



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

Caracterización de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas en muestras alimentarias, ambientales y clínicas

Elena Ojer Usoz

Pamplona, Julio 2015



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

**Caracterización de enterobacterias productoras de β -lactamasas
de espectro extendido aisladas en muestras alimentarias,
ambientales y clínicas**

Memoria presentada por D^a Elena Ojer Usoz para optar al Grado de Doctor por la
Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento Interfacultativo de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Navarra, y estimamos que puede ser presentado al tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, julio de 2015

Dra. Ana Isabel Vitas Pemán

Dr. David González Fernández

“Como no sabía que era imposible, lo hice”

A. Einstein

A Javi, Ruth y Lucas

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerles a Isabel y a Anabel por haberme dado la oportunidad de empezar a trabajar en el laboratorio con ellas, por confiar en mí y animarme para realizar esta tesis.

A mi directora de tesis, la Dra. Anabel Vitas, por contagiarme su pasión por el trabajo bien hecho. Por su disponibilidad, por su dedicación, por aportar puntos de vista diferentes a mis escritos, por las correcciones y por transmitirme confianza en todo momento.

A mi codirector de tesis, Dr. David González, por su interés en aprender conmigo, por ayudarme a entender la parte molecular de esta investigación y por involucrarse siempre en mi trabajo.

A mis compañeras “microbias”. A María, compañera y amiga durante todo este tiempo. Por todo lo que me has enseñado, por tu interés y ayuda en cualquier momento. Por escucharme en mis momentos de agobio y estar siempre ahí. A Leire por compartir conmigo tantos momentos divertidos dentro y fuera del laboratorio.

A todo el Departamento de Microbiología y Parasitología, al Dr. Nacho Moriyón y al Dr. Guillermo Martínez de Tejada, por todas las gestiones realizadas para la concesión de la beca. A Alberto, Pedro y Andrés por resolver mis dudas con PCRs, geles y equipos. A Raquel por su disponibilidad y ayuda con las AmpC, y a Paloma por la puesta a punto de las PCRs. A todos los que estáis en el departamento y siempre me habéis echado una mano con lo que he necesitado.

Al Servicio de Microbiología de la Clínica Universidad de Navarra por haberme permitido realizar parte de este trabajo en su laboratorio. Al Dr. Leiva por su apoyo y confianza desde el principio, por ayudarme a interpretar las CMI y resolver mis dudas “clínicas”.

A todos los alumnos y alumnas que han pasado por el laboratorio y que han trabajado conmigo en diferentes partes de esta investigación, a Jean Philippe, Elisa, Rebeca, Marco, Marta, Theo y Eric.

A la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra por la financiación concedida para esta investigación.

A mi familia y en especial a mis padres por haber confiado en mí y haberme dado su apoyo desde el principio en esta aventura.

Y por supuesto al que ha hecho posible que esta tesis salga adelante. A Javi, mi marido, porque siempre has confiado en mí, has tenido paciencia y me has animado cuando más lo necesitaba. Porque sin tu ayuda, ninguno de los proyectos emprendidos estos años hubiera sido posible. A mi peques Ruth y Lucas por sus gritos y sus sonrisas cada vez que llegaba a casa, y por transmitirme su incansable energía.

A todos, GRACIAS.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ABREVIATURAS

CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN	1
1.1. Resistencia a antibióticos: la pandemia del Siglo XXI.....	3
1.2. Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	5
1.3. Filogenia y virulencia de <i>Escherichia coli</i>	7
1.4. Resistencia a antibióticos en <i>Enterobacteriaceae</i>	10
1.4.1. Resistencia a antibióticos β -lactámicos.....	10
1.4.2. β -lactamasas de espectro extendido.....	15
1.4.3. Otras β -lactamasas.....	19
1.4.4. Resistencia a antibióticos no β -lactámicos asociados a BLEEs.....	20
1.5. Problemática actual: diseminación de las BLEEs.....	21
1.6. Avance de resistencias: necesidad de vigilancia y caracterización de BLEEs.....	25
CAPÍTULO 2 – HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	29
CAPÍTULO 3 – MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1. Selección de muestras.....	37
3.1.1 Muestras de alimentos.....	38
3.1.2. Muestras ambientales.....	42
3.1.3. Muestras clínicas.....	44
3.2. Ensayos microbiológicos.....	44
3.2.1. Aislamiento de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación.....	44

3.2.2	Identificación y conservación de cepas	47
3.3.	Métodos fenotípicos de detección de BLEEs.....	47
3.3.1.	Técnicas de difusión en disco	48
3.3.3.1	Test de disco combinado	49
3.3.1.2.	Test de sinergia de doble disco	50
3.3.2.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	51
3.3.3.	Estudio de otras betalactamasas	53
3.3.3.1	Detección de β -lactamasas de tipo AmpC	53
3.3.3.2	Detección de carbapenemasas de tipo KPC	54
3.3.3.3	Detección de metalo- β -lactamasas	54
3.3.3.4	Detección de OXA-48	55
3.4.	Detección de genes codificantes de BLEEs	55
3.4.1.	Extracción del ácido desoxirribonucleico	55
3.4.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	56
3.4.2.1	Detección de genes SHV, TEM y OXA	56
3.4.2.2	Detección de genes CTX-M.....	57
3.4.2.3	Detección de genes de otras β -lactamasas	59
3.4.2.4	Electroforesis.....	59
3.4.3.	Secuenciación de los productos amplificados.....	60
3.5.	Estudio filogenético de cepas de <i>Escherichia coli</i>	60
3.6.	Estudio mediante <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	62
3.6.1	Extracción del ADN	62
3.6.2	Análisis mediante PCR y secuenciación	63
3.6.3	Análisis bioinformático	64
3.7.	Análisis estadístico	67

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE ENTEROBACTERIAS BLEEs AISLADAS EN MUESTRAS DE ALIMENTOS.....69

4.1.	Introducción	71
4.2.	Prevalencia de cepas de enterobacterias resistentes a cefpodoxima en alimentos	71
4.3.	Caracterización de la susceptibilidad antibiótica	76
4.4.	Caracterización de los genes implicados en las resistencias	84
4.5.	Caracterización de otras β -lactamasas.....	89

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE ENTEROBACTERIAS BLEEs AISLADAS EN MUESTRAS AMBIENTALES.....91

5.1.	Introducción	93
5.2.	Prevalencia de cepas de enterobacterias resistentes a cefpodoxima en muestras ambientales	93
5.2.1	Ambientes acuáticos	94
5.2.2.	Ambientes de producción animal.....	98
5.3.	Caracterización de la susceptibilidad antibiótica	101
5.3.1	Ambientes acuáticos	101
5.3.2.	Ambientes de producción animal.....	107
5.4.	Caracterización de los genes implicados en las resistencias	113
5.4.1	Ambientes acuáticos	114
5.4.2.	Ambientes de producción animal.....	117
5.5.	Caracterización de otras β -lactamasas.....	120

CAPÍTULO 6 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE <i>E. coli</i> BLEEs AISLADAS EN MUESTRAS CLÍNICAS.....	125
6.1. Introducción	127
6.2. Caracterización de la susceptibilidad antibiótica	128
6.3. Caracterización de los genes implicados en las resistencias	134
6.4. Caracterización de otras β -lactamasas.....	137
CAPÍTULO 7 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ESTUDIO FILOGENÉTICO DE CEPAS DE <i>E. coli</i> PRODUCTORAS DE BLEEs.....	139
7.1. Introducción	141
7.2. Distribución de BLEEs según los grupos filogenéticos	141
7.3. Análisis de complejos clonales y secuencias tipo mediante MLST	147
7.3.1 STs y CCs de cepas procedentes de alimentos.....	150
7.3.2 STs y CCs de cepas procedentes de ambientes acuáticos.....	153
7.3.3 STs y CCs de cepas procedentes de ambientes de producción animal.....	155
7.3.4 STs y CCs de cepas procedentes de muestras clínicas.....	158
CAPÍTULO 8 – DISCUSIÓN FINAL	163
CAPÍTULO 9 – CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFÍA	185
ANEXO I.....	211
ANEXO II.....	219

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.	Principales antibióticos β -lactámicos empleados en clínica.....	12
Tabla 1.2.	Clasificación combinada de las β -lactamasas (Ambler, 1980; Bush y col., 1995).....	14
Tabla 1.3.	Características de las minor BLEEs (adaptación de Naas y col., 2008)..	18
Tabla 1.4.	Principales antibióticos no β -lactámicos empleados en clínica.....	21
Tabla 3.1.	Grupos de alimentos incluidos en el estudio	39
Tabla 3.2.	Número y tipos de muestras analizadas en las poblaciones de Navarra seleccionadas en el estudio.	41
Tabla 3.3.	Localidades EDAR y ríos a los que vierten el agua	42
Tabla 3.4.	Número de muestras de piensos analizadas y tipo de ganado al que van destinadas	43
Tabla 3.5.	Antibióticos y rangos de concentraciones utilizadas en la determinación de las CMI's	52
Tabla 3.6.	Secuencias de nucleótidos de los cebadores empleados, indicando tamaño esperado del amplicón, temperatura de hibridación y referencia bibliográfica.....	58
Tabla 3.7.	Cepas utilizadas como controles en las PCR para detectar <i>bla</i> _{BLEEs}	59
Tabla 3.8.	Secuencias de nucleótidos de los cebadores empleados en la PCR triple.	62
Tabla 3.9.	Secuencia de nucleótidos de los cebadores de PCR de los siete genes constitutivos para el tipado de <i>E. coli</i> por MLST (Tartof y col., 2005).....	63
Tabla 3.10.	Programas utilizados para el análisis de las secuencias génicas.....	64
Tabla 4.1.	Resumen de las muestras de alimentos analizadas y las cepas CPD ^R aisladas.....	73
Tabla 4.2.	Concentración de enterobacterias CPD ^R en las muestras positivas de los distintos tipos de alimentos analizados (porcentajes por rangos de recuento).	75

Tabla 4.3. Confirmación por diversos métodos fenotípicos de enterobacterias productoras de BLEEs aisladas en alimentos	77
Tabla 4.4. Cepas aisladas en alimentos confirmadas (%) según las distintas combinaciones de antibióticos utilizadas en el CDT	78
Tabla 4.5. Genotipos <i>bla</i> _{BLEE} en las cepas productoras de BLEEs aisladas en alimentos	86
Tabla 4.6. Genotipos <i>bla</i> _{BLEE} en otras especies distintas a <i>E. coli</i> aisladas en alimentos	89
Tabla 5.1. Resumen de las muestras analizadas y las cepas CDP ^R aisladas en el estudio de los distintos nichos ambientales.....	94
Tabla 5.2. Concentración de enterobacterias (totales y CDP ^R) en muestras positivas procedentes de entornos acuáticos (porcentajes por rangos de recuento).....	95
Tabla 5.3. Concentración de enterobacterias (totales y CDP ^R) en muestras positivas procedentes del entorno de producción animal (porcentajes por rangos de recuento)	99
Tabla 5.4. Confirmación por diversos métodos fenotípicos de enterobacterias productoras de BLEEs aisladas en EDAR.....	101
Tabla 5.5. Confirmación por diversos métodos fenotípicos de enterobacterias productoras de BLEEs aisladas en ríos.....	102
Tabla 5.6. Porcentajes de cepas BLEEs de origen acuático confirmadas por distintas combinaciones de antibióticos utilizadas en el CDT	102
Tabla 5.7. Confirmación por métodos fenotípicos de enterobacterias productoras de BLEEs aisladas en suelos de granjas.....	107
Tabla 5.8. Confirmación por métodos fenotípicos de enterobacterias productoras de BLEEs aisladas en piensos.....	107
Tabla 5.9. Porcentajes de cepas BLEEs aisladas en ambientes de producción animal confirmadas según las distintas combinaciones de antibióticos utilizadas en el CDT	108

Tabla 5.10. Genotipos <i>bla</i> _{BLEE} en las cepas productoras de BLEEs aisladas en muestras de EDAR.....	115
Tabla 5.11. Genotipos <i>bla</i> _{BLEE} en las cepas productoras de BLEEs aisladas en muestras de ríos.....	116
Tabla 5.12. Genotipos <i>bla</i> _{BLEE} en las cepas productoras de BLEEs aisladas en muestras de suelos de granjas	119
Tabla 5.13. Genotipos <i>bla</i> _{BLEE} en las cepas productoras de BLEEs aisladas en muestras de piensos ..	120
Tabla 5.14. Genes detectados por PCR múltiple en las cepas sospechosas de expresar β-lactamasas de tipo AmpC aisladas en ambientes acuáticos	123
Tabla 5.15. Genes detectados por PCR múltiple en las cepas sospechosas de expresar β-lactamasas de tipo AmpC aisladas en ambientes de producción animal.....	124
Tabla 6.1. Cepas de <i>E. coli</i> CDP ^R aisladas en la Clínica Universidad de Navarra durante el periodo 2009-2012	128
Tabla 6.2. Porcentajes de cepas BLEEs de origen clínico confirmadas por distintas combinaciones de antibióticos utilizadas en el CDT	129
Tabla 6.3. Genotipos <i>bla</i> _{BLEE} en las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEEs aisladas en muestras clínicas.....	136
Tabla 8.1. Resumen de las muestras analizadas, prevalencias, cepas aisladas y confirmadas como BLEEs	170
Tabla 8.2. Porcentajes de genes <i>bla</i> _{BLEE} más prevalentes en los distintos nichos estudiados ..	173

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Pared celular de una bacteria Gram negativa y detalle de la estructura del lipopolisacárido (Prescott y col., 2004)	6
Figura 1.2. Mecanismo de acción de los betalactámicos (Suarez y Gudiol, 2009)....	11
Figura 1.3. Reacción catalizada por una β -lactamasa (http://www.brenda-enzymes.org)	13
Figura 1.4. Tipos de β -lactamasas más comunes en enterobacterias. * Clasificación de Ambler, ** Clasificación de Bush (Cavaliere, 2005). ***Dentro del grupo OXA se encuentran algunas BLEEs.....	18
Figura 1.5. Distribución mundial de las β -lactamasas tipo CTX-M (adaptado Cantón y Coque, 2006).....	22
Figura 1.6. Evolución de los aislamientos de <i>E. coli</i> resistentes a cefalosporinas de tercera generación en Europa. A: 2002; B: 2013 (Datos del ECDC).....	26
Figura 2.1. Flujo de bacterias resistentes en nuestro entorno.....	32
Figura 3.1. Cronograma de los muestreos realizados	37
Figura 3.2. Localización en Navarra de los puntos de muestreo y tipo de muestras analizadas	38
Figura 3.3. Protocolo de investigación de E-BLEE en muestras de alimentos, piensos, suelos de granjas (paja y heces de animales) y aguas.....	46
Figura 3.4. Protocolo seguido para el estudio de sensibilidad antibiótica por métodos de difusión en disco.....	49
Figura 3.5. Resultados de la prueba de disco combinado (CDT) de una cepa productora de BLEE. A) Discos de CAZ y CTX con y sin CA; B) Discos de FEP con y sin CA	

Figura 3.6. Resultados de la prueba de sinergia en doble disco (DDST). A) Cepa productora de BLEE (potenciación del halo); B) Cepa que muestra un aplanamiento del halo de inhibición.....	51
Figura 3.7. Halos de inhibición para cefoxitina (FOX) y cefotetán (CTT). A) Cepa resistente a ambos antibióticos, B) Cepa sensible a ambos antibióticos	53
Figura 3.8. Cepa de <i>K. pneumoniae</i> KPC positiva (Adaptación de Rosco)	54
Figura 3.9. Halos de inhibición en el estudio de metalo-beta-lactamasas. A) Cepa productoras de BLEE con alteración de las porinas de membrana; B) Cepa productora de MBLs	55
Figura 3.10. Árbol de decisión dicotómica (Adaptación de Clermont y col., 2000).....	61
Figura 3.11. Análisis de secuencias utilizando Sequence Massager	64
Figura 3.12. Análisis de secuencias utilizando ClustalOmega	65
Figura 3.13. Análisis de la secuencia del gen <i>adk</i> con la herramienta MLST de la Universidad de Warwick.....	65
Figura 3.14. Análisis de las secuencias de los siete genes con la herramienta MLST de la Universidad de Warwick.	66
Figura 4.1. Distribución de las distintas especies de enterobacterias CPD ^R aisladas en alimentos	75
Figura 4.2. Porcentajes de resistencia a los antibióticos estudiados en cepas aisladas en alimentos. 1: penicilinas; 2: cefalosporinas; 3: monobactams; 4: Inhibidores de β -lactamasas; 5: carbapenems; 6: aminoglucósidos; 7: quinolonas; 8: tetraciclinas; 9: otros	82
Figura 4.3. Genes de β -lactamasas detectados en las cepas aisladas en alimentos	85
Figura 5.1. Distribución de las distintas especies de enterobacterias aisladas en aguas: A) EDAR; B) Ríos.....	97
Figura 5.2. Distribución de las distintas especies de enterobacterias aisladas en ambientes ganaderos. A) suelos de granjas; B) piensos	100

Figura 5.3. Porcentajes de resistencia a los antibióticos estudiados en cepas aisladas en ambientes acuáticos. 1: penicilinas; 2: cefalosporinas; 3: monobactams; 4: Inhibidores de β -lactamasas; 5: carbapenems; 6: aminoglucósidos; 7: quinolonas; 8: tetraciclinas; 9: otros	106
Figura 5.4. Porcentajes de resistencia a los antibióticos estudiados en cepas aisladas en ambientes de producción animal. 1: penicilinas; 2: cefalosporinas; 3: monobactams; 4: Inhibidores de β -lactamasas; 5: carbapenems; 6: aminoglucósidos; 7: quinolonas; 8: tetraciclinas; 9: otros.....	112
Figura 5.5. Genes de β -lactamasas detectados en las cepas aisladas en el conjunto de muestras ambientales	114
Figura 5.6. Ejemplo de gel de agarosa con los productos de la PCR múltiple según Pérez-Pérez y Hanson (2002) para detección de genes productores de AmpC.....	120
Figura 6.1. Porcentajes de resistencia a los antibióticos estudiados en cepas aisladas en muestras clínicas. 1: penicilinas; 2: cefalosporinas; 3: monobactams; 4: Inhibidores de β -lactamasas; 5: carbapenems; 6: aminoglucósidos; 7: quinolonas; 8: tetraciclinas; 9: otros	133
Figura 6.2. Genes de β -lactamasas detectados en las cepas aisladas en muestras clínicas.....	13
Figura 7.1. Distribución de las cepas de <i>E. coli</i> en grupos filogenéticos según su origen.	142
Figura 7.2. Distribución de las cepas productoras de BLEEs más frecuentes según los grupos filogenéticos y porcentajes asociados.	145
Figura 7.3. Composición clonal por MST (Minimun spanning tree) de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEES según la procedencia de la muestra. Cada círculo corresponde a una ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el origen de la muestra según se indica en la leyenda.....	148
Figura 7.4. Composición clonal (MST) de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEES. Cada círculo corresponde a una ST, siendo su tamaño proporcional al número de	

aislados. El color de los círculos indica el tipo de BLEE expresada por la cepa como se indica en la leyenda..... 149

Figura 7.5. Composición clonal (MST) de las cepas de E. coli productoras de BLEES aisladas en alimentos. Cada círculo corresponde a un ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el tipo de alimentos en que se ha aislado la cepa según se indica en la leyenda 151

Figura 7.6. Composición clonal (MST) de las cepas de E. coli productoras de BLEES aisladas en ambientes acuáticos. Cada círculo corresponde a un ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el origen de cada cepa según se indica en la leyenda..... 154

Figura 7.7. Composición clonal (MST) de las cepas de E. coli productoras de BLEES aisladas en ambientes de producción animal. Cada círculo corresponde a un ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el origen de cada cepa según se indica en la leyenda 157

Figura 7.8. Composición clonal (MST) de las cepas de E. coli productoras de BLEES aisladas en muestras clínicas. Cada círculo corresponde a un ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica tipo de BLEE producida por cada cepa según se indica en la leyenda 159

Figura 8.1. Iniciativa *One Health* 165

Figura 8.2. Movilidad de varias STs entre distintos nichos 175

Figura 8.3. Líneas estratégicas del plan de acción de la AEMPS (Adaptación AEMPS, 2014) 178

ABREVIATURAS

AK	Amikacina
AMC	Amoxicilina/ácido clavulánico
AMP	Ampicilina
AMS	Ampicilina/sulbactam
ASM	<i>American Society for Microbiology</i>
AZT	Aztreonam
BLEE	β -lactamasa de espectro extendido
CAZ	Ceftazidima
CAZ/CA	Ceftazidima/ácido clavulánico
CC	Complejo clonal
CHL	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COL	Colistina
CPD	Cefpodoxima
CPD ^R	Cefpodoxima resistente
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
CTX/CA	Cefotaxima/ácido clavulánico
CXM	Cefuroxima
CZ	Cefazolina
EARSS	<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance System</i>
E-BLEE	Enterobacteria productora de β -lactamasa de espectro extendido
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>

EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ETP	Ertapenem
FEP	Cefepima
FEP/CA	Cefepima/ácido clavulánico
FM	Nitrofurantoína
FOT	Fosfomicina
FOX	Cefoxitina
GM	Gentamicina
IMP	Imipenem
LV	Levofloxacino
MER	Meropenem
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MST	<i>Minimum spanning tree</i>
MXF	Moxifloxacino
MZ	Mezlocilina
NOR	Norfloxacino
OMS/ WHO	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIP	Piperacilina
ST	Secuencia tipo (<i>sequence type</i>)
SXT	Trimetoprim/sulfametoxazol
TZP	Piperacilina/tazobactam
TET	Tetraciclina
TIG	Tigeciclina
TO	Tobramicina

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

1.1. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS: LA PANDEMIA DEL SIGLO XXI

Las resistencias a antibióticos no son un fenómeno nuevo, pero constituyen uno de los mayores problemas de Salud Pública en la actualidad (WHO, 2014). El desarrollo de nuevos antibióticos en las décadas de los 50 y 60 y las posteriores modificaciones de esas moléculas, nos hicieron creer que siempre iríamos por delante de los microorganismos. Sin embargo, el abuso de antibióticos en medicina, veterinaria y agricultura ha supuesto un aumento en el número y la diversidad de resistencias en bacterias. Además, estas resistencias suponen importantes costes económicos (gastos en Salud Pública) y personales (pérdida de vidas humanas).

En un principio, el estudio de las resistencias de los microorganismos a los antibióticos se centró en el ámbito hospitalario debido al fracaso de la terapia antimicrobiana en muchos pacientes. La detección de resistencias en patógenos nosocomiales como *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) y microorganismos multirresistentes como *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* etc., se ha convertido en la actualidad en una práctica de rutina en los laboratorios clínicos.

En 1995 la ASM (*American Society for Microbiology*) en su informe “*Report of the ASM task force on antibiotic resistance*” propuso una serie de medidas para controlar la diseminación de las resistencias a antibióticos dirigidas, principalmente, a poblaciones del entorno hospitalario. Igualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) propuso en 1998 una serie de estrategias para contener la diseminación de estas resistencias más allá del hospital. Estas medidas se orientaban a aquellas personas con capacidad de prescribir y dispensar antibióticos y al propio consumidor, teniendo como objetivo mejorar la utilización de antibióticos (WHO, 1999). Ese mismo año, el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC,

European Centre for Disease Prevention and Control) funda la EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*), actualmente EARS-NET, un sistema de vigilancia para intentar controlar la diseminación y la selección de las resistencias a antimicrobianos. Dentro de las campañas que promueven, se instaura el 18 de noviembre como el “Día Europeo para el Uso Prudente de los Antibióticos”.

En los últimos años el estudio de resistencias se ha trasladado del ámbito clínico al extrahospitalario. Las infecciones adquiridas en la comunidad han centrado el interés del personal médico y científico, y además, numerosos estudios muestran la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en diferentes nichos (Pitout y col., 2005; Kojima y col., 2005; Carattoli y col., 2005; Hernández y col., 2005).

Asimismo, se ha observado que entre las nuevas bacterias resistentes destacan muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Johnson y col., 2005). A este respecto, se ha detectado un aumento en la adquisición de genes de resistencia especialmente en *E. coli* y *Salmonella spp.* confiriéndoles resistencia frente a cefalosporinas de nueva generación (Batchelor y col., 2005; García-Migura y col., 2014). Varios estudios han señalado la posibilidad de que las enterobacterias de origen animal estén actuando como reservorio de estas resistencias transmitiéndose al hombre a través de la cadena alimentaria (Aarestrup, 1999; Wang y col., 2006; Carattoli, 2008). Por lo tanto, el estudio de esta familia de microorganismos es vital para el control de la diseminación de resistencias a antibióticos.

1.2. FAMILIA *Enterobacteriaceae*

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos ubicuos, que forman parte de la microbiota del tracto gastrointestinal del hombre y de los animales. A través de las heces pueden colonizar otros nichos ecológicos como el agua, el suelo y las plantas. Esta familia agrupa a un gran número de bacterias entéricas clasificadas en 76 géneros y a otras muchas bacterias no clasificadas todavía (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>).

Se trata de bacilos Gram negativos con un tamaño medio de 4-5 μm de longitud y 0,5 μm de diámetro, anaerobios facultativos, no esporulados y quimiorganotrofos. Son microorganismos mesófilos, con temperaturas de crecimiento en el rango entre 22 °C y 37 °C. Se caracterizan por no presentar citocromo C y presentan movilidad flagelar peritrica (excepto *Shigella* y *Klebsiella*). Tienen unos requerimientos nutricionales sencillos y son relativamente resistentes a la acción de agentes externos. Poseen la capacidad de fermentar la glucosa a ácido con producción o no de gas (vía ácido-mixta o del butanodiol), reducen los nitratos a nitritos (con alguna excepción) y son capaces de degradar una gran variedad de otros carbohidratos. Estas diferencias metabólicas hacen posible la identificación de las distintas especies.

Desde el punto de vista estructural, las enterobacterias presentan una pared celular formada por una estructura multilaminar (Figura 1.1). La membrana interna o citoplasmática compuesta de fosfolípidos permite el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. A continuación se encuentra el espacio periplásmico, con una fina capa de peptidoglicano (mureína) y gran cantidad de proteínas. La membrana externa está formada por una bicapa de naturaleza lipídica que contiene fosfolípidos, lipopolisacárido y proteínas (como las porinas que forman canales para el paso de moléculas). El lipopolisacárido (LPS) es el principal antígeno de la pared celular, es

termoestable y está compuesto por un polisacárido somático (antígeno O), una región central o núcleo también de naturaleza polisacáridica (común a todas la enterobacterias) y un lípido A o endotoxina. La estructura antigénica de esta familia compuesta por los antígenos O (somático, LPS), H (flagelar proteico) y K (capsular polisacáridico), es la base de la nomenclatura empleada para su clasificación serológica. Además, casi todas las especies poseen fimbrias responsables de la fijación a otras bacterias o a células eucariotas.

Estos microorganismos son patógenos oportunistas del hombre causando tanto infecciones nosocomiales como comunitarias (Murray y col., 2003). Se han definido una serie de factores que predisponen a estas infecciones oportunistas: rotura de las barreras físicas de piel y mucosas (heridas, quemaduras, catéteres), rotura de las barreras fisiológicas (intubaciones, sondas) o alteraciones del sistema inmune. En el caso de las infecciones hospitalarias, Sancho (2000) describe que dos tercios de ellas se producen como consecuencia de la colocación de catéteres y sondas.

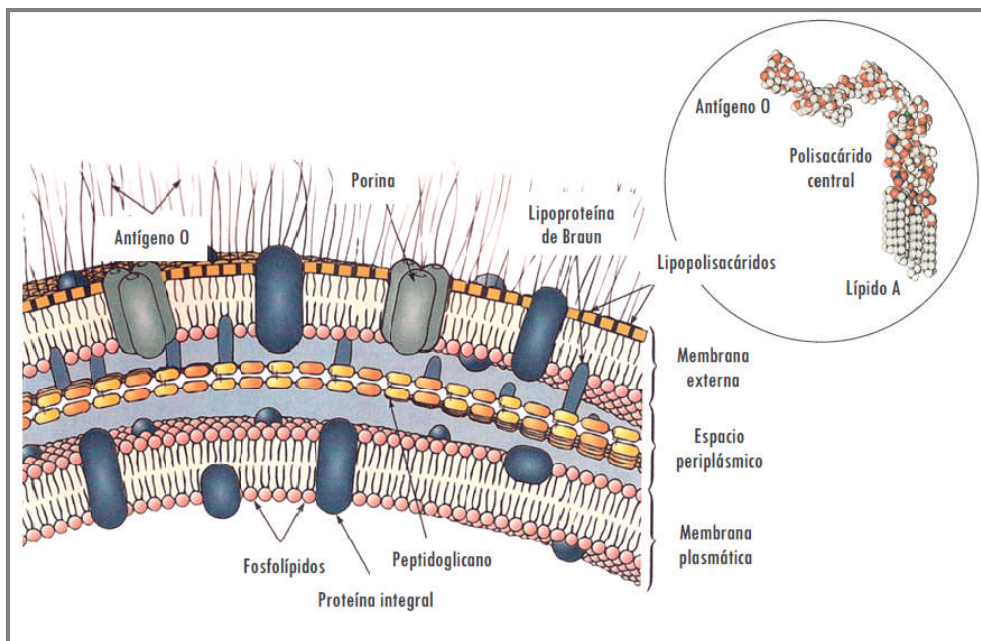


Figura 1.1. Pared celular de una bacteria Gram negativa y detalle de la estructura del lipopolisacárido (Prescott y col., 2004).

Tradicionalmente, las cepas patógenas para el hombre pertenecían a los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* (Wolf, 2000; Prats y Mirelis, 1996). Sin embargo, desde la década de los 90 y debido probablemente al aumento del uso de antibióticos, otros géneros que forman parte de la microbiota comensal habitual del hombre como *Klebsiella* están causando importantes infecciones de origen nosocomial (Bergogne y col., 1993). En la familia *Enterobacteriaceae* las especies que causan infecciones oportunistas con más frecuencia en la actualidad son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*, entre otras.

E. coli forma parte de la microbiota normal del intestino grueso y aunque supone menos del 1 % del total, se encuentra en la microbiota fecal de la mayoría de los adultos sanos (Wilson, 2008). Además, es el microorganismo más frecuentemente aislado como agente etiológico en infecciones urinarias, de heridas, neumonía, meningitis y septicemia (Donnenberg, 2005; Nataro y col., 2007). El segundo puesto de aislamientos lo ocupa *K. pneumoniae*, patógeno causante de enfermedades respiratorias y segundo agente causal de bacteriemia por detrás de *E. coli* (Boop y col., 1999).

1.3. FILOGENIA Y VIRULENCIA DE *Escherichia coli*

La bacteria *E. coli* fue descrita por primera vez en 1885 por el bacteriólogo alemán Theodor Escherich, quien la llamó originalmente *Bacterium coli*. En honor a su descubridor fue denominada posteriormente *Escherichia coli*. Debido a la gran variabilidad de cepas de *E. coli* que podemos encontrar, se han clasificado según su patogenicidad (factores de virulencia) y más recientemente según las relaciones de similitud de secuencias génicas, en grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D).

Según su capacidad patógena, se diferencian (i) cepas comensales, (ii) cepas que causan infecciones intestinales, (iii) cepas que producen infecciones extraintestinales (Soto, 2006). Las cepas comensales de *E. coli* forman parte de la microbiota del intestino de individuos sanos (humanos, mamíferos, aves...) y se consideran no patógenas, aunque pueden ser patógenos oportunistas asociados a infecciones extraintestinales en casos de alteraciones en el sistema inmune. Se caracterizan por carecer de determinantes de virulencia.

Respecto a las cepas de *E. coli* que causan infecciones intestinales en mamíferos, según el tipo de cuadro clínico que producen se dividen en cinco grupos (Murray y col., 2003):

- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC): causa diarreas acuosas seguida de diarrea sanguinolenta, síndrome hemolítico urémico y enfermedad renal. Codifica una citotoxina (toxina Shiga o verotoxina) y el serovar predominante es el O157:H7.
- *E. coli* enteropatogénica (EPEC): causa diarreas acuosas y vómitos en niños y produce una toxina termoestable llamada EAST1.
- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC): es causante de las llamadas “diarreas del viajero” y produce toxinas termoestables (STa, STb) y termolábiles (LT-I y LT-II).
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC): incluye *E. coli* causante de diarreas y disentería. Produce una invasión de las células del epitelio del intestino provocando una reacción de inflamación y ulceración.
- *E. coli* enteroagregativa (EAEC): es causante de diarreas acuosas persistentes y se asocia a epidemias. Produce una toxina EAST-1 y se caracteriza por un patrón de agregación y adherencia al epitelio intestinal.

Por último, las cepas causantes de infecciones extraintestinales en el hombre tienen un gran número de factores de virulencia (Jaureguy y col., 2008) y algunas de ellas son portadoras de genes de resistencia a antibióticos (Johnson y Russo, 2002). Se ha observado que estas mismas cepas de *E. coli* causan también enfermedades en aves de corral (Mellata y col., 2003). Los factores de virulencia que se encuentran en cepas causantes de enfermedad en humanos y en aves sugieren la existencia de una transmisión al hombre a través de los alimentos (Rodríguez-Siek y col., 2005; Johnson y col., 2006).

Estas diferencias entre las distintas *E. coli* patógenas y comensales hicieron necesaria una nueva clasificación independiente de su capacidad patógena. En 1990 Herzer y colaboradores desarrollaron un sistema de clasificación analizando 72 cepas de referencia de *E. coli*, basado en los patrones de movilidad electroforética de 38 enzimas metabólicas. Estos estudios dieron lugar a una clasificación de las cepas en 4 grupos: A, B1, B2 y D (Herzer y col., 1990). Posteriormente, se ha observado la existencia de una relación entre la pertenencia a un filogrupo y la patogenicidad de las cepas. Así, en los filogrupos A y B1 se incluyen cepas comensales y patógenas intestinales, mientras que los filogrupos B2 y D incluyen fundamentalmente cepas patógenas (Johnson y col., 2001 y 2003; Gordon y col., 2005; Gonçalves y col., 2010).

Clermont y colaboradores (2000) desarrollaron una técnica molecular basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de estos cuatro grupos filogenéticos. Se establecieron tres fragmentos de DNA que se utilizaron como marcadores específicos de cada grupo.

- Gen *chuA*: implicado en el transporte del grupo hemo en la cepa de *E. coli* enterohemorrágica 0157:H7.
- Gen *yjaA*: gen de virulencia identificado en el DNA de la cepa de *E. coli* K-12.

- Fragmento TSPE4.C2: muy conservado, que codifica parte de una lipasa esterasa.

Este mismo grupo mejoró años después la técnica, modificando los cebadores utilizados y las condiciones de la PCR (Clermont y col., 2013). Para distinguir los grupos filogenéticos establecieron un árbol de decisión dicotómica basado en la detección de las tres regiones génicas anteriores.

1.4. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN *Enterobacteriaceae*

Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 y la introducción del uso de antibióticos en clínica en la década de los 40, estos compuestos han sido el tratamiento más eficaz contra las infecciones causadas por enterobacterias. Su elevado uso ha generado una fuerte presión selectiva que ha dado lugar a una selección de cepas resistentes a la mayoría de los fármacos disponibles en el mercado, lo que limita las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones bacterianas (Furuya y Lowy, 2006; Livermore, 2003 y 2004).

1.4.1. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Los β -lactámicos son los antibióticos más utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias tanto en clínica humana como veterinaria. Su extendido uso se debe tanto a la excelente capacidad antibacteriana que tienen, como a la baja toxicidad que presentan sobre células eucariotas. Se caracterizan por un anillo β -lactámico que actúa como análogo del sustrato de las PBP (*penicillin binding protein*), enzimas que participan en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular. La similitud estructural del grupo amida del anillo β -lactámico con el dipéptido D-alanil-D-alanina de la mureína, le permite unirse e inactivar estas enzimas (Fisher y Mobashery, 2009; Massova y Mobashery, 1998). Este anillo β -lactámico va unido

generalmente a un anillo secundario cuya naturaleza determina los diferentes tipos de antibióticos que conforman esta familia. Los β -lactámicos son agentes bacteriolíticos, por lo que además de esta inhibición directa de las PBP, provocan la lisis celular.

En la Figura 1.2 se muestra el mecanismo de acción de estos antibióticos con el sustrato bacteriano. En primer lugar se produce una reacción reversible, en la que la serina del sitio activo de la PBP reconoce el anillo β -lactámico del antibiótico y se une a él formando un complejo no covalente. A continuación el antibiótico añade un grupo acilo a esta serina, uniéndose de forma covalente el antibiótico a la enzima mediante un enlace éster. Finalmente, una reacción de desacilación libera la enzima inactivada lo que impide la formación del peptidoglicano.

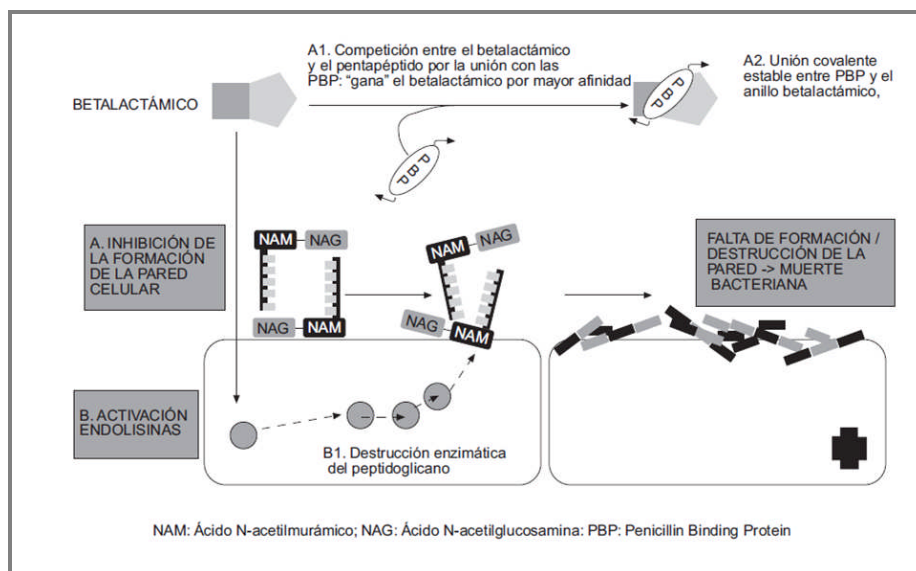


Figura 1.2. Mecanismo de acción de los β -lactámicos (Suarez y Gudiol, 2009)

Según su estructura química estos antibióticos se han clasificado en cuatro familias: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactams. Los principales antibióticos β -lactámicos empleados en clínica se presentan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Principales antibióticos β -lactámicos empleados en clínica.

Familia		Antibióticos de importancia clínica
Penicilinas	Bajo espectro	Bencilpenicilina, meticilina, oxacilina
	Amplio espectro	Amoxicilina, ampicilina, animopenicilina
	Espectro extendido	Piperacilina, mezlocilina, ticarcilina
Cefalosporinas	1ª Generación	Cefalexina, cefalotina , cefazolina
	2ª Generación	Cefoxitina, cefuroxima, cefotetán
	3ª Generación	Ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima
	4ª Generación	Cefepima, cefpiroma
Carbapenems		Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem
Monobactams		Aztreonam

Los microorganismos han desarrollado varios mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos que se diferencian según su base genética. La resistencia cromosómica o natural es intrínseca a algunos géneros bacterianos, mientras que la resistencia adquirida se debe a la aparición de mutaciones o al intercambio de elementos génicos (transposones o integrones) entre cepas (Cantón y col., 2002; Livermore, 2003). En la resistencia frente a β -lactámicos están implicados varios mecanismos:

- i) Alteración de la diana del antibiótico (PBP) que disminuye la capacidad del mismo para unirse a ella.
- ii) Alteración de la permeabilidad de la membrana externa (mutaciones en las porinas) que modifica la entrada del antibiótico.
- iii) Modificación de las bombas de eflujo que eliminan el antibiótico al exterior.
- iv) Producción de enzimas que destruyen o inactivan el antibiótico, como las β -lactamasas.

De estos 4 mecanismos, la producción de β -lactamasas es el más extendido entre las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Las β -lactamasas son llamadas también penicilin (cefalosporín) amido-betalactam hidrolasas y se localizan en el espacio periplásmico. Hidrolizan irreversiblemente el enlace amida del núcleo β -

lactámico, transformando el antibiótico en un compuesto inactivo (Figura 1.3). Su síntesis puede ser constitutiva (codificada a nivel cromosómico o plasmídico) o inducida por los propios antibióticos.

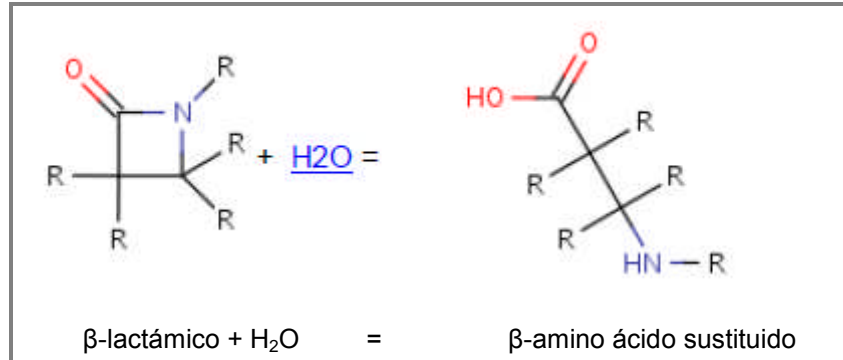


Figura 1.3. Reacción catalizada por una β -lactamasa (<http://www.brenda-enzymes.org>)

Existen varios esquemas de clasificación de β -lactamasas que se han ido actualizando en el tiempo. La primera clasificación surgió en 1968 y fue realizada por Sawai y colaboradores (1968), que ordenaron penicilinasas y cefalosporinasas en función de su respuesta a antisueros. En 1973, Richmond y Sykes incluyeron en este esquema todas las β -lactamasas conocidas (Richmond y Sykes, 1973). En 1980 se propuso la primera clasificación basada en la estructura molecular (Ambler, 1980) y en 1991 (Ambler y col., 1991) se completó ordenando las enzimas en cuatro clases (A, B, C y D). Finalmente la clasificación más reciente es la propuesta por Bush-Jacoby-Medeiros (Bush y col., 1995), que distingue cuatro grupos (1, 2, 3 y 4) y en la que se combinan los criterios de funcionalidad de las clasificaciones anteriores con datos de codificación y actividad enzimática. En la Tabla 1.5 se combinan estas dos clasificaciones y se añaden las características de las distintas β -lactamasas descritas.

Tabla 1.2. Clasificación combinada de las β -lactamasas (Ambler, 1980; Bush y col., 1995)

Grupo funcional (Bush)	Clase molecular (Ambler)	Características
Grupo 1	C	Cefalosporinas cromosómicas y plasmídicas Resistentes a β -lactámicos (excepto carbapenems) No inhibidas por ácido clavulánico Engloba a las cefalosporinas de tipo AmpC
Grupo 2	A y D	Penicilinasas, cefalosporinasas, oxacilinasas y carbapenemasas Codificación plasmídica (mayoría) Inhibidas por el ácido clavulánico
2a		Penicilinasas
2b		β -lactamasas de amplio espectro (BLEA) Penicilinasas y cefalosporinasas
2be		β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) Inactivan cefalosporinas de 3ª generación y monobactams
2br		β -lactamasas de tipo IRT (Inhibidor resistente TEM) Resistentes a inhibidores como ácido clavulánico y sulbactam, pero no al tazobactam
2c		β -lactamasas que hidrolizan carbenicilinas
2d		β -lactamasas con acción frente a cloxacilinas Inhibidas escasamente por ácido clavulánico Incluyen algunas BLEEs tipo OXA
2e		Cefalosporinasas que hidrolizan monobactams (aztreonamasas)
2f		Carbapenemasas con serina en su centro activo
Grupo 3	B	Metallo- β -lactamasas (zinc en su sitio activo) Inhibidas por agentes quelantes como el EDTA Codificación cromosómica o plasmídica No inhibidas por ácido clavulánico Resistentes a carbapenems y β -lactámicos No hidrolizan monobactams.
Grupo 4	-	Penicilinasas de codificación cromosómica No inhibidas por ácido clavulánico

1.4.2. β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

El término β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) o *extended-spectrum β -lactamases* (ESBLs) fue utilizado por primera vez por Philippon y colaboradores (1989). Son enzimas de codificación plasmídica, capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a y 4^a generación y monobactams. Además son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Los carbapenems y las cefamicinas no son hidrolizadas por estas enzimas.

La primera β -lactamasa de codificación plasmídica fue encontrada en una cepa de *E. coli* procedente de una paciente llamada "Temoniera" en Grecia, de ahí la denominación de TEM-1. Esta enzima es una β -lactamasa de espectro ampliado (BLEA) por lo que no se trata de una BLEE. Debido a la capacidad de estas enzimas de transferirse de una bacteria a otra mediante plásmidos y transposones, estas β -lactamasas se han aislado posteriormente en otras especies. Otra de las primeras β -lactamasas descritas fue SHV-1, con un dominio sulfidril variable que le da nombre. Esta β -lactamasa se encontró en un inicio en cepas de *K. pneumoniae*, pero se ha localizado también en plásmidos de cepas de *E. coli*. Al igual que TEM-1, esta enzima es una β -lactamasa de amplio espectro, no una BLEE.

En las últimas décadas y debido a la presión selectiva de los nuevos antibióticos utilizados, han ido apareciendo nuevas BLEEs derivadas la mayoría de ellas de estas dos primeras enzimas TEM-1 y SHV-1: "Tan pronto como un nuevo antibiótico es introducido para el uso clínico, es identificada una β -lactamasa con la capacidad de destruir esta actividad" (Bush, 1989). En la actualidad la denominación BLEEs engloba a más de 200 enzimas que se clasifican en diferentes tipos según su secuencia de aminoácidos:

- **Tipo TEM:** Estas β -lactamasas son las más frecuentemente descritas en enterobacterias aunque se encuentran también en otros grupos. Confieren resistencia

a ampicilina, penicilina y a cefalosporinas de primera generación. Las sustituciones de un solo aminoácido en distintas posiciones en la secuencia de la enzima TEM-1 dan lugar a una gran variedad de fenotipos BLEEs. Este tipo de enzimas se localizan generalmente en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* y en menor medida en otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter spp.*, *Morganella spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*) (Dumarche y col., 2002; Perilli y col., 2000; Bonnet, 1999; Morosini y col., 1995) y en otros microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* (Mugnier y col., 1996).

- **Tipo SHV:** Este tipo de BLEE confiere resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera generación. Las sustituciones de aminoácidos, como la de una serina por una glicina en posición 238, dan lugar a variantes, aunque son menos numerosas que las de tipo TEM. En un principio, las enzimas más frecuentemente descritas fueron SHV-2 y SHV-5, pero en la actualidad es la enzima SHV-12 la principalmente aislada en Europa (Paterson y Bonomo, 2005). Estas enzimas derivadas de SHV-1 e identificadas en *K. pneumoniae*, se han descrito también en otras especies de enterobacterias como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* (Rasheed y col., 1997; Bradford, 2001; Tzouveleki y Bonomo, 1999; Poirel y col., 2004).

- **Tipo CTX-M:** Son enzimas que hidrolizan preferentemente la cefotaxima por lo que se les llamaba cefotaximasas (activas frente a cefotaxima aislada en Munich, CTX-M). Además, son activas frente a cefuroxima y cefepime y son inhibidas por tazobactam mejor que por ácido clavulánico o sulbactam. Engloban más de 70 enzimas que se clasifican filogenéticamente en cinco grupos según su secuencia de aminoácidos, con una identidad superior al 94% dentro de cada grupo (Bonnet, 2004):

- Grupo CTX-M-1: CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22.

- Grupo CTX-M-2: CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 y Toho-1.
- Grupo CTX-M-8: incluye CTX-M-8.
- Grupo CTX-M-9: CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27 y Toho-2.
- Grupo CTX-M-25: incluye CTX-M-25 y CTX-M-26.

- **Tipo OXA:** Son BLEEs activas contra la oxacilina, cloxacilina y bencilpenicilina y son poco inhibidas por el ácido clavulánico (Bush y Jacoby, 1995). Filogenéticamente están muy alejadas del resto de BLEEs y parece que la evolución de estas enzimas no se debe a la presión selectiva del uso de antibióticos (Barlow y Hall, 2002). La primera enzima descrita OXA-1 (tipo BLEA) se localizó en *E. coli* aunque posteriormente se ha detectado en otras enterobacterias, en *P. aeruginosa* y en *Acinetobacter baumannii* (Naas y Nordmann, 1999). Las OXA clasificadas como BLEE pertenecen a la clase D de Ambler y al grupo 2d, derivan de la enzima OXA-10 por sustituciones puntuales en aminoácidos.

- **Tipo K1:** estas enzimas son β -lactamasas cromosómicas sensibles a inhibidores de β -lactamasas y se expresan de forma constitutiva en *Klebsiella oxytoca* (Navarro y col., 2002).

Por tanto y en resumen, en la familia *Enterobacteriaceae* se detectan con más frecuencia las β -lactamasas que se presentan en la Figura 1.4.

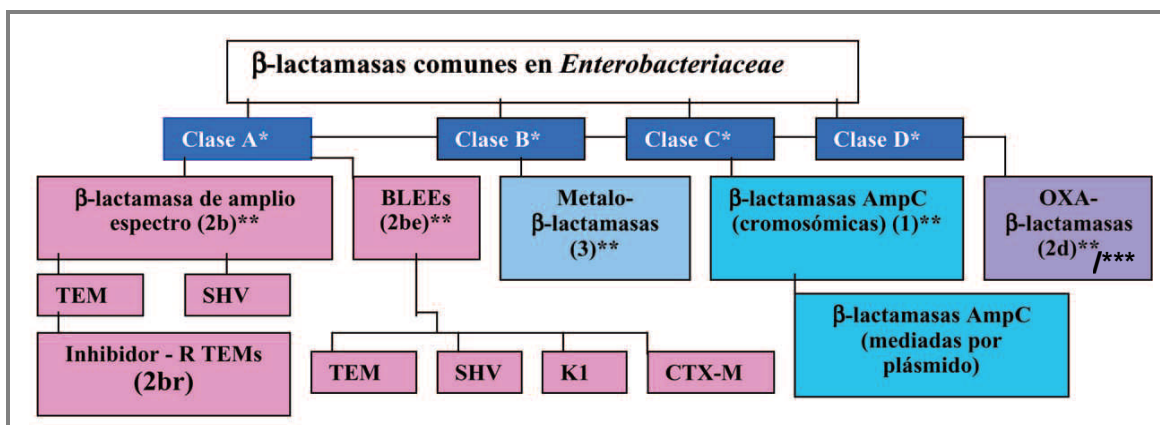


Figura 1.4. Tipos de β-lactamasas más comunes en enterobacterias. * Clasificación de Ambler, ** Clasificación de Bush (Cavalieri, 2005). ***Dentro del grupo OXA se encuentran algunas BLEEs.

