287-91.
- [44] **Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley SG, Jaurin B, et al.** The inhibition of class C  $\beta$ -lactamases by boronic acids. *Biochem J.* **1983**;209(1):229-33.
- [45] **Jacoby GA.** AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **2009**;22(1):161-82.
- [46] **Pérez-Pérez FJ, Hanson ND.** Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* **2002**;40(6):2153-62.
- [47] **Corvec S, Prodhomme A, Giraudeau C, Dauvergne S, Reynaud A, Caroff N.** Most *Escherichia coli* strains overproducing chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamase belong to phylogenetic group A. *J Antimicrob Chemother.* **2007**;60(4):872-6.
- [48] **Mata C, Miró E, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F.** Prevalence of acquired AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. *Clin Microbiol Infect.* **2010**;16(5):472-6.
- [49] **Caroff N, Espaze E, Gautreau D, Richet H, Reynaud A.** Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *J Antimicrob Chemother.* **2000**;45(6):783-8.
- [50] **Livermore DM, Woodford N.** The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* **2006**;14(9):413-20.
- [51] **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **2007**;20(3):440-58.
- [52] **Grundmann H, Livermore D, Giske C, Cantón R, Rossolini G, Campos J, et al.** Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* **2010**;15(46):pii: 19711.

- [53] **Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al.** Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* **2012**;18(5):413-31.
- [54] **Poirel L, Pitout JD, Nordmann P.** Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* **2007**;2(5):501-12.
- [55] **Walther-Rasmussen J, Hoiby N.** Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* **2007**;60(3):470-82.
- [56] **Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* **2009**;9(4):228-36.
- [57] **Livermore DM.** Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med.* **2012**;27(2):128-42.
- [58] **Tórtola MT, Lavilla S, Miró E, González JJ, Larrosa N, Sabaté M, et al.** First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**;49(8):3492-4.
- [59] **Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Sáez D, Bautista V, et al.** Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother.* **2013**;68(2):317-21.
- [60] **Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F.** First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**;55(9):4398-401.
- [61] **Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P.** Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**;48(1):15-22.
- [62] **Livermore DM, Woodford N.** Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol.* **2000**;3(5):489-95.



- [63] **Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R.** Inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother.* **1999**;43(4):447-58.
- [64] **Kotra LP, Haddad J, Mobashery S.** Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**;44(12):3249-56.
- [65] **Gilbert DN.** Aminoglycosides. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone; **2005**:p.328-56.
- [66] **Mingeot-Leclercq M-P, Glupczynski Y, Tulkens PM.** Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**;43(4):727-37.
- [67] **Cass RT, Brooks CD, Havrilla NA, Tack KJ, Borin MT, Young D, et al.** Pharmacokinetics and safety of single and multiple doses of ACHN-490 injection administered intravenously in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**;55(12):5874-80.
- [68] **Zhanell GG, Lawson CD, Zelenitsky S, Findlay B, Schweizer F, Adam H, et al.** Comparison of the next-generation aminoglycoside plazomicin to gentamicin, tobramycin and amikacin. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **2012**;10(4):459-73.
- [69] **Magnet S, Blanchard JS.** Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev.* **2005**;105(2):477-98.
- [70] **Palomino J, Pachón J.** [Aminoglycosides]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2003**;21(2):105-14.
- [71] **Garneau-Tsodikova S, Labby KJ.** Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Medchemcomm.* **2016**;7(1):11-27.
- [72] **Jana S, Deb JK.** Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2006**;70(2):140-50.

- [73] **Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ.** Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* **2015**;13(1):42-51.
- [74] **Vakulenko SB, Mobashery S.** Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev.* **2003**;16(3):430-50.
- [75] **Hatch RA, Schiller NL.** Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1998**;42(4):974-7.
- [76] **Aires JR, Köhler T, Nikaido H, Plésiat P.** Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**;43(11):2624-8.
- [77] **Magnet S, Courvalin P, Lambert T.** Resistance-Nodulation-cell Division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**;45(12):3375-80.
- [78] **Rosenberg EY, Ma D, Nikaido H.** AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J Bacteriol.* **2000**;182(6):1754-6.
- [79] **Yamane K, Wachino J-i, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y.** Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis.* **2005**;11(6):951-3.
- [80] **Ramirez MS, Tolmasky ME.** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* **2010**;13(6):151-71.
- [81] **Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP.** Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother.* **2001**;48(suppl 1):87-102.
- [82] **Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH.** Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* **1993**;57(1):138-63.
- [83] **Ramirez MS, Nikolaidis N, Tolmasky ME.** Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the *aac(6')-Ib* paradigm. *Front Microbiol.* **2013**;4:121.

- [84] **Fernández-Martínez M, Miró E, Ortega A, Bou G, González-López JJ, Oliver A, et al.** Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. **2015**;46(2):157-63.
- [85] **Miró E, Grunbaum F, Gomez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, et al.** Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist*. **2013**;19(2):94-9.
- [86] **Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, Hao B, Chen L, Shields RK, et al.** Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. *Antimicrob Agents Chemother*. **2014**;58(8):4443-51.
- [87] **Armstrong ES, Miller GH.** Combating evolution with intelligent design: the neoglycoside ACHN-490. *Curr Opin Microbiol*. **2010**;13(5):565-73.
- [88] **Endimiani A, Hujer KM, Hujer AM, Armstrong ES, Choudhary Y, Aggen JB, et al.** ACHN-490, a neoglycoside with potent in vitro activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. **2009**;53(10):4504-7.
- [89] **Galani I, Souli M, Daikos GL, Chrysouli Z, Poulakou G, Psychogiou M, et al.** Activity of plazomicin (ACHN-490) against MDR clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter spp.* from Athens, Greece. *J Chemother*. **2012**;24(4):191-4.
- [90] **Rodríguez-Avial I, Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Culebras E.** In vitro activity of the next-generation aminoglycoside plazomicin alone and in combination with colistin, meropenem, fosfomicin or tigecycline against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae strains. *Int J Antimicrob Agents*. **2015**;46(6):616-21.
- [91] **Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Zhang JC, Maharjan S, Doumith M, et al.** Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother*. **2011**;66(1):48-53.

