

Tesina de Licenciatura en Ciencias biológicas

Resistencias asociadas a betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* uropatógenas

Pablo Ávila

Tutor: MSc. Nicolás Cordeiro

Departamento de Bacteriología y Virología
Instituto de Higiene, Facultad de Medicina.

Tribunal:

Dr. PhD. Gustavo Varela

MSc. Nicolás Cordeiro

Dr. PhD. Rafael Vignoli

Índice

Resumen	3
1) Introducción.....	5
1.1 <i>Escherichia coli</i>	5
1.1.a UPEC	5
1.2 Betalactámicos.....	6
1.3 Resistencia a los antibióticos	8
1.3.a Modificación directa de la molécula de antibiótico	9
1.3.a.i) Agregado de grupos químicos	9
1.3.a.ii) Lisis del antibiótico	10
1.3.a.ii.1) Betalactamasas	10
1.3.a.ii.2) Betalactamasas de tipo CTX-M	12
1.3.b Trastorno de permeabilidad y eflujo	13
1.3.b.i) Disminución de la Permeabilidad	13
1.3.b.ii) Bombas de eflujo	13
1.3.c Cambio en el sitio blanco	13
1.3.c.i) Protección del sitio blanco	13
1.3.c.ii) Modificación del sitio blanco	14
1.4 Mecanismos genéticos relacionados a la resistencia	14
1.4.a) Mutación	14
1.4.b) Transferencia horizontal de genes.....	15
1.4.c) Integrones	15
1.4.d) Secuencias de inserción	16
1.5) Resistencia en UPEC	16
2) Objetivos	17
2.1) Objetivo general	17
2.1.a) Objetivos específicos.....	17
3) Materiales y Métodos	17
3.1) Cepas.....	18
3.2) Ensayos fenotípicos: determinación de sensibilidad a antibióticos.....	18
3.3) Extracción de ADN.....	18
3.4) Ensayos de conjugación	18
3.5) Caracterización de plásmidos	19
3.6) Detección de genes de resistencia y secuencias de inserción	24

3.7) Electroforesis en gel de agarosa	24
4) Resultados	24
4.1) Ensayos fenotípicos: determinación de sensibilidad a antibióticos.....	24
4.2) Ensayos de conjugación y caracterización de plásmidos.....	26
4.3) Identificación genotípica de genes de resistencia	27
5) Discusión	31
6) Conclusión	36
7) Perspectivas	36
Referencias	37

Resumen

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son la forma más común de infecciones extra-intestinales causadas por *E. coli* y dicho microorganismo es la principal causa de ITU. Las cepas que causan infecciones del tracto urinario (*E. coli* uropatógeno - UPEC) son especialmente virulentas por su capacidad para producir adhesinas que les permiten adherirse al epitelio de la vejiga y del tracto urinario superior. UPEC causa infecciones urinarias a través de la colonización del tracto gastrointestinal humano, seguida de una infección del tracto urogenital y el subsiguiente establecimiento de la enfermedad. Actualmente, los antibióticos, como el trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina y betalactámicos, son las terapias más recomendadas para el tratamiento de las infecciones urinarias.

Los betalactámicos son un grupo de antibióticos que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, interfiriendo en la síntesis del peptidoglicano mediante un bloqueo en la etapa de transpeptidación. La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales al anillo betalactámico modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactams e inhibidores de las betalactamasas.

La resistencia bacteriana es la capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de un antimicrobiano a dosis terapéuticas. La gran mayoría de mecanismos de resistencia se pueden agrupar en tres categorías: modificación de la molécula de antibiótico, alteración del sitio diana y alteración de la permeabilidad. El principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos en enterobacterias es la producción de betalactamasas. Las betalactamasas son enzimas que actúan hidrolizando el anillo betalactámico haciendo así que el antibiótico pierda su función.

Las denominadas BLEEs son betalactamasas capaces de conferir resistencia bacteriana a aminopenicilinas, cefalosporinas de hasta tercera generación y aztreonam y son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como ácido clavulánico. Una de las más importantes y predominantes a nivel mundial es CTX-M. La asociación de esta enzima a elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, su ubicación en clones exitosos y el fenómeno de co-resistencia ha favorecido su rápida diseminación por la comunidad.

El objetivo del presente trabajo fue detectar las resistencias antibióticas asociadas a betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en aislamientos clínicos de cepas de *Escherichia coli*. Para eso se analizaron mediante técnicas fenotípicas (antibiograma mediante disco difusión y ensayos de conjugación) y moleculares (PCR y PFGE y secuenciación) 21 aislamientos recuperados de muestras de orina provenientes de 2 hospitales. De las 21 cepas analizadas: 7 resultaron ser resistentes a cloranfenicol (33%); 10 a kanamicina; 12 a tetraciclina (57%); 13 a estreptomina (61%); 13 a azitromicina (61%). De las 21 cepas, 8 resultaron ser resistentes a más de dos antibióticos testeados (38%). Sólo uno de los aislamientos conjugados logró transferir la resistencia a azitromicina. De los aislamientos estudiados todas fueron positivas para *bla*_{CTX-M}, siendo *bla*_{CTX-M-2} el más frecuente seguido de *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-14}. Sólo una de las cepas presentó más de una variante de *bla*_{CTX-M}, presentando *bla*_{CTX-2} y *bla*_{CTX-M-14}. *bla*_{TEM} se encontró en más de un 70% de las cepas estudiadas mientras que *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA-1} en un 52% y 48%, respectivamente. Dos aislamientos presentaron *ermB* y ninguna presentó *mel*. De las 10 cepas resistentes a kanamicina 5 fueron positivas para *aac(6')Ib*, de las cuales 4 correspondieron a la variante *aac(6')Ib-cr*. No fue detectado *qnrA*, y sólo en uno fue detectado *qnrB*. *sul1* se encontró presente en 6 de las 21 cepas, mientras que *sul2* fue detectado en 12, coincidiendo ambos solamente en 3 cepas.

De los aislamientos estudiados, 5 presentaron integrones de clase 1, y de éstas sólo 3 presentan *sul1*, y en 2 se encontraron regiones variables. Todas las cepas presentaron algunas de las secuencias de inserción buscadas, siendo la más frecuente IS26, encontrándose en más del 70% de los aislamientos analizados.

Este trabajo muestra que UPEC no sólo combina una gran batería de factores de virulencia, sino que además presenta una gran capacidad de adquirir resistencia de otras bacterias lo que le permite presentar resistencia a una gran cantidad de antibióticos incluso a aquellos no implicados en el tratamiento de infecciones urinarias. Las BLEE juegan un rol fundamental en la adquisición de resistencia ya que tienden a estar asociada a genes que confieren resistencia a otras familias de antimicrobianos. Esto es un llamado de atención al uso racional de antibióticos ya que estos pueden tener un impacto directo e indirecto en la adquisición de resistencia por parte de microorganismos patógenos.

1) Introducción

1.1) *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es el miembro más frecuente e importante del género *Escherichia*. Es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo y fermentador de la glucosa, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae[1]. Esta familia comprende un número muy variado de géneros y especies bacterianas, cuyo hábitat natural es el tubo digestivo del hombre y animales[2]. *E. coli* es el microorganismo más frecuentemente implicado en bacteriemias nosocomiales y comunitarias por gérmenes Gram negativos. Este microorganismo se asocia a múltiples procesos infecciosos, que incluyen la gastroenteritis e infecciones extraintestinales. Las llamadas *E. coli* Patógenas Extraintestinales (ExPEC) son causas importantes de infección de heridas, infección del tracto urinario, peritonitis, neumonía, meningitis y sepsis. El grupo ExPEC incluye subtipos nombrados, como *E. coli* uropatogénico (UPEC), *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC) y *E. coli* asociada a sepsis (SEPEC) [3], [4]. Pero una cepa que causa diarrea no es capaz de causar ITU ni meningitis[2]. Esto se debe a que han adquirido factores de virulencia específicos, codificados en plásmidos o en ADN de bacteriófagos[4].

1.1.a) *E. coli* uropatogénica (UPEC)

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son la forma más común de infecciones extraintestinales causadas por *E. coli* y a su vez, dicho microorganismo es la principal causa de ITU [1]. En el caso de aquellas cepas que causan ITU son especialmente virulentas por su capacidad para producir adhesinas (principalmente *pili* P, AAF/I, AAF/II y Dr), que se unen a las células que recubren la vejiga y el tracto urinario superior (evitando la eliminación de las bacterias durante la micción), y hemolisina HlyA que lisa los eritrocitos y otros tipos celulares (llevando a la liberación de citocinas y a la estimulación de la respuesta inflamatoria) [4]. UPEC causa infecciones urinarias a través de la colonización del tracto gastrointestinal humano, seguida de una infección

del tracto urogenital y el subsiguiente establecimiento de la enfermedad promovido por rasgos específicos de la bacteria (factores de virulencia) y factores relacionados con el huésped[5]. Estas infecciones son un grave problema de salud pública ya que constituyen la segunda causa de consulta infecciosa en la asistencia primaria y se estima que afecta a 150 millones de personas al año a nivel mundial conduciendo a altos costos sanitarios[6]. Actualmente, los antibióticos, como el trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina y ampicilina, son las fármacos más recomendados para el tratamiento de las infecciones urinarias[7].