- Minor BLEEs:** Se han descrito otras enzimas BLEEs que no se engloban en ninguna de las familias descritas anteriormente. Estas β-lactamasas son todavía infrecuentes y están geográficamente localizadas, por lo que en las investigaciones actuales se engloban dentro de las llamadas *minor* BLEEs (Naas y col., 2008) y no son investigadas habitualmente. En la Tabla 1.6 se presentan varias de estas enzimas y su origen. La β-lactamasa PER-1 fue la primera descrita en *P. aeruginosa* y posteriormente se aisló en cepas de *S. typhimurium*, *A. baumannii* y *P. mirabilis*. Otras β-lactamasas descritas en *E. coli* son VEB-1, que fue aislada en Vietnam, y BES-,1 detectada en un aislamiento de *S. marcescens* en Brasil.

Tabla 1.3. Características de las *minor* BLEEs (adaptación de Naas y col., 2008).

β-lactamasa (Origen nombre)	Año ^a	País ^a	Microorganismo	No. variantes
SFO-1 (<i>Serratia fonticola</i>)	1988	Japón	<i>E. cloacae</i>	1
TLA-1 (Tlahuicas, tribu india)	1991	Méjico	<i>E. coli</i>	1
PER (<i>Pseudomonas</i> ext resistance)	1993	Francia	<i>P. aeruginosa</i>	3
VEB-1 (Vietnam extended β-lactamasa)	1996	Vietnam	<i>E. coli</i>	5
BES-1 (Brazilian ESBLs)	1996	Brasil	<i>S. marcescens</i>	1
GES (Guyana ESBLs)	1998	Guinea	<i>K. pneumoniae</i>	9
BEL-1 (Belgium ESBLs)	2004	Bélgica	<i>P. aeruginosa</i>	1
TLA-2 (TLA-1)	2005	Méjico	<i>E. coli</i>	1

^a De la primera descripción.

1.4.3. OTRAS β -LACTAMASAS

Las **β -lactamasas de tipo AmpC** son capaces de hidrolizar cefalosporinas de 3ª generación, cefamicinas e inhibidores de β -lactamasas; sin embargo, son susceptibles a carbapenems. Son enzimas de codificación cromosómica detectadas en enterobacterias de los géneros *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella spp.*, *Serratia spp.*, así como en *Pseudomonas spp.* En la actualidad se han descrito genes codificantes de estas enzimas en plásmidos y asociados a integrones. En *E. coli* son enzimas de baja expresión, pero mutaciones en genes reguladores pueden dar lugar a una hiperexpresión. Por ello, en los aislamientos de *E. coli* con CMI's elevadas frente a cefalosporinas de tercera generación hay que tener en cuenta que esta resistencia puede ser debida a mecanismos diferentes a la producción de BLEEs, como es la hiperproducción de β -lactamasas de tipo AmpC.

Las **carbapenemasas** son un grupo de enzimas de codificación plasmídica o cromosómica, que incluyen miembros de distintas clases de la clasificación de Ambler.

- Carbapenemasas de Clase A: son carbapenemasas con un residuo serina en su centro activo, que hidrolizan cefalosporinas de 3ª generación, carbapenems y monobactams: Son inhibidas por ácido clavulánico pero no por EDTA (Pérez y col., 2007, Queenan y Bush, 2007). Se han descrito varias variantes como Sme, IMI, KPC, GES.

- Carbapenemasas de Clase B: son metalo- β -lactamasas (MBL) que hidrolizan cefalosporinas de 3ª generación, imipenem o meropenem. No son inhibidas por ácido clavulánico pero si se inhiben por EDTA. Las más frecuentes son de tipo IMP y VIM. Se asocian a especies de los géneros *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.* y *Aeromonas spp.*, aunque actualmente se están aislando en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

- Las carbapenemasas de clase D hidrolizan imipenem pero no cefalosporinas de 3ª generación. Son inhibidas por ácido clavulánico pero no por EDTA y la más representativa es OXA-48. Se localizan en enterobacterias, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

1.4.4. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS NO β -LACTÁMICOS ASOCIADOS A BLEEs

Las BLEEs tienen una codificación plasmídica y a menudo forman parte de elementos génicos móviles como transposones e integrones. Con frecuencia, hay genes de resistencia a otros antibióticos utilizados en clínica (Tabla 1.7) que se localizan en estos elementos génicos. En consecuencia, cuando se movilizan estos elementos génicos, ambas resistencias se transmiten asociadas.

Se han observado una serie de genes asociados con más frecuencia a los genes de β -lactamasas o genes *bla* que confieren a las bacterias resistencias frente a aminoglucósidos (Doi y Arakawa, 2007; Mammeri y col., 2005; Robicsek y col., 2006). Igualmente, la enzima CTX-M se ha asociado con genes *qnr* que permite modificar algunas fluoroquinolonas (Poirel y col., 2007; Martínez-Martínez, 1998).

Estudios sobre *E. coli* productoras de BLEE muestran co-resistencia a trimetoprim, cloranfenicol, tetraciclinas, sulfamidas y compuestos de amonio cuaternario. Concretamente, cepas productoras de CTX-M-15 multirresistentes se han convertido en unos de los patógenos causantes de infecciones más importantes tanto a nivel hospitalario como comunitario (Livermore, 2012).

En un estudio realizado en España entre 2001 y 2007 por la EARSS (Oteo y col., 2008), se demostró la existencia de este fenómeno de co-resistencia entre BLEEs y otros antibióticos como gentamicina, amoxicilina/clavulánico, cotrimoxazol y ciprofloxacino en aislamientos clínicos de *E. coli*.

Tabla 1.4. Principales antibióticos no β -lactámicos empleados en clínica.

Familia	Antibióticos
Aminoglucósidos	Amikacina, gentamicina, tobramicina, kanamicina
Glicopéptidos	Vancomicina
Macrólidos	Azitromicina, claritromicina, eritromicina
Polipéptidos	Colistina, bacitracina, polimixina B
Quinolonas	Levofloxacino, norfloxacino, moxifloxacino, ciprofloxacino
Sulfonamidas	Trimetoprim, cotrimoxazol, sulfametizol
Tetraciclinas	Tetraciclina, doxiciclina, tigeciclina
Otros	Cloranfenicol, fosfomicina, nitrofurantoína, rifampicina

1.5. PROBLEMÁTICA ACTUAL: DISEMINACIÓN DE LAS BLEEs

En 1983 se describió en Alemania la primera BLEE de tipo SHV (Knothe y col, 1983) y durante la década de los 80 y los 90 se extendieron los aislamientos de BLEEs de tipo TEM y SHV por toda Europa (Cantón y Coque, 2006). Durante veinte años las β -lactamasas fueron un problema epidémico a nivel hospitalario, principalmente en UCIs donde se observaba una diseminación clonal. Se aislaban fundamentalmente cepas de *Klebsiella spp.*, que era la principal vía de diseminación de BLEEs en hospitales, y de *Enterobacter spp.* (Paterson y Bonomo, 2005).

En la década de los 2000 las β -lactamasas pasan a ser un problema comunitario, de forma que se detecta un aumento del número de aislamientos extrahospitalarios así como una gran diversidad genética (Valverde y col., 2004; Romero y col., 2005). Hay un desplazamiento de BLEEs de tipo SHV y TEM por las β -lactamasas de tipo CTX-M, siendo *E. coli* la especie más representativa. Además, se observa un aumento de los distintos tipos de enzimas CTX-M, ya que su codificación plasmídica hace más fácil su transferencia. Asimismo, se detectan varios clones y elementos génicos que contribuyen a la diseminación de estas cepas. Estas enzimas se han visto implicadas en brotes nosocomiales en Europa, Sudamérica y Asia (Bonnet, 2004).

En la Figura 1.5 se muestra la situación mundial de las BLEEs de tipo CTX-M. Se habla de la “pandemia de CTX-M”, con una amplia diseminación a nivel internacional de CTX-M-15 y una distribución geográfica de otras enzimas como CTX-M-9, CTX-M-14 y CTX-M-10 en España (Sabaté y col., 2002; García y col., 2007; Cantón y col., 2002), CTX-M-1 en Italia y Francia, mientras que CTX-M-2 se detecta solo en países sudamericanos y Japón (Cantón y Coque, 2006).

La enorme capacidad de diseminación de estas enzimas tanto en el ámbito hospitalario como fuera de él ha quedado patente en varias publicaciones (Paterson y Bonomo, 2005; Machado y col., 2007; Gniadkowski, 2008). De esta forma, se aíslan cepas productoras de BLEEs en ambientes acuáticos, en el entorno de producción animal, en diferentes grupos de alimentos y en personas sanas de la comunidad.

El uso extendido de antibióticos a nivel veterinario para el tratamiento de enfermedades y en especial como promotores del crecimiento (Prescott, 2008) ha supuesto una importante selección y diseminación de genes de resistencia en el **entorno ganadero** y el establecimiento de un reservorio de resistencias en animales (Carattoli, 2008). Numerosos estudios han demostrado el aislamiento de bacterias productoras de BLEEs en animales sanos (Briñas y col., 2002; Briñas y col., 2003a; Abreu y col., 2014) y enfermos (Briñas y col., 2003b; Angulo y col., 2004; Cogliani y col., 2011) y su correlación con cepas aisladas en humanos (Vieira y col., 2011). Las medidas promovidas por la FDA (*Food and Drug Administration*) para frenar el uso de cefalosporinas en producción animal y disminuir la dispersión de las resistencias parecen no ser suficientes (FDA, 2012). De hecho, se ha observado también una relación entre el uso de antibióticos en animales y las resistencias detectadas en el hombre (Angulo y col. 2004; Bosman y col., 2014). Por otro lado, cabe señalar que Blaak y colaboradores (2014a), han detectado la presencia de *E. coli* productoras de BLEEs en moscas aisladas en granjas de pollos, lo que sugiere una nueva ruta alternativa de transmisión de estas cepas desde los animales al hombre.

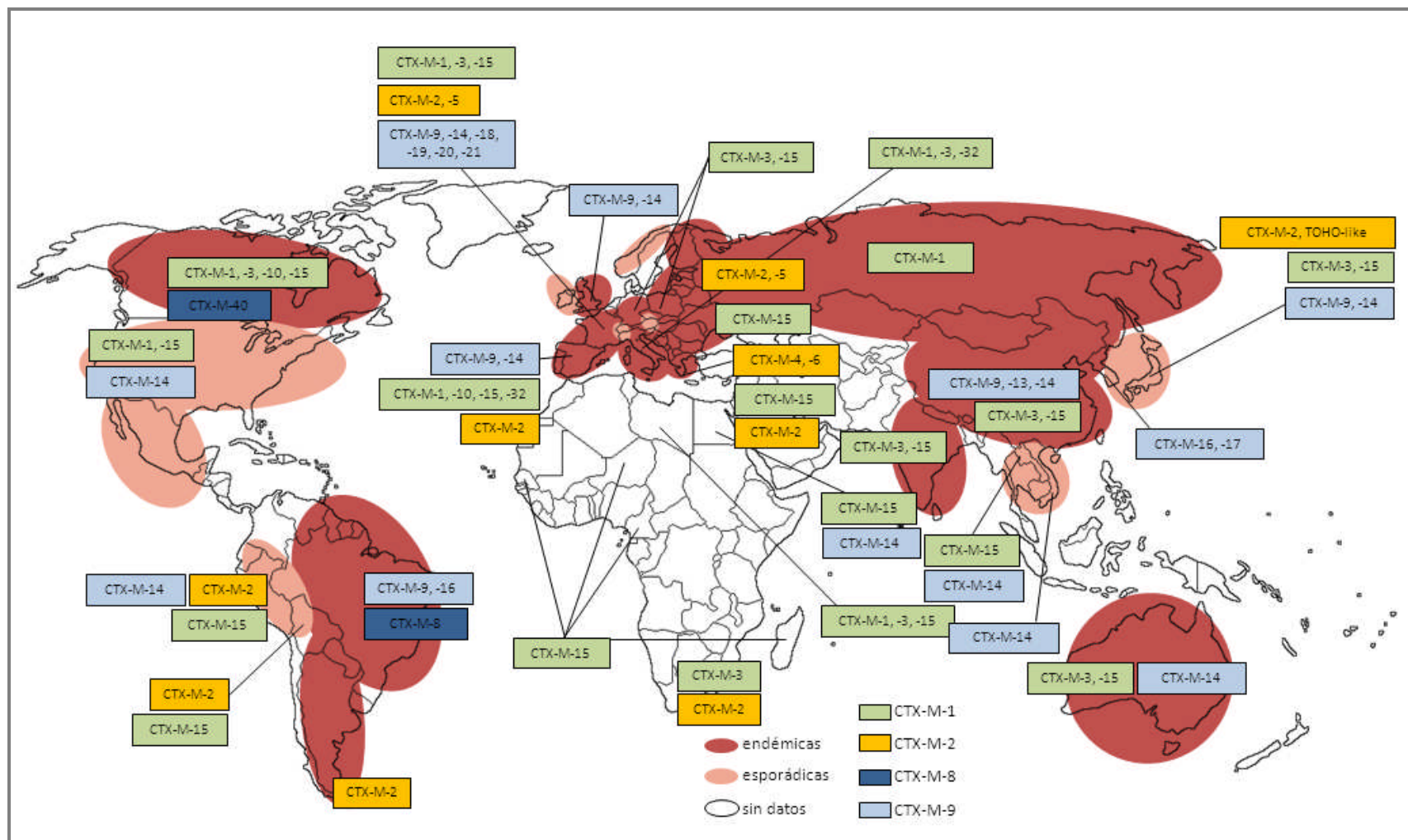


Figura 1.5. Distribución mundial de las β -lactamasas tipo CTX-M (adaptado Cantón y Coque, 2006).

Asimismo se ha estudiado la presencia de bacterias productoras de BLEEs en **productos alimentarios** (Smet y col., 2008) y la transmisión de estas resistencias al hombre a través de la cadena alimentaria (Aarestrup, 1999; Wang y col., 2006; Torres y Zarazaga, 2007). Varios estudios han descrito la presencia de enterobacterias productoras de BLEEs especialmente en productos cárnicos frescos (Bergenholtz y col., 2009; Carattoli, 2008; Carneiro y col., 2010; Escudero y col., 2010; Arslan, 2011; Egervärn y col., 2014; Ojer-Usoz y col., 2013) y cocidos (Amador y col., 2010). También se han aislado en quesos (Arslan y col., 2008; Amador y col., 2009), vegetales (Njage y Buys., 2015; Reuland y col., 2014; Zurfluh y col., 2015), cáscaras de huevos y fiambres (Egea y col., 2011) y pescados frescos (Sousa y col., 2011; Jiang y col., 2012).

La presencia de enterobacterias productoras de BLEEs en vegetales se ha relacionado con las aguas de riego (Njage y Buys, 2015; Blaak y col., 2014b). Los **sistemas acuáticos** tienen una especial relevancia en la emergencia y dispersión de resistencias (Amaya y col., 2012; Tacão y col., 2014). En este ambiente acuático, bacterias de diferentes orígenes (aguas residuales domésticas y de industrias, agricultura, ganaderías...) son capaces de mezclarse y se promueven los intercambios de elementos génicos entre distintas especies bacterianas (Baquero y col., 2008). Por tanto, el agua constituye no solo una ruta de diseminación de resistencias a antibióticos sino también una entrada de estos genes de resistencia a los ecosistemas naturales, transformando bacterias ambientales en reservorios de estas plataformas génicas (Dolejska, 2011).

Diversos estudios demuestran la presencia de bacterias productoras de BLEEs en ríos y lagos (Lu y col., 2010; Tacão y col., 2012; Zurfluh y col., 2013; Hu y col., 2013) y aguas residuales (Reinthalder y col., 2010). En los últimos años se han detectado BLEEs en aguas urbanas representando un potencial riesgo de infección y un problema de Salud Pública (Korzeniewska y Harnisz, 2013; Tissera y Lee, 2013).

La presencia de bacterias resistentes a antibióticos en aguas de consumo ha sido estudiada por varios autores (Armstrong y col., 1982; Pavlov y col., 2004; Zhang y col., 2009). Sin embargo, en España son pocos los estudios actualizados que recogen la prevalencia de bacterias productoras de BLEEs en sistemas acuáticos (Gómez y col., 2010; Ojer-Usoz y col., 2014).

Por otro lado, la existencia de **portadores sanos** de estas resistencias tanto en animales de producción como en humanos (Bonnet, 2004; Livermore y col., 2007; Wang y col., 2013a; Fernández-Reyes y col., 2014) amplía el número de reservorios que contribuirían a la transmisión de estas bacterias resistentes a antibióticos. Un estudio realizado en España muestra el aumento de aislamientos de BLEEs en portadores sanos, pacientes hospitalizados y pacientes en la comunidad, y señala el papel de los portadores sanos (Valverde y col., 2004) así como de los alimentos como mecanismo de diseminación de estas resistencias entre la población (Rodríguez-Siek y col., 2005; Johnson y col., 2006).

1.6. AVANCE DE RESISTENCIAS: NECESIDAD DE VIGILANCIA Y CARACTERIZACIÓN DE BLEEs

El último informe del ECDC, la EFSA (*European Food Safety Authority*) y la EMA (*European Medicines Agency*) sobre resistencia a antibióticos en bacterias y consumo de los mismos, señala los elevados niveles de resistencia en aislamientos de *E. coli* frente a ampicilina, sulfonamidas y tetraciclinas (EFSA y ECDC, 2015). En la Figura 1.6, se muestra la evolución de las resistencias a cefalosporinas de tercera generación en *E. coli* entre 2002 y 2013, y se observa el aumento notable de los niveles de resistencia a estos antibióticos a pesar de las medidas tomadas por las autoridades competentes. Asimismo, algunos autores han definido el término multirresistencia para aquellas cepas con resistencia a tres o más clases de antibióticos (Amador y col., 2011).

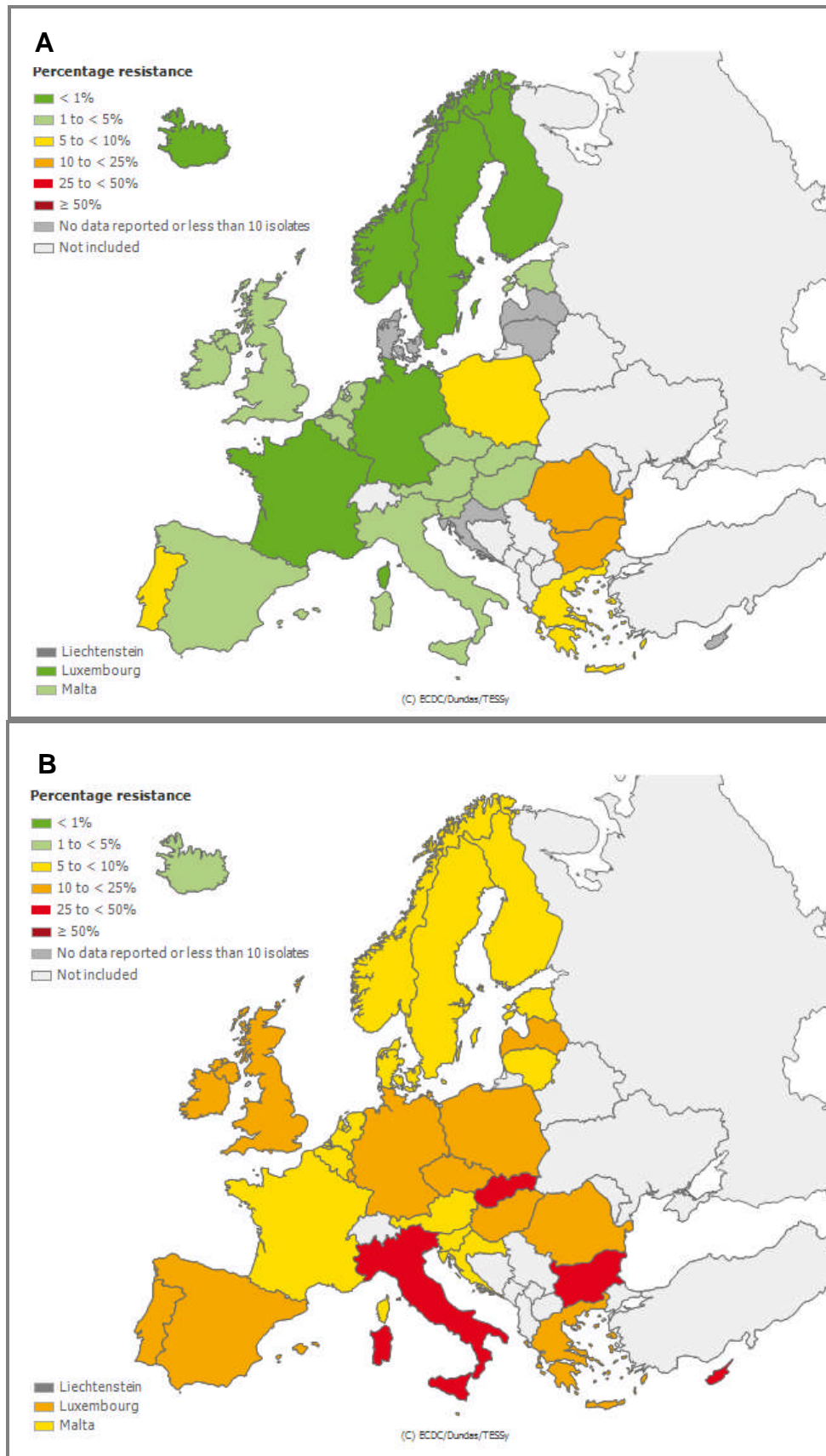


Figura 1.6. Evolución de los aislamientos de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación en Europa. A) 2002; B) 2013 (Datos del ECDC).

Atendiendo a este aumento de las resistencias frente a cefalosporinas, en los últimos años los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE están siendo los carbapenems, ya que son muy resistentes a la hidrólisis por estas β -lactamasas. Sin embargo, su uso debe ser racional y moderado ya que se ha descrito un aumento de la resistencia a estos antibióticos en especies bacterianas como *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Corbella y col., 2000). Además se ha observado también una co-producción de β -lactamasas de clase A no BLEEs (TEM-1, SHV-1), β -lactamasas de clase D como OXA y de clase C, especialmente AmpC en cepas de *E. coli* (Doi y Paterson, 2007), lo que podría complicar el tratamiento de enfermedades infecciosas debidas a estas bacterias. Dada la variedad de cepas productoras de BLEEs, el estudio del perfil antibiótico y de los genes implicados en dichas resistencias es esencial para identificar los clones presentes en estas poblaciones de bacterias resistentes y conocer su distribución. La continua vigilancia y el estudio de los mecanismos de resistencia y de las vías de diseminación son elementos imprescindibles para intentar frenar el aumento de la resistencia bacteriana y contribuir a su control. Por otro lado, el uso responsable de antibióticos es clave para reducir la presión selectiva sobre las cepas.

Por tanto, resulta crítico definir las relaciones génicas de las cepas productoras de BLEEs aisladas en los distintos nichos. Esto se ha traducido en un aumento del interés por el **estudio filogenético** de estas cepas en los últimos años. A este respecto, Wirth y colaboradores han desarrollado una base de datos para el estudio mediante MLST (*Multilocus Sequence Typing*) de las relaciones filogenéticas de *E. coli*, asignando cada cepa a una secuencia tipo (ST) y agrupando estas secuencias en complejos clonales (CCs) (Wirth y col., 2006). En un estudio coordinado de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) se investigó la estructura poblacional de aislamientos de *E. coli* productores de BLEE implicados en infecciones del tracto urinario (ITU). Se ha podido ver que en España existe una gran diversidad

de STs y una prevalencia del filogrupo A y de CTX-M-14 en cepas aisladas en hospitales españoles. Además, se observó la presencia de los complejos ST10 y ST23 en aislamientos del filogrupo A y del ST131 asociado a producción de CTX-M-15 en aislamientos del filogrupo B2. También se detectó la presencia de un clon CTX-M-15/ST131/B2 (Oteo y col., 2009).

A pesar de estos trabajos, hay una falta de información y de estudios multisectoriales que den una perspectiva global de la situación actual. En el último informe de la OMS (WHO, 2014) se señala la importancia de integrar toda la información de vigilancia de resistencias para poder comparar los datos obtenidos de cepas de origen alimentario, humano y ambiental. Por ello, es necesario abordar el problema de las resistencias a antibióticos con una visión global, considerando el constante flujo de elementos genéticos que tiene lugar en el medio ambiente, especialmente en el entorno acuático.

CAPÍTULO 2.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La presencia de las β -lactamasas de espectro extendido se perfila como uno de los principales problemas de resistencia a antibióticos betalactámicos en los últimos años. La facilidad de transmisión de estas resistencias entre especies bacterianas o la asociación de la resistencia a otros grupos de antibióticos constituye en la actualidad un grave problema sanitario, que limita las opciones terapéuticas de las infecciones tratadas con estos antimicrobianos. Por ello, es importante conocer la distribución de las β -lactamasas en nuestro medio y su posible diseminación por distintos nichos ambientales que pueden actuar como reservorio.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la utilización inadecuada de antibióticos en clínica y veterinaria está creando una presión selectiva sobre los microorganismos, favoreciendo la aparición de cepas resistentes que entran en circulación de forma recurrente entre diferentes entornos o nichos ecológicos. La codificación plasmídica y el intercambio de elementos génicos permiten una rápida diseminación de estas resistencias en el medio ambiente (especialmente a través de entornos acuáticos), llegando finalmente a explotaciones agrícolas y ganaderas. De esta forma, los microorganismos resistentes pueden entrar en la cadena alimentaria, suponiendo un potencial peligro de Salud Pública (Figura 2.1).

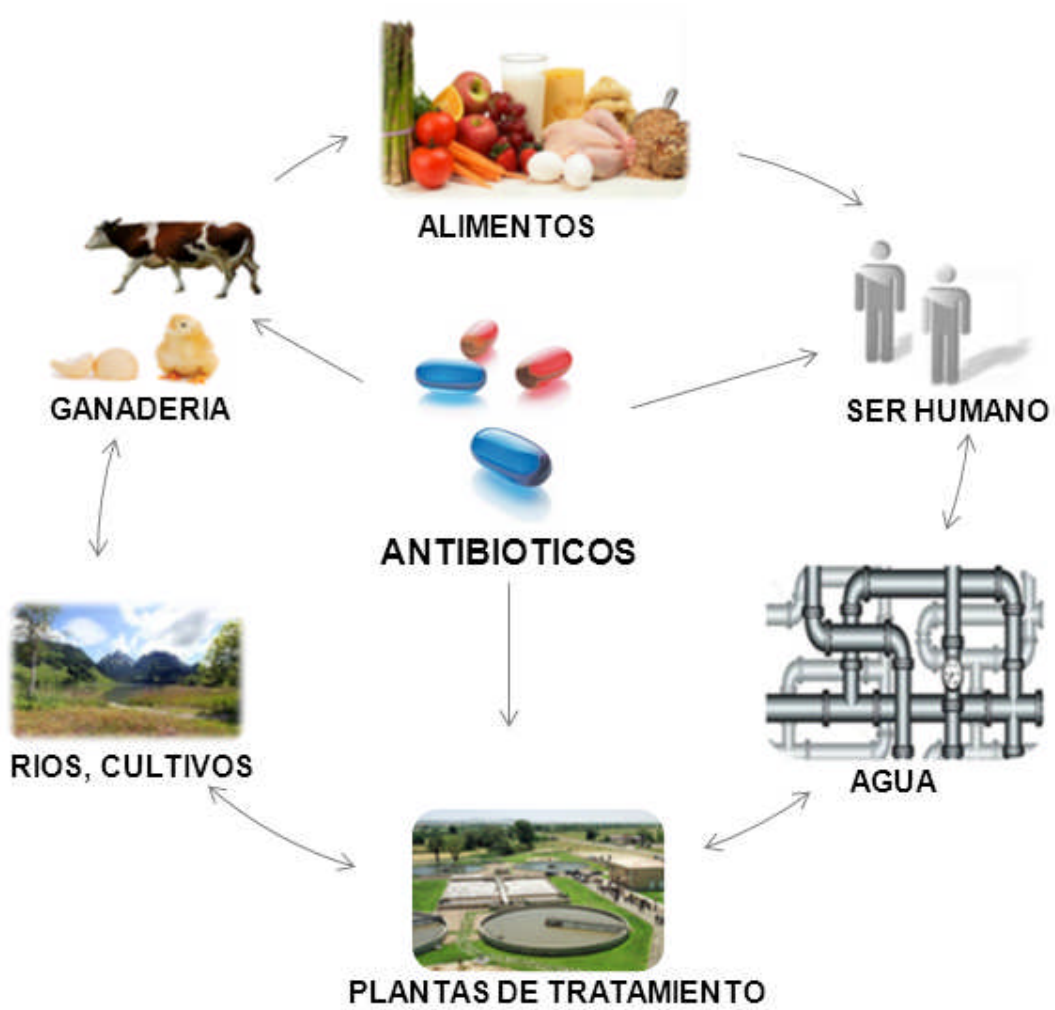


Figura 2.1. Flujo de bacterias resistentes en nuestro entorno

Por ello, el **objetivo general** de este estudio es evaluar la posible dispersión de enterobacterias productoras de BLEE en distintos nichos ecológicos (alimentos, medio ambiente y clínica), a través del análisis de los elementos moleculares implicados en la diseminación de los genes *bla* que codifican para la producción de estas enzimas.

El trabajo se concreta en los siguientes **objetivos específicos**:

1. Aislamiento e identificación de cepas productoras de BLEEs en muestras de alimentos, ambientales (entorno acuático y de producción animal) y clínicas.
2. Caracterización fenotípica de las resistencias mediadas por BLEEs y otras β -lactamasas determinando la susceptibilidad de las cepas a distintos antibióticos.
3. Caracterización molecular de los genes *bla*_{BLEE} implicados en la producción de BLEEs tipo CTX-M, SHV, TEM y OXA mediante PCR y secuenciación.
4. Estudio filogenético de *Escherichia coli* aisladas en los distintos nichos ecológicos, mediante la clasificación en filogrupos y determinación de secuencias tipo por MLST.

CAPÍTULO 3.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SELECCIÓN DE MUESTRAS

Para realizar este trabajo se seleccionaron distintos nichos ecológicos con el objetivo de estudiar la presencia de E-BLEE (Enterobacterias productoras de BLEEs) en el mayor número posible de ambientes. Para ello, se seleccionaron tres posibles fuentes de microorganismos (alimentos, ambiental y clínica) y dentro de cada uno de ellos se analizaron diferentes tipos de muestras. En la Figura 3.1 se muestra el espacio temporal de los diferentes muestreos realizados.

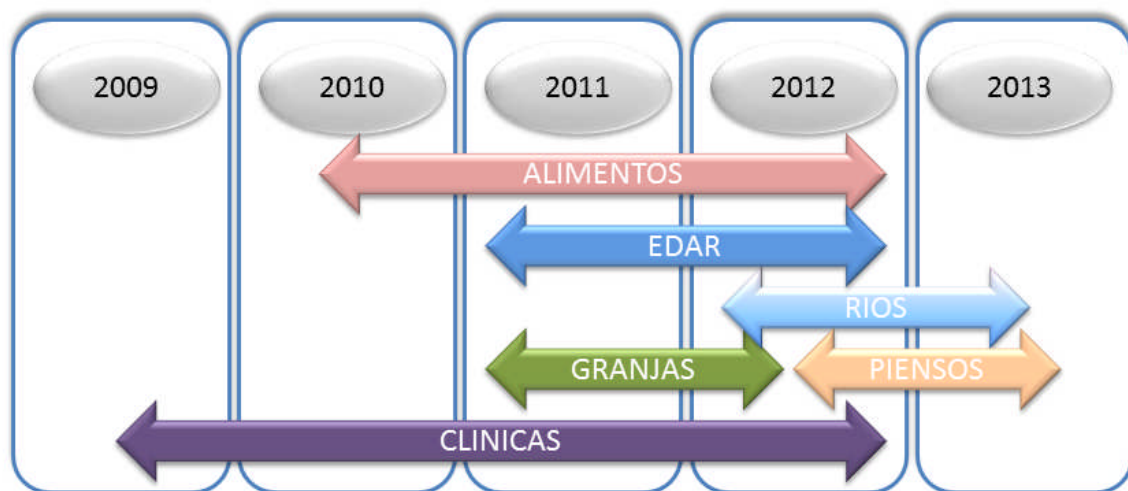


Figura 3.1. Cronograma de los muestreos realizados. * Las cepas de origen clínico (2009-2012) fueron suministradas por la Clínica Universidad de Navarra.

3.1.1. MUESTRAS DE ALIMENTOS

Con el objetivo de obtener datos representativos sobre la presencia de E-BLEE en alimentos puestos a la venta en la Comunidad Foral de Navarra, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios para llevar a cabo el muestreo:

- **Geografía:** selección de poblaciones superiores a 1000 habitantes y con estaciones depuradoras de aguas residuales, para poder realizar un estudio comparativo de las muestras de alimentos y las muestras ambientales

(efluentes de depuradoras y ríos). La distribución geográfica de las poblaciones muestreadas se muestra en la Figura 3.2 (círculos amarillos).

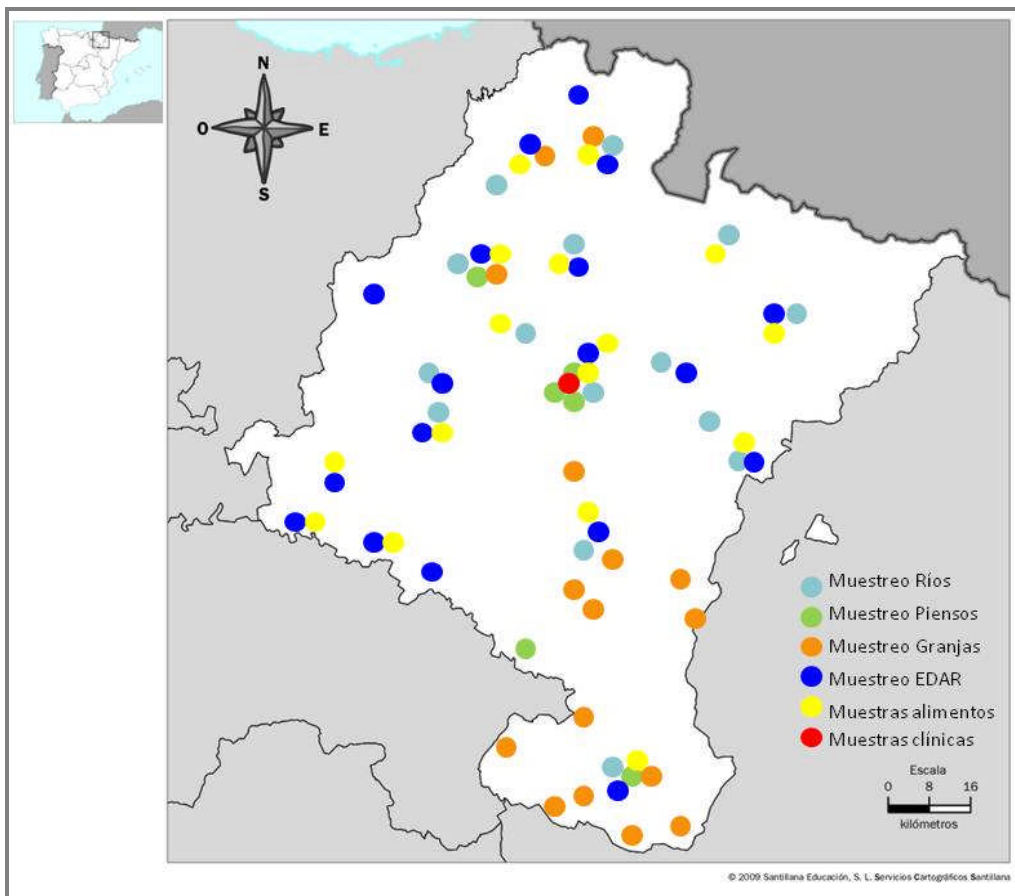


Figura 3.2. Localización de las zonas muestreadas en Navarra y tipo de muestras analizadas.

- **Puntos de venta:** establecimientos de diversas características al alcance del consumidor navarro (grandes cadenas de hiper/supermercados y pequeñas tiendas de venta al por menor, como fruterías, pescaderías y carnicerías).
- **Alimentos:** selección de productos representativos de los principales grupos de alimentos en los que por producción agrícola o ganadera pudiera darse una selección de cepas resistentes (carnes, pescados, vegetales y lácteos). Se incluyeron alimentos frescos a granel (vegetales, carnes y pescados eviscerados) y productos envasados listos para su consumo

(ensaladas IV gama, cárnicos cocidos, quesos frescos y curados loncheados y pescados procesados).

Teniendo en cuenta estas premisas, seleccionamos las categorías y tipos de alimentos que se muestran en la Tabla 3.1, cuyo muestreo se extendió entre diciembre de 2010 y julio de 2013.

Tabla 3.1. Grupos de alimentos incluidos en el estudio

Categoría	Tipo	Presentación	Puntos de muestreo	No. muestras
Cárnicos	Cerdo fresco*	Granel o barqueta	50	104
	Ternera fresca*	Granel o barqueta	50	105
	Pollo fresco*	Granel o barqueta	50	101
	Cocidos	Loncheados envasados	18	34
Vegetales	Lechuga	A granel	46	87
	Lechuga IV gama	Envasada	29	60
	Tomate	A granel	31	79
	Coliflor	A granel	20	20
	Espárragos	Frescos a granel	30	60
Pescados	Trucha fresca	A granel	50	50
	Salmón ahumado	Envasado	20	20
	Surimi (gulas, chaca)	Envasado	16	40
Lácteos	Quesos	Loncheado envasado	34	34
Total			444	794

* Carne picada, salchichas o hamburguesa.

Con el objetivo de que el muestreo fuera lo más representativo posible se siguieron dos estrategias distintas, en función del tipo de presentación de los productos:

- **Productos frescos a granel:** el estudio se llevó a cabo en ultramarinos, supermercados y grandes superficies de las localidades seleccionadas. En función del tamaño de la población muestreada se visitaron uno o varios establecimientos. Así, en el caso del estudio de productos cárnicos en Pamplona, se seleccionaron establecimientos que pertenecían a dueños o cadenas diferentes con el fin de que la procedencia de las carnes fuera lo más

amplia posible. Por otro lado, la recogida de muestras en cada establecimiento estuvo condicionada por la oferta disponible, pero siempre que fue posible se tomaron 3 productos cárnicos (ternera, cerdo y pollo) y 2 vegetales (lechuga y tomate). El estudio de truchas frescas se quedó delimitado en Pamplona, ante la dificultad de encontrar pescaderías en muchas de las localidades.

- **Productos envasados:** este tipo de productos se comercializan por lotes (reconocibles en la etiqueta junto a la fecha de caducidad), y son distribuidos desde la propia empresa (o central que realiza las operaciones de procesado, loncheado y envasado) por toda la geografía española, por lo que un mismo lote podría estar presente en diferentes poblaciones de Navarra. Por ello, se planteó el análisis de diferentes lotes y marcas de los productos en establecimientos de Pamplona (diferentes cadenas de supermercados). Se incluyeron lechugas de IV gama, cárnicos cocidos loncheados, quesos loncheados, pescados tipo surimi (gulas y chaca) y salmón ahumado.

De esta forma, se analizaron un total de 794 productos con las características que se muestran en la Tabla 3.2. Inmediatamente después de la toma de muestras los productos se transportaron al laboratorio en condiciones de refrigeración (nevera portátil con acumuladores de frío) y fueron mantenidos a $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el inicio de los análisis, siempre dentro de las 24 horas siguientes a su recepción. Se registró tipo de producto, fecha de recepción, formato de presentación, fecha de caducidad y lote (productos envasados), lugar de origen y otros datos relevantes para el estudio.

Tabla 3.2. Número y tipos de muestras analizadas en las poblaciones de Navarra seleccionadas en el estudio

Localidad	Hab. *	Alimentos frescos a granel							Productos envasados						
		Cárnicos			Vegetales				Pescados	Cárnicos	Vegetal	Lácteos	Pescados		
		Ternera	Cerdo	Pollo	Lechuga	Tomate	Espárragos	Col	Trucha	Cocidos	Lechuga	Quesos	Gulas	Chaca	Salmón**
Baztán	7.974	5	5	5	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estella	13.947	5	4	6	4	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteribar, V.	2.428	5	6	5	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Irurzun	2.300	5	7	7	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lecumberri	1.486	6	5	5	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leiza	2.889	6	6	6	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ulzama	1.692	0	0	0	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Los Arcos	1.182	1	1	0	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Mendavia	3.655	1	1	0	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Pamplona	196.955	56	54	50	32	27	46	20	50	34	60	34	20	20	20
Ribaforada	3.721	1	2	1	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salazar, V.	1.565	1	2	1	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sangüesa	5.080	5	5	5	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tafalla	11.201	3	3	3	3	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-
Tudela	35.369	4	3	5	5	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Viana	4.062	1	0	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	-	105	104	101	87	79	60	20	50	34	60	34	20	20	20

* Habitantes: Fuente Instituto Nacional de Estadística. Datos a 1 de Enero de 2013. (<http://www.ine.es/>)

** Salmón ahumado loncheado.

3.1.2. MUESTRAS AMBIENTALES

Para estudiar la dispersión de E-BLEE en el medio ambiente se seleccionaron muestras de distintos orígenes: por un lado, aguas procedentes de ríos y de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), y por otro, muestras procedentes del entorno de producción de animales, como piensos y el lecho o cama de los animales en las granjas. De este modo, se pretendió determinar la presencia de estas bacterias en entornos que pueden actuar como reservorio y vehículo de genes de resistencia. En la Figura 3.2 se muestran los distintos puntos muestreados en Navarra para las diferentes categorías de muestras.

Respecto al muestreo de aguas, se seleccionaron un total de 21 **estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR)**, localizadas en poblaciones con ≥ 1000 habitantes distribuidas por toda la geografía Navarra (Tabla 3.3). El periodo de muestreo fue de marzo del 2011 hasta septiembre de 2012 y se realizaron al menos 4 visitas a cada estación, en las que se tomaron muestras de 100 ml de agua efluente de la salida de la depuradora.

Tabla 3.3. Localidades EDAR y ríos a los que vierten el agua.

Localidad	Río	Localidad	Río	Localidad	Río
Sangüesa	Aragón	Tafalla	Cidacos	Aoiz	Irati
Alsasua	Araquil	Lodosa	Ebro	Lumbier	Irati
Echauri	Arga	Mendavia	Ebro	Lecumberri	Larraún
Arazuri	Arga	Tudela	Ebro	Leiza	Leizarán
P. la Reina	Arga	Viana	Ebro	Ochagavía	Salazar
Baztán	Baztán	Estella	Ega	Ulzama	Ulzama
Bera	Bidasoa	Roncal	Esca	Améscoa Baja	Urederra

Por otro lado, se analizaron los principales **ríos** de Navarra que recibían agua de las depuradoras estudiadas. Así, entre marzo de 2012 y marzo de 2013 se recogieron 222 muestras del cauce medio de los siguientes ríos: Aragón, Araquil, Arga, Bidasoa, Cidacos, Ebro, Ega, Esca, Irati, Larraún, Leizarán, Salazar, Ulzama y

Urederra. Se realizaron al menos 4 muestreos en cada río, en diferentes épocas del año, tomando 100 ml de agua en cada recogida de muestras.

Todas las muestras de aguas fueron recogidas en envases estériles y transportadas directamente al laboratorio en condiciones de refrigeración (nevera portátil con acumuladores de frío) y fueron mantenidas a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el inicio de los análisis, siempre dentro de las 24 horas siguientes a su recepción.

En cuanto a la vigilancia de resistencias en el entorno de producción animal, se analizaron 91 muestras de suelos procedentes de 17 **granjas** de ganado vacuno (n=3), ovino (n=2), porcino (n=5), aviar (n=5) y equino (n=2) distribuidas por toda la geografía navarra (Figura 3.2). La toma de muestras se realizó empleando las calzas que utilizan los trabajadores para moverse por las instalaciones, recogiendo paja y heces del suelo de las granjas en bolsas de plástico estériles. Se realizaron al menos 2 visitas a cada una de las granjas durante el periodo de estudio comprendido entre marzo de 2011 y marzo de 2012. Las muestras se transportaron directamente al laboratorio en condiciones de refrigeración. Además, se analizaron 60 muestras de **piensos** destinados a producción animal donados por 7 empresas productoras en el periodo comprendido entre diciembre de 2012 y marzo de 2013 (Tabla 3.4). En la fábrica de producción se recogieron 50 g de producto en envases estériles y se transportaron directamente al laboratorio a temperatura ambiente.

Tabla 3.4. Número de muestras de piensos analizadas y tipo de ganado al que van destinadas

Empresa	Tipo de ganado					
	Vacuno	Porcino	Aviar	Ovino	Conejos	Equino
E1	6	2	1	3	1	1
E2	3	-	-	-	-	1
E3	-	4	-	-	-	-
E4	-	-	2	2	1	-
E5	-	3	4	2	-	-
E6	3	2	3	2	1	1
E7	-	6	2	-	4	-
Total	12	17	12	9	7	3

3.1.3. MUESTRAS CLÍNICAS

La Clínica Universidad de Navarra nos suministró 130 cepas de *Escherichia coli* sospechosas de ser productoras de BLEE procedentes de muestras clínicas de pacientes ingresados entre 2009 y 2012. Estas cepas fueron aisladas de muestras biológicas correspondientes a piel, exudado de herida, hisopado nasal, hisopado inguinal, hisopado uretral, hisopado vaginal y perianal, aspirado bronquial y ascítico, absceso profundo, esputo, catéter de drenaje, biopsia, orina, sangre y muestras sin especificar.

Estas cepas ya habían sido identificadas como *E. coli* mediante el sistema automatizado VITEK® (bioMérieux).

3.2. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

3.2.1. AISLAMIENTO DE ENTEROBACTERIAS RESISTENTES A CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN

Las muestras recogidas se procesaron en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica Bio-II-A (Telstar, Terrasa, España). En todos los casos se llevo a cabo paralelamente un procedimiento de investigación (para determinar la presencia o ausencia de E-BLEE) y un procedimiento de recuento, para determinar la concentración de enterobacterias y de E-BLEE en cada muestra, en caso de que se detectara la presencia de estas últimas.

El **procedimiento de investigación** de E-BLEE consistió en un protocolo de dos fases: una primera de pre-enriquecimiento y enriquecimiento en medio específico para enterobacterias, y una segunda de aislamiento en medio selectivo para microorganismos resistentes (Figura 3.3).

En el caso de las muestras de **alimentos, piensos y suelos de granjas** se pesaron 25 g de muestra, se añadieron 225 ml de agua de peptona tamponada (BPW; Merck, Darmstadt, Alemania) y se homogeneizó el conjunto en *Stomacher* durante 1 minuto (Lab-Blender 400, Seward Medical, Reino Unido). Tras la incubación de la bolsa a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, se transfirió 1 ml a 10 ml de caldo EE Mossel (Difco, Le Pont de Claix, Francia), que fue incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Finalmente, se realizó un aislamiento en agar chromID ESBL (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia) ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 horas). Este medio contiene cefpodoxima como componente selectivo y otros compuestos cromogénicos que permiten identificar a simple vista las especies bacterianas, en función del color de las colonias. Por ejemplo, *Escherichia coli* muestra una coloración rosa/burdeos debido a la β -glucuronidasa que posee; *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter* (β -glucosidasa) crecen formando colonias de color verde, mientras que *Proteus* y *Morganella* dan lugar a colonias marrones (desaminasa). En cualquier caso, se realizó la identificación de géneros y especies por las pruebas bioquímicas adicionales que se indican en el apartado 3.2.2.

En el caso de las **muestras de aguas** (EDAR y ríos), se transfirieron 5 ml de la muestra a 5 ml de caldo EE Mossel a doble concentración y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. A continuación se continuó con el procedimiento de aislamiento en agar chromID ESBL (bioMérieux) descrito anteriormente.

Por otro lado, se llevó a cabo el **recuento de Enterobacterias totales** y de **enterobacterias resistentes a cefpodoxima** sembrando 1 ml del homogeneizado de la muestra o de la muestra directa (en el caso de aguas) en placas de agar VRBG (Merck) y de agar chromID ESBL (bioMérieux), respectivamente. Las placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h y se procedió al recuento de colonias típicas. En el caso del agar VRBG, las enterobacterias fermentan la glucosa por lo que se observan colonias de color rojo-púrpura con o sin halo de precipitación. Mientras que las

colonias que crecen en agar cromogénico se consideraron resistentes a cefpodoxima y se identificaron según los colores descritos anteriormente.