- [92] **Aggen JB, Armstrong ES, Goldblum AA, Dozzo P, Linsell MS, Gliedt MJ, et al.** Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**;54(11):4636-42.
- [93] **Tseng S-P, Wang S-F, Kuo C-Y, Huang J-W, Hung W-C, Ke G-M, et al.** Characterization of fosfomicin resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from human and pig in Taiwan. *PLoS ONE.* **2015**;10(8):e0135864.
- [94] **Zhanel GG, Walkty AJ, Karlowsky JA.** Fosfomicin: a first-line oral therapy for acute uncomplicated cystitis. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* **2016**;2016:2082693.
- [95] **Hooper DC.** Urinary tract agents: nitrofurantoin and methenamine. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone; **2005**:p.473-8.
- [96] **Huttner A, Verhaegh EM, Harbarth S, Muller AE, Theuretzbacher U, Mouton JW.** Nitrofurantoin revisited: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *J Antimicrob Chemother.* **2015**;70:2456–64.
- [97] **Calvo J, Cantón R, Fernández Cuenca F, Mirelis B, Navarro F.** Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 2<sup>a</sup> edición, nº 38. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiología/>. **2011**.
- [98] **Yagi T, Wachino J-i, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, et al.** Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* **2005**;43(6):2551-8.
- [99] **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24<sup>th</sup> informational supplement. Document M100-S24, vol. 34, nº 1. CLSI, Wayne, PA. **2014**.

- [100] **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0. EUCAST, **2015**. (<http://www.eucast.org>).
- [101] **Brown DF, Brown L.** Evaluation of the E-test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother.* **1991**;27(2):185-90.
- [102] **Pfaller MA, Segreti J.** Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases. *Clin Infect Dis.* **2006**;42(Suppl 4):S153-S63.
- [103] **Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A.** Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* **1988** 10(4):867-78.
- [104] **Song W, Bae IK, Lee Y-N, Lee C-H, Lee SH, Jeong SH.** Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by using boronic acid as an AmpC  $\beta$ -lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella spp.* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* **2007**;45(4):1180-4.
- [105] **Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH.** Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* **2001**;7(2):88-91.
- [106] **Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y.** Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol.* **2003**;41(10):4623-9.
- [107] **Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R.** Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**;46(2):500-10.

- [108] **Lartigue M-F, Zinsius C, Wenger A, Bille J, Poirel L, Nordmann P.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M type now in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* **2007**;51(8):2855-60.
- [109] **Girlich D, Poirel L, Nordmann P.** CTX-M expression and selection of ertapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**;53(2):832-4.
- [110] **Xu L, Ensor V, Gossain S, Nye K, Hawkey P.** Rapid and simple detection of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes by multiplex PCR assay. *J Med Microbiol.* **2005**;54(12):1183-7.
- [111] **Helmy MM, Wasfi R.** Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated AmpC  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections in Egyptian hospitals. *Biomed Res Int.* **2014**;2014:171548.
- [112] **Winokur PL, Vonstein DL, Hoffman LJ, Uhlenhopp EK, Doern GV.** Evidence for transfer of CMY-2 AmpC  $\beta$ -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**;45(10):2716-22.
- [113] **Liebana E, Gibbs M, Clouting C, Barker L, Clifton-Hadley FA, Pleydell E, et al.** Characterization of  $\beta$ -lactamases responsible for resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains from food-producing animals in the United Kingdom. *Microb Drug Resist.* **2004**;10(1):1-9.
- [114] **Lee M-F, Peng C-F, Hsu H-J, Chen Y-H.** Molecular characterisation of the metallo- $\beta$ -lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents.* **2008**;32(6):475-80.
- [115] **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al.** Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**;45(4):1151-61.
- [116] **Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P.** Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2011**;70(1):119-23.

- [117] **Jensen VF, Jakobsen L, Emborg H-D, Seyfarth AM, Hammerum AM.** Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* **2006**;58(1):101-7.
- [118] **Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X, et al.** Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *J Clin Microbiol.* **2010**;48(4):1132-8.
- [119] **Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, et al.** Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**;50(12):4114-23.
- [120] **European Centre for Disease Prevention and Control.** Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC. **2015**.
- [121] **Oteo J, Cercenado E, Cuevas Ó, Bautista V, Delgado-Iribarren A, Orden B, et al.** AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*: emergence of CMY-2-producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2010**;67(3):270-6.
- [122] **Naseer U, Haldorsen B, Simonsen GS, Sundsfjord A.** Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway. *Clin Microbiol Infect.* **2010**;16(2):171-8.
- [123] **Pitout JDD, Gregson DB, Church DL, Laupland KB.** Population-based laboratory surveillance for AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerg Infect Dis.* **2007**;13(3):443-8.
- [124] **Dhillon RH, Clark J.** ESBLs: A Clear and Present Danger? *Crit Care Res Pract.* **2012**;2012:625170.

- [125] **Díaz MA, Hernández-Bello JR, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Calvo J, Blanco J, et al.** Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol.* **2010**;48(8):2840-5.
- [126] **Doi Y, Park Y, Rivera J, Adams-Haduch J, Hingwe A, Sordillo E, et al.** Community-associated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. *Clin Infect Dis.* **2013**;56(5):641-8.
- [127] **Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen Ø.** Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2014**;78(1):66-9.
- [128] **Ibrahimagic A, Bedenic B, Kamberovic F, Uzunovic S.** High prevalence of CTX-M-15 and first report of CTX-M-3, CTX-M-22, CTX-M-28 and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae causing urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina in hospital and community settings. *J Infect Chemother.* **2015**;21(5):363-9.
- [129] **Voets GM, Platteel TN, Fluit AC, Scharringa J, Schapendonk CM, Stuart JC, et al.** Population distribution of  $\beta$ -lactamase conferring resistance to third-generation cephalosporins in human clinical Enterobacteriaceae in The Netherlands. *PLoS ONE.* **2012**;7(12):e52102.
- [130] **Carattoli A, García-Fernández A, Varesi P, Fortini D, Gerardi S, Penni A, et al.** Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases isolated in Rome, Italy. *J Clin Microbiol.* **2008**;46(1):103-8.
- [131] **Naseer U, Sundsfjord A.** The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist.* **2011**;17(1):83-97.
- [132] **Paniagua R, Valverde A, Coque TM, Baquero F, Cantón R.** Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae fecal carriers using a chromogenic medium. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2010**;67(4):376-9.