1.2) Betalactámicos

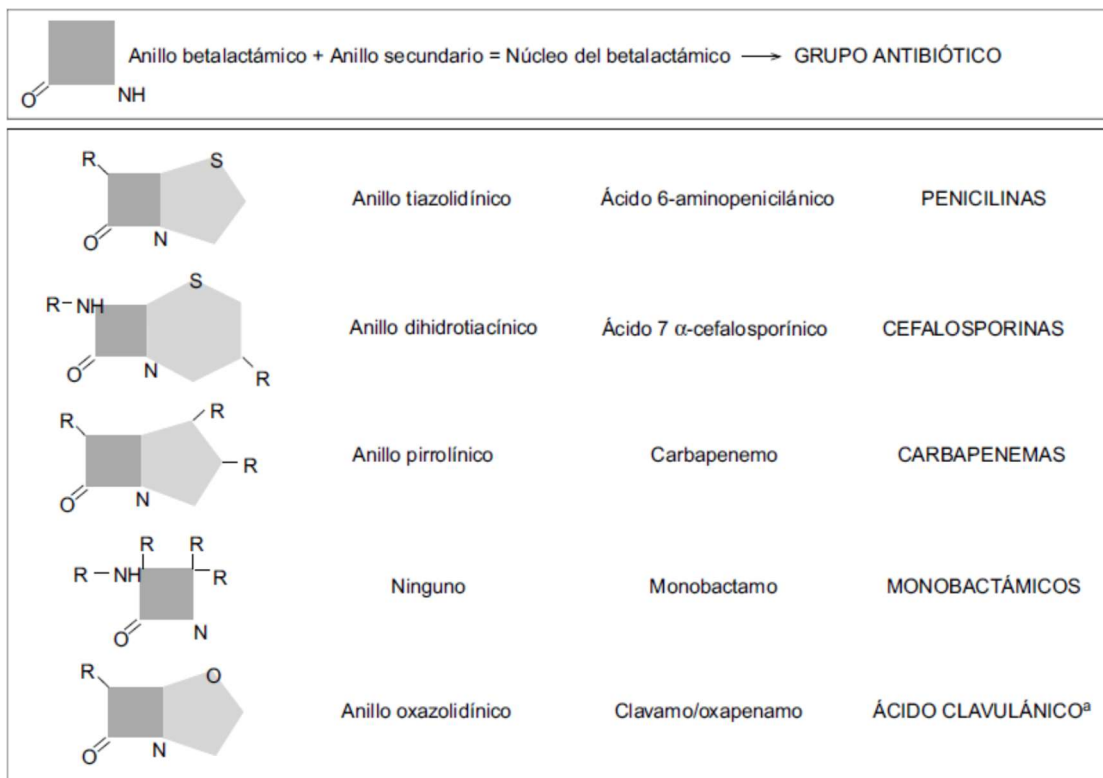
Los betalactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético, que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico[8]. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, interfiriendo en la síntesis del peptidoglicano mediante un bloqueo en la última etapa de su producción (transpeptidación). Son bactericidas y muestran una actividad tiempo dependiente, en la que la destrucción bacteriana y la eficacia del tratamiento se correlacionan con la duración del tiempo (T) en que las concentraciones del fármaco en plasma libre (no unido) permanecen por encima de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del patógeno causante[9]. Tienen un espectro de actividad antimicrobiana que abarca a cocos Gram positivos (excepto *Staphylococcus* resistentes a meticilina) y bacilos Gram negativos (BGN) (enterobacterias y no fermentadores de la glucosa) [10]. No son activos sobre *Mycoplasma* (porque éstos carecen de pared celular) ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* o *Rickettsia*, ya que tienen escasa capacidad de penetración dentro de las células[11]. La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales al anillo betalactámico modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos [11], [12] (Fig. 1):

- Penicilinas: Son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético que contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. De acuerdo a su origen y espectro de acción pueden clasificarse en penicilinas naturales (G y V), penicilinas

resistentes a las penicilinas estafilocócicas (oxacilina, meticilina, dicloxacilina), aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), y ureidopenicilinas (piperacilina) [8].

- Cefalosporinas: Son productos de origen natural. Contienen un núcleo constituido por ácido 7-aminocefalosporánico formado por un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrotiazina. Modificaciones en la posición 7 del ácido 7-aminocefalosporánico están asociadas con cambios en su actividad antibacteriana, y sustituciones en la posición 3 están asociadas a alteraciones en la farmacocinética y en los parámetros metabólicos del agente. Se definen al menos cuatro generaciones de cefalosporinas. Las cefalosporinas de primera generación son muy activas frente a los cocos Gram positivos; en líneas generales, las sucesivas generaciones han perdido parte de esa actividad en beneficio de una mayor actividad frente a bacilos Gram negativos, con algunas excepciones[8].
- Carbapenemes: son los antimicrobianos betalactámicos de más amplio espectro, actividad y resistencia frente a las betalactamasas, incluidas las BLEE. Derivan del anillo carbapenem y se dividen en dos grupos según tengan o no actividad frente a *P. aeruginosa*, perteneciendo al primero imipenem, meropenem y doripenem, y al segundo, ertapenem[10].
- Monobactamas: Aztreonam, el único monobactámico disponible para uso clínico, es un betalactámico monociclitol con una actividad semejante, aunque algo inferior a ceftazidima. Su principal aportación reside en poder administrarse en pacientes con hipersensibilidad de tipo dos a penicilina o cefalosporinas. No tiene actividad frente a cocos Gram positivos ni anaerobios, siendo exclusivamente activa frente a bacterias Gram negativas aerobias, incluidas enterobacterias[8], [10].
- Inhibidores de las betalactamasas: Tienen una actividad antimicrobiana intrínseca insignificante, a pesar de compartir el anillo betalactámico que es característico de los antibióticos betalactámicos. Sin embargo, la similitud en la

estructura química permite a la molécula interactuar con la enzima betalactamasa secretada por ciertas bacterias para conferir resistencia contra los antibióticos betalactámicos. A estos compuestos, se los conoce como inhibidores suicidas, ya que inactivan la enzima por unión relativamente irreversible a la misma. Hay tres en uso clínico: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Esta inhibición restablece la actividad antimicrobiana de los antibióticos betalactámicos contra bacterias resistentes por producción de betalactamasas plasmídicas y algunas cromosómicas, pero no las productoras de betalactamasas de clase C[8], [10].



^aTodos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

Figura 1. Betalactámicos y su estructura química (Figura tomada de “Los betalactámicos en la práctica clínica” 2015)

1.3) Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia bacteriana a los antibióticos puede definirse como la capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de un antimicrobiano a dosis terapéuticas[13]. Esta resistencia puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano y es la capacidad de resistir la acción de un antibiótico como resultado de características estructurales o funcionales inherentes. Por ejemplo, todos los gérmenes Gram negativos son resistentes a la vancomicina, y esta situación no es variable. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. Así, existen cepas de *S. pneumoniae* que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *E. coli* resistentes a la ampicilina, cepas de *Staphylococcus* spp resistentes a la meticilina. La resistencia adquirida puede llevar a un fracaso terapéutico cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre el germen que produce la infección[8], [14]. El gran número de especies dentro de la familia de las enterobacterias conlleva una gran variabilidad de patrones de resistencia natural. Esta diversidad se ve, además, incrementada por la posibilidad de adquirir genes de resistencia tanto de microorganismos de la misma especie como de otras. La adquisición de multiresistencia puede llevar a la ineficacia de la mayoría de los antimicrobianos utilizados en clínica. La gran mayoría de mecanismos de resistencia se pueden agrupar en tres grandes categorías: i) modificación de la molécula antimicrobiana; ii) alteración del sitio diana; iii) alteración de la permeabilidad[15].

1.3.a) Modificación directa de la molécula de antibiótico

Una de las estrategias bacterianas más exitosas para hacer frente a la presencia de antibióticos es producir enzimas que inactiven el fármaco añadiendo grupos químicos específicos al compuesto o que directamente destruyen la propia molécula, haciendo al antibiótico incapaz de interactuar con su objetivo[15].

1.3.a.i) Agregado de grupos químicos

La producción de enzimas capaces de introducir cambios químicos en la molécula antimicrobiana es un mecanismo bien conocido de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas y Gram positivas. Se han descrito muchos tipos de enzimas modificadoras, y las reacciones bioquímicas más frecuentes que catalizan incluyen i) acetilación (aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptograminas), ii) fosforilación (aminoglucósidos, cloranfenicol), y iii) adenilación (aminoglucósidos, lincosamidas) [15].

Uno de los mejores ejemplos de resistencia por medio de modificación antibiótica es el caso de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos[15]. Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos catalizan la modificación en grupos -OH o -NH₂ del núcleo de 2-desoxistreptamina o los residuos de azúcar y pueden ser acetiltransferasas (AAC), nucleotidiltransferasas (ANT) o fosfotransferasas (APH) [16]. Las AACs pertenecen a la superfamilia de proteínas ubicuas relacionadas a GCN5-N-acetiltransferasa (GNAT), que incluyen alrededor de 10.000 proteínas. Las enzimas GNAT catalizan la acetilación de grupos -NH₂ en la molécula aceptora usando acetil coenzima A como sustrato donante, en el caso de AACs el aceptor es un antibiótico aminoglucósido[16].

1.3.a.ii) Lisis del antibiótico

La modificación de antibióticos catalizada por enzimas es un mecanismo importante de resistencia a los antibióticos que ha sido relevante desde el uso del primer antibiótico, con el descubrimiento de las penicilinasas en 1940[15]. Desde entonces, se han identificado muchas enzimas que pueden degradar antibióticos de diferentes familias, incluyendo betalactámicos, macrólidos y fosfomicinas[17], [18].

1.3.a.ii.1) **Betalactamasas**

Aunque la resistencia a los betalactámicos puede estar mediada por distintos mecanismos (producción de enzimas, alteraciones de la permeabilidad, alteración del sitio blanco y expresión de bombas de expulsión activa), el principal mecanismo de resistencia a dicho grupo de antibióticos en enterobacterias es el enzimático, por producción de betalactamasas[19].

Las betalactamasas son enzimas que actúan mediante la hidrólisis del anillo betalactámico. Fueron descritas por primera vez a comienzos de los 40, un año antes de que la penicilina fuera introducida al mercado[15]. La clasificación de las mismas se basa en dos esquemas generales: en el esquema de clasificación molecular de Ambler, y en el sistema de clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros[20]. El esquema de Ambler divide las betalactamasas en cuatro grandes clases (A, B, C y D). La base de esta clasificación es la homología proteica (similitud aminoacídica) y no características fenotípicas. En este esquema de clasificación las betalactamasas de clase A, B y D son serín betalactamasas. En contraste, las enzimas de clase B son metalo-betalactamasas[20]. Por otra parte, la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros se basa en similitudes funcionales (sustrato y perfil de inhibidores) [21]. Hay cuatro grandes grupos y múltiples subgrupos en este sistema[20]. Para simplificar sólo se utilizará la clasificación de Ambler.

Las betalactamasas de mayor importancia médica se encuentran dentro de las clases A y C de Ambler[22]. Las enzimas de clase A se caracterizan por poseer una serina en el sitio activo y por la hidrólisis preferencial de penicilinas. Dentro de este grupo se encuentran enzimas tales como TEM y SHV, y las penicilinasas encontradas en *Staphylococcus aureus*. Con el incremento del uso de cefalosporinas de tercera generación surgieron, por selección, cepas bacterianas con capacidad de expresar diferentes clases de betalactamasas, denominadas de espectro extendido (BLEE) [23]. El esquema de Ambler se desarrolló antes del surgimiento de estas enzimas y no permitió la diferenciación entre las TEM y SHV originales y sus derivados BLEEs[24]. Las denominadas BLEEs son enzimas capaces de conferir resistencia bacteriana a aminopenicilinas, cefalosporinas de hasta tercera generación y aztreonam (pero no a cefamicinas y carbapenems) y son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como ácido clavulánico[20]. Los genes que codifican para BLEEs se encuentran usualmente codificados en plásmidos, junto con genes que codifican para otros mecanismos de resistencia a antibióticos como aminoglucósidos y trimetoprim-sulfametoxazol, o quinolonas. Las BLEE derivan usualmente de enzimas de menor espectro como TEM-1 o SHV-1, por mutaciones que alteran la configuración de aminoácidos alrededor del sitio activo de estas enzimas, o por medio de la captura de nuevos genes de

betalactamasa del metagenoma ambiental, que codifican para enzimas que están naturalmente dotadas de actividad BLEE. Entre las últimas enzimas, se encuentran betalactamasas de tipo PER y CTX-M; dentro de éstas, las últimas han demostrado ser, con mucho, las más exitosas en su diseminación[25], [26].