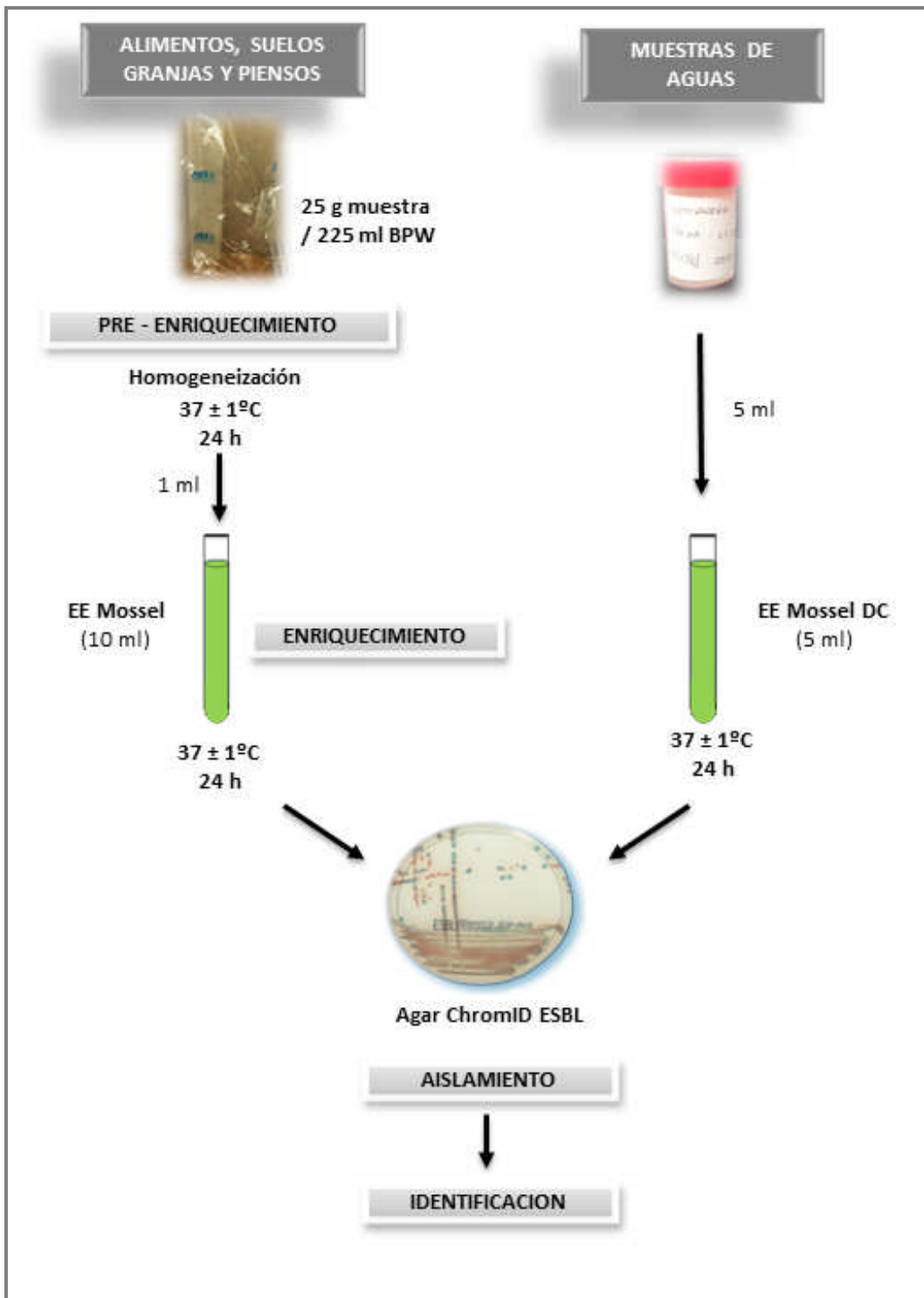


Figura 3.3. Protocolo de investigación de E-BLEE en muestras de alimentos, piensos, suelos de granjas (paja y heces de animales) y aguas.

3.2.2. IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

A continuación se procedió a la identificación de las cepas que crecieron en agar chromID ESBL (bioMérieux) y que por tanto eran resistentes a cefpodoxima y sospechosas de ser E-BLEE.

Las colonias sospechosas se aislaron en agar nutritivo (Biolife, Milán, Italia) y fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas: test de la oxidasa, prueba del indol, crecimiento en Kligler Iron Agar (KIA, bioMérieux), galerías API 10S y 20E (bioMérieux). También se utilizó el sistema VITEK® (bioMérieux) con tarjetas de identificación para Gram negativos en aquellos casos en los que el API no fue suficientemente discriminatorio.

Una vez identificadas, las cepas fueron codificadas por orden correlativo según origen y fecha de aislamiento. La colección de cepas obtenida se conservó en congelación. Para ello, se obtuvieron cultivos puros en agar nutritivo (Biolife) y las colonias se resuspendieron en leche desnatada estéril al 10 % (Scharlab, Barcelona, España). De cada cepa se congelaron 2 viales, de forma que se pudieran almacenar en dos equipos distintos para evitar posibles pérdidas ante averías (-80 °C y -135 °C).

3.3. MÉTODOS FENOTÍPICOS DE DETECCIÓN DE BLEE

Para determinar los patrones de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas en el estudio se han utilizado varios métodos fenotípicos. En todas las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se incluyeron controles con cepas bien caracterizadas en cuanto a la producción de BLEE:

- Control negativo (cepa no productora de BLEE): *E. coli* ATCC 25922
- Controles positivos (cepas productoras de BLEE): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Los antibióticos y concentraciones usadas en los ensayos se especifican en cada método.

3.3.1. TÉCNICAS DE DIFUSIÓN EN DISCO

Se emplearon dos métodos de difusión en disco (test de disco combinado y test de sinergia de doble disco), basados en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores (1966). Estos procedimientos dan como resultados datos cualitativos (sensible, intermedio, resistente), en función de los criterios establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) para el grupo de enterobacterias (*Table 2A Enterobacteriaceae M02 and M07*).

El procedimiento de realización de ambos ensayos se presenta de forma resumida en la Figura 3.4. Partimos de un cultivo fresco y puro de la cepa a ensayar, del que se prepara un inóculo equivalente a 0,5 McFarland. Se inocula una placa de agar Mueller-Hinton (MH, Oxoid, Wesel, Alemania) con ayuda de un hisopo y se colocan los discos de antibióticos, asegurando espacio suficiente para permitir la medición de las zonas de inhibición. Tras incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas, se procede a la lectura del diámetro de los halos de inhibición.

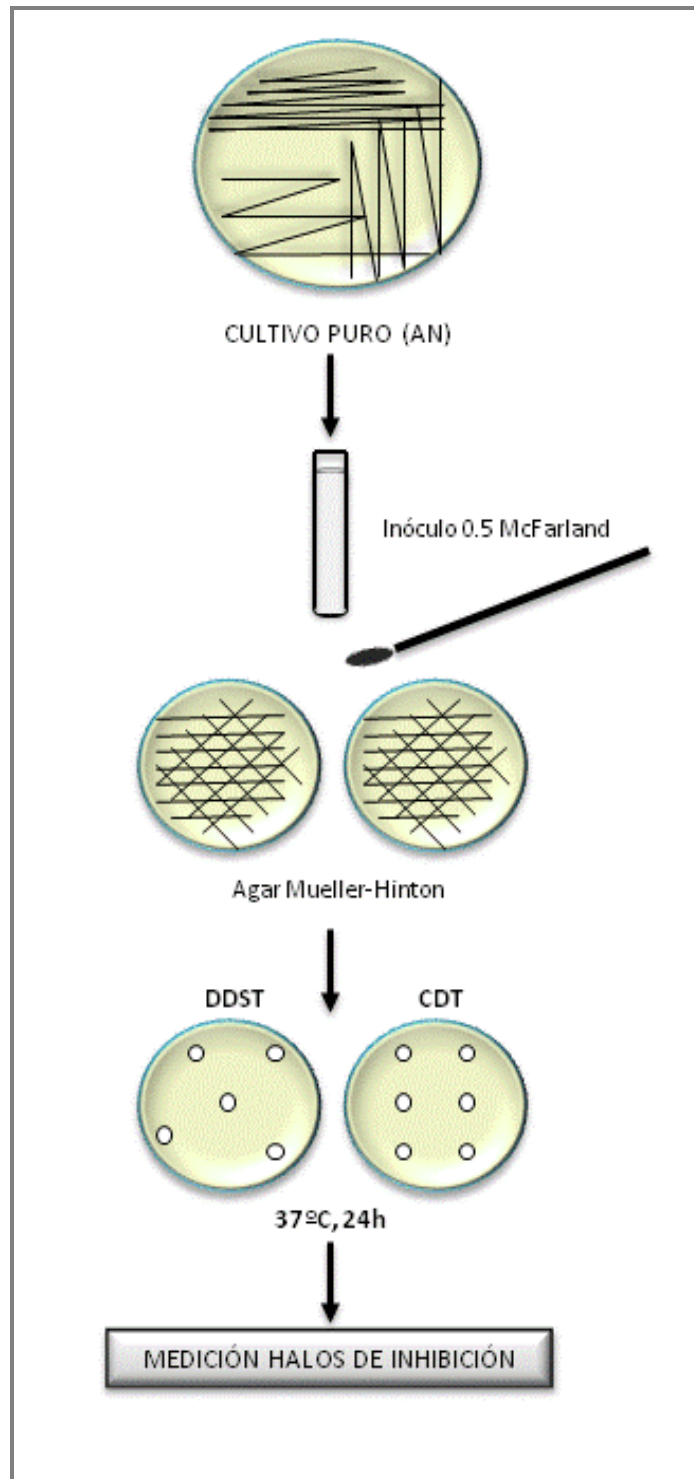


Figura 3.4. Protocolo seguido para el estudio de sensibilidad antibiótica por métodos de difusión en disco: test de disco combinado (CDT) y test de sinergia de doble disco (DDST).

3.3.1.1. Test de disco combinado (*Combination disc test*, CDT)

Este método está basado en la capacidad del ácido clavulánico de inhibir las β -lactamasas (Jarlier y col., 1988). Consiste en medir los halos de inhibición generados

alrededor el disco de cefalosporina y compararlos con los halos generados alrededor del disco de cefalosporina combinada con ácido clavulánico. Siguiendo las recomendaciones del CLSI se colocan discos de ceftazidima (CAZ, 30 µg), ceftazidima/ ácido clavulánico (CAZ/CA, 30/10 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), cefotaxima/ ácido clavulánico (CTX/CA, 30/10 µg), cefepime (FEP, 30 µg) y cefepime/ ácido clavulánico (FEP/CA, 30/10 µg). Todos ellos suministrados por Rosco Diagnostica (Taastrup, Dinamarca).

Cuando el diámetro de los halos de cefalosporina combinada con ácido clavulánico es superior en 5 mm respecto a los obtenidos con la cefalosporina sola se concluye que la cepa es productora de BLEE (Figura 3.5).

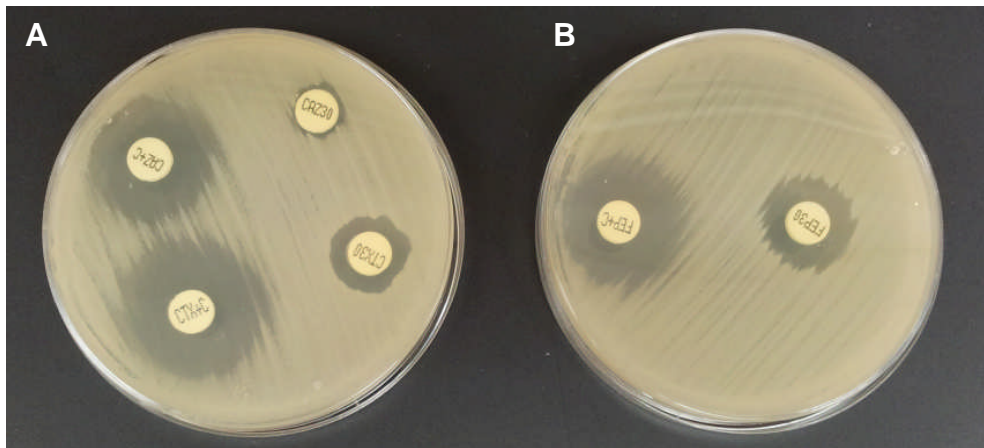


Figura 3.5. Resultados de la prueba de disco combinado (CDT) de una cepa productora de BLEE. A) Discos de CAZ y CTX con y sin CA; B) Discos de FEP con y sin CA.

3.3.1.2. Test de sinergia de doble disco (*Double-disc synergy test*, DDST)

De manera similar, el test de sinergia de doble disco se fundamenta en la potenciación del halo de inhibición que se genera alrededor del disco de antibiótico cuando se enfrenta a un inhibidor de las betalactamasas. En este caso, se coloca el disco de amoxicilina/ácido clavulánico en el centro de una placa de Mueller-Hinton inoculada con la cepa, disponiendo a una distancia de 30 mm los discos de cada uno de los antibióticos para observar el efecto sinérgico (cuando no se observa sinergia se reduce la distancia a 20 mm). De este modo se ensayan los siguientes antibióticos:

amoxicilina/ácido clavulánico (AMC, 30 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg), ceftriaxona (CRO, 30 µg), aztreonam (AZT, 30 µg) y cefotaxima (CTX, 10 µg).

Se considera que la cepa es productora de BLEE cuando se observa una potenciación del halo de inhibición generado entre el disco de AMC y los antibióticos situados a su alrededor (Figura 3.6).

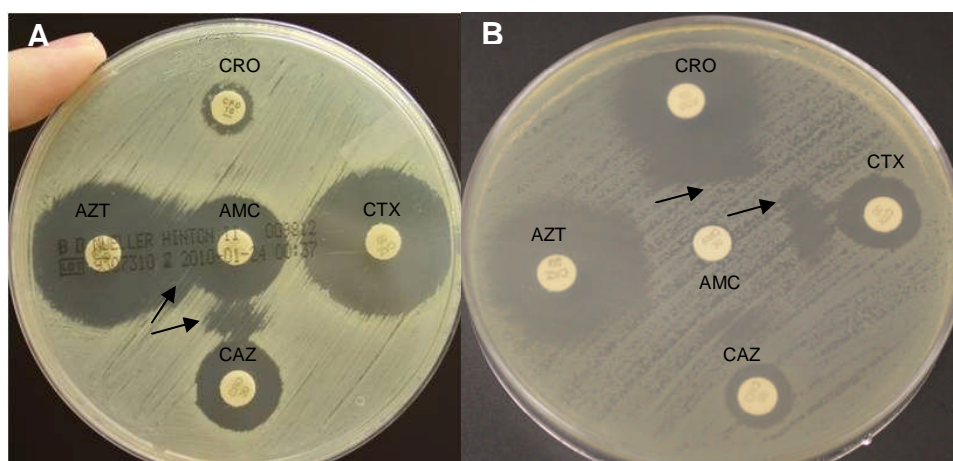


Figura 3.6. Resultados de la prueba de sinergia en doble disco (DDST). A) Cepa productora de BLEE (potenciación del halo); B) Cepa que muestra un aplanamiento del halo de inhibición.

3.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento de un microorganismo *in vitro*, expresada en µg/ml. Esta técnica se puede utilizar también para confirmar la presencia de BLEE, ya que las cepas productoras de estas enzimas producen el descenso de ≥ 3 diluciones dobles en la CMI de la cefalosporina combinada con ácido clavulánico respecto a la CMI de la cefalosporina sola. El procedimiento empleado en este estudio fue la técnica de microdilución con el método automatizado MicroScan® (Siemens AG, Alemania), que utiliza tarjetas comerciales para Gram negativos (NM37, Siemens).

Siguiendo los criterios del fabricante, se prepara un inóculo del microorganismo y se enfrenta a concentraciones crecientes de distintos antibióticos presentes en las tarjetas (Tabla 3.5). Transcurrido el tiempo de incubación (18-24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)

se determinaron las CMI's observando la concentración más baja de antibiótico que inhibe el crecimiento del microorganismo. Se compararon los valores de CMI obtenidos con cada cefalosporina, respecto a la combinada con ácido clavulánico para determinar si la cepa era productora de BLEE. Además se calcularon los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ (inhibición del crecimiento del 50 % y del 90 % de los microorganismos, respectivamente).

Tabla 3.5. Antibióticos y rangos de concentraciones utilizadas en la determinación de las CMI's.

Antibiótico	µg/ml	Antibiótico	µg/ml
Amikacina (AK)	8-32	Ertapenem (ETP)	0,5-4
Amoxicilina/ ac. clavulánico (AMC)	74-16/8	Fosfomicina (FOT)	32
Ampicilina (AMP)	2-16	Gentamicina (GM)	2-8
Ampicilina/sulbactam (AMS)	8/4-16/8	Imipenem (IMP)	2-8
Aztreonam (AZT)	1, 8-16	Levofloxacino (LV)	1-4
Cefazolina (CZ)	8-16	Meropenem (MER)	1-8
Cefepime (FEP)	1, 8-16	Mezlocilina (MZ)	16, 64
Cefotaxima (CTX)	1-32	Moxifloxacino (MXF)	0,5-2
Cefoxitina (FOX)	8-16	Nitrofurantoína (FM)	32-64
Cefpodoxima (CPD)	1-4	Norfloxacino (NOR)	4-8
Ceftazidima (CAZ)	1-16	Piperacilina (PIP)	8-16, 64
Cefuroxima (CXM)	1, 4-16	Piperacilina/tazobactam (TZP)	8-16, 64
Cloranfenicol (CHL)	8-16	Tetraciclina (TET)	4-8
Ciprofloxacino (CIP)	0,5-2	Tigeciclina (TIG)	1-4
Colistina (COL)	2-4	Tobramicina (TO)	2-8
Cefotaxima/ ac. clavulánico (CTX/CA)	0,5/4, 4/4	Trimetoprim/sulfametoxazol (SXT)	2/38- 4/76
Ceftazidima/ ac. clavulánico (CAZ/CA)	0,25/4, 2/4		

3.3.3. ESTUDIO DE OTRAS β -LACTAMASAS

3.3.3.1. Detección de β -lactamasa de tipo AmpC

El estudio de la hiperproducción de esta β -lactamasa se realizó en paralelo al método de DDST. Para ello se prepararon dos placas de Mueller-Hinton, pero una de ellas suplementada con cloxacilina (200 mg/l, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), para evitar el enmascaramiento de la presencia de BLEE. A continuación se colocaron los siguientes antibióticos en ambas placas de MH: amoxicilina/ácido clavulánico (AMC, 30 μ g), ceftazidima (CAZ, 30 μ g), ceftriaxona (CRO, 30 μ g), aztreonam (AZT, 30 μ g) y cefotaxima (CTX, 10 μ g). La cloxacilina inhibe la actividad cefalosporinasa de AmpC y permite detectar la producción de BLEE. Se consideró resultado positivo un aumento en el halo de inhibición de al menos 5 mm entre la placa de MH normal y MH suplementado con cloxacilina.

Posteriormente, en aquellas placas con resultados positivos, se colocaron discos de cefoxitina y cefotetán en placas de Mueller-Hinton, la resistencia a ambos antibióticos confirmaría el fenotipo de cefalosporinasa AmpC (Figura 3.7).

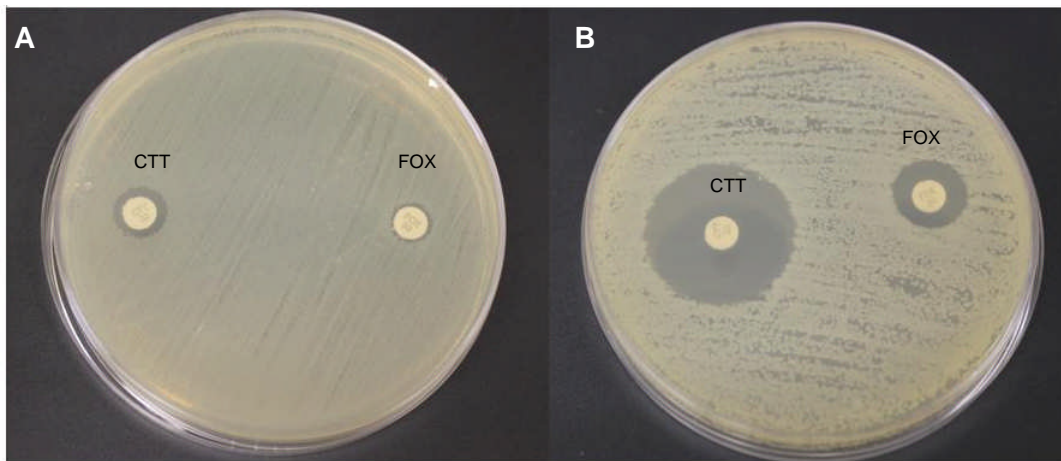


Figura 3.7. Halos de inhibición para cefoxitina (FOX) y cefotetán (CTT). A) Cepa resistente a ambos antibióticos, B) Cepa sensible a ambos antibióticos

3.3.3.2. Detección de carbapenemasas de tipo KPC

La producción de carbapenemasas de tipo KPC se estudió con el kit comercial KPC+MBL Confirm ID Pack de Rosco Diagnostica (Dinamarca). Esta detección fenotípica se basa en la sinergia entre el ácido borónico (BO) y el carbapenem. La enzima KPC es inhibida por el ácido fenilborónico (que también inhibe AmpC). Para diferenciar entre estas dos enzimas el kit incluye la combinación con cloxacilina.

Se consideró resultado positivo para la producción de KPC una diferencia de >4 mm entre los diámetros de los halos de inhibición del disco de meropenem y el meropenem combinado con BO, y una diferencia de halos <4 mm entre el meropenem y la cloxacilina (Figura 3.8).

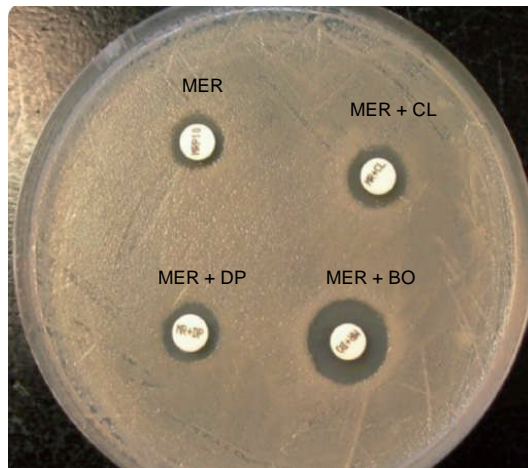


Figura 3.8. Cepa de *K. pneumoniae* KPC positiva (Adaptación de Rosco Diagnostica), discos de meropenem (MER), meropenem/ cloxacilina (MER + CL), meropenem/ ac. dipicolínico (MER + DP) y meropenem/ac. borónico (MER + BO).

3.3.3.3. Detección de metalo- β -lactamasas

La detección fenotípica de metalo- β -lactamasas (MBL) se basa en la inhibición de estas enzimas por el ácido dipicolínico (DPA) (Walsh y col., 2005). Se utilizó el mismo kit comercial que para carbapenemasas tipo KPC.

Se consideró resultado positivo para la producción de MBL una diferencia en el diámetro del halo de inhibición superior a 5 mm entre el disco de meropenem y el de

meropenem combinado con DPA (Figura 3.9). En el caso de que todas las pruebas fueran negativas el test señala que es indicativo de una alteración de las porinas de membrana.

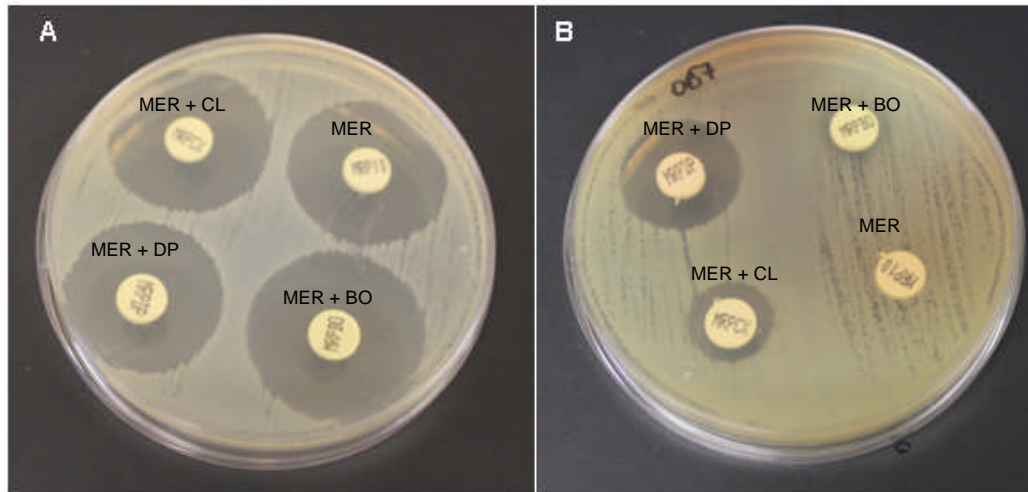


Figura 3.9. Halos de inhibición en el estudio de metalo-beta-lactamasas. A) Cepa productora de BLEE con alteración de las porinas de membrana; B) Cepa productora de MBLs. Discos de meropenem (MER), meropenem/ cloxacilina (MER + CL), meropenem/ ac. dipicolínico (MER + DP) y meropenem/ac. borónico (MER + BO).

3.3.3.4. Detección de OXA-48

La producción de oxacilinasas se estudia con el test de Rosco. Cuando se obtienen resultados negativos en todos los test anteriores (es decir, cuando las diferencias entre los halos de inhibición son ≤ 3 mm), se coloca un disco de temocilina (30 μ g). Si no se observa zona de inhibición en torno al disco se confirma la presencia de OXA-48 o enzimas similares.

3.4. DETECCIÓN DE GENES CODIFICANTES DE BLEE

3.4.1. EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

Para realizar la extracción del ADN total se parte de una unidad formadora de colonia (UFC) que se subcultiva en placa de agar nutritivo a 37 °C durante 18-24 horas para asegurar la pureza de la cepa. A partir de este cultivo puro se resuspenden varias

colonias en 300 µl de agua ultrapura y se hierven durante 10 minutos a 100 °C. Se deja enfriar esta suspensión a temperatura ambiente y se centrifuga 2 minutos a 20.000 x g. El sobrenadante se recoge en un tubo eppendorf y se conserva a -20 °C hasta el momento de su utilización.

3.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa) se empleó para detectar los genes implicados en las resistencias a betalactámicos. En primer lugar se realizaron PCR múltiples para detectar los genes codificantes, posteriormente se realizaron PCR simples para cada gen detectado y finalmente se secuenciaron los amplicones.

Todas las amplificaciones se realizaron en el termociclador GeneAmp® 2700 (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos). Las secuencias de los cebadores se detallan en la Tabla 3.6. Para optimizar el ensayo de PCR en todas las reacciones se utilizaron varias cepas como controles positivos (Tabla 3.7), un control negativo consistente en agua ultrapura y un marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen, Barcelona, España).

3.4.2.1. Detección de genes SHV, TEM Y OXA

La reacción de amplificación de estos genes se realizó mediante PCR múltiple descrita por Colom y colaboradores (2003) en un volumen final de 25 µl: 2 µl de ADN, 2,5 µl de dNTPs 40 mM (Bioline, Londres, Reino Unido), 2,5 µl de *buffer* 10x (Bioline), 1 µl de MgCl₂ 50 mM (Bioline), 2 µl del cebador (Sigma-Aldrich) SHV-F, SHV-R, TEM-F, TEM-R y 3 µl del cebador OXA-F y OXA-R, 1 U de Inmolasa™ polimerasa 5 UI/µl (Bioline) y 2,8 µl de agua ultrapura, hasta completar el volumen final.

La amplificación se realizó con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 32 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 54 °C

durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto), una elongación final a 72 °C durante 10 minutos y mantenimiento a 4 °C.

3.4.2.2. Detección de genes CTX-M

La PCR múltiple para la detección de CTX-M se realizó modificando las condiciones descritas por Woodford y colaboradores (2004). Para un volumen total de 25 µl se definen las siguientes concentraciones finales: 2 µl de ADN, 2,5 µl de dNTPs 40 mM (Bioline), 2,5 µl de *buffer* 10x (Bioline), 1 µl de MgCl₂ 50 mM (Bioline), 1 µl de cada cebador (CTX-M-1-F, CTX-M-1-R, CTX-M-2-F, CTX-M-2-R, CTX-M-9-F, CTX-M-9-R, CTX-M-8-F, CTX-M-25-F y CTX-M-8/25-R), 1 U de Inmolasa™ polimerasa 5 UI/µl (Bioline) y 7,8 µl de agua ultrapura, hasta completar el volumen final. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de 5 minutos a 94 °C, seguidos de treinta ciclos de 45 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 50 segundos a 72 °C, y un ciclo final de 6 minutos a 72 °C.

Tabla 3.6. Secuencias de nucleótidos de los cebadores empleados, indicando tamaño esperado del amplicón, temperatura de hibridación y referencia bibliográfica.

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')*	Tamaño amplicón (pb)	T hibridación (°C)	Referencia
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	AAAAATCACTGGCCAGTTC (F)	415	59,2	Woodford y col. (2006)
	AGCTTATTCATCGCCACGTT (R)		63,4	
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CGACGCTACCCCTGCTATT (F)	552	64,0	Woodford y col. (2006)
	CCAGCGTCAGATTTTTTCAGG (R)		64,6	
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CAAAGAGAGTGCAACGGATG (F)	205	63,5	Woodford y col. (2006)
	ATTGGAAAGCGTTCATCACC (R)		63,8	
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	TCGCGTTAAGCGGATGATGC (F)	666	70,3	
<i>bla</i> _{CTX-M-25}	GCACGATGACATTCGGG (F)	327	64,1	Woodford y col. (2006)
<i>bla</i> _{CTX-M-8/25}	AACCCACGATGTGGGTAGC (R)	666 / 327	64,8	
<i>bla</i> _{SHV}	AGGATTGACTGCCTTTTTG (F)	392	59,3	Colom y col. (2003)
	ATTTGCTGATTCGCTCG (R)		61,6	
<i>bla</i> _{TEM}	ATCAGCAATAAACCAGC (F)	516	53,2	Mabilat y Courvalin. (1990)
	CCCCGAAGAACGTTTTTC (R)		60,7	
<i>bla</i> _{OXA}	ATATCTCTACTGTTGCATCTCC (F)	619	56,5	Colom y col. (2003)
	AAACCCTTCAAACCATCC (R)		58,8	

* F, forward; R, reverse

Tabla 3.7. Cepas utilizadas como controles en las PCR para detectar *bla*_{BLEEs}.

CONTROL	Cepa	Gen	Origen	Procedencia
C2	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14}		
C3	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	Desconocido	Universidad de La Rioja (Dra. Torres)
C4	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{SHV,TEM}		
C5	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{OXA,TEM}		
C6	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Clínico	Clínica Universidad de Navarra (Dr. Leiva)
C13	<i>Serratia fonticola</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	Alimentario	Dpto. Microbiología Universidad de Navarra

3.4.2.3. Detección de genes de otras β -lactamasas

Se realizó una reacción de amplificación de los genes implicados según la PCR múltiple descrita por Pérez-Pérez y Hanson (2002) con los siguientes cebadores: MOXM (520 pb), CITM (462 pb), DHAM (405 pb), ACCM (346 pb), EBCM (302 pb) y FOXM (190 pb), en un volumen total de 50 μ l. La amplificación se realizó siguiendo las condiciones recomendadas: desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C, seguidos de 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 64 °C y 1 minuto a 72 °C, y un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72 °C.

3.4.2.4. Electroforesis

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica se basa en la migración unidireccional del ADN a través de una matriz porosa cuando se aplica un campo eléctrico. La migración es proporcional al logaritmo del peso molecular, lo que permite discriminar las bandas según el tamaño de los fragmentos.

Se preparó un gel de agarosa al 2 % mezclando 1,4 mg de agarosa (Pronadisa, Alcobendas, Madrid, España) y 70 ml de *buffer* TBE 1X (Sigma Aldrich). Se utilizó un sistema de voltaje constante a 120 V (Bio-Rad, Hércules, CA, EEUU) y posteriormente, se tiñó el gel durante 10 minutos en una solución 0,50 μ g/ml de

bromuro de etidio (Bio-Rad) y fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta (Universal Hood II, BioRad).

3.4.3. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Una vez visualizadas las bandas de los amplicones se realizaron PCR simples para cada gen detectado, manteniendo las mismas condiciones de amplificación descritas en el apartado anterior y el volumen final de 25 μ l.

Los productos de amplificación se secuenciaron en el servicio EZ-Seq de Macrogen Europe (Ámsterdam, Países Bajos). Las secuencias nucleotídicas obtenidas se compararon con la base de datos *GenBank* y la web de clasificación de β -lactamasas desarrollada por Jacoby y Bush (<http://www.lahey.org/Studies/>), utilizando la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool*® (BLAST® 2.0.) del *National Center for Biotechnology Information Site* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

3.5. ESTUDIO FILOGENÉTICO DE CEPAS DE *Escherichia coli*

Para realizar el estudio filogenético se seleccionaron un total de 453 cepas de *E. coli* aisladas en el presente estudio y caracterizadas como portadoras de genes BLEE por PCR y secuenciación.

La determinación de grupos filogenéticos se realizó mediante la PCR múltiple (*triplex*) propuesta por Clermont y colaboradores (2000 y 2013). Esta reacción se basa en la amplificación de dos genes (*chuA* y *yjaA*) y un fragmento de ADN (TspE4.C2) que permite clasificar cada cepa en un grupo filogenético (A, B1, B2 y D), según el árbol de decisión dicotómica propuesto por Clermont y col. (2000) (Figura 3.10).

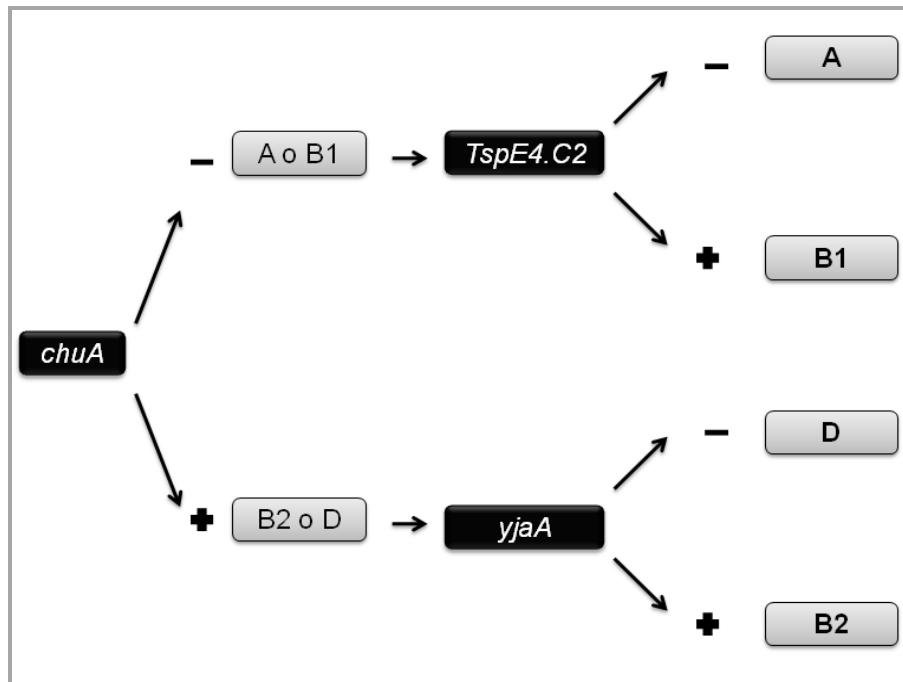


Figura 3.10. Árbol de decisión dicotómico para la clasificación de *E. coli* en grupos filogenéticos (Adaptación de Clermont y col., 2000).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l empleando la siguiente mezcla: 3 μ l de ADN, 2,5 μ l de buffer 10X (Bioline), 2,5 μ l de dNTPs (Bioline), 1 μ l de $MgCl_2$ 50 mM (Bioline), 2 μ l de los cebadores *chuA*-F, *chuA*-R, *yjaA*-F, *yjaA*-R y 3 μ l de los cebadores TspE4.C2-F y TspE4.C2-R (Sigma Aldrich), 1,5 U de *Inmolase*TM *DNA polymerase* 5 U/ μ l (Bioline) y agua ultrapura hasta completar el volumen final.

La reacción de amplificación se lleva a cabo en un volumen final de 25 μ l y en las siguientes condiciones: 4 minutos a 94 $^{\circ}$ C, seguido de 30 ciclos de 5 segundos a 94 $^{\circ}$ C y 20 segundos a 59 $^{\circ}$ C, con un ciclo final de 5 minutos a 72 $^{\circ}$ C. Las secuencias de los nucleótidos de los cebadores se detallan en la Tabla 3.8. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % en *buffer* TBE 1X durante 45 minutos a un voltaje constante de 120 V. Las bandas de amplificación se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Los tamaños de los amplicones se calcularon mediante comparación con el marcador de peso molecular *Marker IX* (Roche, Mannheim, Alemania).

Tabla 3.8. Secuencias de nucleótidos de los cebadores empleados en la PCR triple.

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')*	Tamaño amplicón (pb)
<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT (F)	279
	TGCCGCCAGTACCAAAGACA (R)	
<i>yjaA</i>	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG (F)	211
	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC (R)	
<i>tspE4C2</i>	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA (F)	152
	CGCGCCAACAAAGTATTACG (R)	

* F, forward; R, reverse

3.6. ESTUDIO MEDIANTE *MULTILOCUS SEQUENCE TYPING* (MLST)

Las cepas de *E. coli* que fueron clasificadas en los grupos filogenéticos de Clermont también fueron caracterizadas mediante el esquema de MLST desarrollado por Wirth y colaboradores (2006) para asignarlos a su correspondiente secuencia tipo (ST) y complejo clonal (CC). Para ello, se llevaron a cabo PCR utilizando siete genes conservados de *E. coli* seleccionados de la base de datos de MLST de la Universidad de Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). Estos genes codifican para las siguientes proteínas: *adk*, adenilato ciclasa; *fumC*, fumarato hidratasa; *gyrB*, ADN girasa; *icd*, isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa; *mdh*, malato deshidrogenasa; *purA*, adenilosuccinato; *recA*, motivo unión a ATP/GTP.

3.6.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Se inoculó una colonia de cada cepa en 5 ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI, Scharlab) y se incubó a 37 °C durante 18-24 horas. A continuación se transfirieron 2 ml a un tubo eppendorf y se centrifugó durante 10 minutos a 5000 x g. Posteriormente se extrajo el ADN total empleando el kit *DNeasy® Blood & Tissue* (Qiagen, Barcelona, España). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizó un

protocolo modificado con un pre-tratamiento para bacterias Gram negativas (*Protocol: Pretreatment for Gram-Negative Bacteria*).

La calidad y concentración (ng/μl) del ADN extraído se comprobó mediante un espectrofotómetro de UV-visible NANO DROP 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Estados Unidos), y los extractos se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

3.6.2. ANALISIS MEDIANTE PCR Y SECUENCIACIÓN

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 μl con 3 μl de ADN, 5 μl de buffer 10X (Bioline), 5 μl de dNTPs (Bioline), 1,5 μl de MgCl₂ 50 mM (Bioline), 2 μl de cada cebador (Tabla 3.9) (Sigma-Aldrich), 1,5 U de *Inmolase*[™] DNA polymerase 5 U/μl (Bioline) y agua ultrapura hasta completar el volumen final.

Tabla 3.9. Secuencia de nucleótidos de los cebadores de PCR de los siete genes constitutivos para el tipado de *E. coli* por MLST (Tartof y col., 2005).

Gen	Secuencia del cebador (5'-3') *	T hibridación (°C)	Tamaño amplión (pb)
<i>Adk</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG (F)	54	583
	CCGTCAACTTTTCGCGTATTT (R)		
<i>FumC</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC (F)	54	806
	GTACGCAGCGAAAAAGATTC (R)		
<i>lcd</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA (F)	54	878
	GGACGCAGCAGGATCTGTT (R)		
<i>purA</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA (F)	54	816
	CATACGGTAAGCCACGCAGA (R)		
<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC (F)	60	880
	ATCAGGCCTTCACGCGCATC (R)		
<i>recA</i>	CGCATTGCTTTACCCTGACC (F)	60	734
	TCGTGAAATCTACGGACCGGA (R)		
<i>mdh</i>	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGTGCTGGCGG (F)	60	932
	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT (R)		

* F, forward; R, reverse

Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes: 3 minutos a 94 °C; seguido de 30 ciclos de 1 minuto 95 °C, 1 minuto a la temperatura de unión de cada cebador, 2 minutos a 72 °C, y un ciclo final de 5 minutos a 72 °C.

La secuenciación de los productos de la PCR se realizó en el servicio EZ-Seq de Macrogen Europe, tal y como se explicó en el apartado 3.4.3.

3.6.3. ANALISIS BIOINFORMÁTICO

Las secuencias obtenidas en formato *FASTA* se editaron con las herramientas informáticas que se describen en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Programas utilizados para el análisis de las secuencias génicas.

Nombre	Función	Enlace
Nucleic Acid Sequence Massager	Trasforma la secuencia eliminando espacios, números...	http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm
ClustalOmega	Alinea y compara secuencias	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
Base de datos MLST - Warwick	Compara nuestra secuencia con las de la base de datos	http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli

En primer lugar se analizó la secuencia obtenida para ver si estaba limpia y a continuación se pega la secuencia en formato *FASTA* en *Sequence Massager*, de forma que se eliminan espacios y números (Figura 3.11).

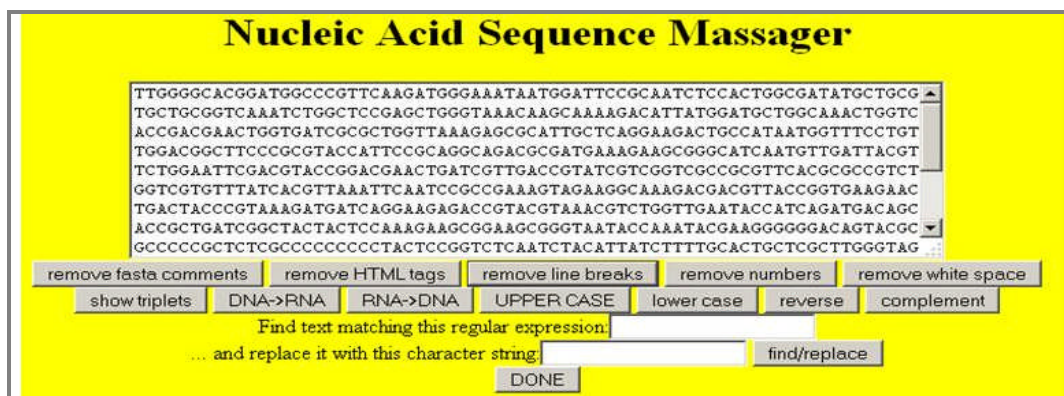


Figura 3.11. Análisis de secuencias utilizando *Sequence Massager*.

En segundo lugar se compara nuestra secuencia con la secuencia del gen de referencia utilizando *ClustalOmega*. Así identificamos los nucleótidos correspondientes al principio y al final del gen de interés (Figura 3.12).

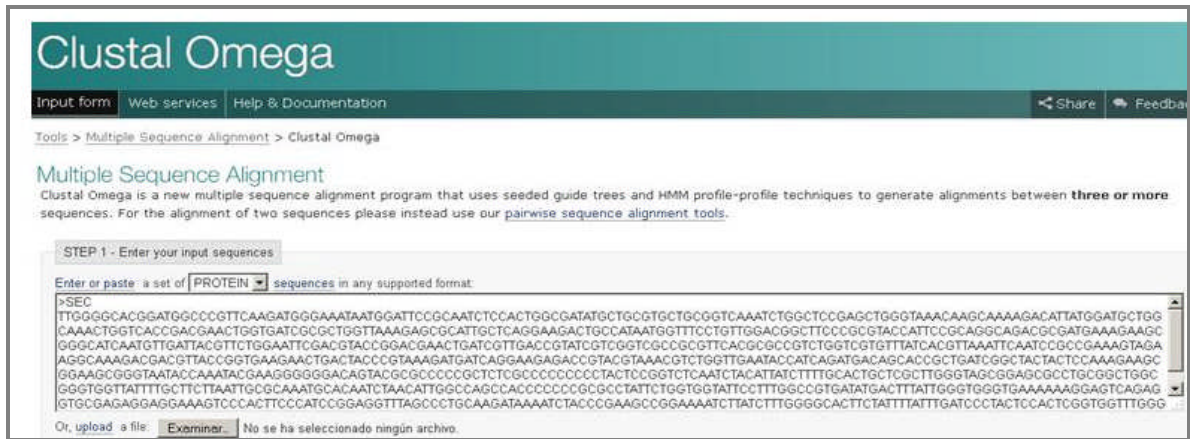


Figura 3.12. Análisis de secuencias utilizando *ClustalOmega*.

De este modo delimitamos en nuestra secuencia el alelo expresado por la cepa analizada. Por último introducimos la secuencia obtenida en la herramienta MLST Warwick y seleccionamos el gen correspondiente. En el ejemplo de la Figura 3.13 hemos seleccionado el gen *adk* y vemos que el alelo correspondiente es el 10.

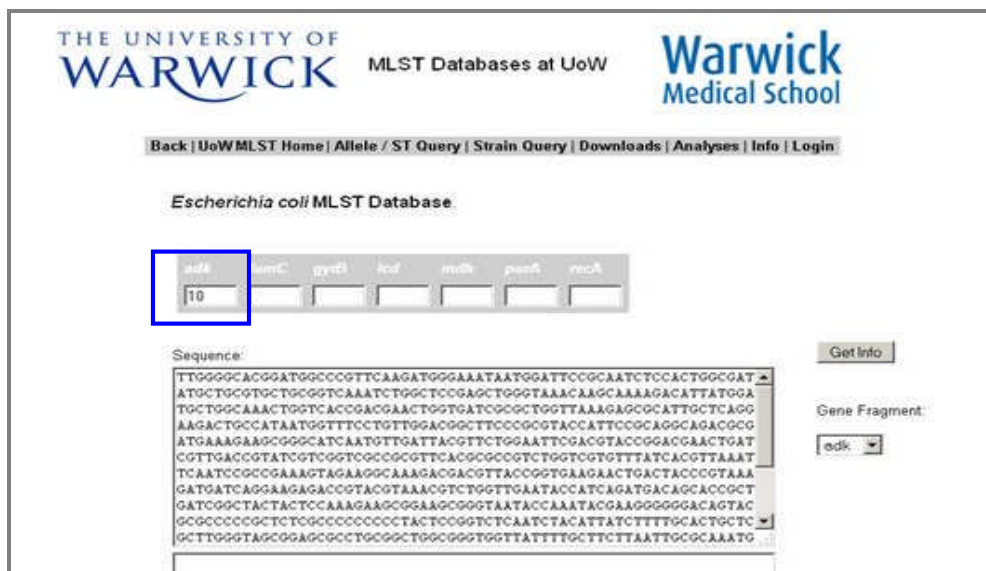


Figura 3.13. Análisis de la secuencia del gen *adk* con la herramienta MLST de la Universidad de Warwick.

Al repetir este proceso obtenemos los alelos correspondientes a los siete genes estudiados. La base de datos de MLST asigna los alelos, secuencias tipo (STs) y complejos clonales (CCs), correspondientes. En siguiente ejemplo podemos ver que la cepa analizada pertenece al ST167 del complejo clonal CC10 (Figura 3.14).

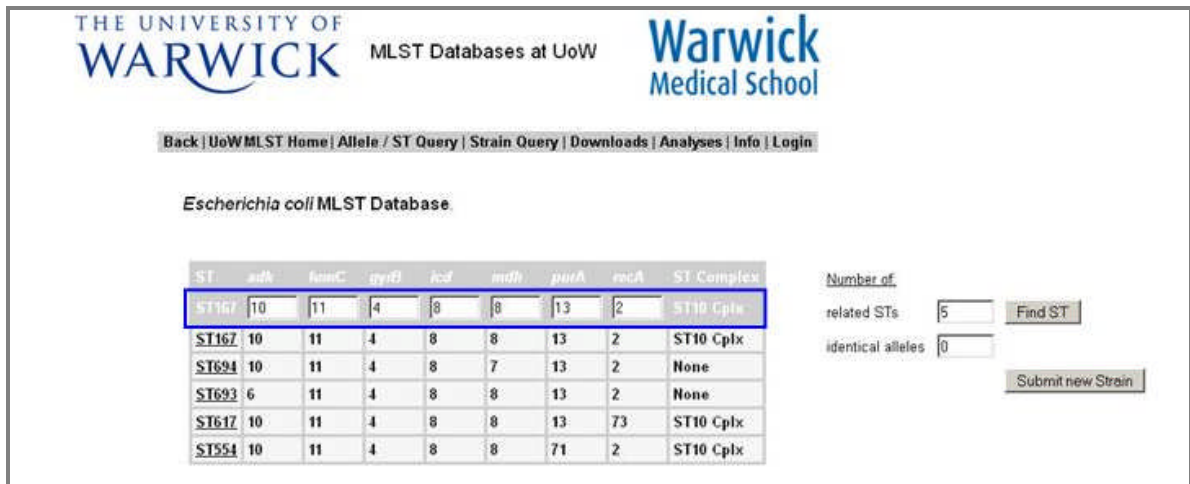


Figura 3.14. Análisis de las secuencias de los siete genes con la herramienta MLST de la Universidad de Warwick.

Por último, una vez analizadas todas las cepas de *E. coli* mediante estas herramientas se introdujeron los datos de cada alelo, los STs y los CC en el programa *BioNumerics* versión 7.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). De este modo se crearon árboles filogenéticos o MST (*Minimum Spanning Tree*) que se basan en el número de alelos comunes de cada cepa. Este algoritmo matemático permite reconstruir a partir de los datos del MLST las relaciones filogenéticas existentes entre las distintas cepas aisladas y los diferentes grupos clonales.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos en este estudio se realizó con el paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) (SPSS Inc., Chicago, Illinois) versión 15.0 para Windows.

El nivel de significación o error α establecido ha sido 0,05.

La comprobación del supuesto de normalidad se realizó empleando coeficientes de asimetría y curtosis con sus correspondientes errores típicos.

Las comparaciones de las proporciones se realizaron mediante test de contingencia R x C siempre que la mínima frecuencia esperada fuera superior a 5; si era inferior a 5 se realizó la prueba exacta de Fisher.

Para el estudio de la evolución de las resistencias en el periodo de estudio, se recogió el parámetro de residuos tipificados y se consideró como significativo cuando su valor z era superior a 1,96.

CAPÍTULO 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE ENTEROBACTERIAS BLEE AISLADAS EN ALIMENTOS

Parte de los resultados de este capítulo han sido publicados en *Meat Science* 93(2): 316-321. Ojer-Usoz y col., 2013. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain (ANEXO I)

4.1. INTRODUCCIÓN

Para determinar la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEEs (E-BLEEs) en diferentes grupos de alimentos se han seleccionado muestras de diversos productos presentes en el mercado navarro. Por un lado, se han analizado carnes y pescados frescos, que van a ser consumidos después de un tratamiento térmico; por otro, vegetales frescos, que se consumen en su gran mayoría crudos después de un lavado sencillo; y finalmente, alimentos envasados listos para consumo (cárnicos cocidos y quesos, así como lechugas de IV gama).

Tras la ingesta de alimentos portadores de estas bacterias resistentes, se podría facilitar la diseminación de genes BLEEs a la microbiota intestinal y a patógenos oportunistas. El resultado de una colonización de estas bacterias resistentes sería una infección de complicado tratamiento (Livermore y Woodford, 2006).

4.2. PREVALENCIA DE CEPAS DE ENTEROBACTERIAS RESISTENTES A CEFPODOXIMA

Se han analizado un total de 794 muestras de alimentos de diversos orígenes: vegetales (n=306), quesos (n=34), pescados (n=110), carnes frescas (pollo n=101; cerdo n=104; ternera n=105) y cárnicos cocidos loncheados (n=34). Los resultados obtenidos muestran la amplia diseminación de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación en alimentos, en concreto a cefpodoxima (CPD^R) con una prevalencia media del 25,2 % (Tabla 5.4). Sin embargo, la presencia de estas enterobacterias CDP^R varía en función del grupo de alimentos analizado, oscilando entre el 0,9 % en pescados y el 85,2 % en carnes frescas de pollo.