- [133] **Hanson ND, Moland ES, Hong SG, Propst K, Novak DJ, Cavalieri SJ.** Surveillance of community-based reservoirs reveals the presence of CTX-M, imported AmpC, and OXA-30 beta-Lactamases in urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a U.S. community. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**;52(10):3814-6.
- [134] **Alonso N, Miró E, Pascual V, Rivera A, Simó M, Garcia MC, et al.** Molecular characterisation of acquired and overproduced chromosomal *blaAmpC* in *Escherichia coli* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents.* **2016**;47(1):62-8.
- [135] **Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, et al.** The prevalence of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2008**;27(10):915-21.
- [136] **Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G, et al.** Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC beta-lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2013**;32(2):253-9.
- [137] **Kristo I, Pitiriga V, Poulou A, Zarkotou O, Kimouli M, Pournaras S, et al.** Susceptibility patterns to extended-spectrum cephalosporins among Enterobacteriaceae harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases using the updated Clinical and Laboratory Standards Institute interpretive criteria. *Int J Antimicrob Agents.* **2013**;41(4):383-7.
- [138] **Ruiz del Castillo B, Vinué L, Román EJ, Guerra B, Carattoli A, Torres C, et al.** Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* producing or not extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *BMC Microbiol.* **2013**;13:84.
- [139] **Hoban DJ, Nicolle LE, Hawser S, Bouchillon S, Badal R.** Antimicrobial susceptibility of global inpatient urinary tract isolates of *Escherichia coli*: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program: 2009-2010. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2011**;70(4):507-11.
- [140] **Mammeri H, Eb F, Berkani A, Nordmann P.** Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. *J Antimicrob Chemother.* **2008**;61(3):498-503.

- [141] **Jørgensen RL, Nielsen JB, Friis-Møller A, Fjeldsøe-Nielsen H, Schønning K.** Prevalence and molecular characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* expressing an AmpC phenotype. *J Antimicrob Chemother.* **2010**;65(3):460-4.
- [142] **Ortega A, Oteo J, Aranzamendi-Zaldumbide M, Bartolomé RM, Bou G, Cercenado E, et al.** Spanish multicenter study of the epidemiology and mechanisms of amoxicillin-clavulanate resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2012**;56(7):3576-81.
- [143] **Rodríguez-Baño J, Oteo J, Garneau-Tsodikovas, Ortega A, Villar M, Conejo MC, et al.** Epidemiological and clinical complexity of amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* **2013**;51(7):2414-7.
- [144] **Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I, Merino P, Picazo JJ.** *Klebsiella pneumoniae*: development of a mixed population of carbapenem and tigecycline resistance during antimicrobial therapy in a kidney transplant patient. *Clin Microbiol Infect.* **2012**;18(1):61-6.
- [145] **Marialouis XA, Santhanam A.** Antibiotic resistance, RAPD- PCR typing of multiple drug resistant strains of *Escherichia Coli* from urinary tract infection (UTI). *J Clin Diagn Res.* **2016**;10(3):DC05-DC9.
- [146] **Toval F, Köhler C-D, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, et al.** Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J Clin Microbiol.* **2014**;52(2):407-18.
- [147] **Reuland EA, Hays JP, de Jongh DM, Abdelrehim E, Willemsen I, Kluytmans JA, et al.** Detection and occurrence of plasmid-mediated AmpC in highly resistant Gram-Negative rods. *PLoS ONE.* **2014**;9(3):e91396.
- [148] **Yoo JS, Byeon J, Yang J, Yoo JI, Chung GT, Lee YS.** High prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae isolated from long-term care facilities in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2010**;67(3):261-5.

- [149] **Soleimani N, Aganj M, Ali L, Shokoohizadeh L, Sakinc T.** Frequency distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Iranian hospital. *BMC Res Notes*. **2014**;7:842.
- [150] **Lindemann PC, Risberg K, Wiker HG, Mylvaganam H.** Aminoglycoside resistance in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Western Norway. *APMIS*. **2011**;120(6):495-502.
- [151] **Park KS, Kim MH, Park TS, Nam YS, Lee HJ, Suh JT.** Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance genes, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in clinical isolates of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Ann Clin Lab Sci Spring*. **2012**;42(2):191-7.
- [152] **Szabó D, Kocsis B, Rókus L, Szentandrassy J, Katona K, Kristóf K, et al.** First detection of plasmid-mediated, quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in Budapest, Hungary. *J Antimicrob Chemother*. **2008**;62(3):630-2.
- [153] **Xiao Y, Hu Y.** The major aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-II found in *Escherichia coli* determines a significant disparity in its resistance to gentamicin and amikacin in China. *Microb Drug Resist*. **2012**;18(1):42-6.
- [154] **Machado E, Coque TM, Cantón R, Baquero F, Sousa JC, Peixe L, et al.** Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing Enterobacteriaceae strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. **2006**;50(9):3220-1.
- [155] **Carattoli A.** Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. **2009**;53(6):2227-38.
- [156] **Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM.** Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the International O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother*. **2009**;53(10):4472-82.