En la última década ha ocurrido un importante cambio en la epidemiología de las BLEEs, observándose una rápida diseminación de cepas de *E. coli* productoras de CTX-M, estableciendo así su predominancia en Europa, Canadá, Sudáfrica, Sudamérica y Asia[27]. Esta difusión explosiva de CTX-M alrededor del mundo ha sido referida como “la pandemia de CTX-M” [28].

1.3.a.ii.2) Betalactamasas de tipo CTX-M

El nombre CTX-M deriva de la potente actividad hidrolítica frente a cefotaxime. Esta característica depende de un ambiente electrostático peculiar y de la flexibilidad de la cavidad catalítica, en combinación con otros elementos estructurales[25].

A diferencia de otras BLEEs, la familia CTX-M constituye un complejo y heterogéneo grupo de enzimas[28]. En función de la secuencia aminoacídica se puede clasificar a las enzimas de tipo CTX-M en cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-4 y CTX-M-25. Dos grupos adicionales CTX-M-74 y CTX-M-75 fueron luego identificados[29]. Cada grupo, a su vez, incluye una serie de variantes alélicas menores que difieren entre sí por una o pocas sustituciones de aminoácidos ($\leq 5\%$). Por otra parte, existen al menos cuatro variantes de CTX-M que exhiben una estructura híbrida, a saber, CTX-M-45 que es un híbrido de CTX-M-14 con una proteína de origen desconocido, y CTX-M-64, CTX-M-123 y CTX-M-132 que son híbridos de CTX-M-15 con diferentes segmentos de CTX-M-14[25]. Análisis filogenéticos han sugerido que, a diferencias de otras BLEEs, las enzimas de tipo CTX-M no se originaron por mutaciones en enzimas previas (mediadas por plásmidos) sino por la incorporación de genes *bla* cromosómicos de *Kluyvera* sp. a elementos genéticos móviles[28]. La asociación de esta enzima a elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, y su ubicación en clones exitosos ha favorecido su rápida diseminación por la comunidad[30]. Se suma a esto el fenómeno

de co-resistencia en cepas productoras de CTX-M, particularmente a los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas, lo que podría facilitar los procesos de co-selección.[28]

En Uruguay, la presencia de cepas de *E. coli* productoras de PER-2, CTX-M-15, SHV-5 o de CTX-M-2, así como la presencia de genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (PMQR) unidos a *bla*_{CTX-M-15}, ya se ha descrito[31].

1.3.b) Trastorno de permeabilidad y eflujo

1.3.b.i) Disminución de la permeabilidad

Las bacterias han desarrollado mecanismos para evitar que los antibióticos alcancen su objetivo intracelular o periplásmico disminuyendo la captación de la molécula antimicrobiana. Este mecanismo limita la afluencia de sustancias del medio externo. La membrana externa de las bacterias Gram negativas, actúa como la primera línea de defensa contra la penetración de múltiples compuestos tóxicos, incluyendo varios agentes antimicrobianos. Las moléculas hidrófilas tales como betalactámicos, tetraciclinas y algunas fluoroquinolonas son particularmente afectadas por los cambios en la permeabilidad de la membrana externa, ya que a menudo utilizan canales de difusión llenos de agua conocidos como porinas para cruzar esta barrera[15].

1.3.b.ii) Bombas de eflujo

Se basa en la presencia de un complejo (bomba) capaz de extraer componentes tóxicos fuera de la célula bacteriana. Este mecanismo de resistencia afecta a una amplia gama de antimicrobianos incluyendo inhibidores de la síntesis de proteínas, fluoroquinolonas, betalactámicos, carbapenemes y polimixinas. Los genes que codifican para las bombas de eflujo pueden localizarse en elementos genéticos móviles o en el cromosoma. Es importante destacar que las bombas codificadas cromosómicamente pueden explicar la resistencia inherente de algunas especies bacterianas a un antibiótico particular[15].

1.3.c) Cambio en el sitio blanco

1.3.c.i) Protección del sitio blanco

Consiste en la producción de proteínas que median la protección del sitio blanco. La mayoría de los genes clínicamente relevantes envueltos en este mecanismo se encuentran en elementos genéticos móviles[15]. Un ejemplo de esto son las proteínas de resistencia a quinolonas Qnr, que son un determinante de resistencia a fluoroquinolonas mediado por plásmido que se encuentra frecuentemente en aislamientos clínicos[32].

1.3.c.ii) Modificación del sitio blanco

La introducción de modificaciones en el sitio blanco es uno de los mecanismos de resistencia antibiótica más comunes en bacterias patógenas, afectando a casi todas las familias de antibióticos. Ésta modificación puede consistir en 1) una mutación puntual en el gen que codifica para el sitio blanco (Ej: una mutación a nivel del gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la enzima ARN polimerasa, confiriendo resistencia a rifampicina); 2) una alteración enzimática del sitio blanco (Ej: metilación a nivel del ribosoma por una metilasa codificada por los genes *erm*); 3) un reemplazo o cambio del sitio blanco (Ej: meticilino resistencia en *S. aureus* debido a la presencia de una nueva PBP llamada PBP 2a) [15].

1.4) Mecanismos genéticos relacionados a la resistencia

Las bacterias han desarrollado mecanismos para adaptarse con rapidez y eficiencia a los cambios y estímulos ambientales, lo que les permite coordinar y regular la expresión de los genes para las estructuras con múltiples componentes o las enzimas de una o más vías metabólicas [33]. La resistencia bacteriana a los antibióticos es un aspecto particular de su evolución natural, seleccionada bajo la presión de los productos antibacterianos, tanto si se trata de antibióticos como de antisépticos o desinfectantes. Este fenómeno mundial incluye todos los gérmenes patógenos para el ser humano y las diversas clases de antibióticos. La resistencia de las bacterias a los antibióticos puede

ser natural, provenir de mutaciones o bien originarse por transferencia horizontal de genes[33].

1.4.a) Mutaciones

Una mutación es un cambio heredado en la secuencia de bases de los ácidos nucleicos, que constituyen el genoma de un organismo. La misma se produce al azar y en condiciones naturales con baja frecuencia, y se debe fundamentalmente a errores en los procesos de replicación del DNA[34]. En este escenario, un subconjunto de células bacterianas derivadas de una población susceptible desarrolla mutaciones en genes que afectan a la actividad de un determinado fármaco, dando como resultado la supervivencia de células bacterianas en presencia de la molécula antimicrobiana. Una vez que surge un mutante resistente, el antibiótico elimina la población susceptible y predominan las bacterias resistentes[15].

1.4.b) Transferencia horizontal de genes

La adquisición de ADN externo mediante transferencia horizontal de genes (THG) es uno de los mecanismos más importantes de evolución bacteriana y frecuentemente es responsable del desarrollo de resistencia antimicrobiana. Clásicamente las bacterias adquieren material genético externo a través de tres tipos de estrategias: 1) transformación; 2) transducción; 3) conjugación[15].

Particularmente en bacterias Gram negativas, muchos de los genes de resistencia están asociados a elementos genéticos móviles, permitiendo el movimiento entre diferentes moléculas de ADN (por ejemplo, el cromosoma bacteriano y un plásmido). Los genes que confieren resistencia se encuentran en forma de genes casetes particulares que colectivamente forman un grupo genético importante. Estos casetes pueden existir transitoriamente en una forma circular libre, pero no incluyen todas las funciones necesarias para su propio movimiento y están usualmente asociadas con elementos de captura y expresión de genes llamados integrones (Int) [35].

1.4.c) Integrones

Un integrón es generalmente definido por la presencia de un gen que codifica para una integrasa (*intI*), un sitio de recombinación específica (*attI*) y un promotor (P_{ant}). La secuencia aminoacídica de IntI ha sido utilizada como base para dividir los integrones en “clases”, con aquellos que poseen IntI 1 definidos como de “clase 1”, IntI 2 como de “clase 2” e IntI 3 como de “clase 3”. Los integrones de clases 1, 2, y 3 fueron los primeros identificados en asociación con elementos genéticos móviles[36], [37]. Los integrones de clase 1, los más frecuentes en clínica, se caracterizan por tener una secuencia 5' conservada (5'-CS), que contiene el gen codificador de la integrasa, y una secuencia 3' conservada (3'-CS), donde se sitúan los genes que confieren resistencia a amonio cuaternario y a las sulfamidas. Entre ambas regiones es donde se sitúan los genes casete[36]. Un casete génico típicamente consiste en poco más que un sólo gen sin promotor y un sitio de recombinación (*attC*). Estos sitios de recombinación difieren en longitud y secuencia, pero comparten regiones conservadas en sus extremos y son generalmente repeticiones invertidas imperfectas, predichas para formar estructuras de tallo-lazo[35]. Los genes en casete son integrados en lo que se denomina comúnmente región variable. El número de genes en casete en esta región es precisamente variable: se describieron desde integrones con región variable nula, como en In0, hasta algunos con más de siete genes en casete; sin embargo, la presencia de dos o tres casetes suele ser lo más habitual[38].

1.4.d) Secuencias de inserción (IS)

Son segmentos de ADN bacteriano que pueden moverse de una posición en un cromosoma a una posición diferente dentro de una misma molécula de ADN o entre moléculas distintas[39]. Las secuencias de inserción bacteriana se identificaron inicialmente durante los estudios de sistemas genéticos por su capacidad para generar mutaciones como resultado de su translocación. El interés en la resistencia a los antibióticos y los plásmidos transmisibles reveló posteriormente un papel importante de las IS en la diseminación de genes de resistencia y en la promoción de la adquisición de genes[40].

1.5) Resistencia en UPEC

La introducción de terapias antimicrobianas ha contribuido significativamente al manejo de esta patología. Sin embargo, la resistencia a los antimicrobianos en aquellos aislamientos provenientes de ITU es un ejemplo representativo de la creciente resistencia antimicrobiana[41], [42]. La producción de BLEEs ha emergido como un importante mecanismo de resistencia entre estos uropatógenos[41]. Los plásmidos que codifican para las BLEEs contienen, con frecuencia, otros genes de resistencia para distintos antimicrobianos, como aminoglucósidos, tetraciclinas e inhibidores de la vía del folato (trimetoprim-sulfametoxazol). Además, las cepas productoras de BLEE son con más frecuencia resistentes a quinolonas, que las cepas no productoras de BLEE[43]. La co-resistencia en *E. coli* a las oxiiiminocefalosporinas (especialmente mediada por BLEEs) y a las quinolonas es un evento mundial cada vez mayor, y en particular en América Latina. Sin embargo, la información disponible sobre la difusión en nuestro continente de diferentes clones y los factores de virulencia son escasos[31].