Los productos cárnicos frescos han sido los principales vehículos de estas resistencias, con una prevalencia superior al 40 % en todos los grupos y muy especialmente la carne de pollo, que se perfila como el alimento que presenta un riesgo más elevado de transmisión de estas cepas. Sin embargo, al igual que en los pescados frescos, estos productos son sometidos a un proceso de cocinado (tratamiento térmico) antes de su consumo, por lo tanto la concentración de microorganismos se reduciría y con ello su riesgo de transmisión.

En concordancia con nuestros datos, varios estudios presentan prevalencias elevadas en productos cárnicos. Casella y colaboradores (2015) han observado una prevalencia del 40 % de E-BLEEs en productos cárnicos de cerdo (n=4), ternera (n=3) y pollo (n=8), aislando 6 cepas de enterobacterias resistentes a cefalosporinas. Igualmente, Beninati y colaboradores (2015) estudiaron en Alemania la presencia de *E. coli* productoras de BLEEs en 38 muestras de pollo y pavo importadas desde Italia, detectando una prevalencia del 68,4 % en pollo y del 100 % en pavo.

Zarfel y colaboradores (2014) analizaron 50 muestras de carne de pollo en Austria, obteniendo una prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEEs del 42 %. Otro estudio realizado en Polonia analizó 141 muestras de productos cárnicos de cerdo (n=78), ternera (n=44) y pollo (n=19) detectando 18 cepas de *E. coli* productoras de BLEEs (Wasiński y col., 2014).

Por otro lado, teniendo en cuenta la baja prevalencia de enterobacterias CPD^R encontrada en quesos (0 %), cárnicos cocidos loncheados (2,7 %) y vegetales (4,6 %), estos alimentos podrían considerarse más seguros. Sin embargo, todos ellos son alimentos listos para su consumo sin tratamientos culinarios adicionales, por lo que no se reduciría la carga de microorganismos presentes y supondrían un mayor riesgo desde el punto de vista de transmisión estas cepas. Nuestras observaciones están en concordancia con otros estudios realizados en Europa, como el de Reuland y colaboradores (2014) en Países Bajos, en el que detectaron E-BLEEs en 7 cepas

aisladas en vegetales, observando una prevalencia del 6 %. Además, estos autores detectaron que 5 de las 7 cepas de E-BLEE procedían de cultivos orgánicos, lo que demuestra la presencia de estas resistencias también en este tipo de producción agraria. Asimismo, el estudio realizado por Mesa y colaboradores (2006) en España, obtuvo una prevalencia de 0,4 % E-BLEEs en las 738 muestras de alimentos listos para su consumo analizadas, procedentes de un servicio de catering. Las tres únicas cepas resistentes encontradas fueron aisladas en ensaladas de lechuga y tomate (n=2) y pollo cocinado (n=1).

Por el contrario, a diferencia de lo encontrado en nuestro estudio y en los trabajos referidos previamente, Zurfluh y colaboradores (2015) han observado una mayor prevalencia de E-BLEEs en vegetales (25,4 %) importados a Suiza desde Asia y Sudamérica. Además, en el 32,6 % de las muestras positivas se aisló más de una cepa de E-BLEEs distinta. Estos datos revelan diferencias entre Asia y Sudamérica con Europa, que puede deberse a la falta de control de las aguas de riego así como a una falta de medidas de higiene en la manipulación de alimentos. A pesar de ello, la EFSA considera importante la investigación de vegetales de consumo fresco y hoja grande por su posible riesgo de transmisión de peligros microbiológicos (EFSA, 2012).

Tabla 4.1. Resumen de las muestras de alimentos analizadas y las cepas CPD^R aisladas.

Categorías de alimentos	No. muestras analizadas	No. muestras + (%)	No. enterobacterias CPD^R	No. <i>E. coli</i> CPD^R
Carnes frescas pollo	101	86 (85,2)	107	92
Carnes frescas cerdo	104	46 (44,2)	56	42
Carnes frescas ternera	105	52 (41,1)	56	43
Vegetales	306	14 (4,6)	15	5
Pescados	110	1 (0,9)	1	0
Cárnicos cocidos	37	1 (2,7)	1	0
Quesos	34	0	0	0
Total	794	200 (25,2)	236	182

Por otro lado, se detectaron diferencias en cuanto a los **recuentos de enterobacterias** CDP^R en las muestras positivas (Tabla 4.2). Así, se observa que las carnes de pollo y ternera presentaron un mayor número de muestras con concentraciones de bacterias resistentes superiores a 10^3 UFC/g (6,5 % y 5,8 %, respectivamente). En cualquier caso, la mayoría de las muestras mostraron recuentos inferiores a 10 UFC/g (72,5 % carnes, 73,4 % vegetales, 100 % pescados y 100 % cárnicos cocidos), lo cual es especialmente relevante en el caso de los cárnicos cocidos, al no realizar un tratamiento térmico posterior que pudiera reducir la carga de bacterias resistentes. Por otro lado, no se han observado diferencias significativas entre los distintos tipos de carne ($p=0,021$).

Estos datos contrastan con los obtenidos por otros autores, si bien hay que precisar que en este estudio nos hemos centrado en la familia *Enterobacteriaceae* y en un mecanismo de resistencias muy concreto como son las BLEEs y otros autores solo se centran en la resistencia a otros antibióticos β -lactámicos. Por ejemplo, Amador y colaboradores (2009) obtuvieron recuentos de enterobacterias resistentes a ampicilina de hasta 10^7 UFC/g, en quesos elaborados a partir de leche pasteurizada, mientras que en nuestro estudio no hemos aislado bacterias resistentes a cefpodoxima en ninguna muestra de quesos. Este mismo grupo, en otro estudio realizado en productos cárnicos, detectó recuentos de enterobacterias resistentes a ampicilina en torno a 10^5 UFC/g en muestras de jamón cocido de pavo y cerdo y 10^3 UFC/g en salchichas de pavo (Amador y col., 2011).

Tabla 4.2. Concentración de enterobacterias CPD^R en las muestras positivas de los distintos tipos de alimentos analizados (porcentajes por rangos de recuento).

Categorías de alimentos	No. muestras +	% muestras con recuentos (UFC/g)			
		<10	10-10 ²	10 ² -10 ³	>10 ³
Vegetales frescos	9	66,7	22,2	11,1	0
Vegetales IV gama	5	80	20	0	0
Pescados	1	100	0	0	0
Carnes frescas pollo	86	68,4	14,6	10,5	6,5
Carnes frescas cerdo	46	76,1	10,7	8,7	4,5
Carnes frescas ternera	52	73,1	9,6	11,5	5,8
Cárnicos cocidos	1	100	0	0	0
TOTAL (%)	200	147 (73,5)	23 (11,5)	20 (10,0)	10 (5,0)

Respecto a la **identificación** de las 236 cepas de enterobacterias CPD^R aisladas, se observó una enorme diversidad de especies portadoras de resistencias. En total se han detectado 16 especies distintas (Figura 4.1) siendo predominante *E. coli* (77,1 %), seguida de *Serratia fonticola* (6,8 %) y *E. cloacae* (4,2 %).

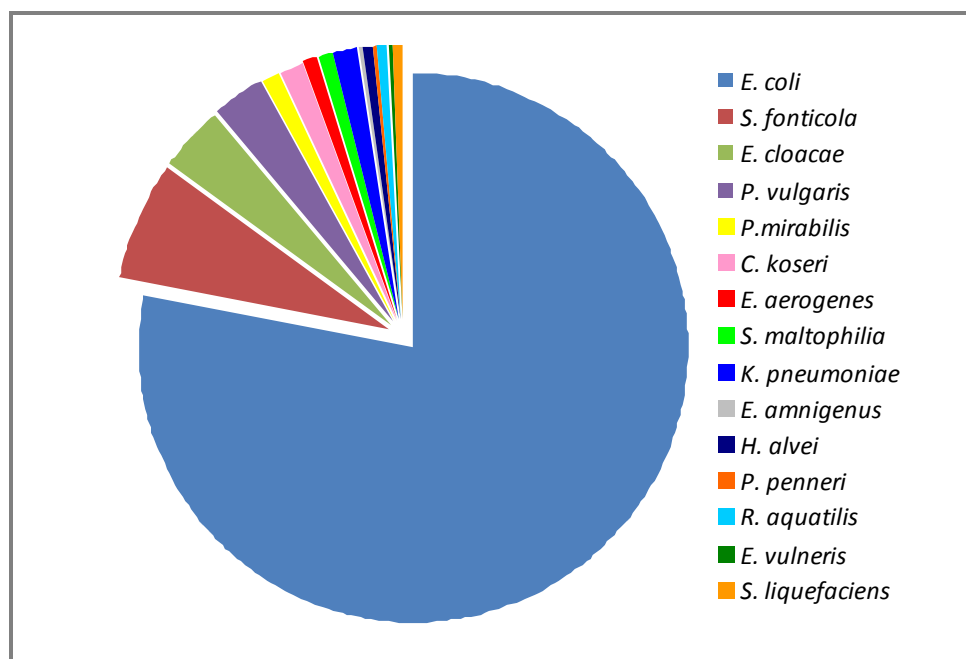


Figura 4.1. Distribución de las distintas especies de enterobacterias CPD^R aisladas en alimentos.

Estos resultados están en concordancia con el estudio realizado por Amador y col. (2011) en productos cárnicos, que muestran la presencia de 11 especies distintas de enterobacterias (*E. coli*, *Cedecea davisae*, *M. morganii*, *E. cloacae*, *Escherichia vulneris*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae ssp. ozaenae*, *Enterobacter amnigenus*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae ssp. pneumoniae*, *S. liquefaciens*) con una clara prevalencia de *E. coli*. Como se puede observar en la Figura 4.1, varias de las especies que aislaron Amador y colaboradores coinciden con las identificadas en nuestro estudio. Sin embargo, Casella y colaboradores (2015) solo detectaron en productos cárnicos cuatro especies de enterobacterias, aunque en concordancia con nuestro estudio *E. coli* era predominante (50 %) sobre *P. mirabilis* (n=1), *Citrobacter diversus* (n= 1) y *K. pneumoniae* (n=1).

Por otro lado, Zurfluh y colaboradores (2015) detectaron 60 cepas de E-BLEEs pertenecientes a 5 especies distintas, en muestras de vegetales importados desde Asia y Sudamérica, y observaron una mayor prevalencia de *E. coli* (43.3 %) y *K. pneumoniae* (43,3 %) sobre *E. cloacae* (10 %), *E. aerogenes* (1,7 %) y *C. sakazakii* (1,7 %). Aunque la variabilidad observada fue menor se detectan las mismas especies que en nuestro estudio (excepto *C. sakazakii*). Asimismo, Mesa y colaboradores (2006) detectaron en ensaladas y pollo una mayor presencia de *E. coli* (66,7 %) que de *K. pneumoniae* (33,3 %), siendo las dos únicas especies aisladas.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Se estudió la producción de BLEEs de las 236 cepas de enterobacterias CDP^R aisladas en alimentos empleando distintos métodos fenotípicos. El 95,3 % de las cepas fueron confirmadas como productoras de BLEEs por al menos uno de ellos (Tabla 4.3). Mediante el test de disco combinado (CDT) se confirmaron 224 cepas de enterobacterias CDP^R (94,9 %) como productoras de BLEEs, mediante el test de doble

difusión en disco (DDST) el 94,5 % y mediante la técnica automatizada de MicroScan® (Siemens) el 82,6 %.

Tabla 4.3. Confirmación por diversos métodos fenotípicos de enterobacterias productoras de BLEEs aisladas en alimentos.

Especie	No. aislados	No. cepas BLEEs +*	No. BLEEs + según métodos fenotípicos		
			CDT	DDST	MicroScan®
<i>E. coli</i>	182	179	179	179	176
<i>S. fonticola</i>	16	15	14	15	0
<i>E. cloacae</i>	11	9	9	8	7
<i>P. vulgaris</i>	8	5	5	5	4
<i>P. mirabilis</i>	3	3	3	3	3
<i>K. pneumoniae</i>	3	3	3	3	2
<i>C. koseri</i>	3	3	3	3	1
<i>S. maltophilia</i>	2	1	1	1	1
<i>E. aerogenes</i>	2	2	2	2	1
<i>E. vulneris</i>	1	0	0	0	0
<i>H. alvei</i>	1	1	1	0	0
<i>P. penneri</i>	1	1	1	1	0
<i>R. aquatilis</i>	1	1	1	1	0
<i>S. liquefaciens</i>	1	1	1	1	0
<i>E. amnigenus</i>	1	1	1	1	0
TOTAL (%)	236	225 (95,3)	224 (94,9)	223 (94,5)	195 (82,6)

* Confirmados por al menos un método fenotípico

Atendiendo a los **métodos fenotípicos** empleados, el CDT fue que el confirmó el mayor número de cepas productoras de BLEEs seguido del DDST. Se comparó la resistencia de las cepas frente a los distintos antibióticos utilizados en el CDT para analizar cuál era más específico. En la Tabla 4.4 se muestran los porcentajes obtenidos para el total de muestras y por grupos de alimentos (cárnicos y vegetales). Para el conjunto de muestras CAZ es el antibiótico que mayor porcentaje de confirmación ofrece. Sin embargo, en cepas aisladas en cárnicos, CTX es más específico, mientras que en cepas aisladas en vegetales CAZ y FEP confirman mayor número de cepas. Estos datos contrastan con los obtenidos por Blaak y colaboradores

(2014b) en un estudio realizado en vegetales en los Países Bajos, en el que la mayoría de las cepas fueron confirmadas utilizando CTX como agente selectivo y solo el 1,4 % utilizando CAZ. Estas diferencias sugieren la existencia de diferentes perfiles de resistencia entre España y Países Bajos.

Tabla 4.4. Cepas aisladas en alimentos confirmadas (%) según las distintas combinaciones de antibióticos utilizadas en el CDT

Antibióticos CDT	Total cepas (%)	Cepas de cárnicos (%)	Cepas de vegetales (%)
CTX vs. CTX/CA	86,2	94,8	40
FEP vs. FEP/CA	84,5	92,2	60
CAZ vs. CAZ/CA	88,8	92,2	60

Para realizar la confirmación fenotípica de E-BLEEs, el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) recomienda la utilización del CDT con ceftazidima y/o cefotaxima y combinado con cefepime para una mayor sensibilidad y especificidad de la técnica (CLSI, 2012). En esta línea, nuestra recomendación sería la combinación de las técnicas de sinergia del doble disco y test de discos combinados, empleando como antibióticos CAZ o CTX en solitario y combinado con ácido clavulánico. Esta combinación tiene una ejecución e interpretación sencilla y proporciona unos porcentajes de confirmación de BLEEs elevados.

Por otro lado, la utilización del método automatizado MicroScan® (Siemens) permite completar la información de cada cepa al proporcionar datos de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de cada antibiótico. Según el fabricante, este método está validado para cepas de *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *E. coli*, lo que explicaría el fallo de sensibilidad en la detección de BLEEs en el caso de *Serratia fonticola*. Un estudio de Jorgensen y colaboradores (2010) evaluó la eficacia de este método automatizado para detectar cepas productoras de BLEEs seleccionadas por métodos de difusión en disco. Observaron una alta confirmación de estas cepas (98 %), aunque constataron algunos fallos de sensibilidad con cepas de

K. pneumoniae productoras de CTX-M-15 y SHV-12. Sin embargo en nuestro estudio el MicroScan® ha detectado la presencia de BLEEs en todas las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas (incluidas productoras de CTX-M-15 y SHV-12) excepto una cepa productoras de TEM-42.

Los aislados se clasificaron en las categorías sensible (S) y resistente (R) (incluyendo resistencia intermedia y resistencia total), teniendo en cuenta los criterios establecidos por el CLSI (2012). Como puede observarse en la Figura 4.2, todas las cepas han mostrado una resistencia superior al 98 % frente a las tres penicilinas estudiadas (AMP, PIP, MZ) y superior el 97 % frente a cefalosporinas de primera (CZ), segunda (CXM) y tercera generación (CPD, CTX, CAZ). El estudio de las CMIs confirmó el descenso en los valores para CTX vs. CTX/CA típico de las cepas productoras de BLEEs. Beninati y colaboradores (2015) observaron en cepas aisladas en productos cárnicos unos altos valores de resistencia frente a AMP (100 %) y CTX (94 %), pero la resistencia frente a CAZ se detectó solo en el 30 % de las cepas de *E. coli* productoras de BLEEs. También se ha observado una tasa de resistencia elevada frente a FEP (94,2 %) y sin embargo solo el 9,7 % de las cepas aisladas mostraron resistencia frente a FOX. Por el contrario, el estudio de Wasiński y colaboradores (2014) realizado en cepas productoras de BLEEs aisladas en productos cárnicos en Polonia, detectó una baja resistencia frente a FEP (11,1 %).

Respecto a las combinaciones con inhibidores de β -lactamasas se han encontrado diferencias significativas en las tasas de resistencia ($p=0,016$), siendo la combinación con sulbactam la que presenta los mayores niveles de resistencia (79,1 %) frente a los valores obtenidos para las combinaciones de AMC y TZP (18 % y 1,9 %, respectivamente). Además, en el caso del TZP se observa una disminución de la CMI respecto a la piperacilina en solitario, lo que indica que sería una buena opción terapéutica para el tratamiento de infecciones por estos microorganismos.

Cabe señalar que no se ha aislado ninguna bacteria resistente a carbapenems, aunque cinco cepas muestran valores cercanos al punto de corte. Estos resultados coinciden con los obtenidos en un estudio realizado en Suecia en productos cárnicos, que también demostró una elevada susceptibilidad a carbapenems en cepas productoras de BLEEs aisladas en estos alimentos (Egervärn y col., 2014). Además, estos mismos autores describieron una elevada resistencia de las cepas frente a aminoglucósidos, que está en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio, en el que hemos observado una elevada resistencia frente a AK (99,5 %). Sin embargo, las tasas de resistencia frente a otros aminoglucósidos como GM (10,7 %) y TO (7,8 %) son mucho menores.

Respecto a las quinolonas, los porcentajes de resistencia son iguales o superiores al 50 % (LV 50 %; CIP 56,8 %; MXF 67 %) y muestran que nuestros datos están en concordancia con estudios realizados a nivel europeo (Ferech y col., 2006; Egervärn y col., 2014), que además señalan a estos antibióticos como los más utilizados. Por el contrario, un estudio realizado en Portugal (Amador, 2009) detectó una baja tasa de resistencia frente a CIP (2,3 %).

Aunque la resistencia frente a TIG fue mínima (0,5 %), se ha apreciado una resistencia elevada frente a TET (83 %), similar al 85 % detectado por Beninati y col (2015) en cepas aisladas en carnes, pero superior a la observada por Amador y colaboradores (2009 y 2011) en productos cárnicos y quesos, en los que encontraron porcentajes de resistencia del 42,3 % y del 46,5 % respectivamente. Sin embargo, la tasa de resistencia frente a SXT es inferior (40,8 %). Este antibiótico, utilizado para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, se considera una buena alternativa para el tratamiento de infecciones por *E. coli* transmitidas vía cadena alimentaria (WHO, 2007). Por último, la resistencia frente a otros antibióticos como CHL (23,7 %), COL (21,8 %), FOT (2,9 %) y FM (14,6 %) fue mucho menor a la observada frente a otras familias de antimicrobianos. Por lo tanto, los carbapenems junto con TZP, TO, FOT y

GM y TIG serían los antibióticos más efectivos para el tratamiento de infecciones debidas a estos microorganismos. Asimismo, en concordancia con nuestras observaciones, Amador y colaboradores (2011) señalaron que GM, CIP y los carbapenems serían los antibióticos más eficientes por presentar tasas de susceptibilidad del 98,3 %, 97,7 % y 95,3 % respectivamente.

Varios estudios explican la elevada resistencia que se observa en cepas aisladas en alimentos frente a penicilinas, tetraciclinas, amoxicilina/clavulánico, colistina y trimetoprim por el uso intensivo de estos antibióticos en ganadería en general y más concretamente en el ganado porcino (Amador y col., 2011; Silbergeld y col., 2008; Egervärn y col., 2014). Sin embargo, aunque en nuestro estudio hemos observado una alta tasa de resistencia frente a penicilinas y tetraciclinas, cabe destacar la tasa de resistencia frente a COL (21,8 %) siendo lo esperable una tasa similar a los carbapenems, por lo que habría que realizar un estudio de estos resultados. Analizando las resistencias frente a TET en el grupo de productos cárnicos, no se han observado diferencias significativas ($p=0,017$) según el origen (87,5 % en cerdo, 90 % en ternera y 96,4 % en pollo), lo que se explicaría por el extendido uso de este antibiótico en las producciones ganaderas (Emborg y col., 2007; Nawaz y col., 2008). Esta elevada tasa de resistencia a las tetraciclinas es resultado del uso habitual de esta familia de antibióticos en la ganadería europea, ya que según los datos del Consejo Avícola Británico (www.ruma.org.uk) ha sido el antibiótico más utilizado entre los años 2005 y 2009. El uso de cefalosporinas de tercera y cuarta generación se ha reducido en la producción ganadera, así como el uso de fluoroquinolonas como medida profiláctica en pollitos de un día y de enrofloxacino en cerdos. Sin embargo, sí hemos encontrado diferencias significativas ($p=0,043$) en las tasas de resistencia a CIP entre los diferentes productos cárnicos, siendo del 49,1 % en carnes de cerdo, 64,3 % en ternera y del 80,4 % en carnes de pollo, lo que podría deberse al uso extendido de quinolonas en el ganado avícola.

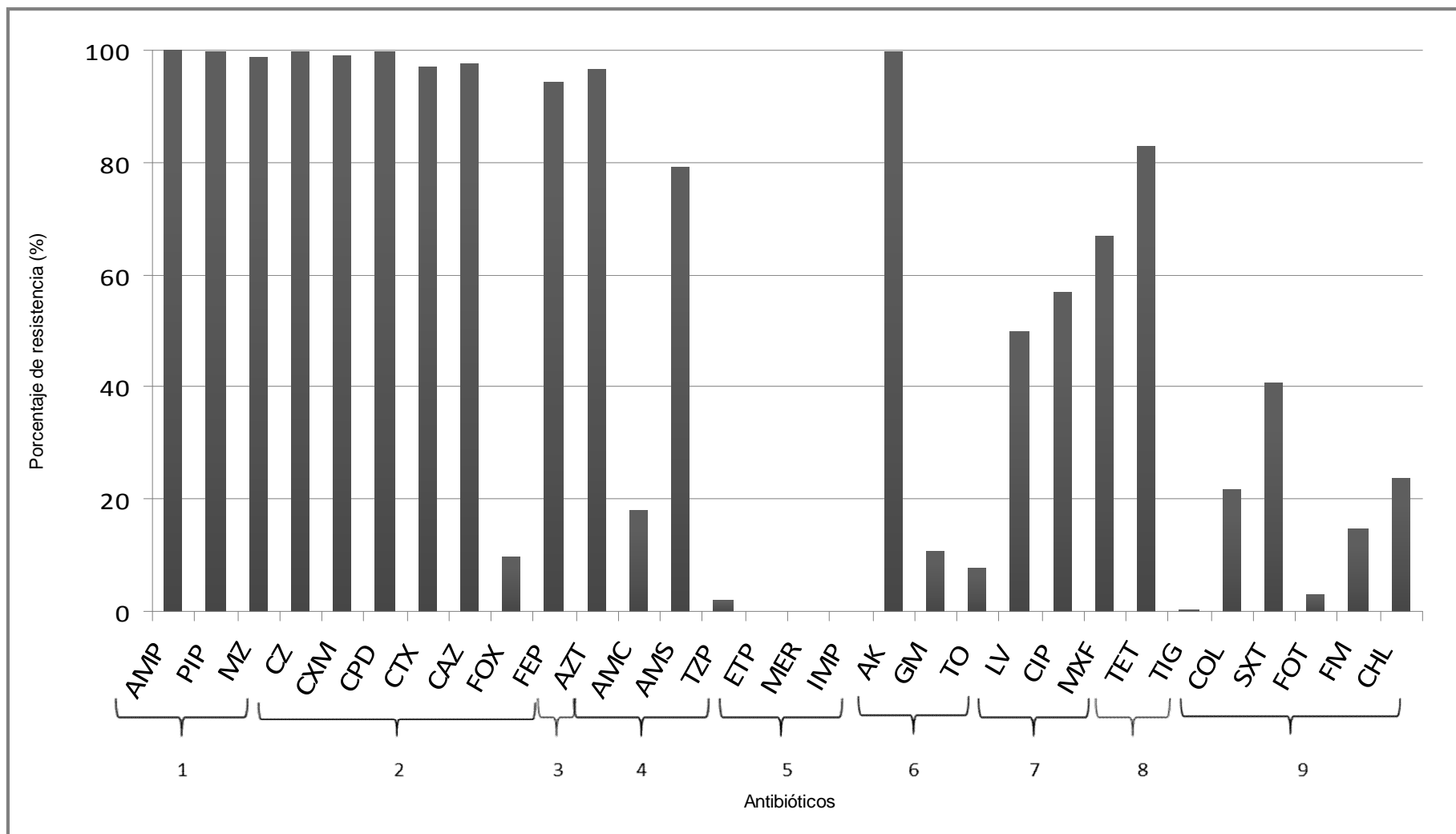


Figura 4.2. Porcentajes de resistencia a los antibióticos estudiados en cepas aisladas en alimentos. 1: penicilinas; 2: cefalosporinas; 3: monobactams; 4: Inhibidores de β -lactamasas; 5: carbapenems; 6: aminoglucósidos; 7: quinolonas; 8: tetraciclinas; 9: otros.

Posteriormente, se estudió la presencia de multirresistencias en las cepas productoras de BLEEs, definida por Amador y colaboradores como resistencia a tres o más clases de antibióticos (2011). Se observó que el 84,8 % de las cepas presentaban un fenotipo de multirresistencia, y que el más prevalente era una resistencia combinada frente a β -lactámicos + penicilinas + TET + CIP (observado en el 52,8 % de las cepas E-BLEEs), seguido de un patrón de resistencia frente a β -lactámicos + penicilinas + TET + CIP + SXT (42,6 %). Sin embargo, en el estudio realizado por Amador y colaboradores (2009) en cepas productoras de β -lactamasas aisladas en quesos, se detectó multirresistencia solo en el 31,4 % de las cepas. Además, encontraron tres fenotipos multirresistentes distintos a los detectados en nuestro estudio, que incluyen resistencia frente a cefoxitina y cloranfenicol con una prevalencia inferior al 5 %. En nuestro estudio solo dos cepas mostraron este mismo fenotipo de resistencia descrito por Amador y colaboradores.

En concordancia con nuestro estudio, Egervärn y colaboradores (2014) detectaron en los productos cárnicos importados a Suiza, una alta tasa de multirresistencia. El 81 % de las cepas aisladas en muestras de pollo mostraron perfil multirresistente, el 99 % de ternera y el 97,7 % de cerdo, tasas similares a las obtenidas en nuestro trabajo.

Considerando el elevado número de cepas con fenotipos de multirresistencia aisladas en alimentos, se podría afirmar que este hecho puede contribuir a la diseminación de cepas productoras de BLEEs que además de la resistencia a β -lactámicos llevan asociadas otras resistencias, lo que supone una dificultad añadida en el tratamiento de infecciones debidas a estos microorganismos. Asimismo, en relación con los distintos perfiles de susceptibilidad a antibióticos, se han encontrado 174 perfiles diferentes en las 225 cepas identificadas como productoras de BLEEs. Esta elevada diversidad de perfiles y de multirresistencias está en concordancia con

las observaciones realizadas por otros autores en el resto de Europa (Livermore y col., 2007; Fernandes y col., 2008).

Por último, 41 cepas han mostrado un fenotipo negativo para la producción de BLEEs según el MicroScan® lo que supone un 17,3 % de las cepas analizadas. De estas cepas solo tres corresponden a *E. coli* y una a *K. pneumoniae*, el resto pertenecen a otros géneros como *Enterobacter spp.* o *Serratia spp.* para los que esta técnica no está tan estandarizada. Más adelante analizaremos otros mecanismos de resistencia que pueden presentar estas cepas.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LAS RESISTENCIAS

La secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR mostró la presencia de genes implicados en las resistencias a β -lactámicos en el 69,8 % de las cepas confirmadas como E-BLEEs (150 cepas de *E. coli* y 7 cepas de otras especies). No se ha detectado producción de estos genes en el 30,2 % de las cepas restantes que corresponden a *E. coli* (n=29), *S. fonticola* (n=14), *P. vulgaris* (n=5), *E. cloacae* (n=8), *C. koseri* (n=3), *E. aerogenes* (n=2), *P. penneri* (n=1), *K. pneumoniae* (n=1), *H. alvei* (n=1), *R. aquatilis* (n=1), *S. liquefaciens* (n=1), *S. maltophilia* (n=1), *E. amnigenus* (n=1), *E. vulneris* (n=1) y *P. mirabilis* (n=1). Considerando que estas cepas tienen un fenotipo BLEE es probable que sean portadoras de genes bla_{BLEE} no incluidos en este estudio como los *minor* BLEE descritos por Naas y colaboradores (2008).

Atendiendo a las familias de β -lactamasas estudiadas, se han detectado genes pertenecientes a CTX-M (59,2 %), TEM (36,3 %) y SHV (21 %). En la Figura 4.3 se muestran todos los genes detectados, siendo los de mayor prevalencia $bla_{CTX-M-14}$ (33,5 %), seguido de bla_{SHV-12} (16,4 %), $bla_{CTX-M-1}$ (15,9 %) y bla_{TEM-42} (11,5 %). El resto de genes ($bla_{CTX-M-15}$, $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-8}$, bla_{SHV-5} , $bla_{SHV-133}$, bla_{TEM-52} y bla_{TEM-55}) tienen

una prevalencia muy baja (0,6 %), habiéndose detectado sólo una cepa portadora de cada uno de ellos. Además, es importante destacar que los genes *bla*_{TEM-1} no son BLEEs, por lo que se han incluido dentro del grupo de otros genes, excepto en aquellas cepas en las que se expresan simultáneamente junto a un gen *bla*_{BLEE}.

En Europa, Livermore y colaboradores (2007) han señalado que las enzimas más frecuentemente encontradas en alimentos han sido CTX-M-15 y CTX-M-14, lo cual discrepa en parte con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Así, aunque el gen *bla*_{CTX-M-14} ha sido detectado en el 33,5% de los aislados, *bla*_{CTX-M-15} solo se ha encontrado en una cepa de *E. coli*.

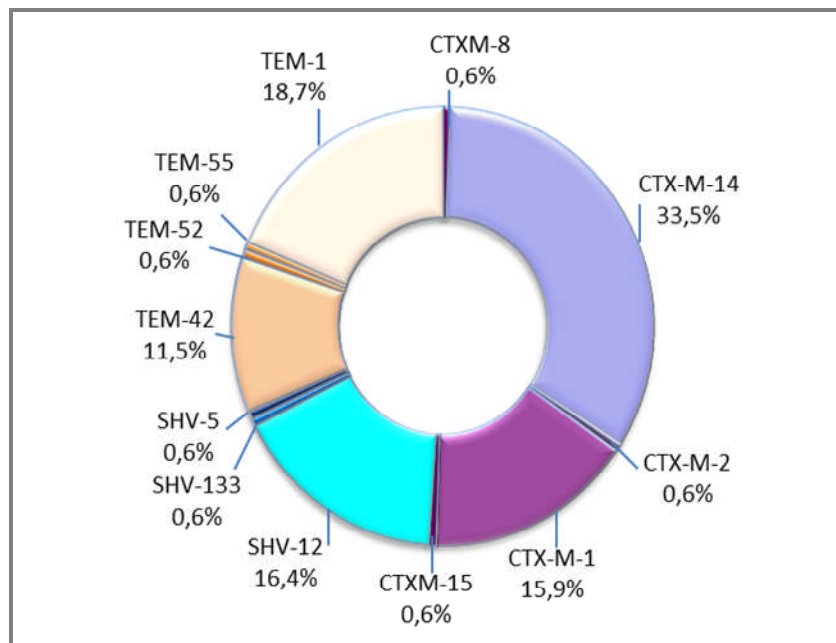


Figura 4.3. Genes de β -lactamasas detectados en las cepas aisladas en alimentos

El resumen de los genotipos encontrados en las cepas de *E. coli* y en el resto de especies se muestra en la Tabla 4.5. Entre las cepas de *E. coli* el gen predominante fue *bla*_{CTX-M-14} y se pudo encontrar en solitario o combinado con otros genes. De hecho, el 23 % de las cepas expresaron dos genes *bla*, siendo uno de ellos de la familia TEM.

Asimismo, el gen *bla*_{TEM-1} se localizó combinado con otros genes en el 55,9 % de las cepas que lo expresaban. Respecto a *bla*_{TEM-42} se detectó en 35 cepas de las cuales 20 de ellas lo tenían combinado con otros genes. Por el contrario, los genes *bla*_{TEM-52} y *bla*_{TEM-55} se hallaron en una única cepa cada uno y en solitario. Esta baja prevalencia de *bla*_{TEM-52} se debe a que el reservorio original de estos genes de resistencia se encuentra en *Salmonella spp.*, género que no ha sido detectado en nuestro estudio. La presencia de estos genes se explicaría por una transferencia horizontal desde cepas de *Salmonella spp.* a *E. coli* (Carattoli., 2008). Atendiendo a los genes de la familia SHV, *bla*_{SHV-12} fue el predominante (n=19) mientras que *bla*_{SHV-5} sólo se encontró en una cepa de *E. coli*. Asimismo, el estudio de Briñas y colaboradores (2002) sólo detectó esta familia de genes en el 3 % de las cepas.

Tabla 4.5. Genotipos *bla*_{BLEE} en las cepas productoras de BLEEs aisladas en alimentos.

Tipo genotipo	No. cepas (%)	Especies	
		<i>E. coli</i>	Otras
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	40 (25,5)	39	1
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-1}	9 (5,7)	9	0
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-42}	12 (7,6)	12	0
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-42}	1 (0,6)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-8} + <i>bla</i> _{TEM-1}	1 (0,6)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	1 (0,6)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	25 (15,9)	23	2
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-1}	2 (1,1)	2	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-42}	1 (0,6)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-145}	1 (0,6)	1	0
<i>bla</i> _{SHV-12}	19 (12,1)	19	0
<i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{TEM-1}	6 (3,8)	6	0
<i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{TEM-42}	6 (3,8)	6	0
<i>bla</i> _{SHV-5} + <i>bla</i> _{TEM-1}	1 (0,6)	1	0
<i>bla</i> _{SHV-133}	1 (0,6)	0	1
<i>bla</i> _{TEM-42}	15 (9,6)	12	3
<i>bla</i> _{TEM-52}	1 (0,6)	1	0
<i>bla</i> _{TEM-55}	1 (0,6)	1	0
Otros genes	14 (8,9)	14	0
TOTAL	157	150	7

Cabe destacar que entre los aislados cárnicos no se observan diferencias significativas en los genotipos de las cepas aisladas. Así en **carnes de pollo** se ha detectado una mayor prevalencia de *bla*_{CTX-M-14} (34,4 %), seguida de *bla*_{TEM-42} (22,9 %), *bla*_{SHV-12} (20,5 %) y *bla*_{CTX-M-1} (15,7 %). Destaca la variedad de genotipos observados, a que es la única carne en la que se ha detectado *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-133}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{TEM-145} y *bla*_{TEM-52} (1,2 %). Por el contrario, Belmar Campos y colaboradores (2014), destacaron una mayor prevalencia de cepas portadoras de *bla*_{CTX-M-1} (69 %) y *bla*_{SHV-12} (18 %) en carnes de pollo en Alemania, pero no aislaron ninguna cepa portadora de *bla*_{CTX-M-15} y solo el 6 % de ellas portaban el gen *bla*_{CTX-M-14}. Por otro lado, el trabajo de Zarfel y colaboradores (2014) realizado también en carnes de pollo en Austria, detectó cepas de *E. coli* que codificaban genes *bla*_{CTX-M-1} (46,1 %), *bla*_{SHV-12} (46,1 %) y *bla*_{SHV-2} (7,7 %) combinados en tres cepas con *bla*_{TEM-1}.

Casella y colaboradores (2015) pudieron observar que en cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* aisladas de carnes de pollo, estaban asociados fenotipos de multirresistencia con genes poco predominantes como *bla*_{CTX-M-2} (n=1) y *bla*_{CTX-M-8} (n=1). En nuestro trabajo las dos únicas cepas que expresaron estos genes pertenecen a *E. coli*. La primera de ellas fue aislada en una muestra de pollo y expresaba el gen *bla*_{CTX-M-8} presentando además un fenotipo de multirresistencia a β-lactámicos, penicilinas, quinolonas, AMS y TET. La segunda cepa aislada en una carne de cerdo, fue portadora del gen *bla*_{CTX-M-2} presentando un fenotipo de resistencia a β-lactámicos, penicilinas, quinolonas, AMS, TET y SXT.

Atendiendo a los genes detectados en **carnes de ternera** se observó menor variabilidad que en carnes de pollo, siendo también *bla*_{CTX-M-14} predominante (40 %). Asimismo se detectaron los genes *bla*_{TEM-42} (25 %), *bla*_{CTX-M-1} (17,5%), *bla*_{SHV-12} (12,5 %), *bla*_{TEM-55} (2,5 %) y *bla*_{CTX-M-8} (2,5 %). Sin embargo, Egervän y colaboradores (2014) detectaron una mayor prevalencia de *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{TEM-52} en carnes de ternera y ninguna cepa que expresara *bla*_{OXA}. Esta baja prevalencia de cepas

*bla*_{OXA} ha podido observarse igualmente en otro trabajo realizado en España en el que solo se detectó una cepa productora de esta enzima de las 20 aisladas en alimentos (Briñas y col., 2002) y está en consonancia con nuestro estudio, en el que no hemos detectado ninguna enzima perteneciente a esta familia.

Los resultados observados en **carnes de cerdo** fueron muy similares a los observados en carne de ternera, siendo *bla*_{CTX-M-14} (40 %) el gen predominante, y detectándose *bla*_{SHV-12} (22,5 %), *bla*_{CTX-M-1} (20%), *bla*_{TEM-42} (15 %) y *bla*_{CTX-M-2} (2,5 %). La alta prevalencia de cepas de *E. coli* portadoras del gen *bla*_{CTX-M-14} contrasta con los resultados obtenidos en un estudio realizado en Austria en 20 muestras de carne picada de cerdo y ternera (Petternel y col., 2014). El genotipo prevalente entre las 24 cepas de *E. coli* productoras de BLEEs aisladas fue *bla*_{CTX-M-1} (n=18), detectando en menor medida *bla*_{CTX-M-14} (n=2), *bla*_{CTX-M-32} (n=1), *bla*_{SHV-12} (n=1), y *bla*_{TEM-52} (n=2).

Igualmente, Egervärn y colaboradores (2011) detectaron en 119 muestras de carne de cerdo 7 cepas de *E. coli* portadoras de *bla*_{CTX-M-1} (71,4 %), *bla*_{CTX-M-14} (14,3 %) y *bla*_{TEM-52} (14,3 %).

Respecto a las cepas aisladas en **vegetales**, de las 4 cepas de *E. coli* aisladas en lechuga solo una era portadora del gen *bla*_{CTX-M-1}, dos cepas expresaron *bla*_{TEM-1} y en una de ellas no se detectó ninguno de los genes estudiados. Egea y colaboradores (2011) analizaron la presencia de enterobacterias productoras de BLEEs en 32 ensaladas, detectando solo una cepa de *E. coli* portadora del gen *bla*_{SHV-12}. Asimismo, otro trabajo realizado en Holanda encontró los genes *bla*_{CTX-M-15} (n=3), *bla*_{CTX-M-14} (n=2), *bla*_{CTX-M-1} (n=1) y *bla*_{SVH-12} (n=1) en cepas de *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* aisladas de vegetales frescos (Reuland y col., 2014).

Considerando los aislados pertenecientes a especies distintas a *E. coli*, tan sólo en 7 cepas aisladas en productos cárnicos se detectaron los genes estudiados (Tabla 4.6). Es probable que las cepas en las que no se han detectado genes *bla*

estén expresando otros tipos de genes más específicos de especie o mecanismos de resistencia asociados a otro tipo de β -lactamasas como veremos a continuación.

Tabla 4.6. Genotipos bla_{BLEE} en otras especies distintas a *E. coli* aisladas en alimentos.

Especies	Tipo genotipo	Origen	No. cepas (%)
<i>E. cloacae</i>	bla_{TEM-42}	Pollo	1 (12,5)
<i>K. pneumoniae</i>	$bla_{SHV-133}$	Pollo	1 (12,5)
	bla_{TEM-42}	Pollo	1 (12,5)
<i>P. mirabilis</i>	bla_{TEM-42}	Ternera	1 (12,5)
	$bla_{CTX-M-1}$	Cerdo, ternera	2 (25)
<i>S. fonticola</i>	$bla_{CTX-M-14}$	Pollo	1 (12,5)
TOTAL			7

4.5. CARACTERIZACIÓN DE OTRAS β -LACTAMASAS

Las cepas de enterobacterias que crecen en agar chromID ESBL son resistentes a cefpodoxima, pero esta resistencia puede estar mediada por mecanismos distintos a la producción de BLEEs como la hiperproducción de β -lactamasas de tipo AmpC o la alteración de proteínas de membrana. En el caso de *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia* la producción de AmpC es cromosómica y puede dar lugar a un perfil de resistencia de CPD, AMC, FOX y sensibilidad a FEP, sin existir una producción de BLEEs. En cambio en *E. coli* esta producción de AmpC está codificada a nivel plasmídico y es interesante detectarla ya que puede enmascarar la producción de BLEEs (Thomson, 2010).

Por lo tanto, para completar el estudio de caracterización de β -lactamasas, se ha incluido el análisis de **β -lactamasas de tipo AmpC** (Clase C de Ambler). Aquellas cepas que fueron definidas como BLEEs negativas por el MicroScan® o en las que se observaron diferencias en el test de disco combinado realizado sobre placas de MH normal y MH suplementado con cloxacilina (>5 mm de diferencia) fueron sospechosas de producir β -lactamasas de tipo AmpC. Para estudiar la presencia de estas enzimas se colocaron discos de cefoxitina y cefotetán y se midieron los halos de inhibición. En

total se han estudiado 12 cepas de origen alimentario sospechosas de ser productoras de otros tipos de β -lactamasas.

Los resultados mostraron que ninguna de las cepas es productora de β -lactamasas de tipo AmpC, ya que fueron resistentes (resistencia total o intermedia) frente a cefoxitina pero sensibles a cefotetán, lo que indica una alteración de la permeabilidad de membrana. Este resultado fue también confirmado mediante el kit de Rosco Diagnóstica (Dinamarca). Sin embargo, Wasiński y colaboradores (2014) sí detectaron 7 cepas de *E. coli* productoras de AmpC en un estudio de productos cárnicos de ternera, pollo y cerdo realizado en Polonia. La detección de cepas productoras de AmpC ha sido un objetivo secundario en nuestro estudio, por lo que es posible que el cribado inicial de cepas realizado en busca de aquellas productoras de BLEEs pueda haber eliminado posibles cepas productoras de otras β -lactamasas.

Atendiendo a las cepas que presentaron valores cercanos a los puntos de corte para carbapenems, se utilizó el kit de Rosco Diagnóstica (Dinamarca) para estudiar la presencia de **β -lactamasas de tipo KPC, MBL y OXA-48**. Los resultados sugieren que todas las cepas excepto una *S. maltophilia* aislada de lechuga combinaron la producción de BLEEs con alteraciones de las porinas de membrana, por tanto sería necesario realizar más estudios para confirmar este fenotipo. Este hecho está en concordancia con el perfil de susceptibilidad observado para estas cepas, ya que la combinación de estos mecanismos de resistencia puede dar lugar a una reducción de la susceptibilidad a carbapenems (Adler y col., 2013). Esta cepa de *S. maltophilia* productora de metalobetalactamasa, se trata de un microorganismo de baja patogenicidad que presenta resistencia intrínseca a múltiples antibióticos (Zhang y col., 2001).

CAPÍTULO 5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE ENTEROBACTERIAS BLEEs AISLADAS EN MUESTRAS AMBIENTALES

Parte de los resultados de este capítulo han sido publicados en: *Water Res.* 56: 37-47 Ojer-Usoz y col., 2014. High dissemination of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in effluents from wastewater treatment plants. (ANEXO II)

5.1. INTRODUCCIÓN

Para estudiar la presencia de E-BLEEs en el medio ambiente se han seleccionado dos tipos de entornos que pueden ser especialmente importantes en la función de reservorio y diseminación de las resistencias: medio ambiente acuático y entorno de producción animal. En relación al entorno acuático se han analizado, por un lado, **aguas efluentes de EDAR**, donde debido a los tratamientos de depuración se produce una acumulación de microorganismos con el consiguiente riesgo de intercambio génico; y por otro, **aguas de ríos** para determinar la posible diseminación de E-BLEEs a cultivos y explotaciones ganaderas a través del agua de riego. En los ambientes de producción animal se ha incluido el estudio de **suelos de granjas**, para determinar la diversidad de E-BLEEs procedentes de los animales de cría, así como de **piensos**, posible vía de entrada de resistencias a los animales a través de la alimentación.

5.2. PREVALENCIA DE CEPAS DE ENTEROBACTERIAS RESISTENTES A CEFPODOXIMA EN MUESTRAS AMBIENTALES

En total se han analizado 652 muestras provenientes de ambientes acuáticos y de producción animal, detectándose una amplia distribución de enterobacterias CPD^R. En la Tabla 5.1 se presentan los datos correspondientes a estos nichos. La mayor prevalencia de estas bacterias se ha observado en las estaciones depuradoras de aguas residuales (58,4 %), seguidas de suelos de granjas (51,6 %), piensos de animales (25 %) y muestras de ríos (20,2 %). El hecho de que el número de enterobacterias CPD^R aisladas sea superior al número de muestras positivas se debe al aislamiento de más de una cepa CPD^R en alguna de las muestras.

Tabla 5.1. Resumen de las muestras analizadas y las cepas CPD^R aisladas en el estudio de los distintos nichos ambientales.

Categorías de muestras	No. muestras analizadas	No. muestras + (%)	No. enterobacterias CPD^R	No. <i>E. coli</i> CPD^R
EDAR	279	163 (58,4)	185	135
Ríos	222	45 (20,2)	49	31
Suelos de granjas	91	47 (51,6)	50	46
Piensos	60	15 (25)	16	5
Total	652	270 (41,4)	300	217

5.2.1. AMBIENTES ACUÁTICOS

Respecto a la **prevalencia** de enterobacterias CDP^R, se han aislado estas bacterias en el 100 % de las plantas de tratamiento de aguas estudiadas y en el 64,3 % de los ríos analizados (9 de 14). Estos porcentajes son mayores que los publicados por Zurfluh y colaboradores (2013), en el que detectaron enterobacterias productoras de BLEEs en el 36,2 % de los ríos y lagos analizados en Suiza. Estas diferencias se podrían explicar, entre otras razones, por los tratamiento de cloración de las aguas efluentes (en Navarra no se realizan) y por las medidas de control para evitar el avance de resistencias tomadas en Suiza, que incluyen una estricta política de uso de antibióticos y que en España todavía no se ha establecido (Filippini y col., 2006).

Además, no se han observado diferencias significativas entre las muestras recogidas en los meses cálidos (Mayo - Septiembre) y los meses fríos del año (Octubre - Abril) ($p=0,023$ y $p=0,014$, respectivamente, para muestras de aguas EDAR y de aguas de ríos). Este dato indica que la temperatura del agua no influye en la supervivencia y proliferación de estas bacterias resistentes en ambientes acuáticos, sino que la diseminación es continua a lo largo del tiempo.

En la estación depuradora más importante de Navarra (mayor volumen de aguas residuales tratadas) el 100 % de las muestras analizadas han sido positivas,

mientras que este porcentaje varía entre un 34 % y un 90 % en el resto de estaciones. De forma global, en el 58,4 % de las muestras procedentes de EDAR (n=279) se han aislado cepas CDP^R.

Atendiendo a los **recuentos** en muestras en las que se han enterobacterias resistentes (muestras positivas) (Tabla 5.2), se observa que tanto en aguas EDAR como en aguas de ríos la mayoría de las muestras presentan concentraciones de enterobacterias totales superiores a 10³ UFC/ml, mientras que la concentración de enterobacterias CDP^R es inferior a 10 UFC/ml en el 95 % de las muestras. El recuento más elevado de CDP^R entre las aguas EDAR ha sido de 50 UFC/ml y corresponde a una cepa de *S. odorifera*, mientras que en una muestra de agua de ríos la mayor concentración de enterobacterias CDP^R observada fue de 25 UFC/ml (cepa de *E. coli*).

Tabla 5.2. Concentración de enterobacterias (totales y CDP^R) en muestras positivas procedentes de entornos acuáticos (porcentajes por rangos de recuento)

Tipo de muestra	Microorganismos	% muestras con recuentos (UFC/ml)			
		<10	10-10 ²	10 ² -10 ³	>10 ³
Aguas EDAR	Enterobacterias totales	3,9 %	21,3 %	35 %	38,8 %
	Enterobacterias CDP ^R	97,3 %	2,7 %	-	-
Aguas de ríos	Enterobacterias totales	2,9 %	14 %	37,1 %	45,7 %
	Enterobacterias CDP ^R	95,1 %	4,9 %	-	-

Al comparar los datos obtenidos en estos ambientes acuáticos, se ha observado que, en general, los recuentos de enterobacterias totales en ríos son más elevados que en EDAR. Es posible que en las EDAR se estén seleccionando durante el proceso de depuración determinados grupos bacterianos que no tienen por qué ser enterobacterias CDP^R. Una vez que las aguas llegan a los ríos algunas enterobacterias pueden sobrevivir mejor y su concentración aumenta. Además, se ha detectado que los recuentos más altos corresponden a tres ríos y que el punto de recogida de aguas se encuentra a menos de 5 km aguas abajo de una explotación

ganadera. Por tanto, estas concentraciones de enterobacterias en ríos se deban probablemente a una contaminación desde las granjas a los ambientes acuáticos.