- [157] **Walkty A, Adam H, Baxter M, Denisuik A, Lagacé-Wiens P, Karlowsky JA, et al.** In vitro activity of Plazomicin against 5,015 Gram-Negative and Gram-Positive clinical isolates obtained from patients in Canadian Hospitals as part of the CANWARD study, 2011-2012. *Antimicrob Agents Chemother.* **2014**;58(5):2554-63.
- [158] **Oteo J, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, Fernández S, et al.** Parallel increase in community use of fosfomicin and resistance to fosfomicin in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* **2010**;65(11):2459-63.
- [159] **Lee S-Y, Park Y-J, Yu JK, Jung S, Kim Y, Jeong SH, et al.** Prevalence of acquired fosfomicin resistance among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Korea and IS26-composite transposon surrounding fosA3. *J Antimicrob Chemother.* **2012**;67(12):2843-7.
- [160] **Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I, Hernández E, Picazo JJ.** [Increasing prevalence of fosfomicin resistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* urinary isolates (2005-2009-2011)]. *Rev Esp Quimioter.* **2013**;26(1):43-6.
- [161] **Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE.** Fosfomicin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* **2010**;10(1):43-50.
- [162] **Karlowsky JA, Denisuik AJ, Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Baxter MR, Hoban DJ, et al.** In vitro activity of fosfomicin against *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections in Canada as part of the CANWARD surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother.* **2014**;58(2):1252-6.
- [163] **Kahlmeter G, Poulsen HO.** Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO-SENS study revisited. *Int J Antimicrob Agents.* **2012**;39(1):45-51.

- [164] **Kresken M, Pfeifer Y, Hafner D, Wresch R, Körber-Irrgang B.** Occurrence of multidrug resistance to oral antibiotics among *Escherichia coli* urine isolates from outpatient departments in Germany: Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and the role of fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents.* **2014**;44(4):295-300.
- [165] **Naber KG, Schito G, Botto H, Palou J, Mazzei T.** Surveillance study in Europe and Brazil on clinical aspects and antimicrobial resistance epidemiology in females with cystitis (ARESC): implications for empiric therapy. *Eur Urol.* **2008**;54(5):1164-78.
- [166] **Sanchez GV, Master RN, Karlowsky JA, Bordon JM.** In vitro antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* isolates among U.S. outpatients from 2000 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother.* **2012**;56(4):2181-3.
- [167] **Gobernado M, Valdés L, Alós J, García-Rey C, Dal-Ré R, García-de-Lomas J, et al.** Antimicrobial susceptibility of clinical *Escherichia coli* isolates from uncomplicated cystitis in women over a 1-year period in Spain. *Rev Esp Quimioter.* **2007**;20(1):68-76.
- [168] **Katsarolis I, Poulakou G, Athanasia S, Kourea-Kremastinou J, Lambri N, Karaiskos E, et al.** Acute uncomplicated cystitis: from surveillance data to a rationale for empirical treatment. *Int J Antimicrob Agents.* **2010**;35(1):62-7.
- [169] **Coque TM, Novais Â, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al.** Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* **2008**;14(2):195-200.
- [170] **Prakash V, Lewis JS, Herrera ML, Wickes BL, Jorgensen JH.** Oral and parenteral therapeutic options for outpatient urinary infections caused by Enterobacteriaceae producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**;53(3):1278-80.
- [171] **Puerto AS, Fernández JG, del Castillo JdD, Pino MJ, Angulo GP.** In vitro activity of beta-lactam and non- $\beta$ -lactam antibiotics in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2006**;54(2):135-9.



**ANEXO**

---







# Plazomicin Activity against 346 Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase/AmpC-Producing *Escherichia coli* Urinary Isolates in Relation to Aminoglycoside-Modifying Enzymes

Maria del Carmen López-Díaz,<sup>a</sup> Esther Culebras,<sup>a</sup> Iciar Rodríguez-Avial,<sup>a</sup> Esther Ríos,<sup>a</sup> José Manuel Viñuela-Prieto,<sup>a</sup> Juan J. Picazo,<sup>b</sup> Carmen Rodríguez-Avial<sup>b</sup>

Servicio de Microbiología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain<sup>a</sup>; Departamento de Medicina (Microbiología), Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain<sup>b</sup>

**ABSTRACT** The activity of plazomicin and clinically relevant aminoglycosides was tested against 346 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* urinary isolates, and the results were correlated with the presence of aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs). Data showed that plazomicin was very active against all ESBL/AmpC-producing *E. coli* urinary isolates. Its activity was not related to the AME genes studied.

**KEYWORDS** AMEs, ESBL, *Escherichia coli*, plazomicin, aminoglycosides

*Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) have emerged as major global pathogens, primarily associated with urinary tract infections (1). These strains possess plasmids that carry genes conferring resistance to multiple antibiotic classes (2). As a result, therapeutic options against these  $\beta$ -lactam-resistant *E. coli* infections are extremely limited.

Aminoglycoside resistance in Gram-negatives is mainly conferred by production of aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) (3). Genes encoding AMEs are located on mobile genetic elements along with other resistance determinants, resulting in multidrug-resistant (MDR) isolates (3). Plazomicin is a next-generation aminoglycoside modified to evade AMEs. The compound is currently under clinical development for the treatment of complicated urinary tract infections (cUTIs) and acute pyelonephritis as a single agent (4, 5).

In this study, we evaluated the activity of plazomicin and clinically relevant aminoglycosides against 346 ESBL/AmpC-producing *E. coli* urinary isolates. The presence of four AME genes was also investigated, and the relationship between the AME genes detected and the resistance phenotype found was determined.

The isolates were obtained prospectively during 2013 at the Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain). Only one isolate per patient was included. PCR characterization (6, 7) showed 302 ESBL producers and 44 AmpC producers.

MICs of gentamicin, tobramycin, amikacin, and plazomicin were determined by the agar dilution method. MICs of plazomicin were also determined by the broth microdilution method (8). Antimicrobial agents were obtained from their respective manufacturers. Plazomicin was supplied from Achaogen (South San Francisco, CA). The results were interpreted according to the guidelines of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (9).

All isolates resistant to at least one of the aminoglycosides studied were tested by PCR for the presence of AME genes. Sets of primers for the following genes were

**Received** 18 November 2016 **Returned for modification** 22 November 2016 **Accepted** 29 November 2016

**Accepted manuscript posted online** 5 December 2016

**Citation** López-Díaz MDC, Culebras E, Rodríguez-Avial I, Ríos E, Viñuela-Prieto JM, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C. 2017. Plazomicin activity against 346 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* urinary isolates in relation to aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02454-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02454-16>.