2) Objetivos

2.1) Objetivo general:

El objetivo del presente trabajo fue detectar las resistencias antibióticas asociadas a betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en aislamientos clínicos de cepas de *Escherichia coli* uropatógenas.

2.1.a) Objetivos específicos:

- Detectar genes de resistencia a antibióticos betalactámicos, distintos a *bla*_{CTX-M}.
- Detectar genes de resistencia a otros grupos de antibióticos.
- Detectar diferentes elementos genéticos móviles.

3) Materiales y Métodos

3.1) Cepas

Se trabajó con 21 cepas de *E. coli* uropatógenas sospechosas de producir de BLEE obtenidas de dos hospitales, entre el 1° de marzo del 2010 y el 28 de febrero del 2011. Cada aislamiento fue designado con la letra E o HP de acuerdo al hospital de origen. Los aislamientos fueron recuperados de muestras de orina. Las cepas fueron aisladas en McConkey lactosa (McL) y luego criopreservadas a -85°C en glicerol al 33% (v/v) (910µL de suspensión bacteriana+390µL de glicerol).

3.2) Ensayos fenotípicos: determinación de sensibilidad a antibióticos

Para evaluar la sensibilidad antibiótica de las cepas se utilizó la técnica de disco difusión de Kirby-Bauer, siguiendo las indicaciones del CLSI[44]. Para la confirmación de BLEE se colocaron los discos de ceftazidime, cefotaxima y ampicilina-sulbactam, de manera estratégica según recomendaciones del CLSI para la detección fenotípica de BLEE. Se probaron además los siguientes antibióticos: azitromicina, cloranfenicol, kanamicina, (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), estreptomina, tetraciclina. (BD BBL TM, Franklin Lakes, Estados Unidos)

3.3) Extracción de ADN

El ADN de las cepas se extrajo mediante “shock” térmico. Para eso se realizó una suspensión bacteriana, a partir de dos colonias previamente aisladas en medio TSA, en 200µL de buffer TE-tritón (TE:10 mM Tris:1 mM EDTA) 1% (v/v), la misma fue sometida 10 minutos a 100°C y luego colocada a -20°C por 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó 10 min a 13000rpm, conservando el sobrenadante y descartando el pellet. Las extracciones de ADN fueron conservadas a -20°C hasta su posterior uso.

3.4) Ensayo de conjugación

Para determinar si la resistencia a azitromicina era transferible se realizaron ensayos de conjugación según el protocolo de Shin y cols. modificado[45]. El primer día las cepas donantes fueron recuperadas del glicerol en placas de McL con 4mg/μL de ceftriaxona (CRO) (Laboratorio Libra, Montevideo, Uruguay), mientras que la cepa receptora *E. coli* J53-2 (F+ met pro rifR) fue recuperada en McL con el agregado de antibiótico. El segundo día se pusieron ambas cepas a crecer en 3mL de caldo LB (el cultivo de la cepa donante fue suplementado con 4mg/mL de CRO). Las condiciones de incubación fueron 37°C en agitación (200rpm) por tres horas. Pasada las tres horas se realizó la mezcla de conjugación con una relación 1:10 donante/receptor (200μl de la cepa donante en 2mL de la cepa receptora). La mezcla de conjugación fue sembrada con rastrillo (50μL y 100μl de la mezcla de conjugación, 100μl de la cepa donante y 100μL de la cepa receptora) en placas de McL suplementadas con 150μg/ml de rifampicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y 32μg/mL de azitromicina (Urufarma, Montevideo, Uruguay) e incubadas toda la noche a 37°C.

3.5) Caracterización de plásmido

Para conocer el tamaño del plásmido transferido mediante conjugación se llevó a cabo el protocolo de Barton et al[46]. Para el armado de los bloques se partió de una suspensión bacteriana equivalente a McFarland 7,4 en *buffer* de suspensión celular (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0). Los bloques se armaron a partir de 150 μl de la suspensión bacteriana, Proteinasa K (0,5 mg/mL) (Bioline, Londres, Reino Unido) y 150μl de agarosa de campo pulsado (Bio-Rad Laboratories S.A, California, USA) con el agregado de 2,5 mL SDS 10% (m/v) (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA) y 22,5 mL de TE (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0). Una vez solidificados se colocaron en 2 ml de *buffer* de lisis [Tris 50mM, EDTA 50mM, N-lauril sarcosina 1% (m/V) (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA), 0,25 mg/ml de Proteinasa K] y se incubaron durante 18 horas en un baño a 56°C con agitación. Pasadas las 18 horas se realizaron 5 lavados de 15 minutos en baño a 56°C con agitación, 2 con agua mQ y 3 con *buffer* TE. Posteriormente, los bloques tratados con la nucleasa S1 (5 U/mL) por 1 hora a 37°C, y se mantuvieron en *buffer* TBE 0,5X (45mM Tris base, 1mM EDTA, 45mM Ácido bórico) hasta el momento de armado

del gel. Paralelamente se procesó un bloque de *S. enterica* serovar Braenderup H9812, con XbaI (0.3 U/mL) (Gibco. BRL, Life Technologies, Inc., NY, USA) que genera bandas de tamaño conocido. La agarosa utilizada fue agarosa de campo pulsado y las condiciones de corrida fueron las siguientes: 18hs, 14°C, 6V, 2.2 pulso inicial, 54.2 pulso final. La corrida electroforética se llevó a cabo en un sistema CHEF DR-II (Bio-Rad Laboratories S.A, California, USA)

Para calcular el tamaño del plásmido se realizó una regresión lineal en Excel.

Para completar la caracterización de los plásmidos se les realizó búsqueda de grupos de incompatibilidad y sistemas de adicción mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores específicos[47], [48] (Tablas 1y 2).

Tabla 1. Cebadores para la determinación de los sistemas de adicción plasmídica utilizados en este trabajo

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
pemk F pemk R	AACGAGAATGGCTGGATGC CCAACGACACCGCAAAGC	232
ccdA F ccdB R	AGGAAGGGATGGCTGAGGT GGTAAAGTTCACGGGAGAC	230
relE F relE R	AAAAACCCGATGGCGACAG TGATAGACCAGGCGAAAAC	370
parD F parD R	ACGGACCAGCAGCACCAG AGCCCTTGAGCCTGTCCG	534
vagC F vagD R	GGGACCTGGATTTTGATGG GAGCAGATGTTGGTGTCG	210
hok F sok R	AGATAGCCCCGTAGTAAGTT GATTTTCGTGTCAGATAAGTG	203
pndC F pndA R	TCAATCAACCAGGGCTCT CCTCACCATCCAGACAAA	140
srnB F srnC R	ACTGATTGTAGCCTCTTCTTT CACCACTGTATTTCCCCTGT	171

Tabla 2. Cebadores utilizados en este trabajo para la búsqueda de grupos de incompatibilidad plasmídica.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
HI1 F HI1 R	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471
HI2 F HI2 R	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	644
I1 F I1 R	CGAAAGCCGGACGGCAGAA TCGTGTTCCGCCAAGTTCGT	139
X F X R	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	376
L/M F L/M R	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785
N F N R	GTCTAACGAGCTTACCGAAG GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559
FIA F FIA R	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462
FIB F FIB R	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	702
W F W R	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG GGTGCGCGGCATAGAACCGT	242
Y F Y R	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT	765
P F P R	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534
FIC F FIC R	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	262
A/C F A/C R	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465
T F T R	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750
FIIS F FIIS R	CTGTCGTAAGCTGATGGC CTCTGCCACAAACTTCAGC	270
F F F R	TGATCGTTTAAGGAATTTTG GAAGATCAGTCACACCATCC	270
K/B F K R	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	160
K/B F B/O R	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	160

3.6) Detección de genes de resistencia y secuencias de inserción

La búsqueda de betalactamasas se llevó a cabo mediante PCR. Las betalactamasas buscadas fueron: CTX-M, SHV, TEM y OXA 1[49] (Tabla 3).

Tabla 3. Cebadores de betalactamasas utilizados en este trabajo

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
PAN CTX M F PAN CTX M R	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	543 pb
CTX-M-1 F CTX-M-1 R	CCCATGGTTAAAAAATCACTG GCTAGCCGGGCCGCCAACGTGA	830 pb
CTX-M gr2 F CTX-M gr2 R	TTAATGATGACTCAGAGCATT GATACCTCGCTCCATTTATTGC	875 pb
CTX-M gr3 F CTX-M gr3 R	ACCTGATTAACTACAATCCCAT ACTTTCTGCCTTCTGCTCTGGC	514 pb
CTX-M gr4 F CTX-M gr4 R	GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG GTAAGCTGACGCAACGTCTG	473 pb
CTX-M-8 F CTX-M-8 R	TGAATACTTCAGCCACACG TAGAATTAATAACCGTCGGT	922 pb
CTX-9-M F CTX-9-M R	ATGGTGACAAAGAGARTGCAA TTACAGCCCTTCGGCGATGAT	841 pb
CTX-M-25 F CTX-M-25 R	AGAAAAAGCGTAAGGCGGGC CCGTCCGTGACAATTCTGGC	862 pb
SHV A SHV B	GGGTTATTCTTATTTGTGCG TTAGCGTTGCCAGTGCTC	900 pb
OT3 OT4	ATGAGTATTCAAACTTTCCG CCACTGCTTAATCAGTGAGG	900 pb
OXA 1 F OXA 1 R	GGCACCAGATTCAAACTTTCAA GACCCAAGTTTCCTGTAAGTG	575 pb

A aquellas cepas que mostraron resistencia a los antibióticos testados en el antibiograma se les realizó la búsqueda de genes de resistencia por PCR. Los genes buscados fueron los siguientes: *ermB* (resistencia a macrólidos); *aac* (resistencia a aminoglucósidos); *sul1* y *sul2* (resistencia sulfonamidas); *qnrA* y *qnrB* (resistencia a quinolonas) [Tabla 4] [31].

Tabla 4. Cebadores utilizados en este trabajo.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño
qnrA F qnrA R	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	516 pb
qnrB F qnrB R	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG ACGACGCCTGGTAGTTGTCC	469 pb
ermB F ermB R	CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC GAATCGAGACTTGAGTGTGC	359 pb
sul1 F sul1 R	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	436 pb
sul2 F sul2 R	TCAAGGCAGATGGCATTCC ATCGAAGCGCAGCCGCAAT	385 pb
aac F aac R	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTT	481 pb

QnrA y QnrB confieren resistencia a quinolonas; ErmB confiere resistencia a macrólidos; Sul1 y Sul2 confieren resistencia a sulfonamida; AAC confiere resistencia a aminoglucósidos

A todas las cepas se les realizó PCR para *int11*, regiones variables (RV) y secuencias de inserción (*IS10*, *IS26*, *ISCR1*, *IS903* e *ISEcp1*) [50], [51] [Tabla 5].