Respecto a las **especies** de enterobacterias aisladas en estos ambientes acuáticos, se observa una clara prevalencia de *E. coli* en ambos nichos (EDAR: 73 %; ríos: 63,3 %) sobre el resto de especies de la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 5.1), siendo *E. cloacae* la segunda especie más frecuentemente aislada (EDAR: 9,7 %; ríos: 18,4 %). Asimismo se observa una mayor variabilidad de especies en aguas de EDAR (n=11) que la observada en ríos (n=8). Zurfluh y colaboradores (2013) encontraron una diversidad aún menor en aguas de ríos, aislando únicamente cinco especies (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Raoultella planticola*, *E. cloacae* y *E. amnigenus*).

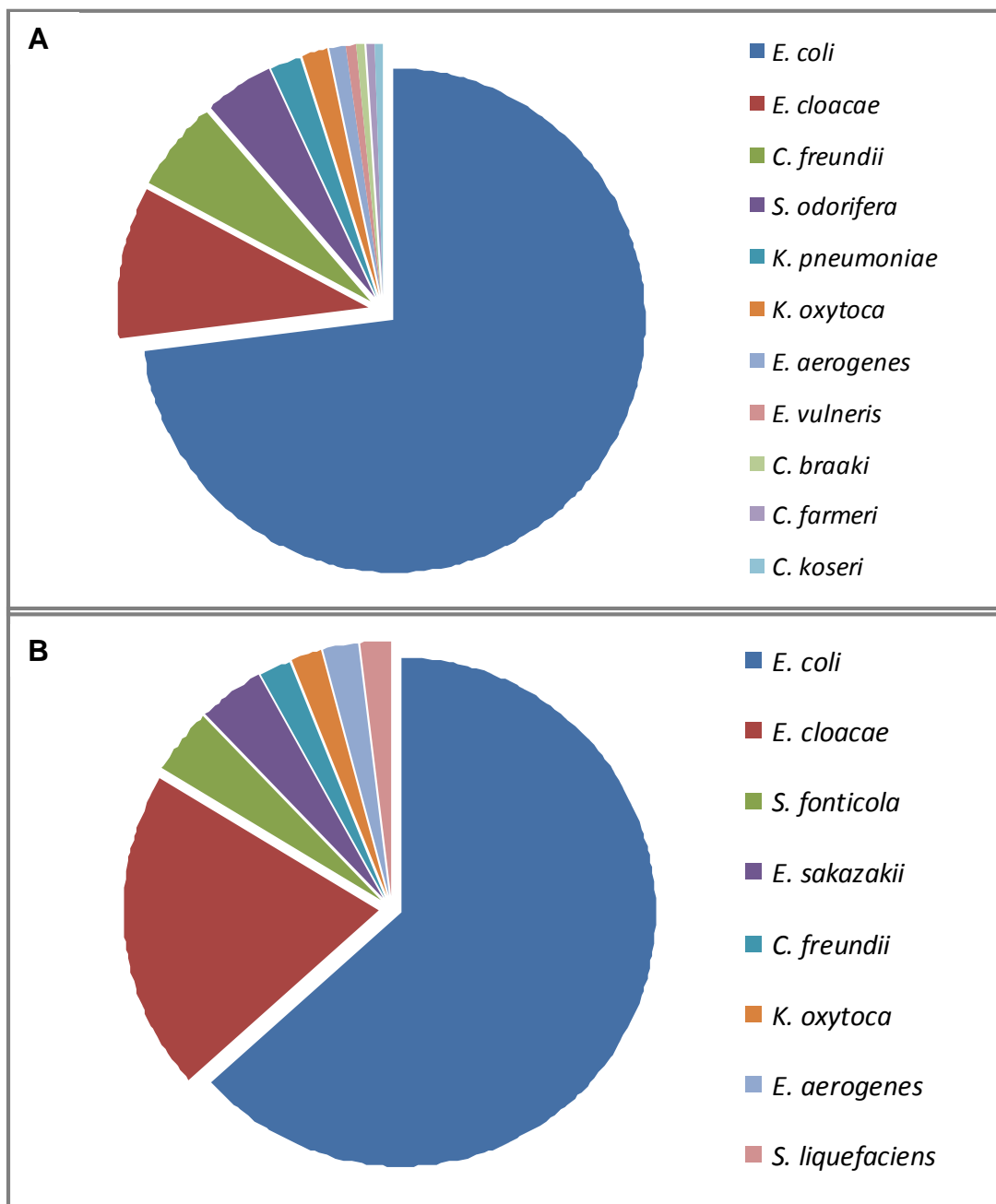


Figura 5.1. Distribución de las distintas especies de enterobacterias aisladas en aguas. A) EDAR; B) Ríos.

5.2.2. AMBIENTES DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Se han aislado enterobacterias CDP^R en el 100 % de las granjas y en el 71,4 % de las empresas de piensos muestreadas. Asimismo, en el 51,6 % de las muestras de suelos de granjas y en el 25 % de los piensos analizados se han detectado estas bacterias. Las muestras en las que se han aislado enterobacterias CDP^R corresponden a granjas de pollos, cerdos y caballos, y a piensos destinados a la alimentación de pollos y cerdos. Estas prevalencias son inferiores a las observadas en ambientes acuáticos y pueden deberse, entre otras razones, a la gran carga bacteriana presente en los suelos de granjas (procedente de las heces de los animales) que hace que predominen determinados grupos bacterianos en la competencia por los nutrientes.

Al igual que en ambientes acuáticos, tampoco en estos nichos se han observado diferencias significativas entre las muestras recogidas en los distintos meses del año, por lo que podemos afirmar que la población de enterobacterias CDP^R se mantiene constante a lo largo del tiempo.

Como era de esperar, los **recuentos** de enterobacterias totales en las muestras positivas de suelos de granjas son mucho más elevados que en los ambientes acuáticos, por la presencia de heces de animales en el entorno (Tabla 5.3). Así, la media de enterobacterias totales fue de $7,7 \times 10^5$ UFC/g, que contrasta con el valor medio obtenido en piensos (2×10^2 UFC/g). Por otro lado, considerando los recuentos de enterobacterias CDP^R vemos que son inferiores a 10 UFC/g en el 97,8 % de las muestras de suelos de granjas y en el 100 % de los piensos. Estos resultados serían un reflejo de la competición entre las distintas enterobacterias por el mismo nicho, en el que todavía prevalecen las bacterias no resistentes a los antibióticos estudiados. Sin embargo, destacan dos muestras de suelo de la misma producción ganadera de cerdos con recuentos de 2×10^3 UFC/g de *E. coli* CDP^R, concentración significativamente superior a la encontrada en otras granjas.

Tabla 5.3. Concentración de enterobacterias (totales y CDP^R) en muestras positivas procedentes del entorno de producción animal (porcentajes por rangos de recuento).

Tipo de muestras	Microorganismos	% muestras con recuentos (UFC/g)			
		<10	10-10 ²	10 ² -10 ³	>10 ³
Suelos granjas	Enterobacterias totales	-	15,6 %	5,6 %	78,9 %
	Enterobacterias CDP ^R	97,8 %	-	2,2 %	-
Piensos	Enterobacterias totales	26,7 %	10 %	48,3 %	15 %
	Enterobacterias CDP ^R	100 %	-	-	-

Al igual que lo observado en los ambientes acuáticos, la identificación de las **especies** de enterobacterias CDP^R aisladas mostró una clara prevalencia de *E. coli* en suelos de granjas (92 %), aunque en piensos es *E. cloacae* la especie predominante (43,8 %) seguida de *E. coli* (31,3 %) (Figura 5.2). Destaca que en ambientes de producción animal se observa una menor diversidad de especies que en los acuáticos, debido probablemente a la carga de microbiota intestinal de los animales que está presente en los suelos. Aunque en esta microbiota intestinal la variedad de especies es muy elevada, la competición por los nutrientes y las condiciones del medio pueden hacer que prevalezcan unas especies y que otras queden enmascaradas.

En concordancia con nuestros resultados, un estudio realizado en muestras de suelos de granjas en España demostró una baja diversidad de especies bacterianas (Mesa y col., 2006). Únicamente aislaron *E. coli* en granjas de pollos y cerdos, mientras que en granjas de conejos se detectaron cepas de *E. coli* y *E. cloacae*. Asimismo, en otro estudio realizado en Suiza en granjas de cerdos, vacas, pollos y conejos, aislaron un total de 91 cepas de las que la mayoría eran *E. coli* (n=89) y solo dos aislados pertenecieron a otras especies (*E. cloacae* y *Citrobacter youngae*) (Geser y col., 2012). Sin embargo, en ninguna de las granjas de terneras muestreadas en nuestro estudio (n=3) se han aislado cepas resistentes. A pesar de que el número muestreado de granjas es bajo, sorprende que no se haya encontrado ninguna

enterobacteria CDP^R, cuando se ha observado una prevalencia del 41,1 % en carnes de ternera. Este hecho podría explicarse por una pérdida de *fitness* de las cepas de enterobacterias CDP^R aisladas en suelos de granjas (Baquero, 2009). Estas cepas se encontrarían en inferioridad de condiciones respecto al resto de competidores, ya que la adquisición de resistencias frente a antibióticos puede suponer la aparición de otras mutaciones menos beneficiosas para la bacteria que disminuyan su supervivencia en el medio ambiente.

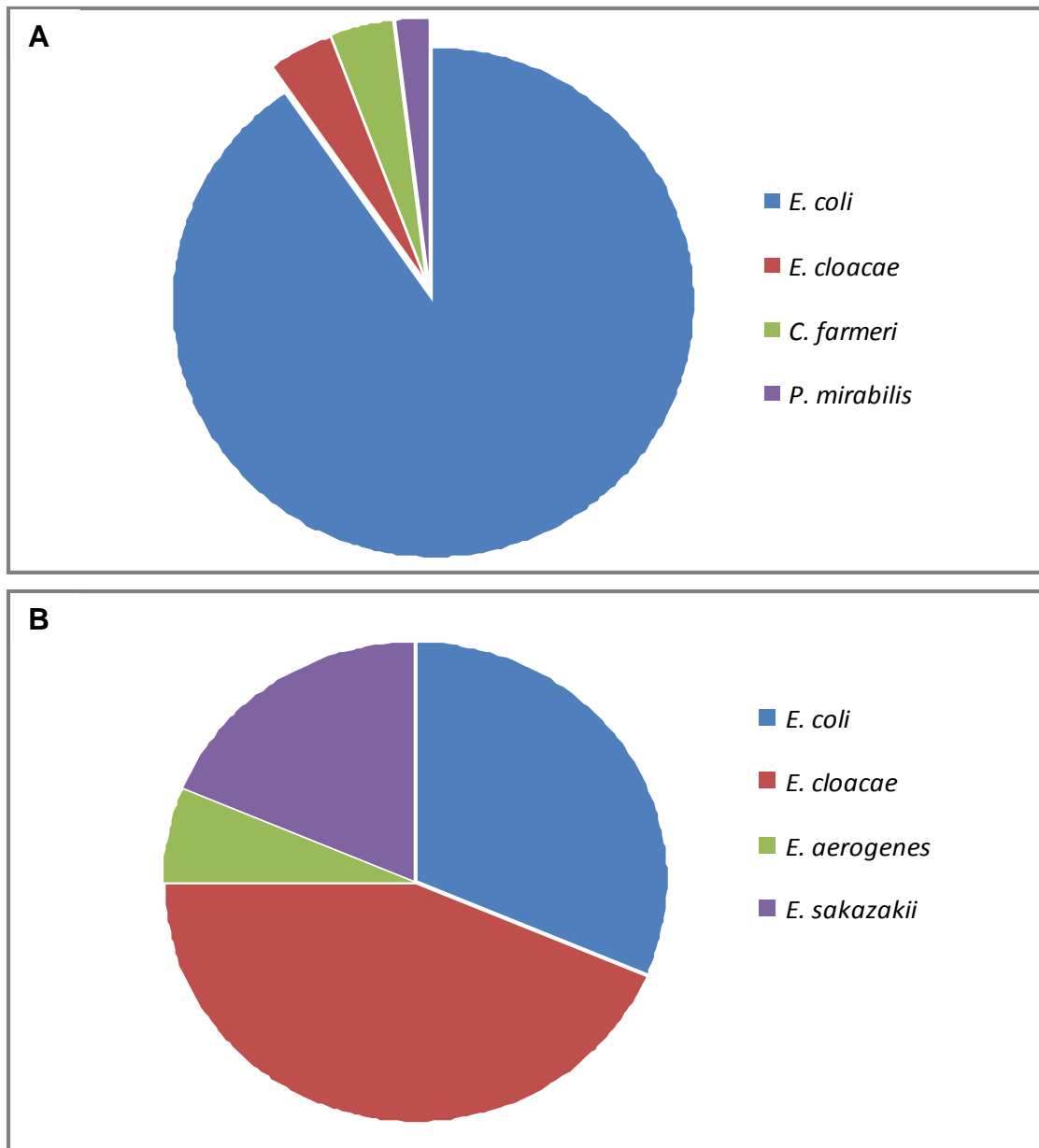


Figura 5.2. Distribución de las distintas especies de enterobacterias aisladas en ambientes ganaderos. A) Suelos de granjas; B) Piensos.

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

5.3.1. AMBIENTES ACUÁTICOS

De las 234 cepas de enterobacterias CDP^R aisladas en entornos acuáticos, el 88,1 % de las procedentes de EDAR y el 83,7 % de las procedentes de ríos fueron confirmadas como productoras de BLEEs por al menos un método fenotípico (Tabla 5.4 y Tabla 5.5). Como se puede observar, el test de disco combinado (CDT) es el **método fenotípico** que mayor número de cepas confirma como BLEEs tanto en EDAR como en ríos, si bien los porcentajes de confirmación varían según el antibiótico utilizado (Tabla 5.6).

Tabla 5.4. Confirmación por diversos métodos fenotípicos de enterobacterias productoras de BLEEs aisladas en EDAR

Especie	No. aislados	No. cepas BLEEs +*	No. BLEEs + según métodos fenotípicos		
			CDT	DDST	MicroScan®
<i>E. coli</i>	135	132	132	127	127
<i>E. vulneris</i>	1	0	0	0	0
<i>S. odorifera</i>	8	5	5	5	0
<i>E. cloacae</i>	18	12	11	1	2
<i>E. aerogenes</i>	2	1	1	1	1
<i>C. braaki</i>	1	1	1	0	0
<i>C. freundii</i>	11	4	3	1	1
<i>C. koseri</i>	1	1	1	1	0
<i>C. farmeri</i>	1	1	1	1	1
<i>K. pneumoniae</i>	4	4	4	3	3
<i>K. oxytoca</i>	3	2	1	0	1
TOTAL (%)	185	163 (88,1)	160 (86,5)	140 (75,7)	136 (73,5)

* Confirmados por al menos un método fenotípico

Tabla 5.5. Confirmación por diversos métodos fenotípicos de enterobacterias productoras de BLEEs aisladas en ríos.

Especie	No. aislados	No. cepas BLEEs +*	No. BLEEs + según métodos fenotípicos		
			CDT	DDST	MicroScan®
<i>E. coli</i>	31	30	30	29	25
<i>E. cloacae</i>	10	5	5	1	2
<i>E. aerogenes</i>	1	1	1	1	1
<i>E. sakazakii</i>	2	1	1	0	0
<i>C. freundii</i>	1	1	1	0	1
<i>K. oxytoca</i>	1	0	0	0	0
<i>S. fonticola</i>	2	2	2	2	0
<i>S. liquefaciens</i>	1	1	1	1	0
TOTAL (%)	49	41 (83,7)	41 (83,7)	34 (69,4)	29 (59,2)

* Confirmados por al menos un método fenotípico

Como se observa en la Tabla 5.6, la cefotaxima es el antibiótico que mayor porcentaje de cepas confirma en ambos nichos. En concordancia con nuestros resultados, Polfuss y colaboradores (2012) observaron una mayor sensibilidad del CDT cuando se utiliza CTX que al utilizar FEP o CAZ. Sin embargo, obtuvieron una alta proporción de falsos positivos en la determinación de BLEEs por métodos de difusión en disco, especialmente en *E. cloacae* y *K. oxytoca*.

Tabla 5.6. Porcentajes de cepas BLEEs de origen acuático confirmadas por distintas combinaciones de antibióticos utilizadas en el CDT.

Antibióticos CDT	Cepas de EDAR (%)	Cepas de ríos (%)
CTX vs. CTX/CA	81,1	75,5
FEP vs. FEP/CA	74,1	55,1
CAZ vs. CAZ/CA	67	28,6

Respecto a los dos restantes métodos fenotípicos, se observa que estos métodos funcionan mejor con cepas de *E. coli* (n=166) que con otras especies (el 97,6 % de las cepas de *E. coli* aisladas fueron confirmadas por CDT, el 94 % por

DDST y el 92,2 % por MicroScan®). Sin embargo, hay que destacar que en el caso de especies con pocos aislados como *E. aerogenes*, *A. cloacae*, *C. farmeri*, *C. koseri* y *K. pneumoniae*, muchas de las cepas se han confirmado satisfactoriamente por los tres métodos fenotípicos. Destaca de nuevo la baja sensibilidad de este sistema con el género *Serratia spp.*

Para estudiar la **susceptibilidad a los antibióticos** se realizó el estudio de los valores de CMI, que además de mostrar el perfil de resistencias de las cepas, contribuye a reforzar la identificación de las cepas como productoras de BLEEs, siempre que muestren un aumento de estos valores para CPD, CTX, CAZ y AZT y se observe un descenso en los valores de CTX vs. CTX/CA (Figura 5.3).

Respecto a penicilinas y algunas cefalosporinas (CZ, CXM y CPD) no hay diferencias significativas en los porcentajes de resistencia a estos antibióticos entre cepas aisladas en aguas de EDAR y en ríos, siendo del 100 % en ambos casos. Respecto al resto de cefalosporinas, se observa una resistencia cercana 100 % frente a CTX y superior al 80 % frente a CAZ. Las tasas de resistencia frente a FOX son menores en ambos nichos (EDAR: 35 %; ríos: 43 %) y se observan diferencias significativas ($p=0,023$) en los porcentajes de resistencia frente a FEP (EDAR: 82 %; ríos: 18 %).

En concordancia con nuestro estudio, Zhang y colaboradores (2009) destacaron la elevada resistencia frente a penicilinas y cefalosporinas. La presencia tanto de microorganismos resistentes como de antibióticos en ambientes acuáticos ha sido estudiada previamente y refleja la alteración de estos sistemas acuáticos por la acción del hombre (Baquero y col., 2008; Andersen y Sandaa, 1994).

Un estudio realizado por Tação y colaboradores (2014) evaluó la susceptibilidad a antibióticos en cepas productoras de BLEEs aisladas en ríos de Portugal y observaron una alta resistencia frente a antibióticos no β -lactámicos como tetraciclinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Además señalaban la importancia

de los sistemas acuáticos en la dispersión y el intercambio de genes de resistencia. Por el contrario, nuestros resultados muestran una tasa de resistencia inferior al 20 % frente a aminoglucósidos e inferior al 50 % para quinolonas. En el caso de estos antibióticos las resistencias en ríos son siempre inferiores a las observadas en EDAR, excepto frente a TET en el que la tasa de resistencia en ríos es mayor (71 %) que en EDAR (48 %). Estas diferencias pueden deberse a los distintos antibióticos utilizados en España y Portugal. Además, Tacão y colaboradores (2014) señalan la presencia de varios fenotipos de multiresistencia en cepas de *E. coli* aisladas en sistemas acuáticos en los que se observa resistencia frente a penicilinas, cefalosporinas de tercera generación, AZT, SXT y FEP.

Por otro lado, en ambos nichos se observa una resistencia elevada frente a monobactams (>85 %), y se ha detectado una resistencia superior en ríos que en EDAR frente a COL, FOT y CHL.

Considerando la resistencia a carbapenems, 12 cepas aisladas en EDAR muestran valores cercanos al punto de corte, tres cepas de ríos muestran resistencia frente a IMP y una frente a ETP. Estas cepas se analizaron posteriormente para estudiar la producción de otras β -lactamasas y se confirmó la presencia de β -lactamasas de tipo AmpC en algunas de ellas. A este respecto, otras publicaciones alertan de la emergencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en cepas de *K. pneumoniae* aisladas tanto en muestras clínicas como ambientales (Isozumi y col., 2012; Koh y col., 2012; Thomas y col., 2013; Pulcrano y col., 2014).

Además, cabe señalar que se han encontrado 131 perfiles de susceptibilidad distintos entre las 135 cepas de *E. coli* aisladas de EDAR y 25 en las 31 cepas de *E. coli* aisladas en ríos. Estos datos demuestran la elevada diversidad de este grupo de enterobacterias y la actuación de los sistemas acuáticos como reservorio de resistencias. Además, en el 63,7 % de las cepas de *E. coli* se ha descrito un perfil de multiresistencia común frente a AMP, PIP, MZ, CZ, CXM, AMS y TET. Estudios

previos señalan un incremento en los niveles de resistencia a antibióticos en estaciones depuradoras de aguas y un elevado porcentaje de cepas multirresistentes (Silva y col., 2006). En concreto, las 74 cepas productoras de BLEEs descritas por Zurfluh y colaboradores (2013) expresaron un fenotipo de multirresistencia.

Un reciente estudio realizado en Reino Unido (Amos y col., 2014) señala la falta de eficacia de los tratamientos de depuración de las EDAR, su contribución al establecimiento de un resistoma ambiental así como a la diseminación de resistencias en el medio ambiente. Además, aunque las depuradoras son eficaces en la reducción de la concentración de materia orgánica y de nitrógeno en las aguas, pueden aumentar el porcentaje de bacterias resistentes en el agua efluente como consecuencia de la acumulación de microorganismos durante los tratamientos, favoreciendo así el intercambio de elementos génicos entre ellos. Por último, hay que destacar que la presencia de bacterias resistentes en aguas de EDAR y ríos constituye un potencial riesgo para la salud humana, ya que supone un vehículo muy efectivo para la diseminación de resistencias (Finley y col., 2013). La utilización de aguas de río para el riego de cultivos y su potencial uso en instalaciones ganaderas puede favorecer el acceso de las bacterias resistentes a productos de origen vegetal y animal, y finalmente, la colonización del tracto intestinal del hombre (Coleman y col., 2012).

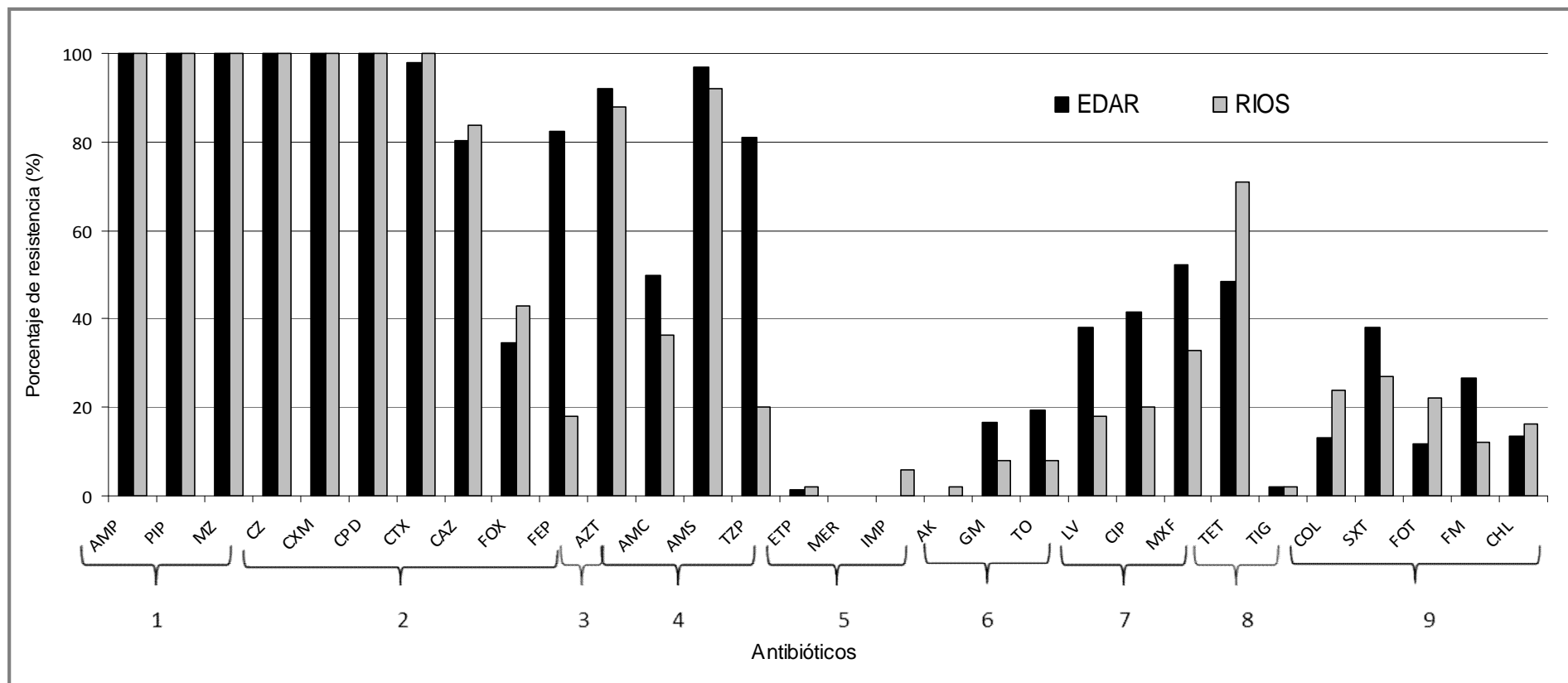


Figura 5.3. Porcentajes de resistencia a los antibióticos estudiados en cepas aisladas en ambientes acuáticos. 1: penicilinas; 2: cefalosporinas; 3: monobactams; 4: Inhibidores de β -lactamasas; 5: carbapenems; 6: aminoglucósidos; 7: quinolonas; 8: tetraciclinas; 9: otros.

5.3.2. AMBIENTES DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Se han confirmado como enterobacterias productoras de BLEEs por al menos un método fenotípico el 96 % de las cepas de enterobacterias CDP^R aisladas en suelos de granjas y al 75 % de las cepas de piensos (Tabla 5.7 y Tabla 5.8). Además se han encontrado cepas de *E. coli* productoras de BLEEs en el 50,6 % de las muestras, lo que supone una prevalencia mayor que la observada en un estudio similar realizado en granjas de cerdos en Reino Unido, en el que la incidencia fue del 23,4 % (Randall y col., 2014).

En nuestro estudio se han aislado enterobacterias productoras de BLEEs

Tabla 5.7. Confirmación por métodos fenotípicos de enterobacterias productoras de BLEEs aisladas en suelos de granjas.

Especie	No. aislados	No. cepas BLEEs +*	No. BLEEs + según métodos fenotípicos		
			CDT	DDST	MicroScan®
<i>E. coli</i>	46	46	46	46	46
<i>E. cloacae</i>	2	0	0	0	0
<i>C. farmeri</i>	1	1	1	1	1
<i>P. mirabilis</i>	1	1	1	1	1
TOTAL (%)	50	48 (96)	48 (96)	48 (96)	48 (96)

* Confirmados por al menos un método fenotípico

Tabla 5.8. Confirmación por métodos fenotípicos de enterobacterias productoras de BLEEs aisladas en piensos.

Especie	No. aislados	No. cepas BLEEs +*	No. BLEEs + según métodos fenotípicos		
			CDT	DDST	MicroScan®
<i>E. coli</i>	5	5	5	5	5
<i>E. cloacae</i>	7	6	6	6	0
<i>E. aerogenes</i>	1	1	1	1	1
<i>E. sakazakii</i>	3	0	0	0	0
TOTAL (%)	16	12 (75)	12 (75)	12 (75)	6 (37,5)

* Confirmados por al menos un método fenotípico

En este caso, los tres **métodos fenotípicos** confirmaron como BLEEs el 100 % de las cepas de *E. coli*, *C. farmeri*, *P. mirabilis* y *E. aerogenes* aisladas en suelos de granjas y piensos. Sin embargo, las cepas de *E. cloacae* aisladas en piensos (n=6) no fueron confirmadas como productoras de BLEEs por el método MicroScan®, pero sí por CDT y DDST. Los métodos de discos confirmaron como productoras de BLEEs al mismo número de cepas, pero al igual que lo observado en las cepas aisladas en ambientes acuáticos, los mayores porcentajes de confirmación se obtuvieron con la combinación de cefotaxima (Tabla 5.9). La técnica automatizada de Siemens resulta adecuada para el estudio de cepas de *E. coli*, *C. farmeri*, *P. mirabilis* y *E. aerogenes*, pero en el caso de *E. cloacae* no determina la presencia de BLEEs, mientras que las técnicas de difusión en disco si lo hacen (6 de 9 cepas).

Tabla 5.9. Porcentajes de cepas BLEEs aisladas en ambientes de producción animal confirmadas según las distintas combinaciones de antibióticos utilizadas en el CDT.

Antibióticos CDT	Cepas de suelos (%)	Cepas de piensos (%)
CTX vs. CTX/CA	96	68,7
FEP vs. FEP/CA	92	31,3
CAZ vs. CAZ/CA	54	43,8

Considerando estos resultados y los obtenidos en ambientes acuáticos, nuestra recomendación sería la combinación de las técnicas de sinergia del doble disco y test de discos combinados, empleando en este caso los antibióticos que mayor porcentaje de confirmación ofrecen (CTX vs CTX/CA) y utilizando además el método automatizado de Siemens para completar los datos de susceptibilidad de cada cepa. Aunque los porcentajes de confirmación según los distintos antibióticos utilizados varíen entre los diferentes nichos ecológicos, estas diferencias se pueden deber a la presencia de distintos tipos de BLEEs.

Respecto a la **susceptibilidad antibiótica** de las cepas aisladas, los resultados son similares a los obtenidos en ambientes acuáticos (Figura 5.4). Se observa de nuevo una resistencia del 100 % frente a penicilinas, cefalosporinas (excepto FOX y FEP) y AZT (aunque el porcentaje ha sido menor en piensos), y niveles superiores a 37 % en ambos nichos frente a tetraciclinas (72 % en granjas). En piensos, las tasas de resistencia para FOX y FEP aumentan respecto a las observadas en granjas mostrando valores del 68,8 % y 50 % respectivamente. Asimismo, se detectó una tasa de resistencia frente a COL más elevada en piensos (37,5 %) que en suelos de granjas (10 %).

Estos resultados se pueden explicar por el uso abusivo de estos antibióticos en producción animal. El informe de la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) señala que en 2012, España estaba a la cabeza de las ventas de antibióticos para el tratamiento de animales de producción (1.693 toneladas), solo superada por Alemania (1.707,5 toneladas). Este informe indica que los antibióticos más vendidos en nuestro país para el tratamiento de animales de producción fueron las tetraciclinas seguidas por las penicilinas. La venta de cefalosporinas es mucho menor y sin embargo las resistencias observadas en ambientes ganaderos frente a estos antibióticos son elevadas, lo que indica que las medidas tomadas para reducir el uso de cefalosporinas no han tenido su efecto todavía (EMA, 2014).

Por otro lado, cabe destacar la alta sensibilidad a carbapenems (100 %), TIG (100 %), FOT (98 %), FEP (98 %), TZP (96 %), FM (92 %) y GM (92 %) que han mostrado las cepas aisladas en suelos de granjas. Asimismo, la susceptibilidad frente a carbapenems, AK, GM y TIG en cepas aisladas en piensos es del 100 %. Considerando las combinaciones de antibióticos destaca AMS por ser la que mayor tasa de resistencia presenta tanto en suelos (68 %) como en piensos (93,8 %).

Algunos de los datos presentados están en concordancia con las observaciones realizadas en otros estudios, si bien no se han encontrado trabajos que

analicen la presencia de bacterias resistentes en piensos. Por tanto, atendiendo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, consideramos que es necesario realizar más estudios en esta línea.

Así, en un estudio realizado en granjas de pollos y pavos tampoco se observó resistencia frente a AK, mientras que las resistencias a penicilinas y SXT fueron el 65,3 % y 47,2 %, respectivamente (Randall y col., 2011). Además detectaron una tasa de multirresistencia del 70 %, superior a la que hemos observado en el presente estudio (58 %).

En el estudio realizado en la India por Kar y colaboradores (2015) se aislaron 16 cepas de *E. coli* productoras de BLEEs en granjas de pollos. Estas cepas mostraron unos porcentajes de resistencia similares a los obtenidos en nuestro estudio frente a CAZ (100 %), CTX (100 %), AZT (100 %), CPD (100 %) y TET (77 %). Por el contrario, los porcentajes que detectaron frente a otros antibióticos fueron considerablemente superiores: TO (100 %), AMC (94 %), TZP (94 %), SXT (88 %), LV (88 %), CIP (83 %), FEP (66 %), CHL (61 %), IMP (27 %) y AK (22 %). Estas diferencias en tasas de resistencia frente a estos antibióticos entre España e India podrían deberse a deficientes medidas de higiene y condiciones de estabulación de los animales en las explotaciones ganaderas del país asiático, que permitirían una mayor presencia de microorganismos e intercambio de elementos génicos asociados a resistencias.

Considerando las muestras de suelos de granjas según el animal de cría, no se han observado diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las tasas de resistencias a la mayoría de los antibióticos estudiados, excepto en el caso FOT y CHL. Las tasas de resistencia frente a estos dos antibióticos han sido significativamente más bajas ($p = 0,027$) en granjas de pollos (FOT: 18,4 % y CHL: 7,9 %) que las observadas en granjas de cerdos (FOT: 83,3 % y CHL: 66,7 %).

Para reducir la presencia de resistencias en ambientes ganaderos, la restricción del uso de antibióticos parece ser eficaz, ya que un estudio realizado en Australia detectó bajos niveles de resistencia a fluoroquinolonas en enterobacterias como resultado de restringir su uso en animales de producción y en el hombre (Cheng y col., 2012).

Algunos autores proponen entre otras medidas el uso de técnicas de compostaje y digestión enzimática para el estiércol antes de su uso como abono, para eliminar los residuos de antibióticos presentes y reducir su diseminación en la agricultura (Leung y col., 2011; Pruden y col., 2013).

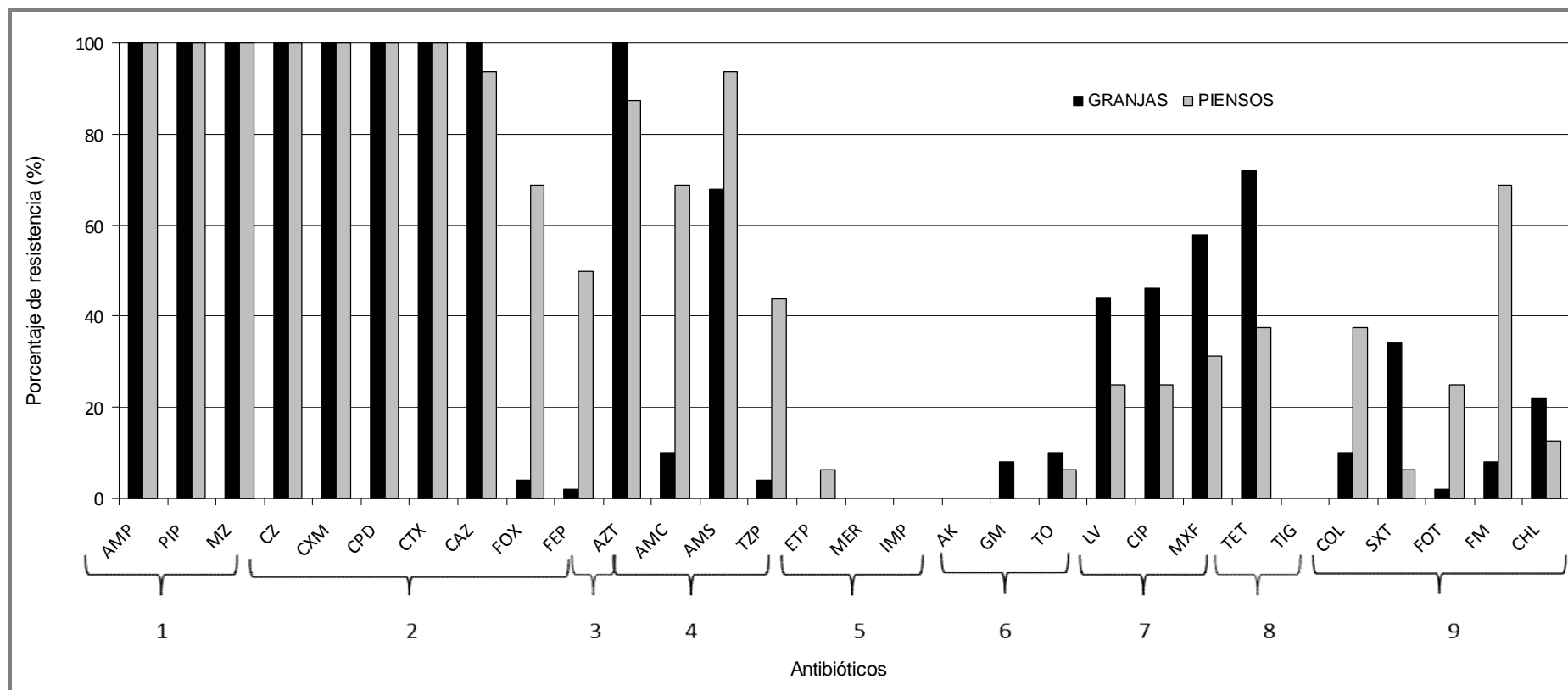


Figura 5.4. Porcentajes de resistencia a los antibióticos estudiados en cepas aisladas en ambientes de producción animal. 1: penicilinas; 2: cefalosporinas; 3: monobactams; 4: Inhibidores de β -lactamasas; 5: carbapenems; 6: aminoglucósidos; 7: quinolonas; 8: tetraciclinas; 9: otros.

5.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LAS RESISTENCIAS

Los métodos genotípicos de PCR y secuenciación utilizados mostraron la presencia de genes implicados en la resistencia a las β -lactamasas estudiadas en el 74,2 % de las cepas confirmadas como E-BLEEs por al menos un método fenotípico. Las cepas en las que no se ha detectado producción de estos genes (n=68) corresponden en el 81 % de los casos a géneros como *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.* y *Serratia spp.*, que pueden estar expresando otros tipos de BLEEs distintas a las que buscamos en este estudio.

Considerando las familias de β -lactamasas detectadas en las muestras ambientales se ha observado una predominancia de CTX-M (45,7 %) seguida de SHV (16,2 %), TEM (10,5 %) y OXA (0,3 %). En la Figura 5.5 se muestra la distribución de genes que codifican para β -lactamasas en las cepas aisladas. Hay que tener en cuenta que se han detectado también los genes *bla*_{OXA-1} y *bla*_{TEM-1} que se incluyen en esta figura pero que no son *bla*_{BLEE} por lo que para el estudio de genotipos se han agrupado en otros genes (excepto en aquellas cepas en que su producción está asociada a las de enzimas BLEEs).

Atendiendo a los genes detectados, se observa una predominancia de *bla*_{CTXM-1} (19,7 %), seguido de *bla*_{CTXM-14} (18,1 %) y *bla*_{SHV-12} (15,9 %). Sin embargo, si analizamos los resultados según el origen de las cepas aisladas se observan algunas diferencias. En cepas aisladas en muestras de aguas de EDAR es *bla*_{CTXM-14} el gen predominante, en ríos y piensos es *bla*_{CTX-M-1}, mientras que *bla*_{SHV-12} es el más prevalente en cepas aisladas en suelos de granjas. Cabe destacar que en los cuatro nichos estudiados se han aislado cepas de *E. coli* productoras de las BLEEs CTX-M-14 y CTX-M-1.

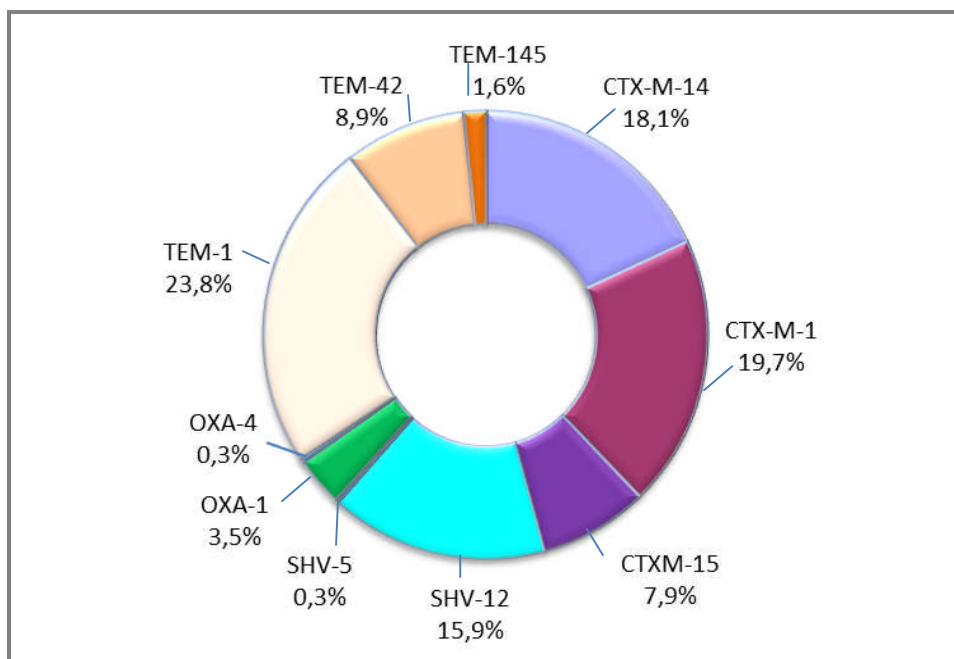


Figura 5.5. Genes de β -lactamasas detectados en las cepas aisladas en el conjunto de muestras ambientales.

5.4.1. AMBIENTES ACUÁTICOS

En ambientes acuáticos se han detectado los genes *bla*_{BLEE} estudiados en el 72,4 % de las cepas aisladas en EDAR y en el 68,3 % de las cepas de ríos. En la Tabla 5.10 se muestran todos los genotipos detectados en cepas E-BLEE aisladas en aguas efluentes de **EDAR**. Junto al elevado número de cepas portadoras de varios genes *bla*_{BLEE} (n=51) se puede observar que *bla*_{CTXM-14} ha sido el gen predominante (24,5 %), seguido de *bla*_{CTXM-1} (18,4 %), *bla*_{SHV-12} (14,1 %) y *bla*_{TEM-42} (11,7 %) mientras que *bla*_{TEM-145} sólo aparece en 2 cepas (1,2 %) aisladas en una EDAR y un río separados geográficamente. Además, se han detectado también los genes *bla*_{TEM-1} y *bla*_{OXA-1}, que al no ser BLEEs solo se han tenido en cuenta en aquellas cepas es las que estaban asociados a otro gen BLEE. Estos resultados contrastan por los obtenidos por Tacão y colaboradores (2015), que mostraron una elevada diseminación de bacterias multirresistentes y elevada prevalencia de *bla*_{OXA} (33,3 %) seguida de *bla*_{TEM} (24,1 %) y *bla*_{CTX-M} (5,6 %) en cepas aisladas en aguas urbanas. Por otro lado, en nuestro estudio hemos observado una cepa de *E. coli* portadora de *bla*_{CTX-M-55}. Esta

enzima se está localizando en los últimos años en el este asiático y recientemente se ha observado su aumento en cepas de origen nosocomial en China (Pan y col., 2013; Wang y col., 2013; Zhang y col., 2014).

Tabla 5.10. Genotipos *bla*_{BLEE} en las cepas productoras de BLEEs aisladas en muestras de EDAR.

Tipo genotipo	No. cepas (%)	Especies	
		<i>E. coli</i>	Otras
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	27 (16,6)	26	1
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-1}	9 (5,5)	9	0
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-42}	3 (1,8)	3	0
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-145}	1 (0,6)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	22 (13,5)	22	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-1}	6 (3,7)	6	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-12}	1 (0,6)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-42} + <i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{OXA-1}	1 (0,6)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	5 (3,1)	4	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1}	4 (2,5)	3	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{OXA-1}	2 (1,2)	1	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-1}	5 (3,1)	4	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-42} + <i>bla</i> _{OXA-1}	1 (0,6)	0	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{OXA-1}	1 (0,6)	0	1
<i>bla</i> _{CTX-M-55}	1 (0,6)	1	0
<i>bla</i> _{TEM-42}	8 (4,9)	7	1
<i>bla</i> _{SHV-12}	8 (4,9)	5	3
<i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{TEM-1}	5 (3,1)	5	0
<i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{TEM-42}	6 (3,7)	6	0
<i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{TEM-145}	1 (0,6)	1	0
Otros genes	45 (27,6)	15	19
TOTAL	163	132	31

Respecto a las cepas aisladas en **aguas de ríos** (n=41) los genes predominantes han sido *bla*_{CTXM-1} (24,4 %) y *bla*_{CTXM-14} (17,1 %), seguidos por *bla*_{CTXM-15} (9,8 %) y *bla*_{SHV-12} (9,8 %) (Tabla 5.11). Sin embargo, varios estudios realizados en aguas de ríos muestran una distribución diferente de los genes de la familia CTX-M. Así, el estudio realizado por Bajaj y colaboradores (2015) en cepas de *E. coli* aisladas en aguas de ríos de la India muestra una prevalencia de CTX-M (16 %), siendo

*bla*_{CTXM-15} el gen más abundante de esta familia. De igual forma, Zurfluh y colaboradores (2013) obtuvieron una predominancia de *bla*_{CTXM-15} (62,2 %), seguido de *bla*_{CTXM-1} (10,8 %) y *bla*_{CTXM-14} (8,1 %) en un estudio realizado en ríos y lagos de Suiza. Cabe destacar la presencia de *bla*_{OXA-4} en una cepa de *E. cloacae*, ya que esta enzima se ha localizado recientemente en *P. aeruginosa* en India (Kingsley y col., 2013).

Tabla 5.11. Genotipos *bla*_{BLEE} en las cepas productoras de BLEEs aisladas en muestras de ríos.

Tipo de genotipo	No. cepas (%)	Especies	
		<i>E. coli</i>	Otras
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	5 (12,2)	4	1
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-145}	2 (4,9)	2	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	3 (7,3)	3	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-1}	6 (14,6)	6	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-42}	1 (2,4)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	1 (2,4)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1}	3 (7,3)	3	0
<i>bla</i> _{TEM-42}	1 (2,4)	1	0
<i>bla</i> _{SHV-12}	3 (7,3)	3	0
<i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{TEM-145}	1 (2,4)	1	0
<i>bla</i> _{SHV-5} + <i>bla</i> _{TEM-1}	1 (2,4)	1	0
<i>bla</i> _{OXA-4}	1 (2,4)	0	1
Otros genes	13 (31,7)	4	9
TOTAL	41	30	11

A pesar de que CTX-M-15 es la enzima más frecuentemente aisladas en entornos acuáticos (Bajaj y col., 2015; Zurfluh y col., 2013) en nuestro estudio han sido CTX-M-14 y CTX-M-1 las enzimas más prevalentes en estos ambientes. En nuestra opinión, esta variabilidad entre países podría deberse a los distintos antibióticos utilizados tanto en clínica como en ganadería que acaban en las aguas de las estaciones depuradoras de agua.

5.4.2. AMBIENTES DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Respecto a las cepas confirmadas como productoras de BLEEs por métodos fenotípicos, se han detectado los genes bla_{BLEE} estudiados en el 94 % de las cepas aisladas en suelos de granjas y en el 41,7 % de las cepas de piensos. Los genes de la familia CTX-M han sido los más aislados tanto en suelos de granjas (n=32) como en piensos (n=5).

Atendiendo a las cepas aisladas en **suelos de granjas** (92 % *E. coli*), los genes bla_{BLEE} están combinados (al menos dos) en 28 cepas, mientras que en 17 aislados se encuentran en solitario (Tabla 5.12). Nuestro estudio muestra como genes prevalentes bla_{SHV-12} (43,8 %) y $bla_{CTX-M-1}$ (37,5 %), seguidos de $bla_{CTX-M-14}$ (18,8 %) y bla_{TEM-42} (16,7 %). Se han observado diferencias significativas ($p=0,034$) entre SHV y CTX-M-1. Además, esta predominancia de SHV-12 contrasta con otros estudios realizados en ambientes de producción animal, en los que se refiere una clara prevalencia de *E. coli bla_{CTX-M-1}* (Aarestrup y col., 2006; Girlich y col., 2007; Hammerun y col., 2014; Laube y col., 2014).

Atendiendo a la prevalencia de cada gen en los distintos tipos de granjas estudiadas, se observan algunas diferencias. En **granjas de pollo** el gen más prevalente es bla_{SHV-12} (45,5 %), seguido de $bla_{CTX-M-1}$ (28,6 %), $bla_{CTX-M-14}$ (16,7 %) y bla_{TEM-42} (9,5 %). En **granjas de cerdo** es $bla_{CTX-M-1}$ (35,7 %) el gen predominante sobre $bla_{CTX-M-15}$ y bla_{TEM-42} , ambos con una prevalencia del 21,4 %. Asimismo, están también presentes en este nicho $bla_{CTX-M-14}$ (14,3 %) y bla_{SHV-12} (7,1 %). Como se ha comentado anteriormente, en ninguna de las **granjas de terneras** analizadas se han aislado cepas resistentes.

Un estudio realizado en España en 2003, detectó por primera vez en pollos sanos la presencia de bla_{SHV-12} y $bla_{CTX-M-14}$ en una cepa de *E. coli* productora de BLEEs (Briñas y col., 2003a), y señaló la posibilidad de que exista una selección cruzada de

resistencias a cefalosporinas con otros antibióticos. Unos años más tarde, este mismo grupo observó un aumento de la prevalencias de estas mismas cepas y la presencia de *bla*_{CTX-M-9} (Briñas y col., 2006). Considerando los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos afirmar que tanto *bla*_{SHV-12} como genes de la familia CTX-M muestran una amplia diseminación en las producciones ganaderas de pollos, mientras que *bla*_{CTX-M} está ampliamente diseminado en las de cerdos.

A este respecto, Randall y colaboradores encontraron una mayor prevalencia de *bla*_{CTX-M-1} en cepas aisladas en granjas de cerdos (18,7 %) y de pollos (10,7 %). Del mismo modo, Geser y col., (2012) observaron en granjas de cerdos, vacas, pollos y ovejas localizadas en Suiza una predominancia de genes del grupo CTX-M-1 (85,7 %) seguidos del grupo CTX-M-9 (6,6 %), SHV (5,5 %) y TEM (2,2 %). En relación a la familia CTX-M, los datos obtenidos en el presente estudio están en consonancia con los estudios referidos, con un porcentaje de cepas productoras de *bla*_{CTXM-1} predominante sobre *bla*_{CTXM-14} y *bla*_{CTXM-15}.