**Copyright** © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Esther Culebras, [eculebras.hcsc@salud.madrid.org](mailto:eculebras.hcsc@salud.madrid.org).

**TABLE 1** *In vitro* susceptibility to different aminoglycosides of 346 *Escherichia coli* isolates in relation to the  $\beta$ -lactamase type produced<sup>a</sup>

Aminoglycoside	ESBL ( <i>n</i> = 302 isolates)				AmpC ( <i>n</i> = 44 isolates)			
	MIC <sub>50</sub> (mg/liter)	MIC <sub>90</sub> (mg/liter)	Range	No. (%) of resistant isolates	MIC <sub>50</sub> (mg/liter)	MIC <sub>90</sub> (mg/liter)	Range	No. (%) of resistant isolates
Gentamicin	1	64	≤0.125 to >64	86 (28.6)	1	64	0.5 to >64	11 (25)
Tobramycin	1	32	≤0.125 to >64	123 (40.9)	1	8	0.5 to 32	12 (27.3)
Amikacin	4	8	0.5 to >64	5 (1.7)	2	4	2 to 8	0
Plazomicin	1	1	0.25 to 4	NA	1	1	0.5 to 2	NA

<sup>a</sup>Resistance data were determined on the basis of EUCAST susceptibility breakpoints. NA, not applicable.

included in the PCR assay: *aac(3)-IIa* (10); *aac(6′)-Ib* (11); *ant(2′′)-Ia* (12); and *aph(3′)-Ia* (11).

Comparisons of MICs for each antibiotic between groups were performed by Mann-Whitney U test. Correlations between pairs of variables were calculated by Spearman's rank test. The significance level was considered a *P* value of ≤0.05. Statistical analysis was performed using IBM SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Overall, the highest resistance rate was observed for tobramycin (38.3%), followed by gentamicin (27.7%). Amikacin showed good activity, with a 1.5% resistance rate and a MIC<sub>90</sub> of 8 mg/liter; similar results were previously reported in ESBL-producing *E. coli* (13, 14).

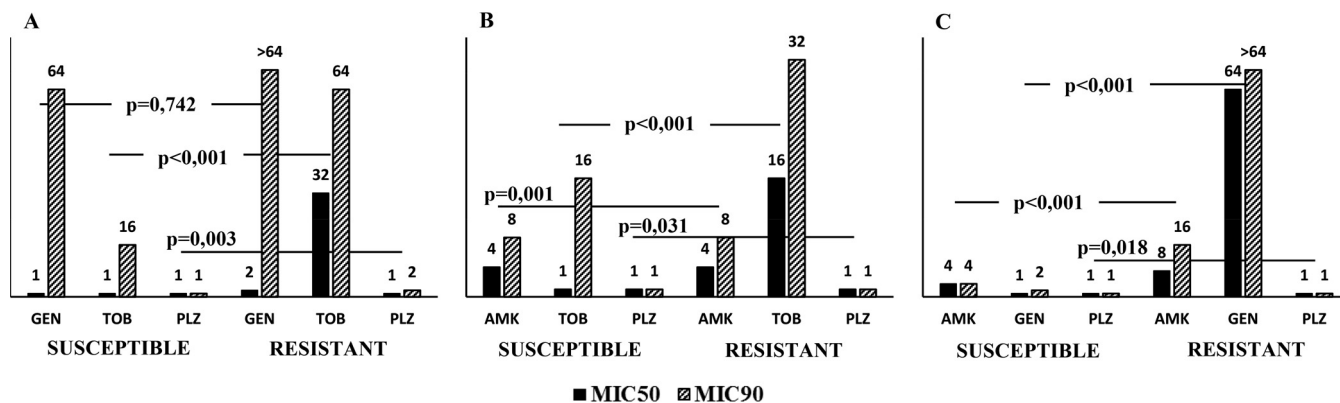
Plazomicin showed the best activity, with a MIC range of 0.25 to 4 mg/liter and MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of 1 mg/liter against all ESBL- and AmpC-producing *E. coli* isolates (data obtained by agar method). No significant differences were found between agar dilution MICs and microdilution MICs (MIC<sub>50</sub>, 0.5 mg/liter; MIC<sub>90</sub>, 1 mg/liter; MIC range, 0.125 to 4 mg/liter). Our findings are consistent with previous studies that showed plazomicin to be highly active against MDR clinical isolates of *Enterobacteriaceae*, including ESBL-producing *E. coli* isolates (15, 16).

The levels of susceptibility to aminoglycosides in relation to the  $\beta$ -lactamase type produced by the isolates are summarized in Table 1. All the AmpC isolates were amikacin susceptible, with MICs of ≤8 mg/liter.

Of the 346 *E. coli* isolates, 144 (41.5%) were resistant to at least one of the aminoglycosides studied. Five different resistance phenotypes were observed among these 144 resistant isolates. Resistance to gentamicin/tobramycin was observed for 86 strains; resistance to tobramycin for 45 strains; resistance to gentamicin for 8 strains; resistance to amikacin/gentamicin/tobramycin for 3 strains; and resistance to amikacin/tobramycin for 2 strains.

As can be seen in Fig. 1, the median MICs of the respective aminoglycosides were significantly higher for the tobramycin- and gentamicin-susceptible and -resistant isolates. Amikacin comparisons showed results that were analogous to those obtained with tobramycin and plazomicin but not to those obtained with gentamicin. The level of correlation between the MICs for plazomicin and amikacin by Spearman's rank test was higher (*r* = 0.600; *P* < 0.001) than the level of correlation between the MICs for plazomicin and tobramycin (*r* = 0.271; *P* < 0.001) and gentamicin (*r* = 0.112; *P* = 0.038), respectively. This is the first description of a correlation between the MICs of plazomicin and those of amikacin, tobramycin, and gentamicin in *E. coli* isolates, although a correlation between the plazomicin MICs and those of gentamicin has been reported in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (17).