Tabla 5. Cebadores utilizados en la búsqueda de secuencias de inserción

Gen	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)
RV	5CS 3CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC AAGCAGACTTGACCTGAT	Variable
<i>int11</i>	I5 I3	ACCGCCAACCTTTCAGCACAT GCGTTCGGTCAAGGTTCTGG	928 pb
<i>IS26</i>	<i>IS26</i> Fw <i>IS26</i> 5'	CCTTTTGCTGATGGAGCTGC CAAAGTTAGCGATGAGGCAG	769 pb
<i>IS903</i>	<i>IS 903</i> Fw <i>IS 903</i> rev R	CCTACAATAAAGCCCTCATC CGGTTGTAATCTGTTGTCCA	760 pb
<i>ISEcp1</i>	tnpAISEcp1F ISEcp1R	AATACTACCTTGCTTTCTGA CAACCACCTTTCAATCATTTTT	462 pb
<i>ISCR1</i> (orf513)	F12R ORFend	AAACCAGCATGGTTGGCTAC CCGTTAAGCTCTTATGTGGG	1210 pb
+10	<i>IS10F</i> <i>IS10R</i>	GAGTGACTAGATGACATATC AATACGATGCCCATTTGACT	348pb

Para la PCR se utilizó un protocolo genérico para todas las reacciones con un volumen final de reacción de 25 µl y con la siguiente concentración final de reactivos: 1X Buffer, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, cebadores 0,5 µM, 0.625 U Taq Polimerasa.

Para detectar la variante *acc(6')-Ib-cr* una parte del producto de PCR para *aac(6')Ib* fue sometido a la digestión con la enzima BseGI (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) según el protocolo seguido por Vignoli et al [31].

3.7) Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación obtenidos por PCR fueron corridos en geles de agarosa al 1% (p/v) utilizando un marcador de peso molecular (MPM) de 100pb o 1Kb dependiendo el tamaño del amplicón. En el caso de la corrida del producto de digestión para la detección de la variante *acc(6')Ib-cr* se utilizó un gel de agarosa en TBE al 2% (p/v).

4) Resultados

4.1) Ensayos fenotípicos: determinación de sensibilidad a antibióticos

De las 21 cepas analizadas: 7 resultaron ser resistentes a cloranfenicol (33%); 10 a kanamicina; 12 a tetraciclina (57%); 13 a estreptomicina (61%); 13 a azitromicina (61%). De las 21 cepas, 8 resultaron ser resistentes a más de dos antibióticos testeados (38%) (Fig. 1) (Tabla 6).

Tabla 6. Perfiles de resistencia de los 21 aislamientos estudiados. C(Cloranfenicol); TE (Tetraciclina); K (Kanamicina); S (Estreptomomicina); AZM (Azitromicina)

Cepas	C	TE	K	S	AZM
E1	(S)	(R)	(R)	(I)	(R)
E2	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
E3	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)
E4	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)
E5	(R)	(R)	(S)	(R)	(S)
E6	(S)	(R)	(R)	(R)	(S)
E7	(I)	(S)	(R)	(R)	(S)
E8	(R)	(R)	(I)	(R)	(R)
E9	(S)	(R)	(R)	(I)	(S)
E10	(R)	(S)	(S)	(S)	(S)
E11	(S)	(R)	(R)	(I)	(R)
E12	(S)	(S)	(S)	(R)	(S)
E13	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
E14	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)
E15	(S)	(S)	(S)	(I)	(R)
HP01	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)
HP02	(R)	(S)	(R)	(I)	(S)
HP03	(R)	(R)	(I)	(R)	(R)
HP04	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)
HP05	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)
HP06	(S)	(S)	(R)	(R)	(S)

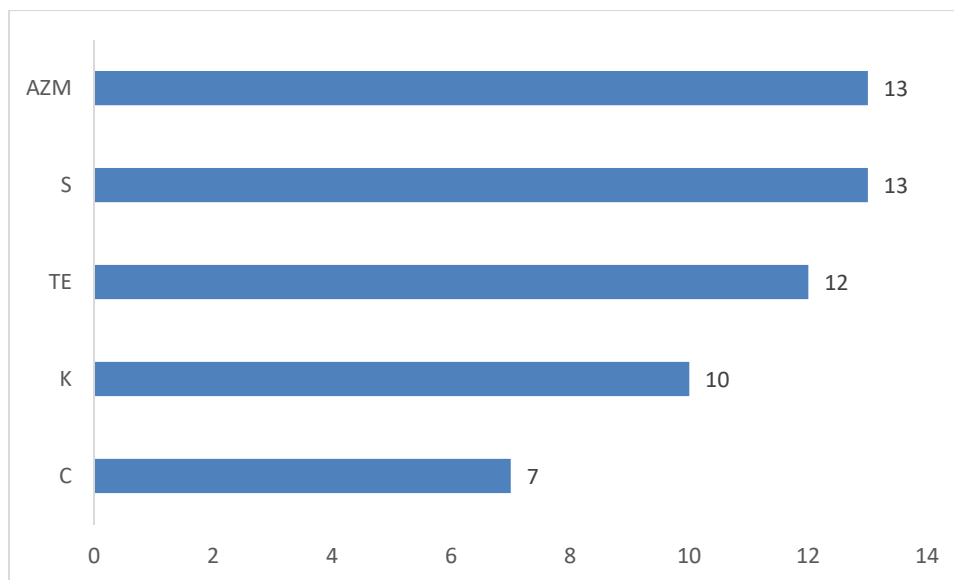


Figura 1. Gráfico en el cual se observa el número de aislamientos resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados. AZM (Azitromicina); S (Estreptomomicina); TE (Tetraciclina); K (Kanamicina)

4.2) Ensayos de conjugación y caracterización de plásmidos

De las cepas conjugadas solo una (E3) logró transferir la resistencia a azitromicina.

Los plásmidos transferidos presentaron un tamaño alrededor de los 150kb. Los mismos presentaron IncI1 como grupo de incompatibilidad y PndA/C como sistema toxina-antitoxina. [Fig. 2-Tabla. 7]

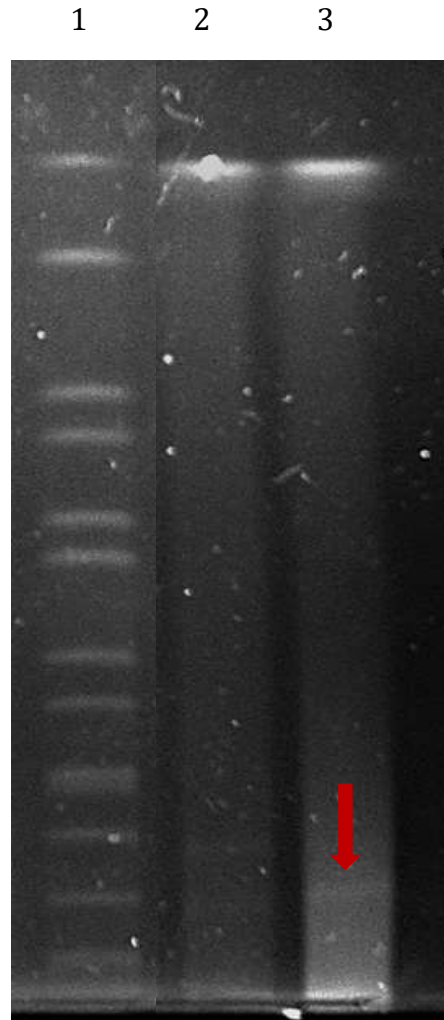


Figura 2. Determinación de tamaño plasmídico mediante tratamiento con nucleasa S1 y posterior Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE; Carriles: 1) *Salmonella* enterica ser. Braenderup H9812; 2) E3; 3) TcE3; HP03; TcHP03. Las flechas rojas indican los plásmidos transferidos mediante conjugación. Tc: Transconjugante

Tablas 7. Transconjugante (Tc) junto a sus perfiles de resistencia a Tetraciclina (TE), Kanamicina (K) y azitromicina (AZM). Grupo de incompatibilidad plasmídica y sistemas de adicción del plásmido conjugado.

TC	TE	K	AZM	Grupo de Incompatibilidad	Sistema de adicción
E3	S	S	R		
Tc E3	S	S	R	IncI1	PndA/C

4.3) Identificación genotípica de genes de resistencia

De las 21 cepas estudiadas todas presentaron algún alelo de *bla*_{CTX-M}, siendo *bla*_{CTX-M-2} la más frecuente, seguida de *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-14} (Fig. 3). Sólo una de las cepas presentó más de una *bla*_{CTX-M}, presentando *bla*_{CTX-2} y *bla*_{CTX-M-14}

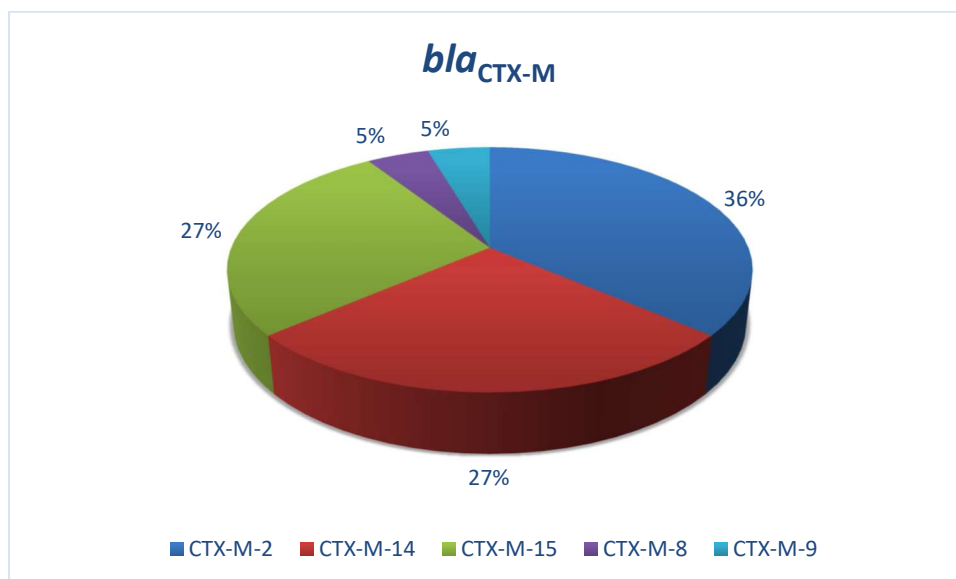


Figura 3. Gráfico en el que se observa la distribución de las variantes alélicas de *bla*_{CTX-M} en los aislamientos estudiados

Todas las cepas presentaron, además de *bla*_{CTX-M}, al menos uno de los otros genes de betalactamasas buscados, siendo el más frecuente *bla*_{TEM}, que se encontró en más del 70% de las cepas estudiadas. Por otra parte, *bla*_{SHV} fue detectado en 10 de 21 aislamientos (52%). Sería interesante conocer la secuencia nucleotídica de las mismas para saber a qué variante pertenecen. y cuál es su perfil de hidrólisis. Por otra parte *bla*_{OXA-1} fue detectado en 9 de 21 aislamientos (48%) [Figs.4 7].