Asimismo, el estudio de Smet y colaboradores (2008) realizado en cepas de *E. coli* aisladas en granjas de pollo de Bélgica, describe de nuevo una predominancia de CTX-M-1 (27,4 %) seguida de TEM-52 (13,2 %), y obtiene porcentajes de prevalencia más reducidos de las enzimas CTX-M-2 (7,8 %), CTX-M-14 (5,9 %), CTX-M-15 (2 %) y TEM-106 (2 %). Por el contrario, en nuestro estudio no hemos aislado ninguna cepa portadora del gen *bla*_{TEM-52} aunque sí se ha detectado *bla*_{TEM-42} en el 16 % de las cepas. Otro estudio realizado en Francia en granjas de pollo (Girlich y col., 2007) destacó la diseminación de *E. coli* productoras de BLEEs tipo CTX-M-1 y sugirió la posibilidad de que exista en Francia un reservorio de plásmidos trasmisibles con esta enzima en pollos.

Tabla 5.12. Genotipos *bla*_{BLEE} en las cepas productoras de BLEEs aisladas en muestras de suelos de granjas.

Tipo de genotipo	No. cepas (%)	Especies	
		<i>E. coli</i>	Otras
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	3 (6,3)	3	0
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-42}	2 (4,2)	2	0
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-1}	3 (6,3)	3	0
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-12}	1 (2,1)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	3 (6,3)	3	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-1}	7 (14,6)	6	1
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-42}	1 (2,1)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{SHV-12}	1 (2,1)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{TEM-1}	5 (10,4)	5	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-42} + <i>bla</i> _{SHV-12}	1(2,1)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-42}	3 (6,3)	3	0
<i>bla</i> _{SHV-12}	11 (23)	10	1
<i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{TEM-42}	1 (2,1)	1	0
<i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{TEM-1}	1 (2,1)	1	0
Otros genes	3 (6,3)	3	0
TOTAL	48	46	2

Por último, en las dos **granjas de caballos** estudiadas es *bla*_{SHV-12} (60 %) el gen predominante sobre *bla*_{CTX-M-1} (20 %) y *bla*_{TEM-42} (20 %). Un estudio realizado en Reino Unido muestra la presencia de *bla*_{CTX-M-1} en el 58,1 % de las cepas aisladas en caballos pero no detecta ninguno de los otros dos genes detectados en nuestro estudio (Maddox y col., 2012). Asimismo, Dierikx y colaboradores (2012) aislaron 12 cepas de *E. coli* productoras de BLEEs en caballos detectando *bla*_{CTX-M-14} (16,7 %), *bla*_{CTX-M-1} (8,3 %) y *bla*_{CTX-M-2} (8,3 %). Sin embargo, Schmiedel y colaboradores (2014) obtuvieron prevalencias similares para *bla*_{CTX-M-15} (38 %) y *bla*_{CTX-M-1} (37 %). Las diferencias que se observan en ambientes de producción animal pueden deberse a los distintos tratamientos que se aplican en estos países.

Respecto a las cepas productoras de BLEEs aisladas en muestras de **piensos**, solo se han identificado los genes *bla*_{BLEE} en 5 de ellas (Tabla 5.13). Todas ellas son

E. coli y expresan genes *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-1} en solitario. Las 7 cepas en las que no se han identificado genes corresponden a *E. cloacae* (n=6) y *E. aerogenes* (n=1). Aunque varios autores han estudiado la presencia de E-BLEE en fuentes diversas del entorno de producción agrícola y ganadera (como aire y moscas) (Blaak y col., 2014a; Sanz y col., 2015), no hemos encontrado ningún estudio que analice la presencia de estas enterobacterias resistentes en los piensos de animales. Sin embargo, los resultados obtenidos en piensos están en concordancia con los observados en suelos de granjas. Las cepas productoras de CTX-M-1 se han aislado en muestras de piensos y suelos de granjas correspondientes a ganado aviar y porcino, mientras que las cepas productoras de CTX-M-14 se han aislado en una muestra de pienso de ganado aviar y suelos de granjas del mismo tipo. Por tanto, podemos afirmar que en ambientes de producción animal hay una elevada presencia de enterobacterias productoras de BLEEs tipo CTX-M-1 y CTX-M-14, mayor que la observada en otros estudios europeos.

Tabla 5.13. Genotipos *bla*_{BLEE} en las cepas productoras de BLEEs aisladas en muestras de piensos.

Tipo de genotipo	No. cepas (%)	Especies	
		<i>E. coli</i>	Otras
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	1 (8,3)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	4 (33,3)	4	0
Otros genes	7 (58,4)	0	7
TOTAL	12	5	7

5.5. CARACTERIZACIÓN DE OTRAS β -LACTAMASAS

Para realizar el estudio de β -lactamasas de tipo AmpC se determinó la susceptibilidad antibiótica frente a cefoxitina y cefotetán. Al obtener varias cepas sospechosas de producir estas enzimas se realizó la PCR múltiple descrita por Pérez-Pérez y Hanson (2002) para detectar las familias más importantes implicadas en estas resistencias. La Figura 5.6 muestra un gel de agarosa con algunos ejemplos de productos amplificados. En la cepa 7 se ve una banda que corresponde con el gen *bla_{FOX}* (190 pb) y otra que correspondería al gen *bla_{CIT}* (462 pb); la cepa 9 tiene una banda a la altura de 302 pb que corresponde con el gen *bla_{EBC}*; en la cepa 11 se observa banda para el gen *bla_{CIT}* y en la cepa 12 se observan dos bandas correspondientes a *bla_{CIT}* y *bla_{FOX}*.

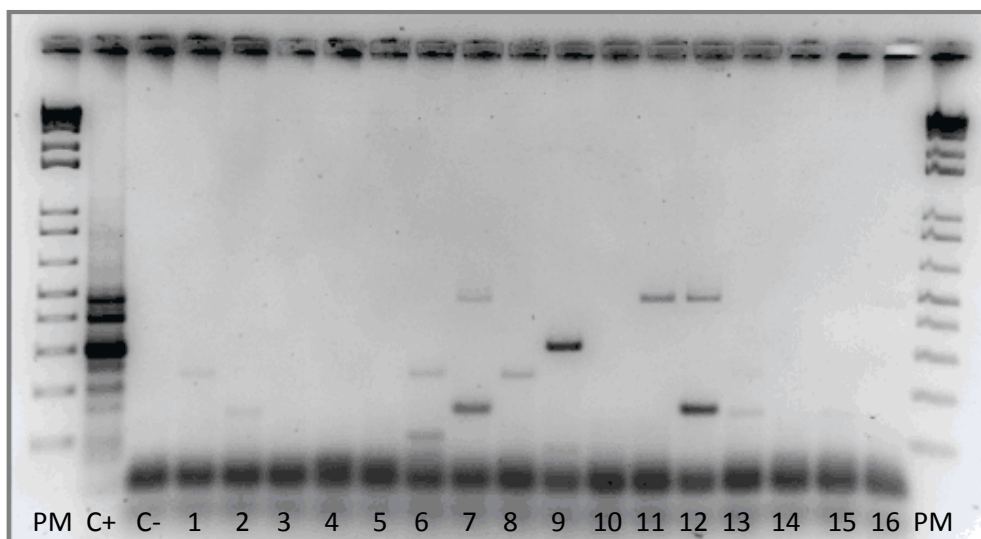


Figura 5.6. Ejemplo de gel de agarosa con los productos de la PCR múltiple según Pérez-Pérez y Hanson (2002) para detección de genes productores de AmpC.

En total se han estudiado 62 cepas ambientales sospechosas de ser productoras de otros tipos de β -lactamasas, procedentes de EDAR (n=39), ríos (n=12), suelos de granjas (n=2) y piensos (n=9). El 67,2 % de estas cepas sospechosas han sido confirmadas como productoras de AmpC mediante PCR (Tabla 5.14).

En el caso de las cepas aisladas en **aguas efluentes** de EDAR, el 39 % de los genes detectados corresponden a *bla*_{FOX}, seguido de *bla*_{EBC} (26,8 %) y *bla*_{CIT} (17,1 %). Además, en 9 de las cepas analizadas se ha detectado varios genes implicados en estas resistencias. Un reciente estudio realizado en Portugal (Amador y col., 2015) que analiza la producción de AmpC en enterobacterias aisladas en aguas urbanas, destaca una elevada prevalencia de *bla*_{EBC} (38,9 %) y menor presencia de cepas productoras de *bla*_{FOX} (1,9 %) y *bla*_{CIT} (1,9 %). Respecto a los aislados en **aguas de ríos**, se han aislado los mismos tipos de genes AmpC, detectándose en cuatro cepas *bla*_{FOX} (n=2) y *bla*_{EBC} (n=2), correspondiendo solo una de ellas a *E. coli*. Estudios realizados en muestras clínicas han apreciado una proporción más baja de *E. coli* productoras de AmpC (4,8 %) en comparación con las productoras de BLEEs (95,2 %) (Oteo y col., 2010).

En ambientes de producción animal se han detectado en total diez cepas productoras de AmpC pertenecientes al género *Enterobacter spp.* (Tabla 5.15). En **suelos de granjas** se aislaron solo dos cepas de *E. cloacae* portadoras del gen *bla*_{EBC}. En España, Briñas y colaboradores (2003a) detectaron una cepa de *E. coli* portadora del gen *bla*_{CMY-2} aislada en pollos. Este mismo grupo detectó años después (Briñas y col., 2006) un aumento en la prevalencia de estas enzimas en pollos. Asimismo, el estudio realizado por Smet y colaboradores en granjas de pollo en Bélgica, refleja una situación distinta con una prevalencia del 49 % de cepas *E. coli* productoras de BLEEs y de la enzima CMY-2 (Smet y col., 2008). Del mismo modo, Dierikx y colaboradores han mostrado una alta prevalencia de *E. coli* productoras de BLEEs y AmpC en granjas de pollos en Alemania (Dierikx y col., 2013). Sin embargo, en nuestro estudio no se ha encontrado CMY-2 sino que se predominan otras enzimas como EBC y FOX. Estos datos parecen indicar una diferente distribución geográfica de estas enzimas debida probablemente a la presión selectiva de los antibióticos.

Por último, se observaron genes implicados en la producción de β -lactamasas de tipo AmpC en 8 cepas aisladas de muestras de **piensos**. Se han detectado los genes bla_{EBC} y bla_{FOX} y en dos cepas aparecen combinados ambos genes. El hecho de que el 50 % de las cepas aisladas en piensos sean productoras de AmpC indica la amplia dispersión de este tipo de resistencias en alimentación animal y la necesidad de reforzar los procedimientos de vigilancia.

Tabla 5.14. Genes detectados por PCR múltiple en las cepas sospechosas de expresar β -lactamasas de tipo AmpC aisladas en ambientes acuáticos.

Especie	No. Cepas	Genes detectados	Origen
<i>E. coli</i>	3	bla_{FOX}	EDAR (n=2); ríos (n=1)
<i>E. coli</i>	1	bla_{FOX} , bla_{CIT}	EDAR
<i>E. coli</i>	1	bla_{FOX} , bla_{CIT} , bla_{MOX}	EDAR
<i>E. cloacae</i>	1	bla_{FOX}	EDAR
<i>E. cloacae</i>	6	bla_{EBC}	EDAR (n=5); ríos (n=1)
<i>E. cloacae</i>	1	bla_{FOX} , bla_{EBC}	EDAR
<i>E. cloacae</i>	1	bla_{EBC} , bla_{ACC} , bla_{DHA}	EDAR
<i>E. cloacae</i>	1	bla_{EBC} , bla_{ACC}	EDAR
<i>E. cloacae</i>	1	bla_{FOX} , bla_{EBC} , bla_{ACC}	EDAR
<i>E. aerogenes</i>	1	bla_{FOX}	EDAR
<i>E. sakazakii</i>	1	bla_{EBC}	Ríos
<i>S. odorifera</i>	1	bla_{FOX} , bla_{EBC} , bla_{ACC}	EDAR
<i>C. freundii</i>	4	bla_{FOX}	EDAR
<i>C. braaki</i>	1	bla_{CIT}	EDAR
<i>C. freundii</i>	2	bla_{CIT}	EDAR
<i>C. freundii</i>	1	bla_{CIT} , bla_{MOX}	EDAR
<i>C. freundii</i>	1	bla_{ACC} , bla_{CIT}	EDAR
<i>S. odorifera</i>	1	bla_{FOX} , bla_{EBC}	EDAR
<i>K. oxytoca</i>	2	bla_{FOX}	EDAR (n=1), ríos (n=1)

Tabla 5.15. Genes detectados por PCR múltiple en las cepas sospechosas de expresar β -lactamasas de tipo AmpC aisladas en ambientes de producción animal.

Especie	No. Cepas	Genes detectados	Origen
<i>E. cloacae</i>	5	<i>bla</i> _{EBC}	Granjas (n=2), piensos (n=3)
<i>E. cloacae</i>	2	<i>bla</i> _{FOX}	Piensos
<i>E. sakazakii</i>	1	<i>bla</i> _{EBC}	Piensos
<i>E. sakazakii</i>	2	<i>bla</i> _{EBC} , <i>bla</i> _{FOX}	Piensos

Para estudiar las posibles cepas productoras de **carbapenemasas de tipo KPC, MBL y OXA-48**, con valores de CMI cercanos al punto de corte para carbapenem, se utilizó el kit de discos comentado en los capítulos anteriores (Rosco Diagnóstica, Dinamarca). En ninguno de los casos se encontraron las diferencias de halos indicadas por el fabricante. Por tanto, todas las cepas aisladas combinarían una producción de BLEEs con alteraciones en las porinas de membrana, es decir, ninguna de las cepas aisladas es productora de metalo- β -lactamasas o de OXA-48.

Por el contrario, otros autores han encontrado carbapenemasas de este tipo en distintos nichos ambientales como granjas de producción animal en la India, detectando *bla*_{NDM-1} en el género *Acinetobacter spp.* (Wang y col., 2012). Asimismo, se han detectado estas enzimas en aguas de ríos de distintos países, como los aislamientos de cepas portadoras de *bla*_{IMI-1} y *bla*_{IMI-2} en Estados Unidos (Aubron y col., 2005), portadoras de *bla*_{BIC-1} en Francia (Girlich y col., 2010) y aislamientos de cepas portadoras de *bla*_{OXA-48} en Portugal (Poirel y col, 2012).

CAPÍTULO 6.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN: CARACTERIZACIÓN
FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *E. coli* BLEEs
AISLADAS EN MUESTRAS CLÍNICAS**

6.1. INTRODUCCIÓN

Con objeto de conocer la prevalencia de E-BLEEs en el entorno clínico, se llevó a cabo un estudio colaborativo con el Servicio de Microbiología de la Clínica Universidad de Navarra. Dada la alta prevalencia de *E. coli* productoras de BLEE encontrada tanto en alimentos como en el entorno de producción animal, se decidió centrar el estudio en las cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación aisladas de pacientes ingresados en la CUN.

E. coli es una de las especies productoras de BLEEs más frecuentes y su estudio filogenético está muy bien definido. Varios estudios señalan que las infecciones por estas bacterias tienen un tratamiento más complicado, con mayores costes y que pueden ocasionar una mayor mortalidad (Cisneros y Cordero, 2007; Lautenbach y col, 2001). Cabe destacar que entre los años 2000 y 2006 la prevalencia de estas cepas en hospitales españoles se incrementó 8 veces (Oteo y col., 2006). Considerando la rápida diseminación de *E. coli* productoras de BLEEs en todo el mundo y las dificultades encontradas para controlarlas, es muy probable que su frecuencia haya aumentado en los últimos años.

A lo largo de un periodo de 4 años (2009-2012) se aislaron 130 cepas de *E. coli* resistentes a CDP^R a partir de diversos tipos de muestras clínicas (Tabla 6.1). Las cepas de origen urinario representan el 45,4 % de los aislados, seguidas de las cepas procedentes de hisopado inguinal (16,1 %) y de hisopado perianal (13,1 %). Los aislados a partir de muestras de sangre representan solo el 4,6 %, aunque tienen mayor impacto clínico debido al aumento de mortalidad que se asocia a los casos de infecciones causadas por *E. coli* productoras de BLEEs respecto a otros microorganismos (Leistner y col., 2014).

Tabla 6.1. Cepas de *E. coli* CDP^R aisladas en la Clínica Universidad de Navarra durante el periodo 2009-2012.

	2009	2010	2011	2012	TOTAL
Orina	5	27	15	12	59
Hisopo inguinal	3	4	4	2	21
Hisopo perianal	2	5	7	3	17
Exudado herida	3	6	2	0	11
Espujo	1	2	3	0	6
Sangre	2	2	1	1	6
Hisopo piel	1	1	0	1	3
Hisopo nasal	0	1	1	0	2
Hisopo vaginal	0	1	1	0	2
Aspirado ascítico	0	1	0	1	2
Absceso profundo	0	2	0	0	2
Catéter drenaje	1	1	0	0	2
Muestra inespecífica	0	1	0	1	2
Hisopo uretral	0	1	0	0	1
Aspirado bronquial	0	0	1	0	1
Biopsia	0	0	0	1	1
TOTAL	18	55	35	23	130

6.2. CARACTERIZACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Todas las cepas *E. coli* CDP^R fueron confirmadas como productoras de BLEE por al menos un método fenotípico, siendo de nuevo los tests de CDT y DDST los que confirmaron mayor número de cepas productoras de BLEEs (96,2 % y el 96,5 %, respectivamente), frente al 94,6 % detectadas mediante MicroScan®.

Respecto a los antibióticos utilizados en el CDT, al igual que lo observado en las cepas aisladas en alimentos y en muestras ambientales, los mayores porcentajes de confirmación se obtuvieron con la combinación de CTX vs. CTX/CA, seguida de FEP vs. FEP/CA.

Tabla 6.2. Porcentajes de cepas BLEEs de origen clínico confirmadas por distintas combinaciones de antibióticos utilizadas en el CDT.

Antibióticos CDT	Cepas confirmadas (%)
CTX vs. CTX/CA	92,4
FEP vs. FEP/CA	87
CAZ vs. CAZ/CA	57,3

En el estudio de la **susceptibilidad antibiótica** realizado por MicroScan® se observó una elevada resistencia frente a penicilinas (99,2 %) y una resistencia superior al 94 % frente a cefalosporinas, con la excepción de FOX que presentó una tasa de resistencia del 14,6 % (Figura 6.1). Considerando estos valores se confirma la producción de BLEEs en estas cepas. Además, con la excepción de 7 aislados, todos ellos muestran un descenso en los valores de CMI para CTX vs. CTX/CA, lo que supone otro argumento para confirmar estas cepas como productoras de BLEE.

En relación con los antibióticos combinados con inhibidores de beta-lactamasas, el mayor porcentaje de resistencia se detecta frente a la combinación AMS con un 89,2 % de aislados resistentes, seguido de AMC (57,7 %) y de TZP (24,6 %). La combinación con sulfonamida (SXT) muestra una resistencia del 65,4 %, similar a la reflejada en un estudio reciente realizado en Francia (67,7 %) (Gibold y col., 2014).

Destaca una elevada susceptibilidad frente a carbapenems (ETP, MER, IMP). Todos los aislados son sensibles a este grupo de antibióticos excepto cuatro cepas, tres de las cuales muestran susceptibilidad intermedia a ETP y la cuarta resistencia total frente a MER. Las carbapenemasas se están convirtiendo en un problema endémico en algunos países (Nordman y col., 2011) y numerosos estudios alertan de la emergencia de resistencias debidas a enterobacterias productoras de estas enzimas a nivel mundial (Pantel y col., 2014; Rodríguez-Villalobos y Glupczynski, 2014;

Pannaraj y col., 2015). Por ello, la detección de resistencias frente a carbapenems resulta crítica para determinar el tratamiento más adecuado ante infecciones debidas a E-BLEEs, ya que se está limitando el rango de antibióticos disponibles. A pesar de la emergencia de estas nuevas resistencias, en el presente estudio se muestra que de momento los carbapenems siguen siendo una alternativa viable para el tratamiento de infecciones por *E. coli* productores de BLEEs.

En relación con los monobactams se ha observado una resistencia del 96,2 % frente a AZT, mientras que la resistencia frente a aminoglucósidos es más reducida (8,5 % AK; 23,1 % GM; 37,7 % TO). Estos resultados están en concordancia con estudios realizados en cepas de *E. coli* productoras de BLEEs en España (Arnan y col., 2011) en los que se observaron tasas de resistencia del 30 % frente a GM y del 33,3 % frente a TO. Asimismo, un estudio realizado en Francia con cepas de *E. coli* productoras de BLEEs mostró tasas de resistencia del 30 % frente a aminoglucósidos (Gibold y col., 2014).

Respecto a las quinolonas (LV, CIP, MXF), los porcentajes de resistencia son superiores al 70 %, lo que está en concordancia con estudios realizados en otros hospitales españoles (Arnan y col., 2011). Además, varios autores señalan la presencia en E-BLEEs de resistencias combinadas con fluoroquinolonas, dato que explicaría las altas tasas de resistencia a estos antibióticos observadas en nuestro estudio; así como la resistencia asociada con SXT, aminoglucósidos y TET (Paterson y Bonomo, 2005; Rodríguez-Baño y Pascual, 2008; Rodríguez-Baño y col., 2010).

Por otro lado, se observan diferencias significativas ($p=0,018$) dentro del grupo de las tetraciclinas, con una alta resistencia frente a TET (76,1 %) y baja frente a TIG (2,3 %), por lo que sería una buena opción terapéutica. De igual modo, las bajas tasas de resistencias observadas frente a otros grupos de antibióticos como COL, FOT, FM y CHL (27,7 %, 4,6 %, 10,8 % y 13,1 %, respectivamente), hace que se perfilen como alternativa en el tratamiento de infecciones debidas a *E. coli* - BLEEs.

Respecto a los patrones de susceptibilidad antibiótica observados, se han encontrado 111 perfiles distintos en las 130 cepas aisladas, hecho que demuestra la elevada diversidad de cepas presentes en los ambientes hospitalarios.

Finalmente, cabe señalar que el 86,2 % de las cepas fueron multirresistentes y en el 43,1 % se detectó una resistencia combinada frente a β -lactámicos, TET, SXT y LV. En un estudio realizado en Francia en pacientes hospitalizados se muestra también una multirresistencia elevada (68,2 %) (Gibold y col., 2014). Por el contrario, estas tasas disminuyen en portadores sanos, según un estudio realizado en niños españoles que mostró en cepas de *E. coli* productoras de BLEEs una tasa de multirresistencia a tres o más clases de antibióticos del 52,4 % y una resistencia del 20,6 % frente a TET, SXT y LV (Fernández-Reyes y col., 2014). Por tanto, la presión selectiva de los tratamientos antibióticos utilizados en el ámbito hospitalario mantiene las tasas de resistencia por encima de las observadas en la comunidad.

Respecto a las recomendaciones de tratamiento señaladas por otros autores, los antibióticos FOX, carbapenems y las combinaciones de AMC o TZP parecen ser los más efectivos contra infecciones causadas por estos microorganismos (Paterson y Bonomo, 2005; Rodríguez-Baño y Pascual, 2008). A la luz de los valores de CMI obtenidos, las combinaciones de CTX/CA, AMC, AMS y SXT no serían efectivas, ya que los elevados valores que presentan impedirían que se alcanzaran concentraciones terapéuticas eficaces *in vivo*. En cambio, la combinación de TZP, con valores más reducidos tendría un efecto más eficaz. Por otro lado, los valores de CMI obtenidos para carbapenems, FOX, AK, TIG, COL, FOT confirman que serían una opción terapéutica válida para el tratamiento de infecciones por estos microorganismos. Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio confirman en parte las recomendaciones terapéuticas ofrecidas por los mencionados autores.

Atendiendo a las resistencias a distintos grupos de antibióticos utilizados habitualmente en clínica, varios estudios han señalado la existencia de una relación

entre el tratamiento con cefalosporinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y SXT y la adquisición de resistencias a β -lactámicos (Rodríguez-Baño y col., 2004). Además, las opciones de tratamiento de las infecciones causadas por *E. coli* productoras de BLEEs son limitadas.

Por lo tanto, en el tratamiento de infecciones por estos microorganismos, es necesario conocer el patrón de sensibilidad de la bacteria así como los antecedentes y el uso previo de antibióticos en el paciente. En el caso de infecciones urinarias, se recomienda diversificar el tratamiento para evitar el desarrollo de resistencias, por lo que se recomienda la FOT y la FM para la cistitis, la TO o AMC en el tratamiento de pielonefritis y carbapenems o TZP en bacteriemias (Gómez y col., 2005).

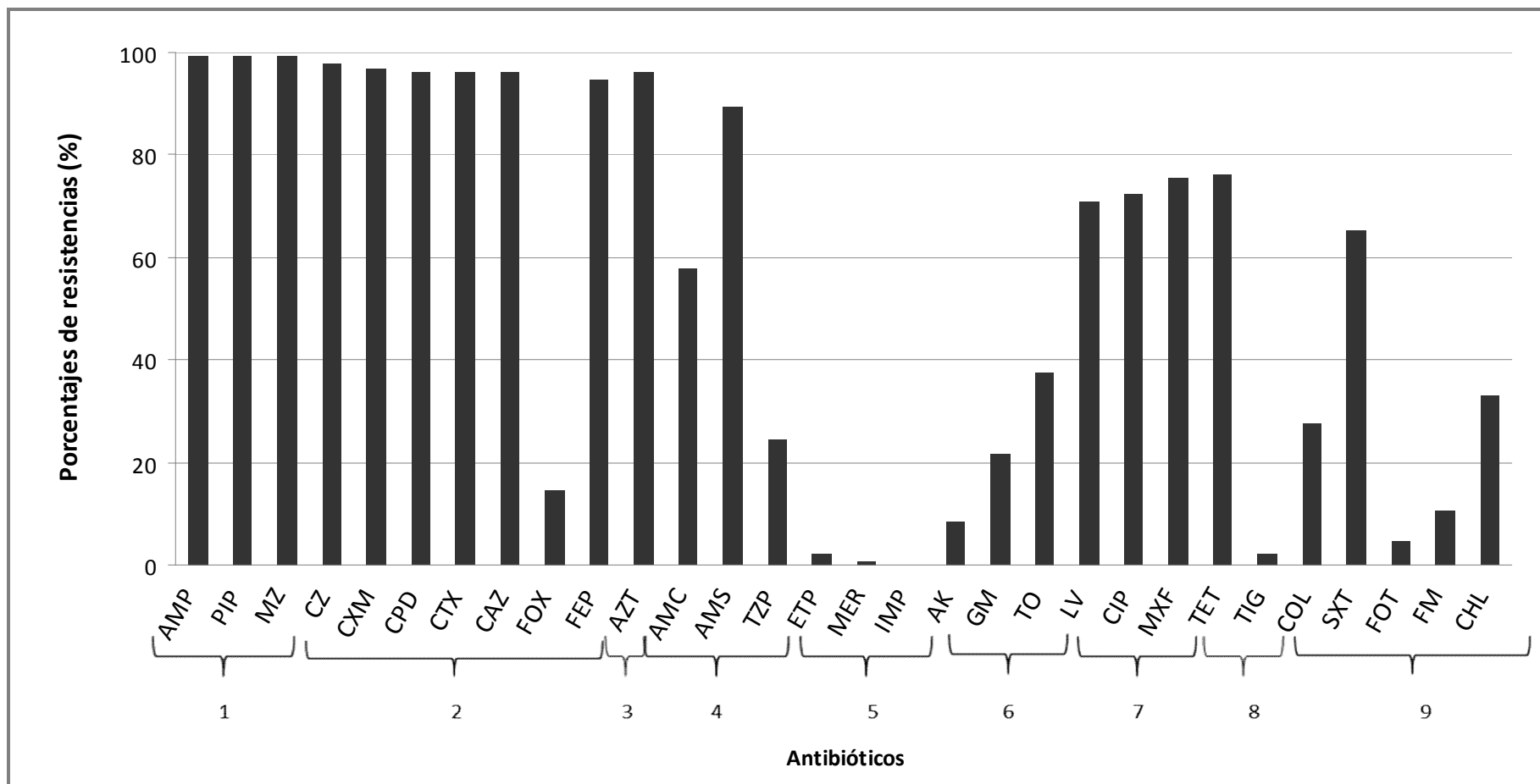


Figura 6.1. Porcentajes de resistencia a los antibióticos estudiados en cepas aisladas en muestras clínicas. 1: penicilinas; 2: cefalosporinas; 3: monobactams; 4: Inhibidores de β -lactamasas; 5: carbapenems; 6: aminoglucósidos; 7: quinolonas; 8: tetraciclinas; 9: otros.

6.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LAS RESISTENCIAS

De las 130 cepas de *E. coli* sometidas a estudio el 89,2 % fueron confirmadas como productoras de BLEEs mediante técnicas de PCR y secuenciación. Las cepas en las que no se han identificado genes pertenecientes a las familias estudiadas (n=14), podrían estar expresando genes de tipo *minor* BLEE (n=6) además 3 cepas expresan en solitario *bla*_{OXA-1} y 5 cepas *bla*_{TEM-1}. Respecto a las familias de enzimas BLEEs detectadas, se ha observado una predominancia de CTX-M (50 %) seguida de TEM (31 %), OXA (11,5 %) y SHV (7,5 %).

Considerando los genes detectados, *bla*_{CTXM-15} (23 %) es el más prevalente, seguido de *bla*_{CTXM-14} (19 %) (Figura 6.2). Además, se ha detectado el gen *bla*_{CTX-M-1} (7,5 %) y *bla*_{CTX-M-3} que está presente solo en una cepa (0,8 %). Como hemos señalado anteriormente, solo se han considerado los genes *bla*_{OXA-1} y *bla*_{TEM-1} cuando están asociados a enzimas BLEEs.

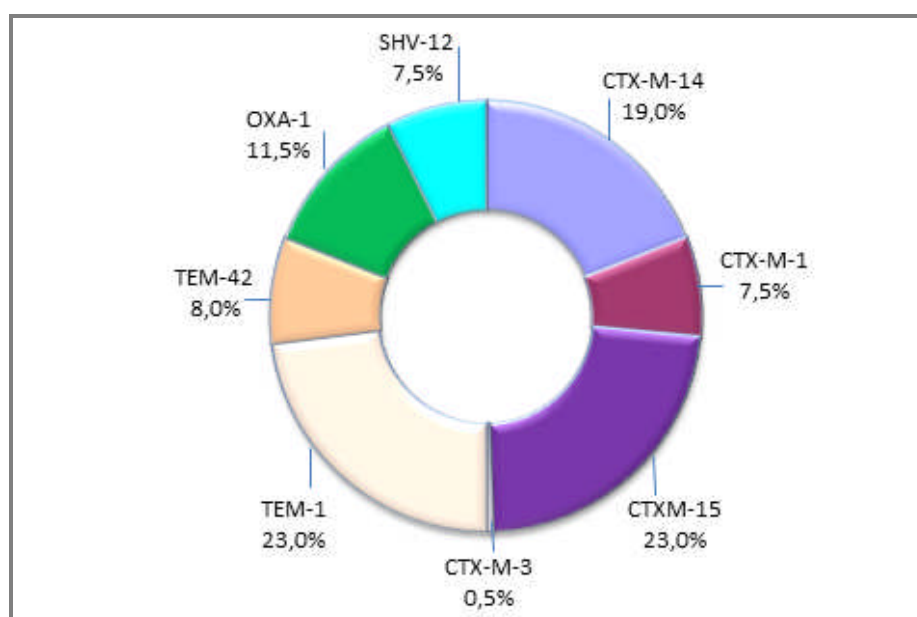


Figura 6.2. Genes de β-lactamasas detectados en las cepas aisladas en muestras clínicas.

En concordancia con nuestro estudio, CTX-M-15 y CTX-M-14 son también las enzimas más frecuentemente encontradas en Europa (Livermore y col., 2007). Un estudio multicéntrico realizado en España, destacó la prevalencia de CTX-M-9 (27,3 %) seguida de SHV-12 (23,9 %) y CTX-M-14 (16,7 %) entre cepas de *E. coli* productoras de BLEEs (Hernández y col., 2005). Asimismo, varios estudios señalan la alta prevalencia de CTX-M-15 con porcentajes en torno al 30 % (Oteo y col., 2006; Valverde y col., 2004).

Por otro lado, Gibold y colaboradores (2014) encontraron en Francia prevalencias de CTX-M-14 (25,2 %) y CTX-M-15 (24,4 %) en cepas aisladas de muestras de orina que no difieren significativamente ($p=0,035$) de las detectadas en el presente estudio (19 % y 23 %, respectivamente), debido probablemente a la cercanía geográfica y al movimiento de personas que se da entre Francia y España. Sin embargo, en nuestro estudio no se han detectado cepas de *E. coli* productoras de *bla*_{CTX-M-8}, tal y como describen Eller y colaboradores en Alemania (2014). Estos autores postulan una posible introducción y transmisión de estas cepas a través de movimientos migratorios de personas y alimentos. Esta hipótesis ha sido comprobada posteriormente por Lübbert y colaboradores en un estudio en el que se ha observado la presencia de bacterias BLEE frecuentes en Asia en viajeros alemanes que habían visitado países de dicho continente (Lübbert y col., 2015).

Respecto al gen *bla*_{SHV-12} se detectó en 15 aislados (7,5 %) y en el 80 % de los casos estaba combinado con genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}. Gibold y colaboradores (2014) describieron prevalencias similares de enzimas TEM (12,3 %), mientras que las enzimas de tipo SHV presentan una prevalencia del 2,8 %, mucho menor que la obtenida en nuestro estudio.

La expresión del gen *bla*_{OXA-1} se observó en 23 aislados (11,5 %) y en 20 de ellos en combinación con genes *bla*_{CTX-M}. Igualmente, un estudio previo realizado en

España, muestra la presencia de cepas de *E. coli* portadoras de β -lactamasas de tipo OXA combinadas con CTX-M y con TEM (Arnan y col., 2011).

Tabla 6.3. Genotipos *bla*_{BLEE} en las cepas de *E. coli* productoras de BLEEs aisladas en muestras clínicas.

Tipo genotipo	No. BLEEs (%)
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	11 (8,5)
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-1}	18 (13,8)
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-12}	1 (0,8)
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-42}	6 (4,6)
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-42} + <i>bla</i> _{OXA-1}	1 (0,8)
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{OXA-1}	1 (0,8)
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{CTX-M-1}	1 (0,8)
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-42}	1 (0,8)
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	2 (1,5)
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1}	2 (1,5)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	5 (3,8)
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-1}	4 (3,1)
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{TEM-42}	3 (2,3)
<i>bla</i> _{CTX-M-1} + <i>bla</i> _{SHV-12}	1 (0,8)
<i>bla</i> _{CTX-M-3} + <i>bla</i> _{OXA-1}	1 (0,8)
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	9 (6,9)
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1}	12 (9,2)
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-12}	2 (1,5)
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{OXA-1}	2 (1,5)
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-42}	2 (1,5)
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-42} + <i>bla</i> _{OXA-1}	1 (0,8)
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{SHV-12}	1 (0,8)
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-1}	17 (13,1)
<i>bla</i> _{TEM-42}	3 (2,3)
<i>bla</i> _{SHV-12}	3 (2,3)
<i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{TEM-1}	6 (4,6)
Otros genes	14(10,8)
TOTAL	130

6.4. CARACTERIZACIÓN DE OTRAS β -LACTAMASAS

Respecto a las cepas sospechosas de producir **β -lactamasas de tipo AmpC** (n=7) se colocaron discos de cefoxitina y cefotetán y se midieron los halos obtenidos. Solo una cepa se comportó como posible productora de AmpC; sin embargo al realizar la PCR para detectar los genes implicados (Pérez-Pérez y Hanson, 2002) no se obtuvieron bandas para ninguno de los genes estudiados. Asimismo, el kit de Rosco Diagnostica (Dinamarca) confirmó la presencia de una BLEE combinada con pérdida de porinas en esta cepa.

Con este mismo kit se investigó la presencia **carbapenemasas de tipo KPC, MBL y OXA-48** en las cepas que presentaron resistencia total o intermedia a carbapenems (n=4). Sin embargo, en ninguno de los aislados se detectó la presencia de estas carbapenemasas, sino que se confirma la presencia de BLEE con alteraciones en las porinas de la membrana.

Por tanto, se confirma la presencia de cepas *E. coli* productoras de BLEE que combinan otros mecanismos de resistencia a antibióticos, como por ejemplo la pérdida de porinas de membrana. Sería necesario confirmar por otros métodos (SDS-PAGE) la pérdida de porinas en estas cepas. Hay estudios que señalan la emergencia de subpoblaciones de *E. coli* productoras de BLEEs con alteraciones en las porinas tras terapia con meropenem (Webster y col., 2010), así como tras ensayos de exposición *in vitro* a ertapenem (Tängdén y col., 2013). Por ello, se recomienda un uso apropiado de carbapenems para minimizar el riesgo de adquisición de resistencias a este grupo de antibióticos.

CAPÍTULO 7.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ESTUDIO FILOGENÉTICO
DE CEPAS DE *E. coli* PRODUCTORAS DE BLEEs**

7.1. INTRODUCCIÓN

Para caracterizar la diversidad filogenética de las cepas de *E. coli* aisladas en el presente estudio, en primer lugar se clasificaron las cepas en los cuatro grupos filogenéticos descritos por Clermont y colaboradores (2000). A pesar de la existencia de una clasificación más reciente, los nuevos grupos añadidos por Clermont y colaboradores (2013) son menos frecuentes y el estudio filogenético estaba iniciado cuando se publicó el artículo mencionado, por lo que la clasificación del presente estudio se basa en el artículo publicado en el año 2000.

A continuación se realizó la técnica del MLST para estudiar la estructura poblacional de la colección de cepas de *E. coli* obtenida en este estudio. De esta manera se caracterizaron los aislados detectando los polimorfismos de los siete genes estudiados (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *recA*, *purA*) por secuenciación. Se genera un perfil alélico de cada cepa y cada perfil define una Secuencia Tipo (ST). Las STs que comparten al menos 5 de los 7 alelos se agruparon en Complejos Clonales (CCs).

En resumen, el análisis de la estructura poblacional de las bacterias aisladas en este estudio, permite la identificación de los diferentes complejos clonales diseminados en distintos nichos, estudiar la asociación de estos complejos con la producción de BLEEs y analizar si en cada uno de los nichos estudiados predominan unas STs u otras.

7.2. CLASIFICACIÓN DE CEPAS DE *E. coli* PRODUCTORAS DE BLEEs SEGÚN GRUPOS FILOGENÉTICOS

Durante el periodo de estudio se aislaron un total de 453 cepas de *E. coli* portadoras de genes *bla*_{BLEE} procedentes de alimentos (n=150), aguas efluentes de EDAR (n=117), aguas de ríos (n=26), suelos de granjas (n=43), piensos (n=5) y

muestras clínicas (n=112). Estos aislados fueron clasificados en los cuatro **grupos filogenéticos** A (44,8 %), B1 (22,5 %), B2 (13,6 %) y D (19,2 %), aunque la distribución varía según el origen de las cepas (Figura 7.1).

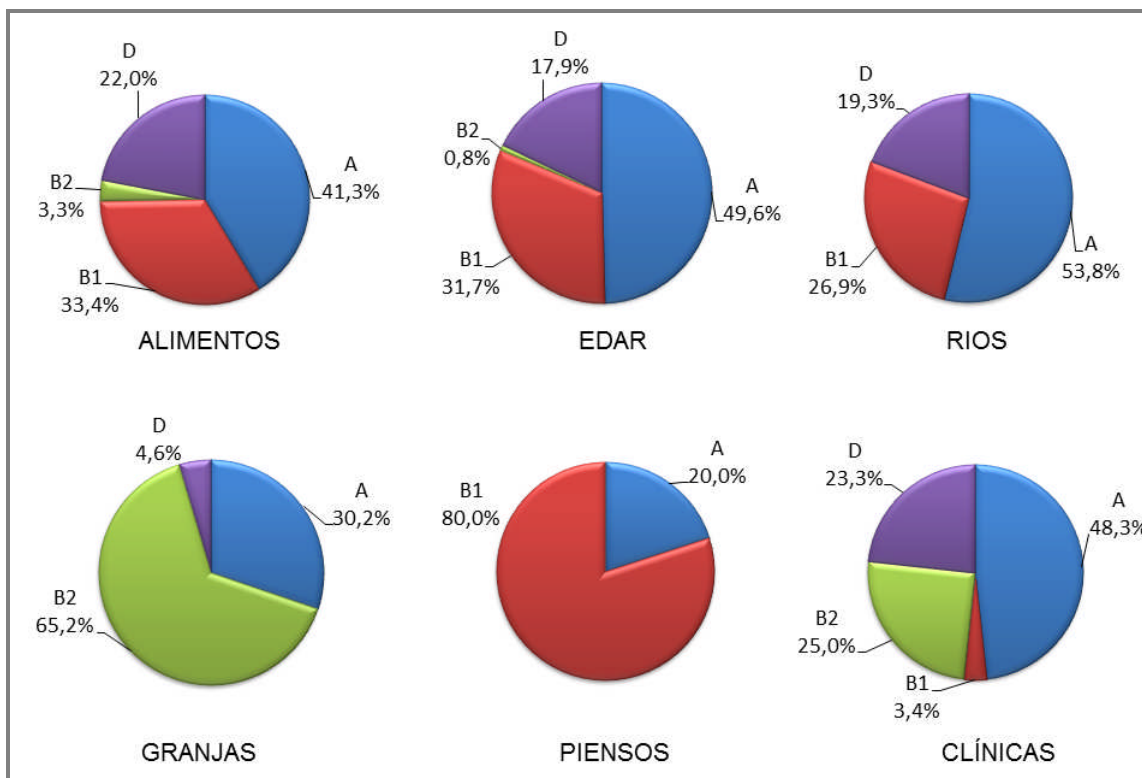


Figura 7.1 Distribución de las cepas de *E. coli* en grupos filogenéticos según su origen.

Así, las cepas procedentes de alimentos, aguas y muestras clínicas pertenecen principalmente al filogrupo A, mientras que las cepas aisladas de piensos de animales pertenecen en un 80 % al filogrupo B1 y un 20 % al grupo A. Asimismo, las cepas aisladas a partir de muestras de suelos de granjas pertenecen en su mayoría al filogrupo B2. El filogrupo A es el único que se ha encontrado en todos los entornos estudiados.

Estos resultados refuerzan los estudios que asocian los filogrupos A y B1 a cepas comensales y aisladas en animales de granja (Gonçalves y col., 2010; Jakobsen y col., 2010), señalando a estos nichos como reservorios de resistencias a cefalosporinas. No obstante, hemos observado una predominancia de este filogrupo A en cepas aisladas de muestras clínicas, lo que sugiere que se está produciendo una

transmisión de BLEEs entre cepas de diferentes nichos. Asimismo, la prevalencia del filogrupo A en aguas de EDAR y ríos señala una posible vía de diseminación de estas cepas mediante los sistemas acuáticos llegando a través de ellos a la agricultura y la ganadería. Por otro lado, hemos observado que el filogrupo B1 está presente en alimentos, aguas y piensos principalmente y en menor medida en cepas de origen clínico. A pesar de que el filogrupo B1 se ha descrito en animales de granja destaca el hecho de que no se ha detectado ninguna cepa perteneciente a él en suelos de granjas lo que nos lleva a pensar en que se está produciendo un desplazamiento de estas cepas comensales por las cepas pertenecientes al B2, que han sido caracterizadas con un gran número de factores de virulencia (Jaureguy y col., 2008). Las cepas más virulentas que causan infecciones extraintestinales en el hombre pertenecen a los filogrupos B2 y D (Coque y col., 2008b; Gordon 2005).

En nuestro estudio se han detectado cepas productoras de BLEEs pertenecientes al filogrupo B2 en granjas (65,2 %), muestras clínicas (25 %), alimentos (3,3 %) y aguas de EDAR (0,8 %). En cepas de origen clínico ya se había demostrado la prevalencia de este filogrupo anteriormente (Coque y col., 2008b), pero el hecho de encontrar una alta prevalencia de estas cepas en granjas indica que en los animales de producción se puede estar produciendo una selección de cepas más virulentas por la presión selectiva ejercida por los tratamientos antibióticos en ganadería. Además de constatar la presencia del filogrupo B2 en cepas aisladas en granjas de pollos (n=21), cerdo (n=6) y ternera (n=1), se han aislado cepas de este mismo filogrupo en carne de pollo (n=2), cerdo (n=1) y ternera (n=1). De esta manera vemos que la prevalencia del filogrupo B2 es especialmente alta en el entorno de producción avícola y su presencia en carnes de pollo refleja la situación que se da en las granjas. Además, Dierikx y colaboradores (2013), detectaron *E. coli* productoras de BLEEs en pollos y trabajadores de granjas de pollos en Alemania, lo que sugiere una transmisión “ocupacional” por contacto directo con el animal.

Del mismo modo, los porcentajes del filogrupo D en alimentos (22 %), aguas de EDAR (17,9 %) y ríos (19,2 %), granjas (4,5 %) y clínica (23,3 %) demuestran que la presencia de este grupo no se restringe solo al ambiente clínico y advierte de la posibilidad de transmitir estas resistencias al hombre a través de la cadena alimentaria. Además, la elevada presencia en el entorno acuático (aguas EDAR y ríos) contribuiría a la diseminación del filogrupo D a otros nichos ecológicos.

En la distribución de grupos filogenéticos entre cepas aisladas de muestras de **aguas de EDAR y ríos** se observa una mayor prevalencia de los filogrupos A y B1, no habiéndose encontrado diferencias significativas en las prevalencias en ambos entornos. En concordancia con nuestros datos, varios estudios realizados en España señalan la baja prevalencia de cepas de *E. coli* pertenecientes al filogrupo B2 en aguas residuales (Sabaté y col., 2008; García-Aljaro y col., 2009).

La distribución en filogrupos observada en las **muestras clínicas** procedentes de pacientes ingresados es similar a la encontrada en un estudio realizado en niños sanos en el norte de España, con una mayor prevalencia de los filogrupos A (50 %) y D (38,2 %) y menor en el caso de B1 y B2 (5,9 %) (Fernández-Reyes y col., 2014).

Por otro lado, se analizó la distribución de los principales **genes bla_{BLEE}** encontrados en este estudio en los cuatro grupos filogenéticos (Figura 7.2). Las prevalencias totales de los genes analizados fueron las siguientes: *bla_{CTX-M-14}*, (34,6 %), *bla_{CTX-M-1}* (22,6 %), *bla_{SHV-12}* (19,5 %), *bla_{TEM-42}* (15,8 %) y *bla_{CTX-M-15}* (14,9 %).

De forma global, se puede observar la diseminación de todos los tipos de BLEEs por los 4 grupos filogenéticos, debida posiblemente al intercambio de elementos génicos con la consiguiente transmisión de BLEEs entre las cepas más virulentas (pertenecientes a B2 y D) y las comensales (grupo A y B1). Por otro lado, destaca la predominancia del filogrupo A en los 5 tipos de BLEEs analizados.

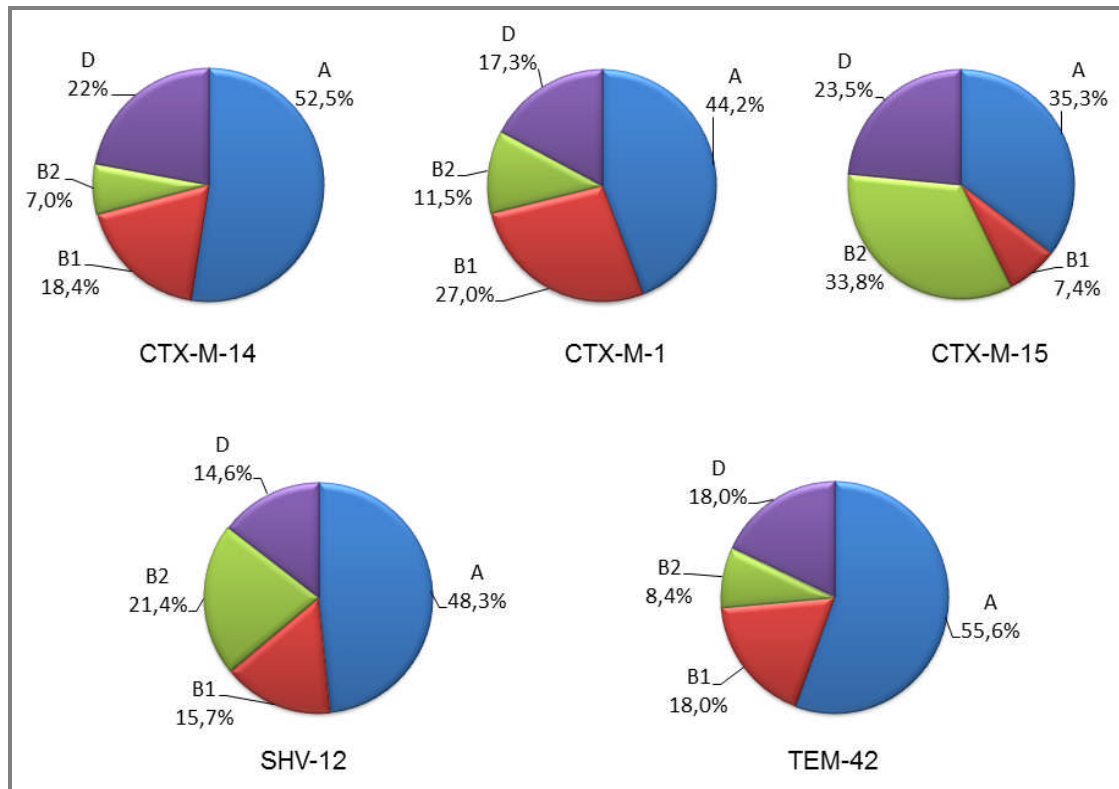


Figura 7.2. Distribución de las cepas productoras de BLEEs más frecuentes según los grupos filogenéticos y porcentajes asociados.

Respecto a las BLEEs de tipo CTX-M, se observó que cepas de *E. coli* productoras de BLEEs de tipo CTX-M-14 y CTX-M-1 pertenecían mayoritariamente al filogrupo A, mientras que aquellas cepas productoras de CTX-M-15 pertenecían tanto al filogrupo A como al B2.

Rodríguez-Baño y colaboradores comprobaron que cepas productoras de BLEEs del grupo CTX-M-1 (principalmente $bla_{CTX-M-15}$) se encontraban en el filogrupo B2 y cepas del grupo CTX-M-9 (como $bla_{CTX-M-14}$) pertenecían a los filogrupos A, B1 y D (Rodríguez-Baño y col., 2012). En consonancia con estas observaciones, en nuestro estudio también pertenecen al filogrupo A, el 54 % de las cepas productoras de CTX-M-14 y el 44% de las productoras de CTX-M-1.