The prevalence of combinations of AME genes among 144 *E. coli* isolates resistant to aminoglycosides is shown in Table 2. At least one AME gene was detected in 94.5% of strains. The most common AME gene was *aac(6′)-Ib* (90 strains; 62.5%), followed by *aac(3)-IIa* (37 strains; 25.7%), *aph(3′)-Ia* (30 strains; 20.8%), and *ant(2′′)-Ia* (19 strains; 13.2%). In total, 98 isolates (68%) contained only one of the evaluated AME genes, 36 (25%) contained two of them, and 2 (1.4%) harbored three. Using EUCAST breakpoints



**FIG 1** *In vitro* susceptibility to various aminoglycosides stratified by (A) amikacin (AMK) susceptibility, (B) gentamicin (GEN) susceptibility, and (C) tobramycin (TOB) susceptibility. *P* values denote differences in median MIC values of the respective aminoglycosides between the amikacin-, gentamicin-, and tobramycin-susceptible and -resistant isolates. The epidemiological cutoff was considered for amikacin resistance (MIC > 8 mg/liter). The MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values are shown above the respective bars. PLZ, plazomicin.

(9), the AME presence was not always correlated with aminoglycoside resistance. Similar results were previously reported both in *E. coli* isolates and in *K. pneumoniae* isolates (17, 18).

PCR screening showed that *aac(6′)-Ib* was the most prevalent gene. Similar results have been reported by other authors (17, 18). All strains with *aac(6′)-Ib* were tobramycin resistant. Only 2 of the 58 isolates that harbored the *aac(6′)-Ib* gene alone expressed phenotypic resistance to amikacin, although it has been reported that *aac(6′)-Ib* confers resistance to both antibiotics (3). These observations were consistent with previous studies where, despite the possession of *aac(6′)-Ib*, low amikacin MICs have been reported for *E. coli* and *K. pneumoniae* strains (14, 17). In our study, moreover, there was a statistically significant relationship (*P* < 0.01) between the presence of an *aac(6′)-Ib* gene and an amikacin MIC of >8 mg/liter. These data showed that the presence of *aac(6′)-Ib* is required for expression of amikacin MICs above the epidemiological cutoff value (ECOFF).

The second-most-common gene in our study was *aac(3)-IIa*, although in other studies, this was the most prevalent gene, followed by *aac(6′)-Ib* (14, 19). The 21 isolates with this resistance gene alone were resistant to gentamicin; the presence of *aac(3)-IIa* in any combination of genes was associated with gentamicin resistance (*P* < 0.01). The resistance to gentamicin observed in our study was predominantly caused by the presence of the *aac(3)-IIa* gene; similar findings have previously been reported (18).

**TABLE 2** Prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme gene combinations in 144 *Escherichia coli* isolates resistant to aminoglycosides in relation to aminoglycoside MICs<sup>a</sup>

AME gene(s)	No. (%) of isolates	MIC <sub>50</sub> /MIC <sub>90</sub> (mg/liter)				Range				No. (%) of resistant isolates			
		AMK	GEN	TOB	PLZ	AMK	GEN	TOB	PLZ	AMK	GEN	TOB	PLZ
<i>aac(6′)-Ib</i>	64 (44.4)	8/16	2/>64	16/32	1/1	2 to 64	0.5 to >64	8 to 64	0.25 to 4	2 (3.1)	24 (37.5)	64 (100)	NA
<i>aac(3)-IIa</i>	21 (14.5)	4/4	>64/>64	8/8	1/1	2 to 8	64 to >64	4 to 32	0.5 to 2	0 (0)	21 (100)	19 (90.5)	NA
<i>aph(3′)-Ia</i>	9 (6.3)	4/8	64/64	8/32	0.5/2	2 to 8	2 to 64	4 to 32	0.5 to 2	0 (0)	8 (88.9)	7 (77.8)	NA
<i>ant(2′′)-Ia</i>	4 (2.8)	2/4	64/64	8/32	0.5/1	2 to 4	64 to 64	8 to 32	0.5 to 1	0 (0)	4 (100)	4 (100)	NA
<i>aad(6′)-Ib</i> + <i>aph(3′)-Ia</i>	13 (9.02)	8/16	64/64	32/32	1/1	4 to 64	0.5 to >64	16 to 32	0.5 to 1	1 (7.7)	8 (61.5)	13 (100)	NA
<i>aac(6′)-Ib</i> + <i>ant(2′′)-Ia</i>	7 (4.9)	8/32	32/64	32/64	1/4	2 to 32	8 to 64	8 to 64	0.5 to 4	1 (14.3)	7 (100)	7 (100)	NA
<i>aac(6′)-Ib</i> + <i>aac(3)-IIa</i>	5 (3.5)	8/>64	>64/>64	32/>64	0.5/1	2 to >64	64 to >64	16 to >64	0.5 to 1	1 (20)	5 (100)	5 (100)	NA
<i>aac(3)-IIa</i> + <i>ant(2′′)-Ia</i>	5 (3.5)	4/4	64/64	8/8	1/1	2 to 4	64 to 64	4 to 8	0.5 to 1	0 (0)	5 (100)	4 (80)	NA
<i>aac(3)-IIa</i> + <i>aph(3′)-Ia</i>	4 (2.8)	2/4	64/>64	8/8	0.5/1	2 to 4	64 to >64	8 to 8	0.5 to 1	0 (0)	4 (100)	4 (100)	NA
<i>ant(2′′)-Ia</i> + <i>aph(3′)-Ia</i>	2 (1.4)	2/4	64/>64	16/16	0.5/1	2 to 4	64 to >64	16 to 16	0.5 to 1	0 (0)	2 (100)	2 (100)	NA
<i>aac(6′)-Ib</i> + <i>aac(3)-IIa</i> + <i>aph(3′)-Ia</i>	1 (0.7)	8/8	32/32	16/16	1/1	8 to 8	32 to 32	16 to 16	1 to 1	0 (0)	1 (100)	1 (100)	NA
<i>aac(3)-IIa</i> + <i>ant(2′′)-Ia</i> + <i>aph(3′)-Ia</i>	1 (0.7)	8/8	>64/>64	16/16	2/2	8 to 8	>64 to >64	16 to 16	2 to 2	0 (0)	1 (100)	1 (100)	NA
None	8 (5.5)	4/8	32/64	8/32	0.5/2	2 to 8	1 to 64	1 to 32	0.5 to 2	0 (0)	7 (87.5)	5 (62.5)	NA

<sup>a</sup>Resistance data were determined on the basis of EUCAST susceptibility breakpoints. AME, aminoglycoside-modifying enzyme; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; PLZ, plazomicin; NA, not applicable.