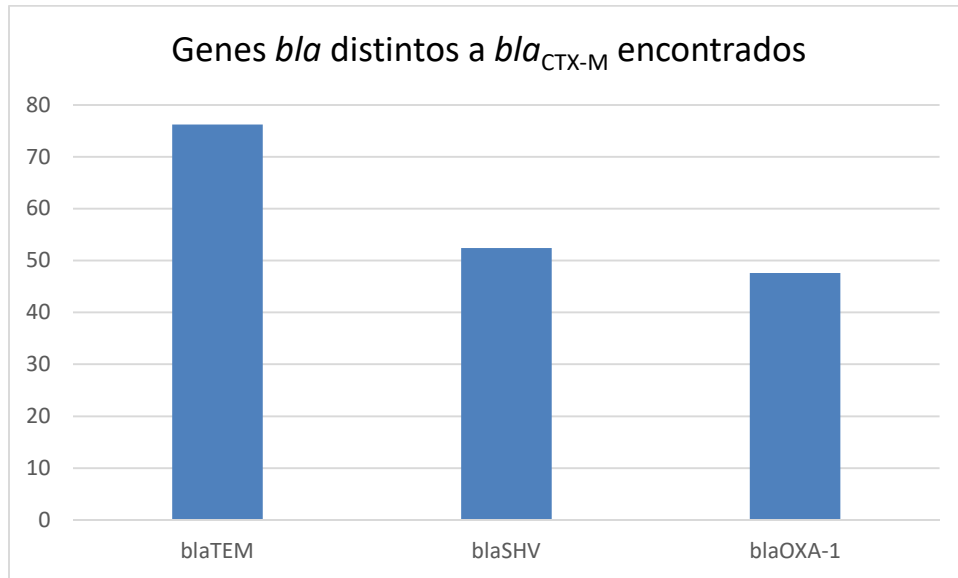


Figura 4. Gráfico que muestra la proporción de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1} en los 21 aislamientos estudiados



Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) del producto de PCR para el gen *bla*_{SHV}. En los carriles 1 y 15 se encuentra el marcador de peso molecular de 100pb (Maestrogen, Hsinchu, Taiwán). En los carriles 4,5,6,8,9,11,13,14,16, 20,21 muestra positivas para *bla*_{SHV}. Carril 22, control positivo. Carril 23 control de mezcla



Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) del producto de PCR para el gen *bla*_{TEM}. En los carriles 1 y 16 se encuentra el marcador de peso molecular de 100pb (Maestrogen, Hsinchu, Taiwán). En los carriles 4-15,17,20,22,23 aislamientos positivos para *bla*_{TEM}. En el carril 24 control positivo y en carril 25 control de mezcla.

Tabla8. Gráfico en el que se observa la asociación de *bla*_{CTX-M} con las diferentes betalactamasas asociadas.

<i>bla</i> _{CTX-M}	Genes de resistencia encontrados
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>sul1 aac(6')Ib</i>
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>ermB sul1 aac(6')Ib-cr</i>
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>sul1 aac(6')Ib-cr</i>
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV} <i>sul2 qnrB</i>
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{OXA-1}

En cuanto a aquellas cepas resistentes a macrólidos, 2 presentaron *ermB*. De las 10 cepas resistentes a kanamicina, 5 fueron positivas para *aac(6')Ib* de las cuales 4 correspondieron a la variante *aac(6')Ib-cr*.

En ningún aislamiento fue detectado *qnrA*, y sólo en uno fue detectado *qnrB*.

sul1 se encontró presente en 6 de las 21 cepas, mientras que *sul2* fue detectado en 12, coincidiendo ambos solamente en 3 cepas.

De las cepas estudiadas, 5 presentaron integrones de clase 1, y de éstas sólo 3 presentan *sul1*, y en 2 se encontraron regiones variables (RV). En la tabla 8 se pueden observar las secuencias de inserción encontradas en cada aislamiento. Todas las cepas presentaron algunas de las secuencias de inserción buscadas, siendo la más frecuente IS26, estando presente en más del 70%. [Fig. 8]

Tabla 9. Presencia de *int11*, regiones variables (Rv) y secuencias de inserción en los diferentes aislamientos. (+) Presencia; (-) ausencia

Cepas	<i>int11</i>	Rv	IS10	IS26	IS903	ISEcP1	ISCR1
E1	+	+	-	+	+	+	-
E2	-	-	+	-	-	-	+
E3	-	-	+	+	+	+	-
E4	-	-	+	+	+	+	-
E5	-	+	-	-	+	-	-
E6	+	-	+	+	-	-	+
E7	-	-	-	+	-	-	+
E8	-	-	+	-	-	-	-
E9	-	-	-	+	-	-	-
E10	+	+	-	+	-	+	-
E11	-	+	-	+	-	-	-
E12	-	-	+	-	+	-	+
E13	-	-	+	+	+	-	+
E14	-	+	+	+	+	-	-
E15	+	-	-	+	-	+	-
HP01	-	-	-	+	+	-	-
HP02	+	-	-	+	-	-	+
HP03	-	-	+	+	+	+	-
HP04	-	-	+	+	-	-	-
HP05	-	+	+	-	+	-	+
HP06	+	+	-	+	-	+	+

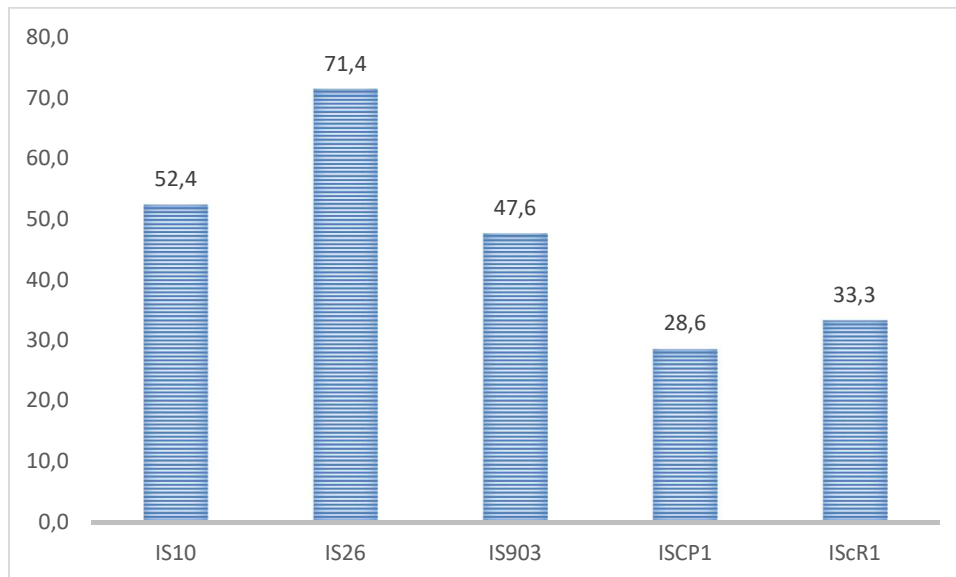


Figura 8. Gráfico en el cual se muestra la proporción de secuencias de inserción encontradas en los 21 aislamientos estudiados.

5) Discusión

El número de cepas de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos ha aumentado progresivamente, causando limitaciones de tratamiento. Hasta finales de la década de 1990, UPEC era relativamente susceptible a los antibióticos de primera línea. Sin embargo, varios estudios de vigilancia realizados durante la década de 2000 en Europa, América del Norte y del Sur demostraron que entre el 20% y el 45% de UPEC era resistente a los antibióticos de primera línea, incluidas las cefalosporinas, las fluoroquinolonas y la trimetoprim-sulfametoxazol[52]. En este estudio, de los 21 aislamientos analizados todos presentaron resistencia a al menos uno de los antibióticos probados. El alto nivel de resistencia observado resulta sorprendente ya que ninguno de estos antibióticos es utilizado rutinariamente en el tratamiento de infecciones urinarias, descartando así en principio la presión de selección. Azitromicina y estreptomicina fueron aquellos antibióticos para los cuales se encontró un mayor número de aislamientos resistentes (13/21) mientras que el cloranfenicol obtuvo los niveles más bajos de resistencia con un 30%. En el caso de la azitromicina (único macrólido efectivo contra Gram negativos) su uso se limita solo al tratamiento de infecciones diarreogénicas y sistémicas por *Salmonella* y *Shigella*[17]. Mientras que la

estreptomycin se ha reservado para el tratamiento combinado de la tuberculosis cuando se produce resistencia o intolerancia a la rifampicina y/o a la isoniazida[53], se han identificado diferentes mecanismos de resistencia a éstos antibióticos en enterobacterias, algunos de los cuales están codificados dentro del cromosoma bacteriano y otros codificados dentro de elementos transferibles como plásmidos.

En un aislamiento resistente a azitromicina (E3) fue detectado *ermB*; aunque el mismo se asocia normalmente al fenotipo MLS_B en cocos Gram positivos, los genes *erm* también han sido encontrados en enterobacterias[17], [54]. Los mismos han sido descritos en plásmidos capaces de portar más de un gen *erm*, como se observa en el plásmido de *E. coli* pTN48 que lleva secuencialmente un gen *erm (B)* más un gen *erm (C)* [17]. En enterobacterias su expresión es constitutiva ya que no han descrito genes *erm* inducibles en esta familia hasta el momento[17].

En cinco aislamientos resistentes a kanamicina se encontró *aac(6')-Ib*, de los cuales cuatro eran la variante *aac(6')-Ib-cr*. Este gen se ha dispersado rápidamente entre las enterobacterias. La resistencia a aminoglucósidos en enterobacterias básicamente es enzimática y puede deberse a dos mecanismos distintos, a la producción de una o varias enzimas inactivantes (AAC, APH y ANT) y a la presencia de metiltransferasas (ArmA, Rmt o Npm) [19]. La inactivación por modificación enzimática es el mecanismo más frecuente en el contexto clínico, siendo la enzima AAC(6') la más frecuente[16]. La misma causa resistencia de alto nivel a kanamicina, tobramicina, y netilmicina, y resistencia moderada a la amicacina[19]. El aumento y la diseminación de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos han reducido la eficacia de estos antibióticos y en algunos casos los han hecho prácticamente inutilizables[45]. Cabe destacar que hay una gran cantidad de enzimas, las cuales no fueron buscadas en éste estudio, que confieren resistencia a aminoglucósidos y que podrían explicar la resistencia a estreptomycin y a kanamicina del resto de las cepas, como por ejemplo *ant(3'')* y *aph(3')-I*; la primera confiere resistencia a estreptomycin y es espectinomycin, y la segunda a kanamicina y neomicina, ambas con incidencia moderada en enterobacterias[19].