Por otro lado, el estudio de Leistner y col. (2014) observó una asociación entre CTX-M-15 con B2 y CTX-M-1 con A, asociación que también ha sido constatada en nuestro estudio.

Respecto a las cepas aisladas en **alimentos**, las productoras de CTX-M-1 pertenecen principalmente a los filogrupos A y B1 y no se observan diferencias significativas entre ambas prevalencias ($p > 0,05$). También pertenecen al filogrupo A la mayoría de cepas productoras de CTX-M-14, la única cepa CTX-M-15 y las cepas productoras de SHV-12 y TEM 42. De igual forma, Belmar-Campos y colaboradores (2014) encontraron una mayor prevalencia de CTX-M-1 en carne de pollo (69 %) sobre SHV-12 (18 %), CTX-M-1 (6 %) y TEM-52 (3 %).

Considerando los **ambientes acuáticos**, la mayoría de las cepas productoras de CTX-M-14 (62,8 %), CTX-M-15 (53,9 %), SHV-12 (82,4 %) y TEM-42 (68,4 %) pertenecen al filogrupo A. Por el contrario, Bajaj y colaboradores (2015) describieron que la mayoría de cepas de *E. coli* productoras de BLEEs aisladas en ríos producían CTX-M-15 y pertenecían al filogrupo D (50 %). Sin embargo, otros estudios destacan la asociación del fenotipo CTX-M-15 con el grupo filogenético B2 y D (Pitout y col, 2005; Coque y col. 2008; Dolejska, 2011). En nuestro estudio la única cepa aislada del filogrupo B2 (agua EDAR) produce una BLEE de tipo CTX-M-15.

En el caso de las cepas aisladas de **suelos de granjas**, hemos encontrado el gen $bla_{CTX-M-1}$ y el gen bla_{SHV-12} preferentemente en cepas pertenecientes al filogrupo B2, mientras que el gen $bla_{CTX-M-15}$ y el gen bla_{TEM-42} se localizan en cepas del filogrupo A y el gen $bla_{CTX-M-14}$ en cepas de los filogrupos A y B2 por igual. Por el contrario, Valentin y colaboradores (2014) encontraron en granjas de pollo, cerdo y ternera una mayor prevalencia de CTX-M-1 (63,3 %), seguida de CTX-M-15 (17,7 %) y CTX-M-14 (5,3 %). Además la mayoría de las cepas productoras de CTX-M-1 se encontraron en el filogrupo A y B1, mientras que al igual que en nuestro estudio CTX-M-15 se detectó en el filogrupo A.

Por último, las cepas aisladas de **muestras clínicas** productoras de CTX-M-15 pertenecen principalmente al filogrupo B2 (47,8 %) y D (25 %) mientras que las productoras de CTX-M-14 pertenecen preferentemente al filogrupo A (68,4 %). Chandramohan y Revell (2012) señalan la prevalencia de *E. coli* productoras de CTX-M-15 en muestras clínicas en aislados de los filogrupos A, B2 y D en un estudio realizado en Estados Unidos, así como la presencia del gen *bla*_{CTX-M-14} en cepas pertenecientes a los filogrupos D y B2. No obstante, en consonancia con nuestro estudio, otro trabajo anterior que incluyó Europa, Norteamérica y Asia destacó que la mayoría de los aislados productores de *bla*_{CTX-M-15} pertenecían al filogrupo B2 (50 %) y D (25 %) (Coque y col., 2008).

7.3. ANALISIS DE COMPLEJOS CLONALES Y SECUENCIAS TIPO MEDIANTE MLST

Para comparar la diversidad genotípica de las cepas de *E. coli* productoras de BLEEs se analizó la composición clonal de la población de cepas aisladas en el presente estudio y las STs detectadas. El análisis de los datos del MLST mediante el programa BioNumerics v7.5. (Applied Maths), permitió analizar de una forma mucho más visual los clones y ST obtenidos. Las líneas de unión entre STs indican las relaciones filogenéticas representadas en negrita, línea continua, guiones o punteada, según el número de alelos discordantes entre perfiles (1, 2, 3, y 4 o más respectivamente)

En la Figura 7.3 se identifican las ST atendiendo al tipo de muestra en la que se ha aislado cada cepa. Se puede observar que algunas STs como ST48, ST88, ST611, ST648... (indicadas con flechas), aparecen en varios nichos diferentes lo que refuerza la hipótesis de diseminación de STs por los distintos ambientes. Por otro lado, en el caso de las cepas de origen clínico se puede observar en la parte inferior izquierda de la figura, una agrupación de STs relacionadas que no aparecen en el

resto de nichos (ST3329, ST838, ST3878...). Con estos datos se refuerza la idea de la dispersión de cepas de *E. coli* productoras de BLEEs que se ha ido desarrollando en este trabajo.

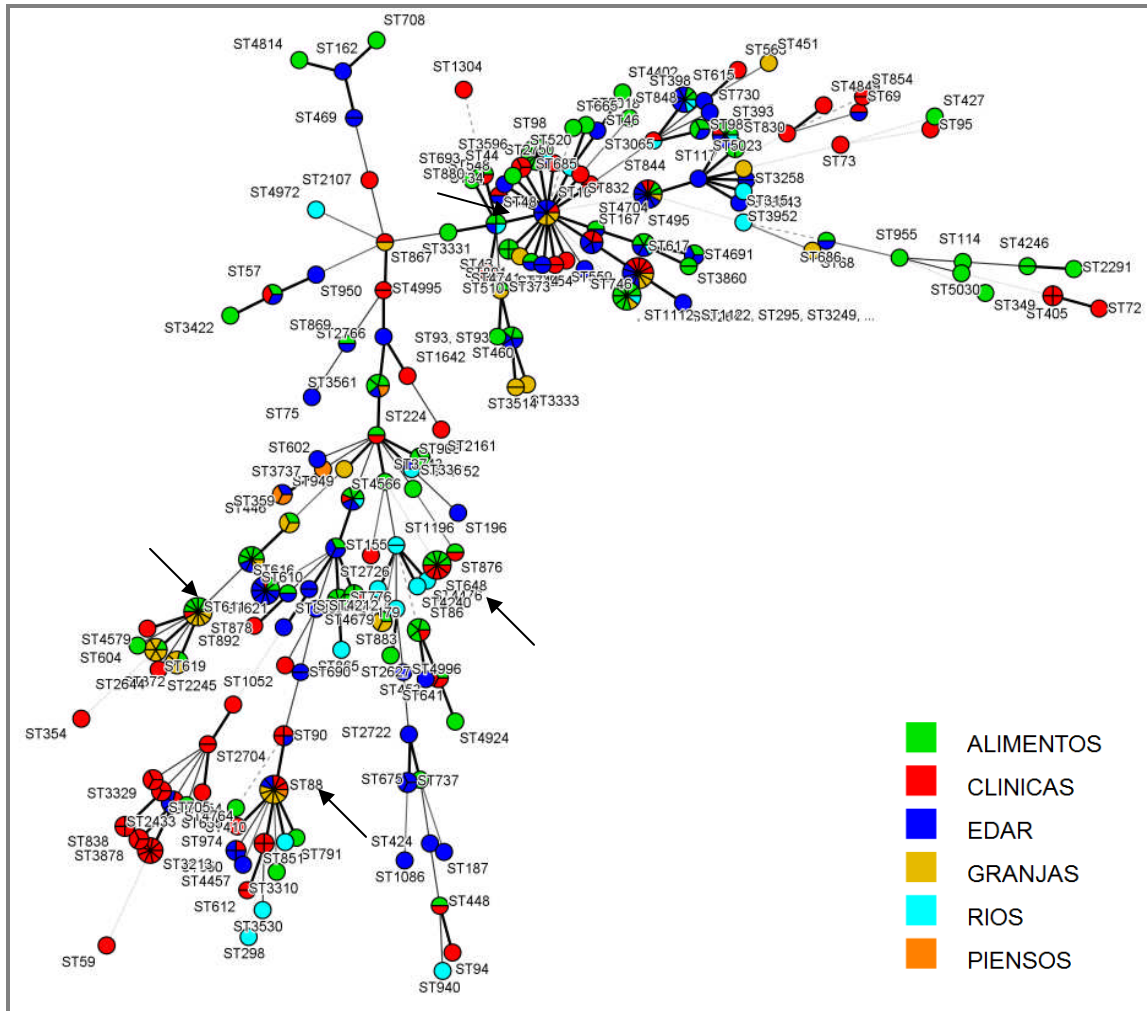


Figura 7.3. Composición clonal por MST (*Minimun spanning tree*) de las cepas de *E. coli* productoras de BLEES según la procedencia de la muestra. Cada círculo corresponde a una ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el origen de la muestra según se indica en la leyenda.

Considerando los CC observados, se han detectado 26 CCs diferentes, siendo el más presente en este estudio CC10 (13,3 %), seguido de CC23 (5,9%), CC131 (5,9 %) y CC155 (2,8 %). Estos complejos clonales han sido descritos previamente y se encuentran recogidos en la web del MLST (<http://mlst.ucc.ie>).

En la Figura 7.4 se muestra el mapa general de los STs de cada cepa aislada considerando el tipo de BLEE que producen. Las cepas de *E. coli* aisladas (n=453) se han agrupado en 177 STs distintas, siendo las más frecuentes ST98 (CC10, grupo A) con 17 aislados, ST617 (CC10) con 13 aislados, ST88 (CC23, grupo A) con 12 aislados y ST648 (CC648, grupo D) con 11 aislados. Cabe señalar que ninguna de las cepas ha sido identificada como ST131 (grupo B2) aunque 27 de ellas que incluyen aislamientos procedentes de alimentos (n=1) y clínicas (n=26) pertenecen al CC131 (9 STs distintas).

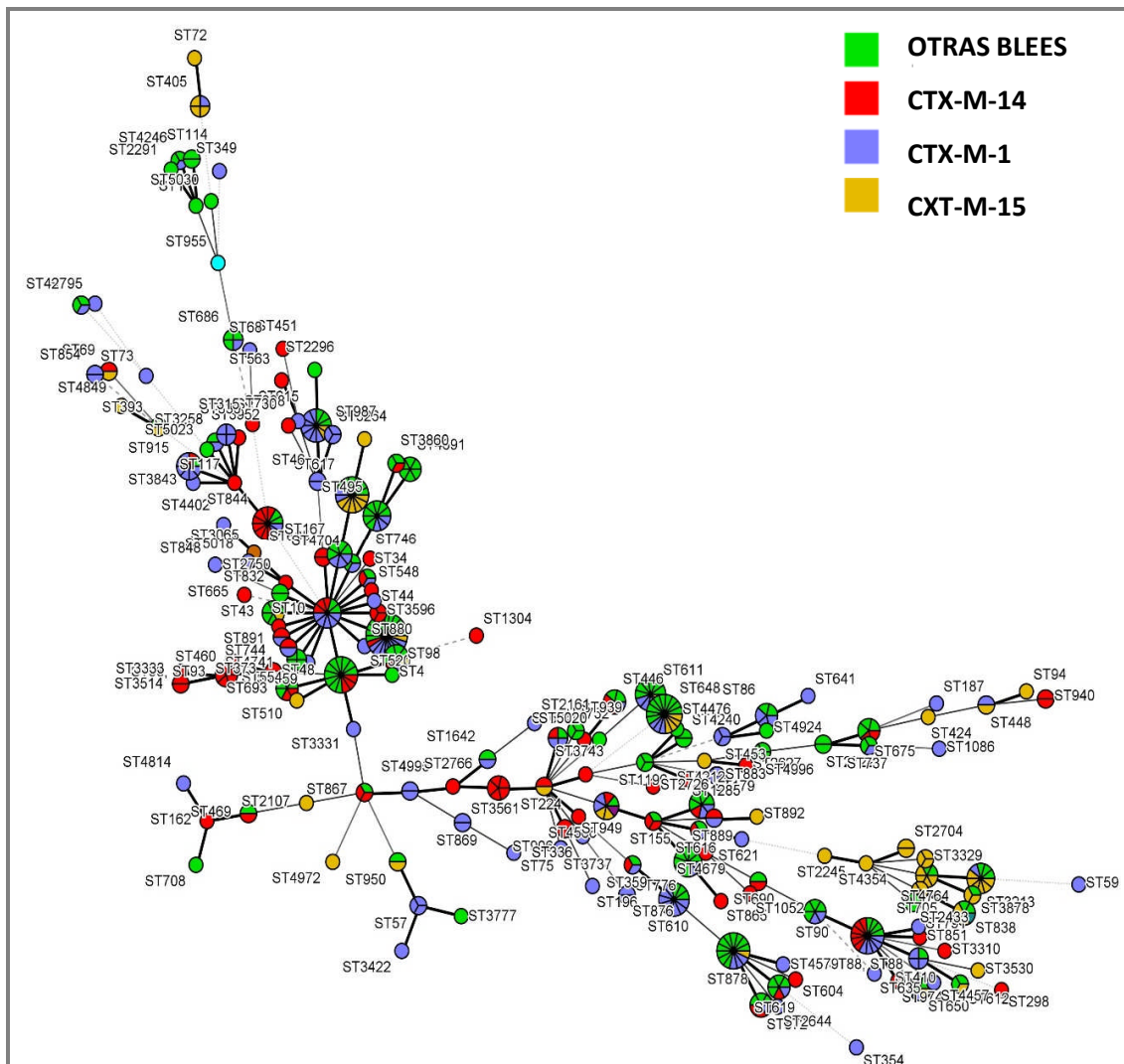


Figura 7.4. Composición clonal (MST) de las cepas de *E. coli* productoras de BLEES. Cada círculo corresponde a una ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el tipo de BLEE expresada por la cepa como se indica en la leyenda.

7.3.1. STS Y CCS DE CEPAS PROCEDENTES DE ALIMENTOS

En cepas de *E. coli* aisladas en alimentos se han observado 14 CCs diferentes que agrupan a 55 cepas, mientras que el resto de cepas no se asocian a ningún complejo conocido (Figura 7.5).

El ST más prevalente ha sido ST98 (CC10, filogrupo A) presente en 13 cepas, seguido del ST776 (n=8), ST878 (n=6), y ST610 (n=5) (Figura 7.4). En carne de pollo, destaca la presencia del ST98 (62 %) y también se ha detectado el ST48 (CC10, grupo A) en dos cepas productoras de SHV-12. El hecho de que Belmar-Campos y colaboradores (2014) detectaran esta misma ST48 entre las cepas aisladas de pollo productoras de CTX-M-1, indica una posible transmisión de elementos génicos. Los ST648, ST776, ST878 y ST98 se han observado en los tres tipos de cárnicos frescos estudiados, lo que indica su dispersión en estos productos. Además, se ha detectado el ST610 en cepas productoras de CTX-M-14 aisladas en carne de pollo y ternera.

Por otro lado, en nuestro estudio se han aislado en carne de pollo, cerdo y ternera cinco cepas pertenecientes a la ST648 (CC648, filogrupo D), productoras de CTX-M-14 (n=3), de CTX-M-14 combinada con TEM-42 y SHV-12 (n=1) y una productora de SHV-5. Asimismo, Belmar-Campos y colaboradores (2014) observaron esta ST648 asociada a cepas productoras de CTX-M-1 aisladas en carne de pollo. También observaron otras STs asociadas a la producción de CTX-M-1 (ST131, ST93, ST205, ST10, ST48), asociadas a SHV-12 (ST38, ST58) y a TEM-52 (ST69). Igualmente, estudios previos han localizado la ST648 en cepas productoras de BLEEs aisladas en humanos, ganado aviar en España y aves salvajes en Alemania (Cortes y col., 2010; Nicolas-Chanoine y col., 2008; Guenther y col., 2010). Estos datos apuntan a una diseminación de esta ST en Europa y a través de distintos nichos, lo que se ve demostrado en nuestro estudio.

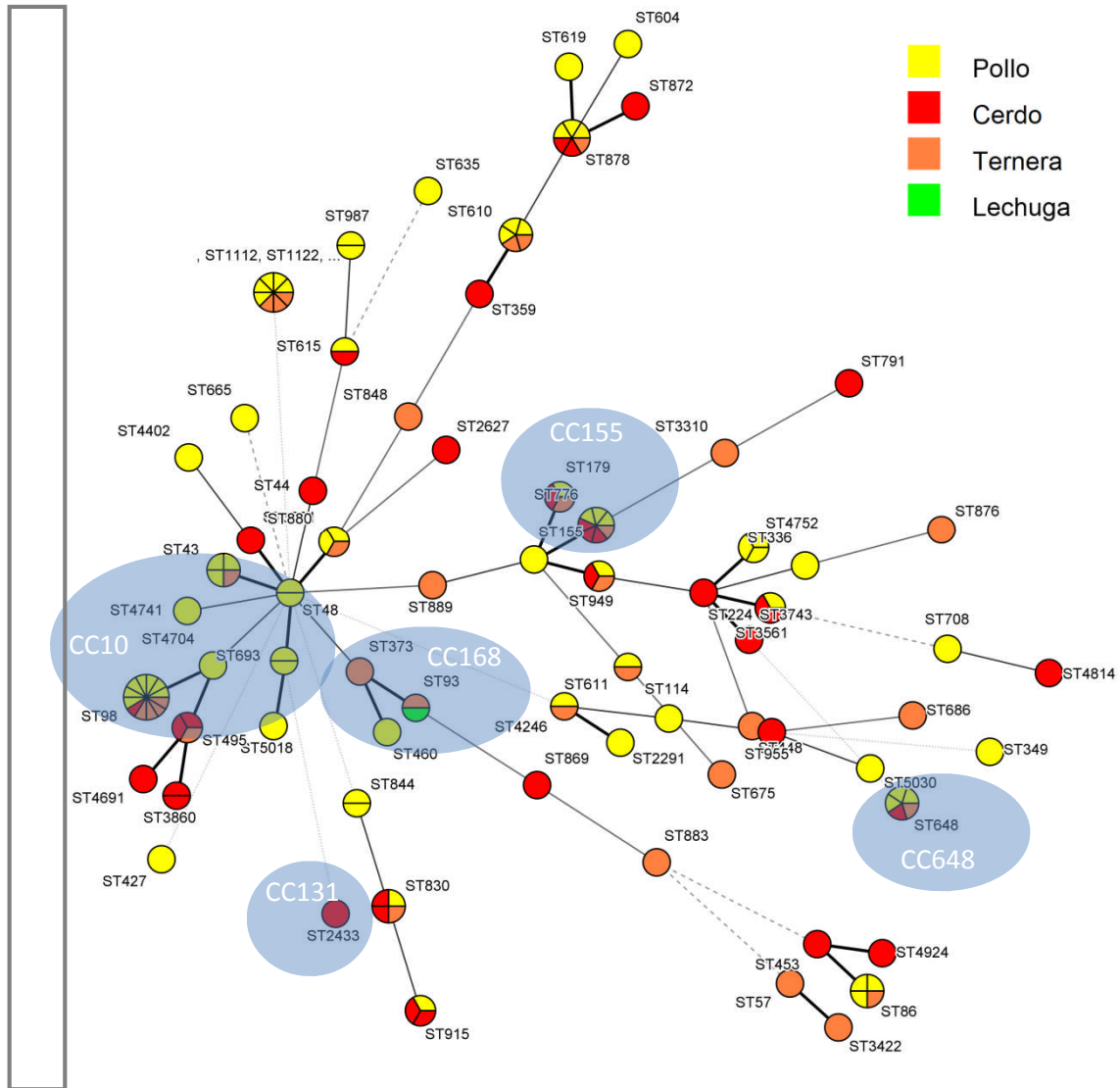


Figura 7.5. Composición clonal (MST) de las cepas de *E. coli* productoras de BLEES aisladas en alimentos. Cada círculo corresponde a un ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el tipo de alimentos en que se ha aislado la cepa según se indica en la leyenda

También se han detectado las ST155 y ST179 (CC155, grupo B1) en seis cepas aisladas en muestras de carne de pollo y cerdo, asociadas a la producción de CTX-M-1, CTX-M-14 y TEM-42, así como en una cepa productora de CTX-M-55 aislada en carne de ternera. Ben Said y colaboradores (2015) han detectado esta ST en cepas aisladas de carne de pollo en Túnez, asociada a la producción de CTX-M-1. En el mencionado estudio también se identificó una cepa productora de CTX-M-2 asociada al ST57, mientras que en nuestro estudio la única cepa productora de esta

BLEE ha sido aislada en carne de cerdo y se asocia a la ST955. Finalmente, cabe destacar que algunas de las ST encontradas por Ben Said y colaboradores no han sido detectadas en nuestro estudio (como ST117 asociada a una cepa productora de CTX-M-1 y ST23 en una cepa productora de CTX-M-14), lo que sugiere que no se ha producido todavía su diseminación.

Asimismo, la ST746 se ha observado en cepas procedentes de una muestra de carne de pollo y de una muestra de agua de EDAR, siendo ambas cepas productoras de CTX-M-1. Un estudio realizado en Rusia con cepas aisladas de aves salvajes (gaviotas) detectó esta misma ST746 multirresistente, pero en este caso producía una BLEE distinta, CTX-M-15 (Bonnedahl y col., 2010).

Por otro lado, la ST359 productora de CTX-M-14, CTX-M-1 y SHV-12 se ha detectado en carne de pollo (n=2) y granjas de pollos (n=2) y también se ha descrito en cepas de *E. coli* aisladas de humanos y aves salvajes (<http://mlst.ucc.ie>). Estos datos sugieren que el reservorio de ST359 puede ser el entorno avícola.

En nuestro trabajo se ha detectado la ST93 (CC168, grupo A) productora de CTX-M-1 en dos cepas de alimentos (carne de ternera y lechuga a granel) y en tres muestras de aguas de distintas EDAR separadas geográficamente. Este hecho sugiere que este clon podría estar circulando por el medio ambiente a través de aguas y canales de riego, llegando así a introducirse en la cadena alimentaria. Además, en muestras de alimentos, solo hemos detectado una cepa aislada en carne de cerdo perteneciente al CC131 (ST2433).

Finalmente, otros clones que se han detectado en varios nichos ecológicos son el ST57 (CC350, grupo D) productor de CTX-M-14 que ha sido aislado en muestras de alimentos, EDAR y clínica; y el ST610 productor de CTX-M-14, que ha sido detectado en alimentos, EDAR y granjas.

7.3.2. STS Y CCS DE CEPAS PROCEDENTES DE AGUAS

La composición clonal de las cepas de *E. coli* productoras de BLEES aisladas en ambientes acuáticos se muestra en la Figura 7.6.

En **aguas de EDAR** se han detectado en total 12 complejos clonales que incluyen 64 STs, mientras que el resto de STs detectados no se incluyen en ningún CC conocido. Se ha observado una predominancia de las ST611 (n=7) y ST844 (n=7), seguidas de ST615 (n=5), ST617 (n=5) y ST10 (n=4).

La ST611 (CC156, grupo A) ha sido detectado en cepas aisladas en EDAR productoras de SHV-12 y TEM-42, así como en pollo y ternera (n=2) y muestras clínicas (n=1). Varios estudios han observado la presencia de este complejo clonal en humanos, aves salvajes y de producción (Bonnedahl y col., 2009; Simoes y col., 2010). El hecho de detectar esta ST en alimentos y más concretamente en pollo indica la existencia de un posible reservorio y su presencia en aguas puede ser un importante factor para su dispersión.

Por otro lado, la ST844 se encuentra en cepas de EDAR productoras de CTX-M-1 (n=6) y CTX-M-14 (n=1), y se ha detectado en dos cepas aisladas en carne de pollo y dos muestras de origen clínico. Igualmente, la ST615 (CC46, filogrupo A) se ha observado en cepas productoras de CTX-M-14 y CTX-M-15, y se había detectado anteriormente en dos cepas aisladas en cárnicos.

Asimismo, cepas pertenecientes a la ST10 (CC10, filogrupo A) y productoras de CTX-M-1 y CTX-M-14 se han aislado tanto en aguas de EDAR (n=4), como en granjas (n=3), como en clínica (n=1), lo que indica una diseminación de esta ST por el medio ambiente. Además la ST10 ha sido detectada anteriormente en clínica y animales de producción (<http://mlst.ucc.ie>). Por otro lado, la ST167 (CC10) asociada a cepas productoras de CTX-M-14 y SHV-12 se ha detectado en cepas aisladas en aguas de EDAR (n=3) y clínicas (n=2).

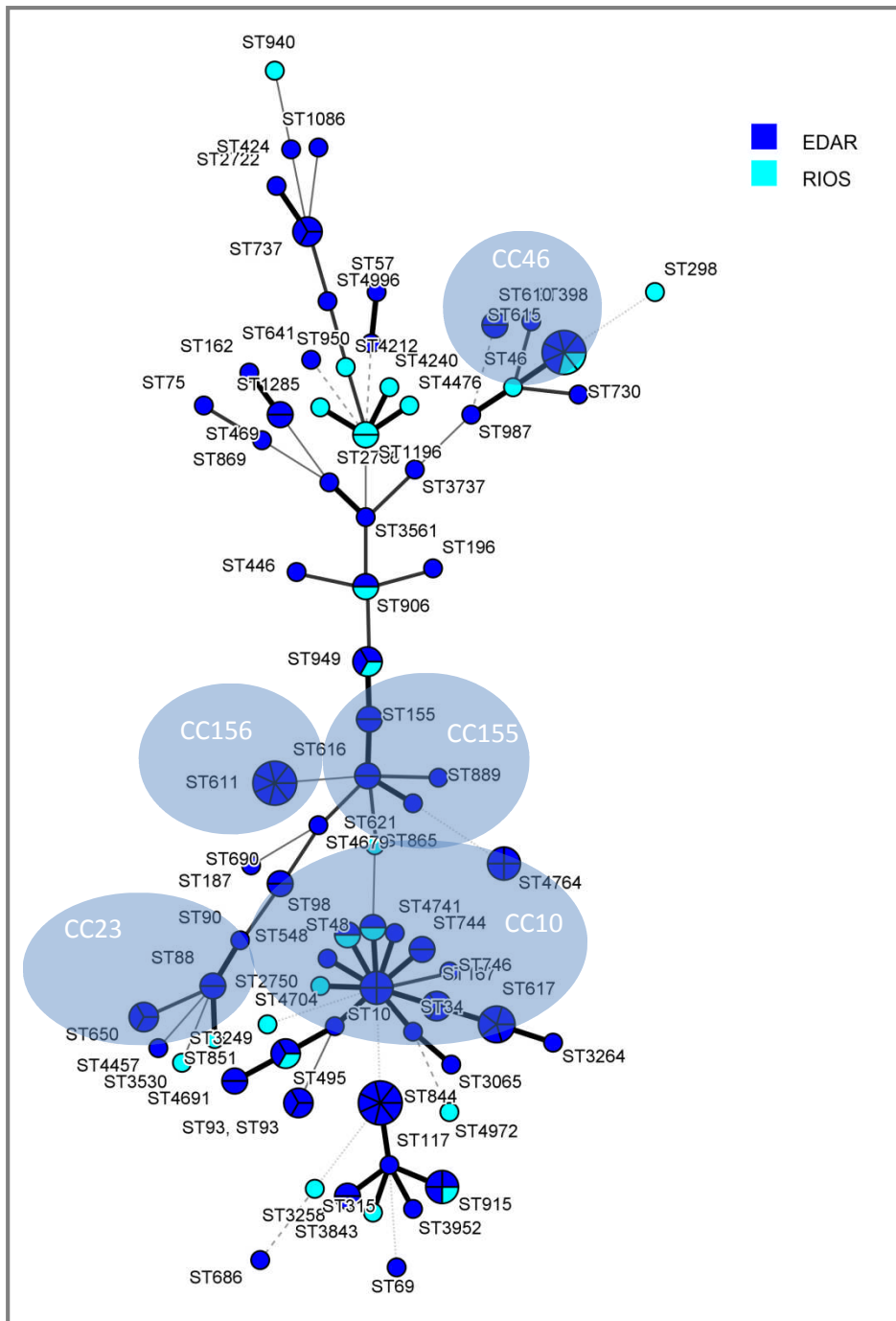


Figura 7.6. Composición clonal (MST) de las cepas de *E. coli* productoras de BLEES aisladas en ambientes acuáticos. Cada círculo corresponde a un ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el origen de cada cepa según se indica en la leyenda.

Las ST88, ST90 y ST650 (CC23, filogrupo A) se han detectado en cepas con producción de CTX-M-14. Respecto al CC155, que ha sido descrito en cepas

productoras de BLEEs aisladas en humanos, patos y pavos (<http://mlst.ucc.ie>), hemos detectado varias STs incluidas en este complejo en muestras de aguas de EDAR (n=6) y en alimentos (n=6).

El estudio de las cepas aisladas a partir de **aguas de ríos** (n=26) ha mostrado también una elevada variabilidad, con 22 STs distintos y solo 6 cepas asociadas a 3 CCs conocidos. Como se puede observar en la Figura 7.6 hay STs compartidas entre los dos ambientes acuáticos estudiados, pero también se observan una serie de STs exclusivas de aguas de ríos (ST940, ST298, ST1196...).

En resumen, se ha detectado una elevada prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEEs (CTX-M-14 y CTX-M-1) en aguas de EDAR y ríos, que pertenecen preferentemente al filogrupo A, y solo una cepa perteneciente al B2. Como otros autores postulan, se podría afirmar que los sistemas acuáticos están implicados en la diseminación de cepas *E. coli* productoras de BLEEs comensales, pero no en la diseminación de las cepas más virulentas (ST131) (Bajaj y col., 2015).

7.3.3. STS Y CCS DE CEPAS PROCEDENTES DE GRANJAS Y PIENSOS

En nuestro estudio hemos detectado 4 CCs que agrupan a 18 cepas con distintas STs, mientras que el resto de STs no pertenecen a ningún CC descrito. Las STs más prevalentes han sido ST88 (n=6), ST878 (n=5) y ST619 (n=5).

Las seis cepas de ST88 (CC23, grupo A) han sido aisladas en granjas de pollos (n=5) y en una muestra de pienso de pollo y son productoras de CTX-M-1 (n=5) y combinadas con SHV (n=1). La ST878 se observa en cepas productoras de SHV-12, mientras que la ST619 (CC101, grupo B2) se ha detectado en cinco cepas productoras de SHV-12 y CTX-M-1.

Además, se han observado seis cepas incluidas en el CC10 (grupo A), tres de ellas productoras de CTX-M-14 y asociadas a la ST10, y otras tres productoras de CTX-M-15 asociadas a ST617.

Por último, se ha detectado la ST373 (CC168, grupo A) en una cepa de *E. coli* multirresistente aislada en una granja de cerdos y productora de CTX-M-1, SHV-12 y TEM-42.

Las STs que no se agrupan en CCs conocidos, pertenecen en su mayoría al filogrupo B2 y son portadoras de *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{SHV-12}. Estos datos demuestran la heterogeneidad de genes de este filogrupo presentes en las cepas aisladas de los animales de producción y que suponen un riesgo para la salud humana, ya que pueden llegar al hombre a través de la cadena alimentaria. Asimismo, Knapp y colaboradores (2010) analizaron suelos y residuos procedentes de granjas de cerdos y señalaron un aumento en la carga de cepas resistentes a antibióticos, postulando este nicho como reservorio clave para la diseminación de resistencias.

Cortes y colaboradores (2010) han comparado cepas aisladas en humanos con cepas aisladas en granjas de pollos y han detectado un perfil de virulencia similar (filogrupo D), aunque difieren en sus secuencias tipo (ST362 en pollos y ST393 en humanos). Además en este estudio se detectó por primera vez en ganado aviar el grupo clonal ST131 (grupo B2) productor de CTX-M-9 y ST648 (grupo D) productor de CTX-M-32. Sin embargo, en nuestro trabajo no hemos detectado ninguna de estas STs, excepto la ST648 observada en cepas aisladas en pollo, cerdo y ternera (n=5) y muestras clínicas (n=5), lo que señala la posible diseminación de esta ST a través de los alimentos.

Como ya se ha comentado anteriormente, en **piensos** se han encontrado 5 cepas pertenecientes únicamente a los grupos filogenéticos A (20 %) y B1 (80%) en las que se han detectado 4 ST distintas (Figura 7.7).

Atendiendo a las 4 cepas del filogrupo B1 productoras de CTX-M-1, incluyen las ST3561 (n=1), ST446 (n=2) y ST602 (n=1), estos dos últimos pertenecen al complejo clonal CC446. Además la ST602, ha sido también observada en muestras de EDAR, lo que indica una posible dispersión de este clon por el medio ambiente.

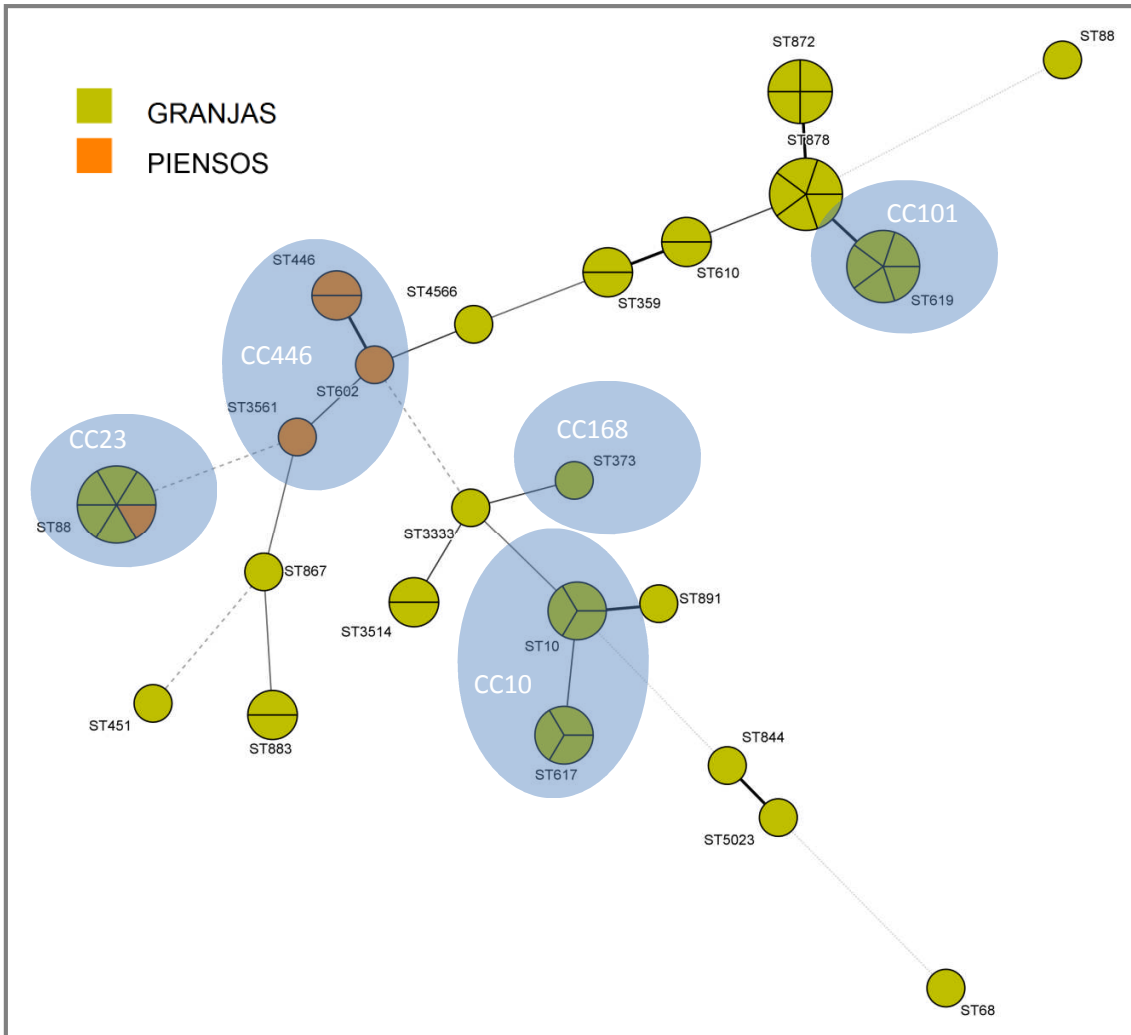


Figura 7.7. Composición clonal (MST) de las cepas de *E. coli* productoras de BLEES aisladas en ambientes de producción animal. Cada círculo corresponde a un ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica el origen de cada cepa según se indica en la leyenda.

Por otro lado, la cepa perteneciente al filigrupo A es productora de CTX-M-14 e incluye el ST88 (CC23). A este respecto cabe destacar, que el pienso del que se ha aislado esta cepa es para ganado aviar, y que este ST88 ha sido aislado en granjas de pollos. Estos datos señalan la posibilidad de una entrada de resistencias en los animales por vía alimentaria.

No se han encontrado otros trabajos que determinen la presencia de cepas productoras de BLEEs en piensos de animales, por lo que hasta donde conocemos este estudio es el primero que analiza la presencia de E-BLEEs en este nicho. Por otro

lado, en el último año se publicó un estudio que detectaba la presencia de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus* y *Bacillus*) resistentes a tetraciclinas en piensos, por lo que consideramos que hay que incrementar la vigilancia de resistencias en los piensos destinados a producción animal (Granados-Chinchilla y col., 2014).

7.3.4. STS Y CCS DE CEPAS PROCEDENTES DE MUESTRAS CLÍNICAS

Se han detectado 17 CCs distintos que agrupan al 60 % de las cepas aisladas, y un total de 66 STs diferentes (Figura 7.8). Las STs detectadas con mayor frecuencia han sido ST3213 (n=9), ST88 (n=6), ST617 (n=5), ST648 (n=5) y ST90 (n=5).

Aunque en este estudio no hemos detectado ninguna cepa que presente ST131 sí se han encontrado secuencias filogenéticamente próximas, ya que se han observado 25 cepas con STs incluidos en el CC131, todos ellos en cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 y aisladas en muestras de orina. Estas cepas incluyen a las ST más prevalentes como ST3213 y ST838. Además la una única cepa productora de CTX-M-3 pertenece al ST838. Estas cepas son de interés porque pueden presentar una elevada virulencia.

Además hemos encontrado cinco cepas aisladas en muestras urinarias y productoras de CTX-M-15, que pertenecen a la ST648 (CC648, grupo D). Esta misma ST fue detectada en cepas aisladas de alimentos pero productoras de CTX-M-14. Como hemos visto anteriormente, varios estudios han detectado cepas ST648 en ganado aviar y humanos (productoras de CTX-M-1 en estos últimos) que están implicadas en infecciones del tracto urinario (Nicolas-Chanoine y col., 2008; Bonnedahl y col., 2010). Además, la presencia de ST95 en una muestra de orina coincide con lo descrito por Bidet y colaboradores (2007), que encuentran varias ST del CC95 que se han visto implicadas en urosepsis infantiles y meningitis.

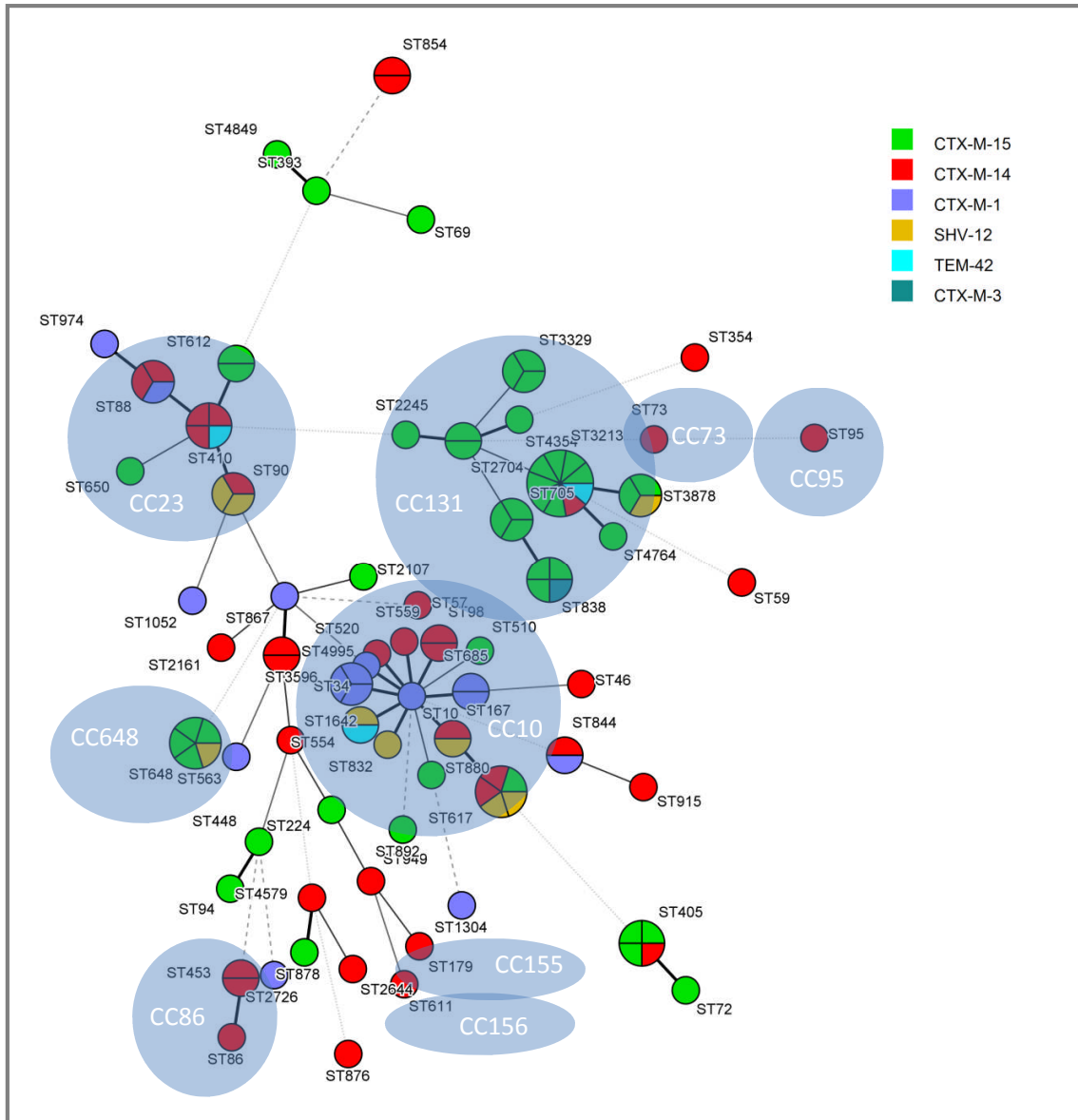


Figura 7.8. Composición clonal (MST) de las cepas de *E. coli* productoras de BLEES aisladas en muestras clínicas. Cada círculo corresponde a un ST, siendo su tamaño proporcional al número de aislados. El color de los círculos indica tipo de BLEE producida por cada cepa según se indica en la leyenda.

También se han detectado STs incluidas en el CC23 (ST410, ST612 y ST88). En este caso se asocian cepas productoras de CTX-M-1 (ST88), CTX-M-14 (ST410) y CTX-M-15 (ST612). La ST179 (CC155, grupo B1) detectada en muestras de alimentos (carne de pollo) se ha detectado también en una muestra de orina, siendo ambas cepas productoras de CTX-M-14 lo que puede indicar una diseminación a través de la cadena alimentaria.

Brisse y colaboradores (2012) evaluaron 304 cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas y estudiaron diferencias entre cepas productoras y no productoras de BLEEs. Observaron una mayor prevalencia del filogrupo B2 (42 %) y A (29 %) y menor prevalencia de los filogrupos B1 (13 %) y D (16 %). Además estas cepas se agruparon en 116 STs distintos correspondientes a 13 CCs y los complejos con mayores frecuencias fueron CC131 (23 %), CC10 (15 %), CC73 (6 %) y CC23 (5 %). En nuestro estudio hemos detectado frecuencias de CCs similares, de forma que CC131 se encontró en 25 cepas (21,6 %), CC10 y CC23 en 19 cepas cada uno de ellos (16,4 %) y CC73 solo en una cepa (0,9 %). Sin embargo, las STs más prevalentes que hemos detectado en nuestro estudio no coinciden con las STs más frecuentes que detectaron Brisse y colaboradores, que fueron ST131 (grupo B2) que como hemos comentado no está presente en nuestro estudio, ST10 (grupo A) del que nosotros hemos detectado 16 cepas y ST73 (grupo B2) que nosotros hemos aislado en una cepa productora de CTX-M-14. También observaron una alta heterogeneidad en los complejos CC10 similar a la nuestra con 11 STs distintos, así como en CC23 (detectaron 5 STs y nosotros hemos observado 6 STs diferentes). Respecto a la variedad de enzimas BLEEs, encontraron 11 tipos de CTX-M distintas con una mayor prevalencia de CTX-M-15 (51 %) seguida de CTX-M-1 (24 %), CTX-M-14 (12 %) y CTX-M-2 (2 %). En nuestro estudio la variedad de BLEEs es menor y están presentes CTX-M-15 (37,9 %), CTX-M-14 (32,8 %), CTX-M-1 (11,2 %), y CTX-M-3 (0,9 %). En resumen, nuestro estudio arroja unos resultados similares a los obtenidos por Brisse y colaboradores en cuanto a prevalencia y heterogeneidad de STs, siendo la mayor diferencia la ausencia de ST131 en las cepas aisladas en nuestro trabajo.

Por otro lado, Chandramohan y Revell (2012), observaron que las cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 se distribuían en los filogrupos B2, D y A, mientras que las productoras de CTX-M-14 pertenecían a los grupos D y B2. Además, las cepas de CTX-M-15 estudiadas tenían una elevada similitud con su cepa ST131 control (>92 %

identidad). Asimismo, detectaron también ST393 y ST394. En nuestro trabajo hemos detectado dos cepas ST393 (CC131, grupo D) productoras de CTX-M-15. Estas cepas han sido aisladas en dos muestras de origen clínico (esputo e hisopado inguinal) y muestran resistencia frente a quinolonas, penicilinas, cefalosporinas y tetraciclina. Varios estudios han descrito con anterioridad la presencia de cepas ST393 productoras de CTX-M-14 con resistencia a fluoroquinolonas que están implicadas en infecciones extraintestinales (Blanco y col., 2011; Johnson y col., 2009).

En resumen, en este estudio hemos demostrado que existen cepas de *E. coli* productoras de BLEEs en un gran número de complejos clonales en los que todavía no habían sido detectadas estas bacterias, lo que muestra la elevada diversidad genética que existe en poblaciones resistentes a β -lactámicos.

CAPÍTULO 8.

DISCUSIÓN FINAL

Según señala el último informe de la OMS (WHO, 2014), actualmente hay una necesidad de abordar el estudio de las resistencias a antibióticos desde un **enfoque global**, para lo que se requiere integrar la información obtenida sobre cepas resistentes aisladas en diversos entornos. En este sentido, la iniciativa *One Health* señala la importancia de estudiar la resistencia a antibióticos en un marco multidisciplinar (Figura 8.1). Esta iniciativa surgió en el primer congreso internacional *One Health* con el objetivo de establecer una estrategia que permita mejorar las colaboraciones y las comunicaciones entre los distintos ámbitos de investigación (salud humana, los animales y el ecosistema) para expandir el conocimiento científico y mejorar la salud humana (<http://www.eeas.europa.eu/health/>; <http://www.cdc.gov/onehealth/>).

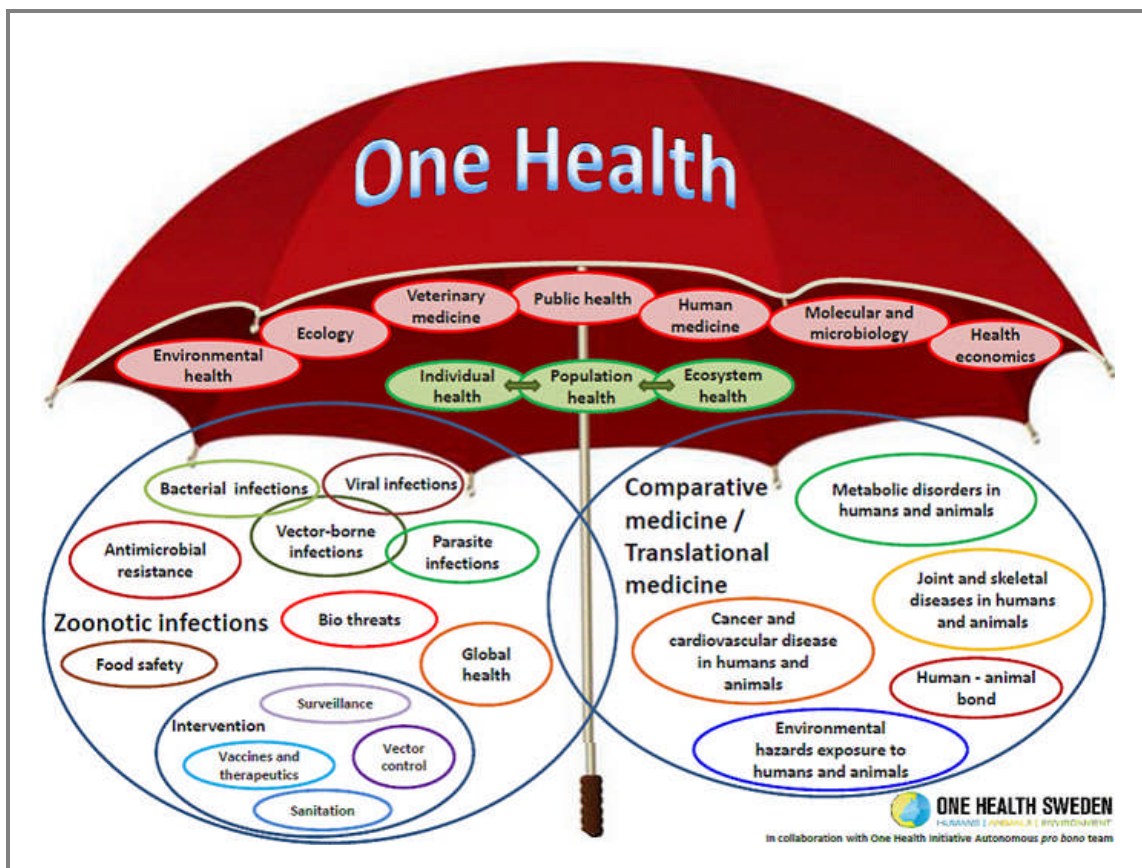


Figura 8.1. Iniciativa *One Health*

En España, varios estudios han analizado la situación de las resistencias a β -lactámicos en diferentes nichos como los ambientes acuáticos (Baquero y col., 2008), animales de producción (Briñas y col., 2006; Cortes y col., 2010; Abreu y col., 2014), en portadores humanos sanos (Rodríguez-baño y col., 2008; Fernández-Reyes y col., 2014) y son numerosos los estudios centrados en la presencia de E-BLEEs en el ámbito hospitalario (Cantón y col., 2002; Valverde y col., 2004; Mesa y col., 2006). Sin embargo, son pocos los trabajos que analizan el problema de las resistencias desde una perspectiva más amplia, comparando las cepas aisladas en diferentes nichos como animales, alimentos y humanos (Briñas y col., 2002), o bien, estudiando la diseminación de clones (Blanco y col., 2011), por lo que no hay datos suficientes para tener una perspectiva global de la situación actual. Atendiendo a esta necesidad, la presente Tesis Doctoral ha pretendido realizar un estudio completo y representativo de la distribución de E-BLEEs en los distintos ambientes de la Comunidad Foral de Navarra.