The presence of the *ant(2'')-Ia* gene was found to be related to gentamicin resistance, as previously described (14, 19). The presence of *aph(3')-Ia* was not associated with resistance to any of the studied aminoglycosides.

In conclusion, in this study, the strains exhibited a remarkable diversity of AMEs; the AME genes involved in clinical aminoglycoside resistance were *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib*, and *ant(2'')-Ia*. High amikacin MICs, above the ECOFF established by EUCAST, have been shown to be related to the presence of *aac(6')-Ib*. The activity of plazomicin was excellent regardless of the AME pattern; it may become a welcomed addition for the treatment of cUTIs, but the real position of this antibiotic will be revealed once pending phase III studies are completed.

## ACKNOWLEDGMENTS

We declare that we have no conflicts of interest.

This work has been funded by grant PI13/01471 as part of the National R&D Plan, AES 2013, and cofunded by the ISCIII and the European Regional Development Fund (ERDF).

## REFERENCES

- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. 2013. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Microbiol* 303:305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>.
- Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM. 2009. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4472–4482. <https://doi.org/10.1128/AAC.00688-09>.
- Ramirez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 13:151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>.
- Karaiskos I, Souli M, Giamarellou H. 2015. Plazomicin: an investigational therapy for the treatment of urinary tract infections. *Expert Opin Investig Drugs* 24:1501–1511. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1095180>.
- U.S. National Institutes of Health. <http://clinicaltrials.gov>.
- Coque TM, Oliver A, Perez-Diaz JC, Baquero F, Canton R. 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* 46:500–510. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.500-510.2002>.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153–2162. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>.
- CLSI. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. CLSI, Wayne, PA.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2013. Break-point tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf).
- Jensen VF, Jakobsen L, Emborg HD, Seyfarth AM, Hammerum AM. 2006. Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 58:101–107. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl201>.
- Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X, Guymon C, Keen EF, III, Robinson BJ, Mende K, Murray CK. 2010. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *J Clin Microbiol* 48:1132–1138. <https://doi.org/10.1128/JCM.02006-09>.
- Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, Ecker DJ, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Thomson JM, Rather PN, Craft DW, Fishbain JT, Ewell AJ, Jacobs MR, Paterson DL, Bonomo RA. 2006. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 50:4114–4123. <https://doi.org/10.1128/AAC.00778-06>.
- Díaz MA, Hernández-Bello JR, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Calvo J, Blanco J, Pascual A; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). 2010. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol* 48:2840–2845. <https://doi.org/10.1128/JCM.02147-09>.
- Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen O, Norwegian Study Group on Aminoglycoside Resistance. 2014. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. *Diagn Microbiol Infect Dis* 78:66–69. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.001>.
- Galani I, Souli M, Daikos GL, Chrysouli Z, Poulakou G, Psychogiou M, Panagea T, Argyropoulou A, Stefanou I, Plakias G, Giamarellou H, Petrikos G. 2012. Activity of plazomicin (ACHN-490) against MDR clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter* spp. from Athens, Greece. *J Chemother* 24:191–194. <https://doi.org/10.1179/1973947812Y.0000000015>.
- Walkty A, Adam H, Baxter M, Denisuk A, Lagace-Wiens P, Karlowsky JA, Hoban DJ, Zhanel GG. 2014. *In vitro* activity of plazomicin against 5,015 gram-negative and gram-positive clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals as part of the CANWARD study, 2011–2012. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2554–2563. <https://doi.org/10.1128/AAC.02744-13>.
- Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, Hao B, Chen L, Shields RK, Press EG, Iovine NM, Townsend BM, Wagener MM, Kreiswirth B, Nguyen MH. 2014. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. *Antimicrob Agents Chemother* 58:4443–4451. <https://doi.org/10.1128/AAC.00099-14>.
- Fernández-Martínez M, Miró E, Ortega A, Bou G, González-López JJ, Oliver A, Pascual A, Cercenado E, Oteo J, Martínez-Martínez L, Navarro F; Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI). 2015. Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 46:157–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.008>.
- Xiao Y, Hu Y. 2012. The major aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-II found in *Escherichia coli* determines a significant disparity in its resistance to gentamicin and amikacin in China. *Microb Drug Resist* 18:42–46. <https://doi.org/10.1089/mdr.2010.0190>.





OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS

---





# Characterization of Inhibitor-Resistant TEM $\beta$ -Lactamases and Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates

Esther Ríos, María Carmen López, Iciar Rodríguez-Avial, Irene Peña, and Juan Jose Picazo

The aim of present work was to characterize the inhibitor-resistant TEM (IRT)  $\beta$ -lactamases produced by *Escherichia coli* in Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain). Mechanisms of fluoroquinolone resistance among IRT-producing strains were also studied. Isolates with susceptibility to cephalosporins and amoxicillin–clavulanate (AMC) resistance were collected in our hospital (November 2011–July 2012) from both outpatients and hospitalized patients. Among 70 AMC-resistant *E. coli* strains, 28 (40%) produced IRT enzymes. Most of them were uropathogens (82.1%) and recovered from outpatients (75%). Seven different IRT enzymes were identified with TEM-30 (IRT-2) being the most prevalent, followed by TEM-40 (IRT-11). A high rate of ciprofloxacin resistance was found among IRT-producing strains (50%). Most of the ciprofloxacin-resistant isolates showed ciprofloxacin minimum inhibitory concentration > 32 mg/L and contained two mutations in both *gyrA* and *parC* genes. Four IRT enzyme producers harbored the *qnr* gene. ST131 clone was mainly responsible for both IRT enzyme production and ciprofloxacin resistance. In conclusion, data from this study show that the frequency of IRT producers was 40% and a high rate of ciprofloxacin resistance was found among IRT-producing isolates. Current and future actions should be taken into account to avoid or reduce the development of AMC and fluoroquinolone resistance in *E. coli*.