En cuanto a tetraciclina y cloranfenicol la búsqueda de resistencia fue sólo fenotípica; siendo el cloranfenicol el antibiótico con el menor número de aislamientos resistentes. Ambos antibióticos presentan variados mecanismos de resistencia desde modificación del antibiótico, modificación del sitio blanco, hasta bombas de eflujo[55]. En el caso de las enterobacterias las bombas de eflujo contra tetraciclina codificadas por los genes *tet*, *tcr* y *otr* son muy comunes[56]. La mayoría de los genes *tet*, *tcr* y *otr* codifican las proteínas encargadas de expulsar la tetraciclina y son parte de la Superfamilia de Facilitadores Principales de transporte. Esto reduce la concentración de tetraciclina intracelular que a su vez protege los ribosomas dentro de la célula[55]. Estas proteínas comparten similitudes en la secuencia aminoacídica y estructuras de proteínas con otras proteínas de eflujo implicadas en la resistencia a múltiples fármacos, la resistencia a amonio cuaternario, el cloranfenicol y la resistencia a la quinolona[57]. El gen *tet(B)* codifica para una proteína de eflujo, que confiere resistencia tanto a la tetraciclina como a la minociclina, pero no a las glicilciclinas[55]. La detección de genes de resistencia a tetraciclinas en cepas productoras de BLEE está pobremente documentada. La información disponible procede, fundamentalmente de datos de secuencias de elementos móviles que codifican BLEE. En una cepa multirresistente de *E. coli* productora de CTX-M-15 en Toronto (Canadá), ha demostrado la presencia de una región de multirresistencia en la cual se incluyen el gen de resistencia a tetraciclinas *tetA* y los genes de resistencia a aminoglucósidos *aac(6')-Ib* y *aac(3)-II*[58]. A diferencia de la tetraciclina, el principal mecanismo de resistencia al cloranfenicol es la inactivación enzimática debido a una cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), aunque también puede estar relacionada la expulsión activa del antibiótico. Tanto los genes que codifican para CAT como los exportadores específicos, a menudo se asocian a elementos móviles como plásmidos, transposones o genes casete y pueden transferirse por conjugación, movilización, transducción o transformación entre bacterias de diferentes géneros y especies. Por otro lado también se han identificado algunos transportadores cromosómicos de múltiples fármacos que exportan cloranfenicol.[55]

En los aislamientos se han detectado *sul 1* y *sul 2*, ambos relacionados con la resistencia a sulfonamidas; la misma no ha sido buscada de manera fenotípica en este trabajo. Las

sulfonamidas se han usado solas o en combinación con trimetoprima para el tratamiento de las infecciones urinarias, lo que explicaría los altos niveles de resistencia comúnmente reportados a estos agentes antimicrobianos entre las cepas de *E. coli*[59]. El gen *sul1* se encuentra normalmente en los llamados integrones de clase 1; se ubica corriente abajo de los genes casete en el extremo 3' conservado. Mientras que *sul2* se encuentra usualmente en plásmidos de la familia IncQ o en otro tipo representado por pB1. En este trabajo sólo tres de los cinco aislamientos con *int11* fueron positivos también para *sul1*, mientras que tres fueron positivos para *sul1* y negativos para *int11*, esto no es común en la literatura, pero coincide con algunos de los resultados obtenidos en otros trabajos[59], [60]. En este trabajo se plantea la posibilidad de que el gen *sul1* se haya perdido o que se encuentre en otro contexto génico, aunque son necesarios más estudios para confirmar dicha teoría. La presencia de *sul2* es independiente de los integrones, y fue el que se encontró con más frecuencia lo que coincide con el trabajo realizado por Blahna et al[61].

La poca presencia de *qnr* (*qnrA* y *qnrB*) en estos aislamientos puede deberse a la baja frecuencia en enterobacterias de estos genes, teniendo en cuenta que no es uno de los mecanismos principales de resistencia a quinolonas en esta familia. [19] La ventaja que reportan estos genes es que se encuentran a nivel plasmídico lo que hace que su diseminación sea más sencilla pudiendo en un futuro ser más frecuentes.

Uno de los mecanismos de resistencia más comunes detectados en UPEC es la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE); esto supone un grave problema terapéutico porque además de ser resistentes a la gran mayoría de betalactámicos, UPEC presenta altas tasas de resistencia a antimicrobianos de otras familias[20]. La presencia de *bla*_{CTX-M} en todos los aislamientos coincide con lo descrito en la literatura en ese momento[28], [31]. A diferencia de lo descrito por Vignoli et al. el gen más frecuente fue *bla*_{CTX-M-2} seguido por *bla*_{CTX-M-15}, siendo las menos frecuentes *bla*_{CTX-M-8} y *bla*_{CTX-M-9}, con un aislamiento cada una[31]. Es destacable la presencia de más de un gen codificador de betalactamasas en todos los aislamientos, siendo el más frecuente *bla*_{TEM-1} que se encontró en más de un 70% de los aislamientos (Ver sección 4.3). Lo más interesante es que todas las cepas estudiadas presentaron al

menos dos betalactamasas, llegando a estar presentes las cuatro (CTX-M, TEM, SHV y OXA-1) en un mismo aislamiento (E4 Y E9), ambas con CTX-M-15; algo similar fue descrito por en una cepa multirresistente de *E.coli* productora de CTX-M-15 en Toronto (Canadá), en donde se ha demostrado la presencia de una región de multirresistencia que contiene transposones o copias parciales de transposones y 5 copias de IS26. En esa región se incluyen los genes que codifican, además para CTX-M-15, OXA-1, y TEM-1[58]. En cuanto a las BLEEs también se han hallado relaciones con otros genes, como ejemplo, ambos aislamientos positivos para *ermB* presentaban *bla*_{CTX-M-14}, algo que fue descrito recientemente por Di Pilato et. al en un aislamiento proveniente de una muestra de urocultivo de Uruguay aislada en 2010[62]. En cuanto a las variantes *cr* de *aac(6')Ib* todas se encontraron en aislamientos con *bla*_{CTX-M-15}, asociación descrita por Bado et. al, la cual describe esta asociación como la más frecuente en una unidad de cuidados intensivos de un hospital en Uruguay[63]. Por último, la asociación de *bla*_{CTX-M-8} con *qnrB* también descrita en Uruguay, pero por García et. al en un hospital pediátrico[49].

Finalmente, la presencia de secuencias de inserción fue importante, todos los aislamientos presentaron al menos una de las secuencias de inserción buscadas. Esto no algo sorprendente ya que desde hace mucho tiempo se conoce el rol que juegan las secuencias de inserción como IS26, la cual fue la secuencia de inserción más frecuente (16/21), en la diseminación de genes de resistencia en Gram negativos, asociándose a éstos y permitiendo así su movilidad[64], [65].

6) Conclusión

E. coli UPEC es un patógeno muy versátil que no sólo combina una gran batería de factores de virulencia que le permite colonizar el tracto urinario, sino que además presenta una gran capacidad de adquirir resistencia de otras bacterias a través de THG; esto a su vez le permite presentar resistencia a una gran cantidad de antibióticos incluso a aquellos no implicados en el tratamiento de infecciones urinarias. Las BLEE juegan un rol fundamental en esto, ya que además de conferir resistencia a la mayoría de betalactámicos tienden a estar asociada a genes que confieren resistencia a otras familias de antimicrobianos. Esto es un llamado de atención al uso racional de antibióticos ya que estos pueden tener un impacto directo e indirecto en la adquisición de resistencia por parte de aquellos microorganismos patógenos.

7) Perspectivas

Con el fin de profundizar en algunos de los resultados obtenidos, se espera en futuros estudios:

- Caracterizar las betalactamasas SHV, TEM encontradas.
- Diseñar ensayos de conjugación con otros antibióticos para determinar la capacidad de transferencia de las resistencias encontradas.
- Adquirir cebadores y poner a punto una PCR para la búsqueda de genes de resistencia a cloranfenicol y tetraciclina.
- Caracterizar el entorno genético de las diferentes *bla*_{CTX-M} encontradas.

Referencias

- [1] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and P. A., Eds., "Enterobacteriaceae," in *Microbiología Médica*, 7ma ed., Barcelona, España: Elsevier S, 2014, pp. 258–273.
- [2] F. Schelotto and G. Alcorta, "Principales grupos de bacilos Gram negativos no exigentes," in *Temas de bacteriología y virología médica*, 4ta. Edici., Montevideo: Oficina del libro FEFMUR, 2008, pp. 369–393.
- [3] R. M. Robins-browne, K. E. Holt, D. J. Ingle, and D. M. Hocking, "Are Escherichia coli Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing?," vol. 6, no. November, pp. 1–9, 2016.
- [4] P. Murray, Rosenthal, *Microbiología Médica*, 7a. Edició. Barcelona, España: Elsevier S.
- [5] A. Shibl, P.-Y. Hong, M. Abd El Ghany, H. Sharaf, G. A. Hill-Cawthorne, and M. H. Al-agamy, "Genomic characterization of NDM-1 and 5, and OXA-181 carbapenemases in uropathogenic Escherichia coli isolates from Riyadh, Saudi Arabia," *PLoS One*, vol. 13, no. 8, p. e0201613, 2018.
- [6] A. L. Flores-Mireles, J. N. Walker, M. Caparon, and S. J. Hultgren, "Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options," vol. 13, no. 5, pp. 269–284, 2016.
- [7] B. Foxman, "The epidemiology of urinary tract infection," *Nat. Rev. Urol.*, vol. 7, no. 12, pp. 653–660, 2010.
- [8] I. Bado, N. Cordeiro, V. García, L. Robino, V. Seija, and R. Vignoli, "Principales grupos de antibioticos," in *Temas de bacteriología y virología médica*, 4ta. Edici., Montevideo: Oficina del libro FEFMUR, 2008, pp. 725–750.
- [9] M. H. Abdul-Aziz *et al.*, "Beta-Lactam Infusion in Severe Sepsis (BLISS): a prospective, two-centre, open-labelled randomised controlled trial of continuous versus intermittent beta-lactam infusion in critically ill patients with severe sepsis," *Intensive Care Med.*, vol. 42, no. 10, pp. 1535–1545, Oct. 2016.
- [10] J. Gómez, E. García-Vázquez, and A. Hernández-Torres, "Los betalactámicos en la práctica clínica," *Rev Esp Quim.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–9, 2015.