## Introduction

**R**ESISTANCE TO AMOXICILLIN–CLAVULANATE (AMC) among clinical isolates of *Escherichia coli* has increased over the last years and it has been associated with a high rate of AMC consumption.<sup>17</sup> Moreover, a rapid progress of ciprofloxacin-nonsusceptible *E. coli* has been closely related to the increase in resistance to AMC.<sup>7</sup>

There are several mechanisms involved in the resistance to AMC. Inhibitor-resistant TEM (IRT) enzymes emerge through mutational events from TEM-1 or TEM-2  $\beta$ -lactamases and they have decreased affinities for amino-, carboxy-, and ureidopenicillins and an altered interaction with class A  $\beta$ -lactamase inhibitors.<sup>4</sup>

Classical mechanisms of quinolone resistance in *E. coli* are due to chromosomal mutations in the genes encoding the quinolone targets (DNA gyrase and topoisomerase IV). Mainly, the mutations are accumulated in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of *gyrA* and *parC*.<sup>8</sup> Resistance to quinolones can also be mediated by plasmid-borne genes such as *qnr*, which protect the quinolone targets from inhibition.<sup>14</sup>

The aim of this study was to evaluate IRT  $\beta$ -lactamases produced by AMC-resistant *E. coli* isolates in Hospital

Clínico San Carlos (Madrid). Since fluoroquinolones are another option for the treatment of infections caused by *E. coli*, our study also investigated the mechanisms involved in quinolone resistance among IRT-producing isolates. The genetic relationship between IRT producers was also determined.

## Materials and Methods

### *Bacterial isolates*

A total of 70 cefotaxime and ceftazidime susceptible but AMC-resistant *E. coli* strains, according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI),<sup>5</sup> were prospectively collected from November 2011 to July 2012 in Hospital Clínico San Carlos from clinical samples of both outpatients and hospitalized patients. Fifty-six strains were isolated from urine, 7 from different exudates, 5 from surgical wound, one isolate from catheter, and one from blood. Among the 70 strains recovered, 20 (28.6%) produced nosocomial-acquired infections and 50 (71.4%) caused community-acquired infections.

Nosocomial-acquired isolates were defined as those acquired at least 48 hr after hospital admission. Community-acquired strains were those isolated in the community or within 48 hr of hospital admission.

# Detection of *Escherichia coli* ST131 clonal complex (ST705) and *Klebsiella pneumoniae* ST15 among faecal carriage of extended-spectrum $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

Esther Ríos,\* María Carmen López, Iciar Rodríguez-Avial, Esther Culebras and Juan José Picazo

## Abstract

**Purpose.** The objective of the present study was to evaluate the prevalence of intestinal colonization with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) in non-selected hospitalized and non-hospitalized patients from the same geographic area of Madrid.

**Methodology.** A total of 501 fecal samples were screened. Diluted samples in saline were cultured in MacConkey agar plates with ceftazidime, cefotaxime, imipenem and meropenem disks. Colonies growing within the inhibition zone of either disk were selected. Characterization of ESBLs and CPEs were performed by PCR and sequencing. The Wider system was used for the bacterial identification. In addition, clonal analysis was carried out for species predominant among the faecal carriage.

**Key Findings.** Among the 501 patients enrolled, 43 (8.6 %) carried ESBL-E and 8 (1.6 %) patients exhibited CPE. The main intestinal colonizer among ESBL-E was CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates in both settings (community and hospital). ST131 clonal complex was the most common among faecal ESBL-producing *E. coli*. All gut carriers of CPE were hospitalized patients, *Klebsiella pneumoniae* being the most prevalent species. Two OXA-48-producing *K. pneumoniae* isolates belonging to ST15 were detected.

**Conclusion.** Present study reveals that faecal carriage of ESBL is common among inpatients and outpatients, whereas carbapenemase producers are only present in the hospital setting. Therefore, active surveillance will be useful for reducing transmission of antimicrobial-resistant bacteria and preventing infection.

## INTRODUCTION

Multidrug-resistant Gram-negative bacteria are a major public health threat. Over the last few years, the production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) has increased significantly for *Enterobacteriaceae* (such as *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*) (<http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>).

Moreover, the increasing use of carbapenems for the treatment of infections involving multidrug-resistant bacteria has led to a rapid international dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) (<http://ecdc.europa.eu/en/eaad/Documents/antibiotics-resistance-EU-data-2014.pdf>). Although resistance to carbapenems remains low in Europe, it is increasing in a few countries, especially in southern and southeastern Europe [1–3].

*Enterobacteriaceae* are inhabitants of human intestinal flora [4], and faecal carriers may represent an important reservoir for person-to-person transmission and dissemination of bacteria [4–6]. Furthermore, gut colonization by multidrug-resistant bacteria has been associated with a high risk of developing subsequent clinical infection [7, 8]. Therefore, active surveillance is a key part in preventing the spread of such strains. Early detection of rectal carriers is important for the purpose of controlling infections [7, 9].

As gastrointestinal carriage may serve as a reservoir for CPE and/or ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) transmission, the objective of the present study was to evaluate the prevalence of intestinal colonization, coinciding with infection episodes in our hospital and in other Spanish

Received 21 September 2016; Accepted 26 November 2016

**Author affiliation:** Microbiology Department, Hospital Clínico San Carlos, c/Martín Lagos s/n, Madrid 28040, Spain.

**\*Correspondence:** Esther Ríos, bioesther@hotmail.com

**Keywords:** faecal carriage; carbapenemases; ESBL; *Enterobacteriaceae*; ST705; OXA-48.

**Abbreviations:** CPE, carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*; ESBL, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase; ESBL-E, ESBL; MLST, multilocus sequence typing; ST, sequence type.





Hospital Universitario  
Clínico San Carlos



Servicio de  
Microbiología (HCSC)



Facultad de  
Ciencias Biológicas  
UCM