- [11] C. Suárez and F. Gudiol, "Antibióticos betalactámicos," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 27, no. 2, pp. 116–129, 2009.
- [12] C. Beltrán, "Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica," *Rev Chil Infect*, vol. 21, no. 1, pp. 39–44, 2004.
- [13] M. García-Gómez, L. Guío, J. L. Hernández, B. Vilar, J. I. Pijoán, and J. M. Montejo, "Bacteriemias por enterobacterias productoras de beta-lactamasas (BLEE, AmpC y carbapenemasas): asociación con los cuidados sanitarios y los pacientes oncológicos," *Rev. española Quimioter.*, vol. 28, no. 5, pp. 256–62, 2015.
- [14] J. M. A. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, and L. J. V Piddock, "Molecular mechanisms of antibiotic resistance," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, no. 1, pp. 42–51, 2015.
- [15] J. M. Munita and C. A. Arias, "Mechanisms of Antibiotic Resistance Jose," *Microbiol Spectr.*, vol. 4, no. 2, pp. 1–37, 2016.
- [16] M. S. Ramirez and M. E. Tolmasky, "Aminoglycoside Modifying Enzymes," *Drug Resist. Updat.*, vol. 13, no. 6, pp. 151–171, 2010.
- [17] C. Gomes *et al.*, "Macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae: Focus on azithromycin," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–30, 2017.
- [18] L. L. Silver, "Fosfomicin: Mechanism and resistance," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 7, no. 2, pp. 1–11, 2017.
- [19] F. Navarro, E. Miró, and B. Mirelis, "Interpretive reading of enterobacteria antibiograms," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 28, no. 9, pp. 638–645, 2010.
- [20] D. L. Paterson and R. A. Bonomo, "Clinical Update Extended-Spectrum Beta-Lactamases : a Clinical Update," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 18, no. 4, pp. 657–686, 2005.
- [21] K. Bush and G. A. Jacoby, "Updated functional classification of β -lactamases," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 3, pp. 969–976, 2010.
- [22] D. M. Livermore, "Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 41 Suppl D, pp. 25–41, Jun. 1998.
- [23] Y. A. Celis, I. Y. P. Manrique, E. M. V. de Silva, M. T. R. Reza, and J. R. M. Anaya, "Ambiente genético del Gen blaCTX-M-12 en aislamientos hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae*," *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 11, no. 1, pp. 48–58, 2009.

- [24] Bradford PA, "Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 14, no. 4, pp. 933–951, 2001.
- [25] M. M. D'Andrea, F. Arena, L. Pallecchi, and G. M. Rossolini, "CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 303, no. 6–7, pp. 305–317, 2013.
- [26] D. L. Paterson *et al.*, "Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, no. 11, pp. 3554–60, Nov. 2003.
- [27] Z. A. Qureshi, D. L. Paterson, A. Y. Peleg, and J. M. Adams-haduch, "Clinical Characteristics of Bacteremia Due to Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae in the Era of CTX-M and KPC-type β -Lactamases," *Clin Microbiol Infect.*, vol. 18, no. 9, pp. 887–893, 2013.
- [28] R. Cantón, J. M. González-Alba, and J. C. Galán, "CTX-M enzymes: Origin and diffusion," *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. APR, 2012.
- [29] H. Lahlaoui, A. Ben Haj Khalifa, and M. Ben Moussa, "Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL)," *Med. Mal. Infect.*, vol. 44, no. 9, pp. 400–404, 2014.
- [30] J. Rodriguez-Bano *et al.*, "Bacteremia Due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in the CTX-M Era: A New Clinical Challenge," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 43, no. 11, pp. 1407–1414, 2006.
- [31] R. Vignoli *et al.*, "Extended-spectrum β -lactamases, transferable quinolone resistance, and virulotyping in extra-intestinal *E. coli* in Uruguay," *J. Infect. Dev. Ctries.*, vol. 10, no. 1, pp. 43–52, 2016.
- [32] L. Martínez-Martínez, A. Pascual, and G. A. Jacoby, "Quinolone resistance from a transferable plasmid.," *Lancet (London, England)*, vol. 351, no. 9105, pp. 797–9, Mar. 1998.
- [33] J. Oromí, "Resistencia bacteriana a los antibióticos," *Med. Integr.*, vol. 36, no. 10, pp. 367–370, 2014.
- [34] A. J. F. Griffiths, S. R. Wessler, R. C. Lewontin, W. M. Gelbart, iDavid T. Suzuk, and

- J. H. Miller, "Mutation, Reparation and Recombination," in *Introduction to Genetic Analysis*, 8th ed., New York: W H Freeman & Co, 2006, pp. 451–480.
- [35] S. R. Partridge, G. Tsafnat, E. Coiera, and J. R. Iredell, "Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons: Review article," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 33, no. 4, pp. 757–784, 2009.
- [36] F. Navarro and E. Miró, "Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión," *Enferm Infecc Microbiol Clin*, vol. 25, no. 2, pp. 11–7, 2007.
- [37] Y. Deng *et al.*, "Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons," *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–11, 2015.
- [38] J. A. Di Conza and G. O. Gutkind, "integrones: Los coleccionistas de genes," *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 42, no. 1, pp. 63–78, 2010.
- [39] A. J. F. Griffiths, S. R. Wessler, R. C. Lewontin, W. M. Gelbart, D. T. Suzuki, and J. H. Miller, "The dynamyc genome: transposable elements," in *An Introduction to Genetic Analysis*, 8th ed., New York: Freeman, W H & Co Ltd., 2005, pp. 423–450.
- [40] M. Chandler and J. Mahillon, "Insertion Sequences Revisited," *Mob. DNA II*, vol. 62, no. 3, pp. 305–366, 2014.
- [41] M. Mukherjee, S. Basu, S. K. M. Mukherjee, and M. Majumder, "Multidrug-resistance and extended spectrum beta-lactamase production in uropathogenic E. coli which were isolated from hospitalized patients in Kolkata, India," *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 7, no. 3, pp. 449–453, 2013.
- [42] R. Ramazanzadeh, "Etiologic agents and extended-spectrum beta-lactamase production in urinary tract infections in Sanandaj, Iran," *East. J. Med.*, vol. 15, no. 2, pp. 57–62, 2010.
- [43] C. Rodríguez-Avial, I. Rodríguez-Avial, E. Hernández, and J. J. Picazo, "Aumento significativo de la resistencia a fosfomicina en cepas de Escherichia coli productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de urocultivos (2005-2009-2011)," *Rev. española Quimioter.*, vol. 26, no. 1, pp. 43–6, 2013.
- [44] M. Wikler, F. Cockerill, W. Craig, M. Dudley, G. Eliopoulos, and D. Hecht, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement*, vol. 27, no. 1. 2007.

- [45] S. Y. Shin *et al.*, "Characteristics of aac(6')-IB-cr gene in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Chungnam area," *Korean J. Lab. Med.*, vol. 29, no. 6, pp. 541–550, 2009.
- [46] B. M. Barton, G. P. Harding, and A. J. Zuccarelli, "A General Method for Detecting and Sizing Large Plasmids," *Anal. Biochem.*, vol. 226, pp. 235–240, 1995.
- [47] A. Carattoli *et al.*, "Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016.," *Euro Surveill.*, vol. 22, no. 31, pp. 1–5, Aug. 2017.
- [48] B. Mnif *et al.*, "Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 65, no. 8, pp. 1599–1603, 2010.
- [49] V. García-Fulgueiras *et al.*, "Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay.," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 66, no. 8, pp. 1725–9, Aug. 2011.
- [50] R. Papa-Ezdra, I. Bado, L. Caiata, R. Vignoli, and V. Seija, "First report of *Pseudomonas aeruginosa* co-harboring blaVIM-2 and blaPER-1 in Latin America," *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 15, pp. 121–122, 2018.
- [51] N. F. Cordeiro *et al.*, "Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the aac(6')-Ib-cr variant isolated from feces of inpatients in an intensive care unit in Uruguay [7]," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, no. 2, pp. 806–807, 2008.
- [52] A. Brolund, "Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective.," *Infect. Ecol. Epidemiol.*, vol. 4, pp. 1–9, 2014.
- [53] R. Vignoli and L. Pardo, "Macrólidos," in *Mecanismo de Resistencia a los Antibióticos*, A. C. Gales and R. Vignoli, Eds. Montevideo, 2016, pp. 133–144.
- [54] M. Szemraj, T. Czekaj, J. Kalisz, and E. M. Szewczyk, "Differences in distribution of MLS antibiotics resistance genes in clinical isolates of staphylococci belonging to species: *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* and *S. warneri*," *BMC Microbiol.*, vol. 19, no. 1, p. 124, Jun. 2019.
- [55] M. C. Roberts and S. Schwarz, "Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms," in *Mayers D.L. (eds) Antimicrobial Drug Resistance. Infectious*

- Disease. Humana Press*, vol. 199, 2009, pp. 227–264.
- [56] R. Tao, G. G. Ying, H. C. Su, H. W. Zhou, and J. P. S. Sidhu, “Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China,” *Environ. Pollut.*, vol. 158, no. 6, pp. 2101–2109, 2010.
- [57] I. T. Paulsen, M. H. Brown, and R. A. Skurray, “Proton-dependent multidrug efflux systems,” *Microbiol. Rev.*, vol. 60, no. 4, pp. 575–608, 1996.
- [58] L. Martínez-Martínez, “Asociación de BLEE con otros mecanismos de resistencia,” *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 2, no. 25, pp. 38–47, 2007.
- [59] A. Gündoğdu, Y. B. Long, T. L. Vollmerhausen, and M. Katouli, “Antimicrobial resistance and distribution of sul genes and integron-associated intI genes among uropathogenic Escherichia coli in Queensland, Australia,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 60, no. 11, pp. 1633–1642, 2011.
- [60] M. Domínguez *et al.*, “Occurrence of Transferable Integrons and sul and dfr Genes Among Sulfonamide-and/or Trimethoprim-Resistant Bacteria Isolated From Chilean Salmonid Farms,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. April, pp. 1–14, 2019.
- [61] M. T. Blahna, C. A. Zalewski, J. Reuer, G. Kahlmeter, B. Foxman, and C. F. Marrs, “The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic Escherichia coli in Europe and Canada,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 57, no. 4, pp. 666–672, 2006.
- [62] V. Di Pilato, R. Papa-Ezdra, A. Chiarelli, V. García-Fulgueiras, L. Pallecchi, and R. Vignoli, “Characterization of the first blaCTX-M-14/ermB-carrying IncI1 plasmid from Latin America,” *Plasmid*, vol. 102, pp. 1–5, Mar. 2019.
- [63] I. Bado *et al.*, “CTX-M-15 in combination with aac(6′)-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae, including K. pneumoniae ST258, in an ICU in Uruguay,” *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 6, pp. 5–9, 2016.
- [64] S. F. Tian, Y. Z. Chu, B. Y. Chen, H. Nian, and H. Shang, “ISEcp1 element in association with bla(CTX-M) genes of E. coli that produce extended-spectrum β -lactamase among the elderly in community settings,” *Enferm. Infecc. Microbiol.*

Clin., vol. 29, no. 10, pp. 731–4, Dec. 2011.

- [65] C. J. Harmer, R. A. Moran, and R. M. Hall, “Movement of IS26-associated antibiotic resistance genes occurs via a translocatable unit that includes a single IS26 and preferentially inserts adjacent to another IS26.,” *MBio*, vol. 5, no. 5, pp. e01801-14, Oct. 2014.