Para estudiar la presencia de esos microorganismos resistentes se han utilizado varios de **métodos fenotípicos**, pero cabe destacar el CDT por ser el que mayor número de cepas ha confirmado como productoras de BLEEs (de hecho es el recomendado por el CLSI como test de referencia debido a su alta sensibilidad y especificidad). Sin embargo, la realización en paralelo del test DDST permite confirmar como BLEEs alguna cepa que no es detectada por el CDT. Ambos métodos de difusión en disco tienen la ventaja de ser más económicos y fáciles de realizar en el laboratorio. Su principal desventaja es que las modificaciones en la distancia y ubicación de los discos pueden llevar a resultados erróneos y además es necesaria una adecuada formación del personal para realizar la interpretación cualitativa de las medidas de los diámetros de los halos. Para solventar este problema, se pueden emplear métodos automatizados para la determinación de las CMI como el MicroScan®. Se trata de un método rápido, sensible y aporta datos muy útiles para

estudiar el perfil de susceptibilidad frente a distintos antibióticos de cada cepa. Además, a nivel clínico el hecho de aportar las CMI supone una importante ventaja a la hora de decidir el tratamiento antibiótico a seguir. Sin embargo, no ofrece buenos resultados para otras especies distintas de *E. coli* y *K. pneumoniae* y tiene la desventaja del elevado coste de los materiales que emplea.

En resumen, consideramos que la elección más adecuada para detectar el mayor número de cepas productoras de BLEEs es utilizar el método CDT empleando más de una cefalosporina de espectro extendido y combinarlo con el DDST y con el método automatizado de Siemens siempre que sea posible. Nuestra recomendación sería la utilización de discos de CAZ (hidrolizada por TEM y SHV) y CTX (hidrolizada preferentemente por las enzimas CTX-M). Asimismo la utilización de discos de FEP es necesaria cuando se sospecha de la presencia combinada de BLEEs y AmpC, ya que FEP no se ve afectada por las β -lactamasas de tipo AmpC y de este modo puede observarse la producción de BLEEs.

La detección de otras β -lactamasas tipo AmpC y MBLs se ha realizado también por métodos de difusión en disco, si bien tanto en el caso de la detección de BLEEs como de otras β -lactamasas es necesario realizar la confirmación mediante **métodos moleculares**. La PCR es el método estándar por ser una técnica sencilla y rápida de realizar, con unos resultados de fácil interpretación. Las limitaciones que encontramos en esta técnica son dos, la primera que está descrita principalmente para cepas de *E. coli* y *Klebsiella spp.* y la segunda que debido a la gran variedad de genes bla_{BLEE} existentes es difícil abarcar a todos ellos, por lo que nuestro estudio se limita a las PCR de los genes más frecuentes (CTX-M-, SHV, TEM y OXA). Esto implica que en cepas con un fenotipo de producción de BLEEs no se detecten más que los genes bla_{BLEE} que se incluyen en la PCR y por ejemplo no se detecten otros como los de las *minor* BLEEs.

En el presente estudio se ha observado la presencia de E-BLEEs en todos los nichos estudiados (Tabla 8.1). La elevada **prevalencia** observada en ambientes de producción animal y en aguas EDAR señala el papel que pueden tener estos ecosistemas como lugares de intercambio génico entre bacterias y de reservorio de estas resistencias (Gómez y col., 2010). La diversidad de **especies** de enterobacterias resistentes encontradas en alimentos (n=16), EDAR (n=11), ríos (n=8), granjas (n=4) y piensos (n=4), indica que estos genes de resistencia no solo se restringen a *E. coli*, aunque es la especie predominante. Esta variabilidad supone nuevos hospedadores para el intercambio de elementos génicos y la posibilidad de adquirir otros genes de resistencia asociados.

Los productos cárnicos frescos (especialmente pollo), se han confirmado como la principal vía alimentaria transmisora de estas resistencias, coincidiendo con la alta prevalencia de E-BLEEs observada en granjas (51,6 %). En este entorno de producción animal, el 25 % de los piensos analizados también son portadores de E-BLEE, lo que indicaría una posible vía de entrada de estos microorganismos en los animales de cría. Aunque no ha sido objeto de esta tesis doctoral el estudio de los residuos antibióticos en piensos, es bien conocida la práctica de añadir antimicrobianos en la alimentación animal para mejorar los ratios de producción (FAO, 2003). Por tanto, la presión antibiótica estaría favoreciendo la selección de bacterias resistentes en el propio alimento para el ganado. Cabe destacar que en este estudio no se han incluido piensos utilizados en piscifactorías para el engorde de truchas, pero según un informe de Comisión Europea (CE, 2013), los piensos empleados en piscifactorías en Europa pueden contener proteínas de animales terrestres (cerdo y pollo), lo que podría ser una fuente de transmisión de bacterias resistentes a los peces. En cualquier caso, la incidencia de E-BLEEs encontrada en nuestro estudio en truchas frescas procedentes de piscifactoría ha sido muy baja (0,9%).

A nivel de Salud Pública es importante recalcar que a pesar de las altas prevalencias (y altas concentraciones en algunos casos) observadas en cárnicos frescos, son productos que van a someterse a un tratamiento térmico antes de su consumo, por lo que el riesgo de transmisión disminuye. Mientras que, afortunadamente, la presencia de estas bacterias en vegetales frescos y alimentos listos para consumo ha sido prácticamente nula.

Tabla 8.1. Resumen de las muestras analizadas, prevalencias, cepas aisladas y confirmadas como BLEEs.

Tipos de muestras	No. muestras		No. enterobacterias			No. cepas de <i>E. coli</i>		
	Analizadas	Positivas (%)	CPD ^R	BLEEs +*	Portadoras de <i>bla</i> _{BLEE}	CPD ^R	BLEEs +*	Portadoras de <i>bla</i> _{BLEE}
ALIMENTOS	794	200 (25,2)	236	225	157	182	179	150
Cárnicos frescos	310	184 (59,4)	219	214	157	177	175	149
Vegetales	306	14 (4,6)	15	11	0	5	4	1
Pescados	110	1 (0,9)	1	0	0	0	0	0
Cárnicos cocidos	34	1 (2,7)	1	0	0	0	0	0
Quesos	34	0	0	0	0	0	0	0
AMBIENTALES	652	270 (41,4)	300	264	196	217	213	191
EDAR	279	163 (58,4)	185	163	118	135	132	117
Ríos	222	45 (20,2)	49	41	28	31	30	26
Suelos granjas	91	47 (51,6)	50	48	45	46	46	43
Piensos	60	15 (25)	10	12	5	5	5	5
CLINICAS	-	-	-	-	-	130	130	112
Total	-	-	-	-	-	529	522	453

* Confirmados por al menos un método fenotípico

El estudio de **susceptibilidad antibiótica** muestra una elevada tasa de multirresistencia en las cepas de enterobacterias CDP^R aisladas en los nichos estudiados en este trabajo. De esta manera no solo hay una diseminación de resistencias a β -lactámicos, sino que observamos una elevada resistencia frente a otras familias de antibióticos como quinolonas y aminoglucósidos. Este hecho tiene implicaciones en Salud Pública ya que reduce las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos.

En la mayoría de las cepas se ha detectado una alta tasa de resistencia frente a penicilinas y cefalosporinas, con la excepción de FOX (en cepas aisladas en granjas, alimentos y clínicas) y de FEP (en cepas aisladas en granjas y ríos). Estos dos antibióticos son estructuralmente más estables a la hidrólisis por BLEEs, lo que explica la sensibilidad en las cepas aisladas en nuestro estudio. Sin embargo se ha observado un aumento de la resistencia frente a FOX por expresión de β -lactamasas de tipo AmpC o por alteración de las porinas de membrana (Morales, 2003). El aumento de resistencia frente a FOX que observamos en nuestro estudio en cepas aisladas en EDAR, ríos y piensos es indicativo de la presencia de β -lactamasas de tipo AmpC, como se ha demostrado por técnicas moleculares.

Los aminoglucósidos muestran unas tasas de resistencias inferiores al 40 %, excepto en el caso de la amikacina en alimentos con unos valores cercanos al 100 %. Destaca este alto porcentaje de resistencia a la amikacina (derivado de la kanamicina) de uso hospitalario y en animales (de producción y de compañía), y un espectro de acción frente a bacterias Gram negativas (incluidas muchas resistentes a gentamicina y tobramicina). Esta resistencia se observa en cepas aisladas en productos cárnicos, por lo que el uso de este antibiótico en animales de producción puede haber ejercido una presión selectiva que haya dado lugar a estas tasas de resistencias.

Las quinolonas ampliamente utilizadas en clínica muestran unas tasas de resistencias más elevadas en cepas de origen clínico (60-80 %), aunque también se

han aislado cepas resistentes a quinolonas en todos los nichos. En todos los casos se observa un menor porcentaje de resistencia para LV, que aumenta en CIP y MXF. Su amplio espectro y excelente actividad frente a infecciones bacterianas ha generado la aparición de resistencias como se muestra en el presente estudio.

Asimismo, se han observado tasas de resistencia a colistina que empiezan a ser preocupantes. Recientemente, Durante-Mangoni y colaboradores (2015) han alertado del incremento de resistencias frente a colistina entre cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas de pacientes sometidos a largos tratamientos con este antibiótico. Nuestros datos también sugieren una posible selección de cepas resistentes a colistina entre enterobacterias productoras de BLEEs.

Los resultados muestran las escasas alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones producidas por E-BLEEs, distintas a los carbapenems que existen en la actualidad. Las bajas tasas de resistencias a estos antibióticos indican que a pesar de los estudios que señalan la emergencia de resistencias frente a estos antibióticos, todavía no se han instaurado en los nichos estudiados.

El estudio de detección de **genes codificantes de enzimas BLEEs** permite observar una diseminación de enzimas de la familia CTX-M en los nichos estudiados, con una predominancia de *bla*_{CTX-M-14} en cepas aisladas en alimentos, *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-14} en ambientales y *bla*_{CTX-M-15} en cepas de origen clínico (Tabla 8.2).

Destaca la alta prevalencia de SHV-12 en granjas de pollo que vemos que disminuye en la carnes analizadas. Se puede observar que aunque unos genes predominan más que otros en los diferentes nichos, los genes BLEEs estudiados están más o menos presentes en todos ellos. Además, la presencia de genes codificantes de enzimas menos frecuentes como *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{OXA-4} y *bla*_{TEM-145} demuestra que a pesar de la prevalencia de CTX-M-14, CTX-M-1 y CTX-M-15, estas otras enzimas se mantienen en las poblaciones bacterianas y suponen otra fuente de variabilidad.

Tabla 8.2. Porcentajes de genes *bla*_{BLEE} más prevalentes en los distintos nichos estudiados

Origen	Tipos de muestras	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{TEM-42}	<i>bla</i> _{SHV-12}
Alimentos	Cárnicos pollo	34,4	15,7	1,2	22,9	20,5
	Cárnicos cerdo	40	20	-	15	22,5
	Cárnicos ternera	40	17,5	-	25	12,5
	Vegetales	-	100*	-	-	-
Ambientales	EDAR	24,5	18,4	11,1	11,7	14,1
	Ríos	17,1	24,4	9,8	4,9	9,8
	Granjas pollos	16,7	28,6	-	9,5	45,5
	Granjas cerdos	14,3	35,7	21,4	21,4	7,1
	Granjas caballos	-	20	-	20	60
	Piensos	80	20	-	-	-
Clínicas		33,5	11,5	39,2	13,1	10,7

* Solo se ha aislado 1 cepa portadora de gen *bla*_{BLEE}

Como se ha comentado anteriormente, tanto en España como en el resto de Europa se ha observado una predominancia de CTX-M. Esta homogeneidad se podría explicar por el aumento de movimientos migratorios, los viajes y el intercambio de mercancías entre países como consecuencia de la globalización. Algunos autores los señalan como causantes de la diseminación de bacterias resistentes (Hawkey, 2015) y demuestran la presencia de bacterias productoras de BLEEs en turistas que viajaron dentro y fuera de Europa (Hawkey y Jones, 2009; Tham y col., 2010). Asimismo, otros estudios señalan las tasas de portadores de E-BLEEs tipo CTX-M a nivel mundial, siendo el sudeste asiático la zona con mayores números de portadores (1,1 millones), seguido de países del oeste del pacífico y este del Mediterráneo (280 y 180 millones respectivamente) y África (110 millones). En América y Europa se han observado en menor número, con tasas de 48 y 35 millones de portadores respectivamente (WHO, 2010; Woerther y col., 2013). Estos datos reflejan la situación en países en vías de desarrollo en los que la falta de acceso a agua potable, la pobreza y otros factores como la elevada densidad de población, pueden facilitar la dispersión de estas resistencias y establecer reservorios donde se produzcan intercambio genéticos que aumenten la variabilidad de cepas resistentes (Woerther y col., 2013). Asimismo, las

diferencias observadas entre países se podrían explicar por el distinto clima, los hábitos alimentarios y la presión que ejercen los distintos tratamientos antibióticos.

Por último el **estudio filogenético** muestra el elevado grado de relación que existe entre las cepas aisladas en distintos ambientes. La presencia de los cuatro filogrupos en la mayoría de los nichos estudiados demuestra la amplia diseminación de cepas de *E. coli* productoras de BLEEs y apunta a una elevada variabilidad en esta población bacteriana que se ve confirmada con el estudio mediante MLST. Cabe destacar la variabilidad de STs y CCs detectados mostrando la diversidad presente en esta población de *E. coli* productoras de BLEEs. Además, la presencia de varias STs iguales en cepas aisladas en diferentes nichos demuestra la existencia de una circulación de estas E-BLEEs por los diversos nichos estudiados (Figura 8.2).

La mayor parte de las STs aisladas están presentes al menos en un nicho acuático, y más concretamente EDAR, lo que señala la importancia que adquieren las aguas residuales en la diseminación de las bacterias. Es el caso de STs como ST48 productora de SHV-12 presente en alimentos, EDAR y ríos; la ST93 productora de CTX-M-1 en alimentos (ternera, lechuga) y EDAR; y la ST610 productora de CTX-M-14 aislada en alimentos, EDAR y granjas.

Por otro lado, varias STs además de detectarse en alimentos y muestras ambientales, aparecen también en muestras clínicas. Por ejemplo, la ST57 (carne de pollos) y ST611 (carne de pollo y ternera) presentes también en EDAR y muestras clínicas de orina; ST617 detectada en EDAR, granjas de cerdo y muestras clínicas de hisopado perianal; ST98 en EDAR, ríos, cárnicos de cerdo, pollo y ternera, y muestras clínicas; y la ST88 en EDAR, piensos (pollo), granjas (pollo) y clínicas. Además, la ST648 se ha encontrado en cepas aisladas en cárnicos de cerdo, pollo y ternera y en muestras clínicas de orina, mientras que la ST878 se ha detectado en granjas (cerdos y pollos), alimentos (cerdo, pollo y ternera) y muestras clínicas. Estos datos sugieren una circulación directa desde los alimentos al hombre.

La presencia de cepas resistentes en el hombre, los animales de consumo, las aguas de depuradoras, ríos y canales de riego, y el medio ambiente en general, permiten mantener flujos continuos de resistencias.

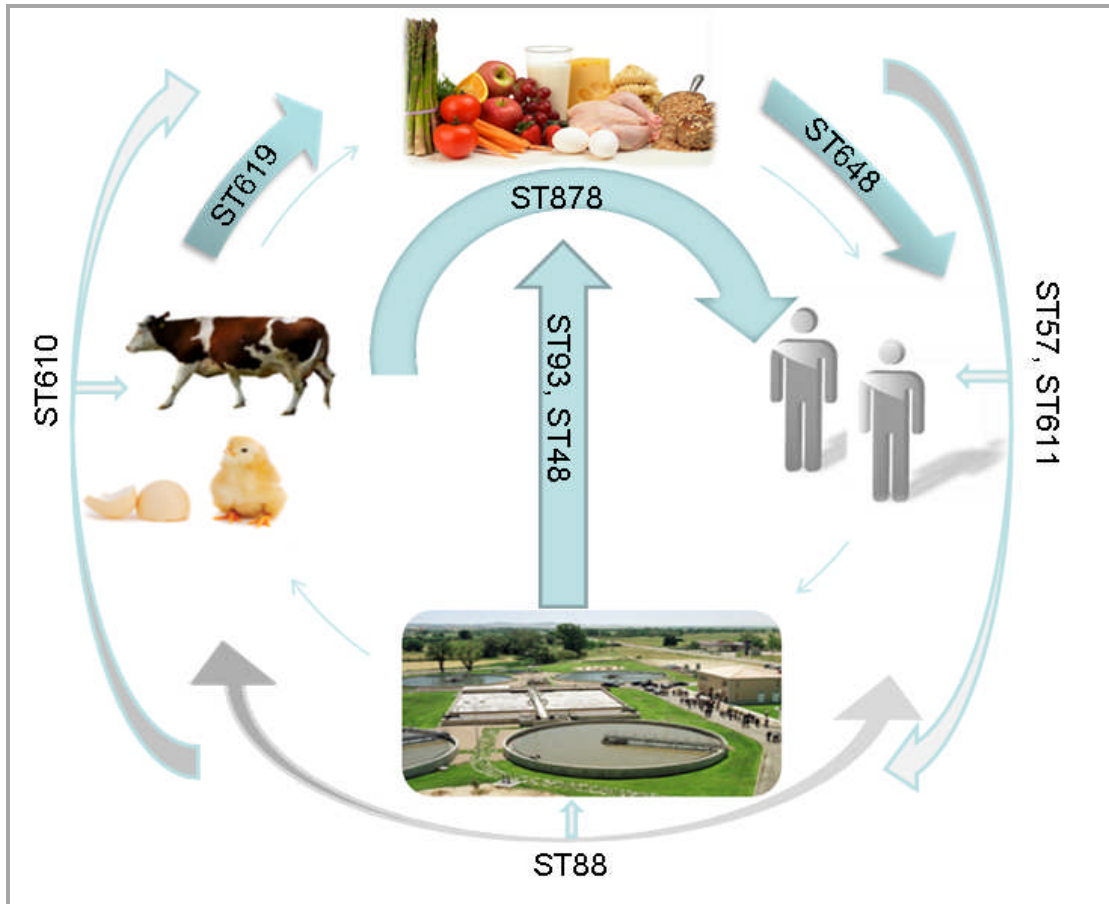


Figura 8.2. Movilidad de varias ST entre distintos nichos.

En resumen, los datos obtenidos en este estudio muestran la situación actual de prevalencia y dispersión de E-BLEEs en ambientes extrahospitalarios de la Comunidad Foral de Navarra. Por tanto, se constata la necesidad de establecer **medidas preventivas para controlar** esta diseminación y frenar sus posibles efectos en la salud humana. Algunas de estas medidas se resumen a continuación y se centran fundamentalmente en el uso racional de antibióticos tanto a nivel humano como veterinario (AEMPS, 2014) y un eficaz sistema de vigilancia de la presencia y tipo de BLEEs en diferentes entornos de la comunidad.

En los últimos años la producción de nuevos antibióticos se ha estancado y cada vez son más escasas las alternativas para tratar infecciones causadas por microorganismos multirresistentes. Aunque la OMS señala la presencia de algunos clones resistentes que pueden ser reemplazados por otros susceptibles (WHO, 2001), las resistencias están muy establecidas y tardarían un tiempo en revertirse. Por tanto, es importante concienciar a la sociedad sobre el uso limitado de antibióticos a aquellas infecciones que realmente lo precisen, siempre bajo prescripción médica y completando el tratamiento en su totalidad. De igual modo, es igualmente importante la concienciación sobre este problema de todo el personal con capacidad de prescribir y dispensar antibióticos. El uso incorrecto de antibióticos en casos de infecciones sin importancia o su subutilización por la falta de recursos sólo sirve para facilitar la aparición de nuevas resistencias.

A nivel hospitalario la utilización de antibióticos es más intensa, por lo que es fundamental su correcto uso para reducir la incidencia de infecciones nosocomiales y la propagación de clones multirresistentes. Además, la aplicación de diferentes medidas de higiene ha obtenido buenos resultados a la hora de frenar brotes de cepas multirresistentes. Extremar las medidas de limpieza, nuevos protocolos de desinfección de material médico, el uso de toallitas con antisépticos, realizar controles ambientales así como la concienciación del personal sanitario sobre la fácil diseminación de estos microorganismos son algunas de las estrategias recomendadas (Gracia Arnillas y col., 2013). Asimismo, el seguimiento de pacientes colonizados con E-BLEEs permite controlar posibles focos de infección en el caso de reingresos y prevenir transmisiones cruzadas. Del mismo modo, la realización de estudios de prevalencia de E-BLEEs en portadores sanos permitiría conocer el papel de los portadores como reservorio de estas resistencias y los posibles riesgos asociados.

Asimismo, es indispensable el cumplimiento de la legislación y de los reglamentos que regulan el uso de antibióticos a nivel veterinario. La OMS ha

señalado una serie de medidas destinadas a reducir la administración excesiva de antibióticos en animales destinados al consumo humano (WHO, 2000) con el objetivo de reducir la presencia de bacterias resistentes y proteger la salud humana. En la misma línea, la FDA reguló el uso de cefalosporinas (2012) y la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) ha diseñado un “Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencias a los antibióticos” (AEMPS, 2014). Igualmente, consideramos que es necesario un control tanto del estiércol utilizado para la fertilización de campos de cultivo, como de los piensos, de manera que se investigue regularmente la presencia de bacterias productoras de BLEEs y de otros microorganismos que puedan suponer un riesgo de diseminación de resistencias.

Por otro lado, se necesita incrementar la vigilancia de importantes reservorios y vehículos de resistencias E-BLEEs como son las aguas residuales. Un mayor conocimiento sobre los niveles y tipos de estos microorganismos en las aguas vertidas desde hospitales y granjas de producción animal, así como el efecto de los procedimientos de depuración y desinfección en las plantas de tratamiento EDAR, es necesario para realizar intervenciones eficaces que reduzcan la presencia de bacterias resistentes en los nichos ambientales. A este respecto, sería necesario investigar el efecto de los tratamientos de desinfección de aguas residuales (cloración, ozonización y rayos UVA) sobre bacterias portadoras de resistencias, con objeto de seleccionar un sistema eficaz para controlar la diseminación de estos microorganismos.

Por último, un sistema de vigilancia de resistencias a nivel nacional en el que se coordinen las distintas provincias compartiendo datos y experiencias es imprescindible para conocer y controlar la diseminación de clones multirresistentes. La existencia de varios sistemas de vigilancia como el de la Red Española de Investigación de Patología Infecciosa (REIPI) y la Red de Vigilancia de Resistencias Antibióticas en Bacterias de Origen Veterinario (Moreno y col., 2010) son un paso

importante para el control de la diseminación de resistencias. Como hemos comentado, actualmente la AEMPS está coordinando un plan para reducir las resistencias con un enfoque conjunto desde la sanidad humana y animal (AEMPS, 2014) en el que se proponen seis líneas estratégicas (Figura 8.3)

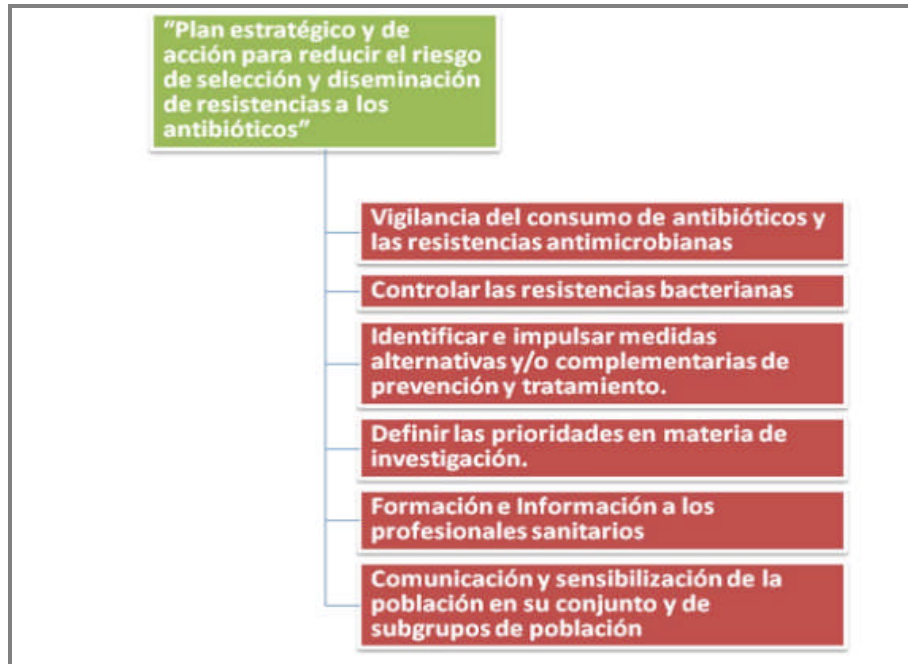


Figura 8.3. Líneas estratégicas del plan de acción de la AEMPS (Adaptación AEMPS, 2014)

Sin embargo, consideramos imprescindible añadir a estas redes de vigilancia datos de los nichos estudiados es esta tesis como los alimentos y los sistemas acuáticos. Asimismo, la integración de estos datos de seguimiento y los resultados obtenidos permitirían conocer a fondo la situación en España y mejorar las estrategias de actuación frente a las resistencias. Finalmente, estos datos servirían para poder establecer normas internacionales de vigilancia así como unos criterios estándar para controlar la diseminación de resistencias a antibióticos.

CAPÍTULO 9.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que pueden extraerse a partir de los datos obtenidos en el presente estudio son las siguientes:

1. Se ha constatado la amplia diseminación de enterobacterias productoras de BLEEs en distintos nichos y poblaciones de la Comunidad Foral de Navarra y que *E. coli* es la principal especie portadora de estas resistencias.
2. La alta presencia de E-BLEEs en productos cárnicos frescos (59,4 % de las muestras) y en menor medida en vegetales (4,6 %) sugiere la posible transmisión de resistencias a través de la ingesta de estos alimentos. La alta prevalencia detectada en carnes de pollo (85,2 %) señala a este producto como el de mayor riesgo, por lo que es necesario insistir en el correcto cocinado de este producto para minimizar la transmisión de resistencias.
3. Los altos niveles de E-BLEEs en carnes están directamente relacionados con la elevada presencia de estos microorganismos en entornos de producción animal (51,6% granjas y 25 % de piensos positivos). Estos datos revelan la necesidad de mejorar y supervisar las técnicas de producción y engorde de animales destinados a consumo, especialmente en el uso racional de antibióticos.
4. La mayoría de las STs de las E-BLEEs aisladas en entornos acuáticos (especialmente en aguas EDAR) se han detectado también en cepas procedentes de alimentos, entorno de producción animal y muestras clínicas. Esto señala la importancia que adquieren las aguas como lugar de intercambio de genes y mecanismo de dispersión de resistencias entre los distintos ambientes.
5. Para una eficaz detección de BLEE recomendamos el uso combinado de los tests de difusión en disco CDT y DDST empleando CAZ y CTX, así

como FEP cuando se sospeche de la presencia combinada de BLEEs y AmpC. Estos métodos fenotípicos deberían ser complementados con técnicas moleculares como la PCR, que a su vez debe ser mejorada para la detección de genes *bla*_{BLEE} en enterobacterias distintas a *E. coli* y *Klebsiella*, así como para la investigación de otros genes *bla*_{BLEE} menos frecuentes.

6. A pesar de que en España predominan las BLEEs CTX-M-9 y CTX-M-14, en Navarra CTX-M-1 ha sido la más extendida, ya que se ha detectado a lo largo de toda la geografía y en todos los tipos de muestras analizadas. Sin embargo, por nichos ecológicos destacan CTX-M-1 en muestras ambientales, CTX-M-14 en alimentos, EDAR y piensos; SHV-12 en granjas y CTX-M-15 en muestras clínicas. Además, en ambientes acuáticos y de producción animal se han encontrado cepas que expresan también β -lactamasas de tipo AmpC, lo que ratifica el papel de estos nichos como reservorio y diseminación de resistencias.
7. Se confirma una elevada tasa de multiresistencias asociada a la expresión de BLEEs, especialmente a quinolonas y aminoglucósidos, aunque las cepas aisladas siguen siendo sensibles a los carbapenems. La información de la CMI aportada por métodos automatizados, además de complementar el diagnóstico obtenido por los métodos anteriores, permite seleccionar las opciones terapéuticas más adecuadas para el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos.
8. La clasificación de las E-BLEEs en filogrupos ha demostrado una mayor presencia de cepas pertenecientes a los grupos A y B1 (cepas comensales) entre las procedentes de alimentos y ambientales. Sin embargo, las cepas del filogrupo B2 (más virulentas) no solo se han detectado en el entorno

clínico sino también en alimentos, granjas y EDAR, lo que alerta sobre el problema de diseminación de cepas potencialmente patógenas.

9. El estudio filogenético ha demostrado no solo la enorme variabilidad de STs (177 distintos) y CCs (26) entre las cepas de *E. coli* aisladas en este estudio, sino también que estas ST no se agrupan en torno a nichos específicos. Este hecho, unido a la detección de un misma ST en cepas aisladas de muestras diversas y geográficamente distantes confirman la hipótesis de la diseminación y recirculación de cepas productoras de BLEEs a través del ambiente, pudiendo llegar hasta el hombre a través de la cadena alimentaria.
10. Los datos obtenidos en este estudio refuerzan la necesidad de desarrollar una serie mecanismos de intervención para frenar los flujos de resistencias observados en la Comunidad Foral de Navarra. Además de seguir las líneas estratégicas postuladas por la AEMPS, recomendamos mantener el enfoque global de vigilancia de estas resistencias, controlando muy especialmente los entornos acuáticos y productos alimentarios, y ampliando la detección de BLEEs y estudios filogenéticos a otras enterobacterias distintas a *E. coli*.

BIBLIOGRAFÍA.

- Aarestrup FM. 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J Antimicrob Agents* 12(4): 279-285.
- Aarestrup FM., Hasman H., Agerso Y., Jensen LB., Harksen S., Svensmark B. 2006. First description of bla(CTX-M-1)-carrying *Escherichia coli* isolates in Danish primary food production. *J Antimicrob Chemother* 57(6): 1258-1259.
- Abreu R., Castro B., Espigares E., Rodríguez-Álvarez C., Lecuona M., Moreno E., Espigares M., Arias A. 2014. Prevalence of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* strains isolated in poultry farms. *Foodborne Pathog Dis* 11: 868-873.
- Adler M., Anjum M., Andersson DA., Sandegren I. 2013. Influence of acquired β -lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 68(1): 51-59.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).2014. Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencias a los antibióticos. AEMPS. Madrid (<http://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica/docs/plan-estrategico-antibioticos.pdf>) Último acceso: 15 mayo 2015.
- Amador P., Fernandes R., Prudêncio C., Brito L. 2009. Resistance to beta-lactams in bacteria isolated from different types of Portuguese cheese. *Int J Mol Sci* 10(4): 1538-1551.
- Amador P, Fernandes R, Brito L, Prudêncio C. 2011. Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* isolated from Portuguese deli meats. *J Food Safety* 31: 1-20.
- Amador PP., Fernandes RM., Prudêncio MC., Barreto MP., Duarte IM. 2015. Antibiotic resistance in wastewater: Occurrence and fate of *Enterobacteriaceae* producers of Class A and Class C beta-lactamases. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 50(1): 26-39.
- Amaya E., Reyes D., Paniagua M., Calderón S., Rashid MU., Colque P., Kühn I., Möllby R., Weintraub A., Nord CE. 2012. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from different aquatic environmental sources in León, Nicaragua. *Clin Microbiol Infect* 18(9): 347-354.
- Ambler RP. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)* 289: 321-331.
- Ambler RP., Coulson AFW., Frere JM., Ghuysen JM., Joris B., Forsman M., Levesque RC., Tiraby G., Waley SG. 1991. A standard numbering scheme for the Class-A beta-lactamases. *Biochem J* 276: 269-270.
- Amos GCA., Zhang L., Hawkey PM., Gaze WH., Wellington EM. 2014. Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. *Vet Microbiol* 171: 441-447.

- Andersen SR., Sandaa RA., 1994. Distribution of tetracycline resistance among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 60(3): 908-912.
- Angulo FJ., Nargund VN., Chiller TC. 2004. Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51(8-9): 374-379.
- Arnan M., Gudiol C., Calatayud L., Liñares J., Domínguez MA., Batlle M., Ribera JM., Carratalà J., Gudiol F. 2011. Risk factors for, and clinical relevance of, faecal extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) carriage in neutropenic patients with haematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30:355-360.
- Arslan S., Ozdemir F. 2008. Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from homemade white cheeses: prevalence and antibiotic susceptibility. *World J Microbiol Biotechnol* 24(10): 2361-2364.
- Arslan S., Eyi A. 2011. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Escherichia coli* from retail meats. *J Food Saf* 31(2): 262-267.
- Aubron C., Porel L., Ash RJ., Nordmann P. 2005. Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis* 11: 260-264.
- Bajaj P., Singh NS., Kanaujia PK., Viridi JS. 2015. Distribution and molecular characterization of genes encoding CTX-M and AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from an Indian urban aquatic environment. *Sci Total Environ* 505: 350-356.
- Baquero F., Martínez JL., Cantón R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotech* 19: 260-265.
- Barlow M., Hall BG. 2002. Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J Mol Evol* 55(3): 314-321.
- Batchelor M., Threlfall EJ., Liébana E. 2005. Cephalosporin resistance among animal-associated *Enterobacteria*: a current perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther* 3: 403-417.
- Bauer AW., Kirby WM., Sherris JC., Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45(4): 493-496.
- Belmar Campos C., Fenner I., Wiese N., Lensing C., Christner M., Rohde H., Aepfelbacher M., Fenner T., Hentschke M. 2014. Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany. *Int J Med Microbiol* 304(5-6): 678-684.

- Beninati C., Reich F., Muscolino D., Giarratana F., Panebianco A., Klein G., Atanassova V. 2015. ESBL-producing bacteria and MRSA isolated from poultry and turkey products imported from Italy. *Czech J Food Sci* 33: 97-102.
- Ben Said L., Jouini A., Klibi N., Dziri R., Alonso CA., Boudabous A., Ben Slama K., Torres C. 2015. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int J Food Microbiol* 203: 86-92.
- Bergenholtz RD., Jorgensen MS., Hansen LH., Jensen LB., Hasman H. 2009. Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. *J Antimicrob Chemother* 64(1): 207-209.
- Bergogne BE., Decré D., Joly Guillou ML. 1993. Opportunistic nosocomial multiply resistant bacterial infections - their treatment and prevention. *J Antimicrob Chemother* 32(A): 39-47.
- Bidet P., Mahjoub-Messai F., Blanco J., Blanco J., Dehem M., Aujard Y., Bingen E., Bonacorsi S. 2007. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *J Infect Dis* 196(2): 297-303.
- Blaak H., Hamidjaja RA., van Hoek A., de Heer L., de Roda Husman AM., Schets FM. 2014a. Detection of ESBL-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. *Appl Environ Microbiol* (1): 239-246.
- Blaak H., van Hoek AH., Veenman C., van Leeuwen AE., Lynch G., van Overbeek WM., de Roda Husman AM. 2014b. Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *Int J Food Microbiol* 168-169: 8-16.
- Blanco J., Mora A., Mamani R., López C., Blanco M., Dahbi G., Herrera A., Blanco JE., Alonso MP., García-Garrote F. y col. 2011. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *J Antimicrob Chemother* 66(9): 2011-2021.
- Bonnedahl J., Drobni M., Gauthier-Clerc M., Hernández J., Granholm S., Kayser Y., Melhus A., Kahlmeter G., Waldenstrom J., Johansson A., Olsen B. 2009. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. 2009. *PLoS One* 4 (6): e5958.
- Bonnedahl J., Drobni P., Johansson A., Hernández J., Melhus A., Stedt J., Olsen B., Drobni M. 2010. Characterization, and comparison, of human clinical and black-headed gull (*Larus*

- Bush K. 1989. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 259-263.
- Bush K., Jacoby GA., Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Ant Agents Chemother* 39: 1211-1233.
- Cantón R., Oliver A., Coque TM., Varela MC., Pérez-Díaz JC., Baquero, F. 2002. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol* 40: 1237-1243.
- Cantón R., Coque TM. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9: 466-475.
- Cantón R., González-Alba JM., Galán JC. 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* 3: 110.
- Carattoli A., Lovari S., Franco A., Cordaro G., Di Matteo P., Battisti A. 2005. Extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 833-835.
- Carattoli A. 2008. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* 14(1): 117-123.
- Carneiro C., Araujo C., Gonçalves A., Vinué L., Somalo S., Ruiz E., Uliyakina I., Rodrigues J., Igrejas G., Poeta P., Torres C. 2010. Detection of CTX-M-14 and TEM-52 extended-spectrum beta-lactamases in fecal *Escherichia coli* isolates of captive ostrich in Portugal. *Foodborne Pathog Dis* 7(8): 991-994.
- Casella T., Rodríguez MM., Takahashi JT., Ghiglione B., Dropa M., Assunção E., Nogueira ML., Lincopan N., Gutkind G., Nogueira MC. 2015. Detection of blaCTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in Brazil. *Int J Food Microbiol* 197: 88-91.
- Cavaliere SJ. 2005. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Pag 157. Figura 12.1. *American Society for Microbiology*. Ed. Marie B. Coyle. University of Washington, Seattle, Washington 98195.
- Cisneros JM., Cordero E. 2007. Relevancia de las BLEE en el pronóstico y coste de las infecciones. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 25: 48-53.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4555-4558.
- Clermont O., Christenson JK., Denamur E., Gordon DM. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep* 5(1): 58-65.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Performance Standards for Antimicrobial. Document M100- S22. In: *Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement*. 32(3). CLSI, Wayne, USA.

- Cogliani C., Goossens H., Greko C. 2011. Restricting Antimicrobial Use in Food Animals: Lessons from Europe. *Microbe* 6(6): 274-279.
- Coleman BL., Salvadori MI., McGeer AJ., Sibley KA., Neumann NF., Bondy SJ., Gutmanis IA., McEwen SA., Lavoie M., Strong D., Johnson I., Jamieson FB., Louie M., ARO Water Study Group. 2012. The role of drinking water in the transmission of antimicrobial-resistant *E. coli*. *Epidemiol Infect* 140: 633-642.
- Colom K., Pérez J., Alonso R., Fernández-Aranguiz A., Larino E., Cisterna R. 2003. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, blaSHV and blaOXA-1 genes in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett* 223(2): 147-151.
- Comisión Europea. Commission regulation (EU) No 56/2013. *Official journal of the European Union*.
- Coque TM., Baquero F., Cantón R. 2008a. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill* 13(47): pii19044. Disponible: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19044>. Último acceso : 24 abril de 2015.
- Coque TM., Novais A., Carattoli A., Poirel L., Pitout J., Peixe L., Baquero F., Cantón R., Nordmann P. 2008b. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Diseases* 14(2): 195-200.
- Corbella X., Montero A., Pujol M., Domínguez MA., Ayats J., Argerich, MJ., Garrigosa F., Ariza J., Gudiol F. 2000. Emergence and rapid spreads of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 38: 4086-4095.
- Cortes P., Blanc V., Mora A., Dahbi G., Blanco JE. Blanco M., Lopez C., Andreu A., Navarro F., Alonso MP., Bou G., Blanco J., Llagostera M. 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol* 76: 2799–2805.
- Cheng AC., Turnidge J., Collignon P., Looke D., Barton M., Gottlieb T. 2012. Control of fluoroquinolone resistance through successful regulation, Australia. *Emerg Infect Dis* 18: 1453-1460.
- Chandramohan L., Revell PA. 2012. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum- b-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a pediatric patient population. *Antimicrob Agents Chemother* 56(9): 4765-4770.
- Dierikx CM., van Duijkeren E., Schoormans AHW., van Essen-Zandbergen A., Veldman K., Kant A., Huijsdens XW., van der Zwaluw K., Wagenaar JA., Mevius DJ. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC-

- producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother* 67 (6): 1368-1374.
- Dierikx C., van der Goot J., Fabri T., van Essen-Zandbergen A., Smith H., Mevius D. 2013. Extended spectrum beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *J Antimicrob Chemother* 68: 60-67.
- Doi Y., Arakawa Y. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 45(1): 88-94.
- Doi Y., Paterson DL. 2007. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. *Int J Infect Dis* 11(3): 191-197.
- Dolejska M., 2011. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella spp.* isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother* 66(12): 2784-2790.
- Donnenberg MS. 2005. *Enterobacteriaceae*. En. *Principles and practice of infectious diseases*. Mandell GL., Bennett JE., Dolin, R. 2567-2586.
- Dumarche P., De Champs C., Sirot D., Chanal C., Bonnet R., Sirot J., 2002. TEM derivative-producing *Enterobacter aerogenes* strains: Dissemination of a prevalent clone. *Antimicrob Agents Chemother* 46(4): 1128-1131.
- Durante-Mangoni E., Del Franco M., Andini R., Bernardo M., Giannouli M., Zarrilli R. 2015. Emergence of colistin resistance without loss of fitness and virulence after prolonged colistin administration in a patient with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 82: 222-226.
- ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control (http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx). Último acceso: 13 Abril 2015.
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2012. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal* 10(3): 2598-2831.
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2015. *EU. Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013*. *EFSA Journal* 13(2): 4036-4214.
- Egea P., López-Cerero L., Navarro MD., Rodríguez-Baño J., Pascual A. 2011. Assessment of the presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in eggshells and ready-to-eat products. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30(9): 1045-1047.

- Egervärn M., Börjesson S., Byfors S., Finn M., Kaibe C., Englund S., Lindblad M. 2014. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. *Int J Food Microbiol* 171: 8-14.
- Eller C., Leistner R., Guerra B., Fischer J., Wendt C., Rabsch W., Werner G., Pfeifer Y. 2014. Emergence of extended-spectrum b-lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany. *J Antimicrob Chemother* 69(2): 562-564.
- European Medicines Agency (EMA). European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2014. Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012. (EMA/333921/2014)
- Emborg HD., Vigre H., Jensen VF., Vieira ARP., Baggesen DL., Aarestrup FM. 2007. Tetracycline consumption and occurrence of tetracycline resistance in *Salmonella typhimurium* phage types from Danish pigs. *Microb Drug Resist* 13: 289-294.
- Escudero E., Vinué L., Teshager T., Torres C., Moreno MA. 2010. Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain. *Res Vet Sci* 88(1): 83-87.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO/OIE/WHO. 2003. First joint expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment.
- Ferech M., Coenen S., Malhotra-Kumar S., Dvorakova K., Hendrickx E., Suetens C., Goossens H., Grupo Proyecto ESAC. 2006. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): Outpatient quinolone use in Europe. *J Antimicrob. Chemother* 58: 423-427.
- Fernandes R., Vieira M., Ferraz R., Prudêncio C. 2008. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: report from two Portuguese hospitals. *J Hosp Infect* 70: 93-95.
- Fernández-Reyes M., Vicente D., Gomariz M., Esnal O., Landa J., Onate E., Pérez-Trallero E. 2014. High rate of fecal carriage of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in healthy children in Gipuzkoa, northern Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 58(3): 1822-1824.
- Filippini M., Masiero G., Moschetti K. 2006. Socioeconomic determinants of regional differences in outpatient antibiotic consumption: evidence from Switzerland. *Health Pol* 78: 77-92.
- Finley RL., Collignon P., Larsson DG., McEwen SA., Li XZ., Gaze WH., Reid-Smith R., Timinouni M., Graham DW., Topp E. 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin Infect Dis* 57(5): 704-710.
- Fisher JF., Mobashery S. 2009. Three decades of the class A β -lactamase acyl-enzyme. *Curr. Protein Pept J Sci* 10: 401-407.

- Food and Drug Administration (FDA). 2012. Cephalosporin Rule. FDA-2012-N-0326.
- Furuya EY., Lowy FD. 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* 4(1): 36-45.
- García A., Navarro F., Miró E., Villa L., Mirelis B., Coll P., Carattoli A. 2007. Acquisition and diffusion of blaCTX-M-9 gene by R478-IncHI2 derivative plasmids. *FEMS Microbiol Lett* 271: 71-77.
- García-Aljaro C., Moreno E. Andreu A., Prats G., Blanch AR. 2009. Phylogroups, virulence determinants and antimicrobial resistance in stx(2) gene-carrying *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *Res Microbiol* 160: 585–591.
- García-Migura L., Hendriksen RS., Fraile L., Aarestrup FM. 2014. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Vet Microbiol* 170(1-2): 1-9.
- Geser N., Stephan R., Hachler H. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res* 8: 21
- Gibold L., Robin F., Tan RN., Delmas J., Bonnet R. 2014. Four-year epidemiological study of extended-spectrum b-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a French teaching hospital. *Clin Microbiol Infect* 20: 20-26.
- Girlich D., Poirel L., Carattoli A., Kempf I., Lartigue MF., Bertini A., Nordmann P. 2007. Extended-spectrum b-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol* 73: 4681-4685.
- Girlich D., Poirel L., Nordmann P. 2010. Novel Ambler class A carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from a *Pseudomonas fluorescens* isolate from the Seine River, Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 328-332.
- Gniadkowski, M. 2008. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect* 14(1): 11-32.
- Gómez J., Muñoz R., Baños V., Gómez G. 2005. Tratamiento de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad: perspectivas actuales y enfoque clínico del paciente. *Rev Esp Quimioterap* 18: 318-327.
- Gómez M., Díaz MT., Araujo M., Sueiro R., Garrido J., 2010. Waste water treatment plants as redistributors of resistance genes in bacteria. *Water Pollut X* 135: 83-94.
- Gordon DM., Stern SE., Collignon PJ. 2005. Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiol SGM* 151: 15-23.
- Gonçalves A., Torres C., Silva N., Carneiro C., Radhouani H., Coelho C., Araújo C., Rodrigues J., Vinué L., Somalo S., Poeta P., Igrejas G. 2010. Genetic characterization of

- extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates of pigs from a portuguese intensive swine farm. *Foodborne Pathog Dis* 7(12): 1569-1573.
- Gracia Arnillas MP., Bosque Vall C., Vela Cano F., Abad Peruga V., Tarragó Eixarch E., Roca Alcarria M.J., Carol Riera M., Balaguer Blasco R.M., Villaescusa Arrabal R., Terrades Arrabal R., Plasencia V., Álvarez Lerma F. 2013. Impacto de las medidas de higiene ambiental en la transmisión de bacilos gramnegativos multirresistentes (BGN-MR) en una UCI polivalente. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 31(Espec Cong 1): 056.
- Granados-Chinchilla F., Alfaro M., Chavarria G., Rodríguez C. 2014. Unravelling a vicious circle: animal feed marketed in Costa Rica contains irregular concentrations of tetracyclines and abundant oxytetracycline-resistant Gram-positive bacteria. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 31(6): 1017-1025.
- Guenther S., Grobbel M., Beutlich J., Bethe A., Friedrich ND., Goedecke A., Lubke-Becker A., Guerra B., Wieler LH., Ewers C. 2010. CTX-M-15-type extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* from wild birds in Germany *Environ Microbiol Rep* 2(5): 641-645.
- Hammerum AM., Larsen J., Andersen VD., Lester CH., Skovgaard Skytte TS., Hansen F., Olsen SS., Mordhorst H., Skov RL., Aarestrup FM., Agerso Y. 2014. Characterization of extended-spectrum b-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 69: 2650-2657.
- Hawkey P., Jones AM. 2009. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 64(4): 3-10.
- Hawkey PM. 2015. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. *J Hosp Infect* 89(4): 241-247.
- Hernández JR., Martínez-Martínez L., Cantón R., Coque TM., Pascual A. 2005. Spanish group for nosocomial infections (GEIH): Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2122-2125.
- Herzer PJ., Inouye S., Inouye M., Whittam TS. 1990. Phylogenetic distribution of branched rna-linked multicopy single-stranded dna among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172(11): 6715-6181.
- Hu YY., Cai JC., Zhou HW., Chi D., Zhang XF., Chen WL., Zhang R., Chen GX. 2013. Molecular typing of CTX-M producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine faeces, specimens from healthy humans, and human patients. *Appl Environ Microbiol* 79(19): 5988-5996.
- INE (Instituto Nacional de Estadística) 2013. Datos a 1 de Enero de 2013. (<http://www.ine.es/>)

- Isozumi R., Yoshimatsu K., Yamashiro T., Hasebe F., Nguyen B., Ngo TC., Yasuda SP., Koma T., Shimizu K., Arikawa J., 2012. blaNDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* from environment, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 18(8): 1383-1384.
- Jakobsen L., Hammerum AM., Frimodt-Moller N. 2010. Detection of clonal group A *Escherichia coli* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, community-dwelling humans, and urinary tract infection (UTI) patients and their virulence in a mouse UTI model. *Appl Environ Microbiol* 76(24): 8281-8284.
- Jarlier V., Nicolas MH., Fournier G., Philippon A. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 10(4): 867-878.
- Jaureguy F., Landraud L., Passet V., Diancourt L., Frapy E., Guigon G., Carbonnelle E., Lortholary O., Clermont O., Denamur E., Picard B., Nassif X., Brisse S. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9: 560.
- Jiang HX., Tang D., Liu YH., Zhang XH., Zeng ZL., Xu L., Hawkey PMJ. 2012 Prevalence and characteristics of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *Antimicrob Chemother* 67(10): 2350-2353.
- Johnson JR., Delavarri P., Kuskowski M., Stell A.L. 2001. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 183: 78-88.
- Johnson, JR., Russo, TA. 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". *J Lab Clin Med* 139: 155-162.
- Johnson JR., Murray AC., Gajewski A., Sullivan M., Snippes P., Kuskowski MA., Smith KE. 2003. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2161-2168.
- Johnson JR., Kuskowski MA., Smith K., O'Bryan TT., Tatini S. 2005. Antimicrobial-resistant and extra intestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *J Infect Dis* 191: 1040-1049.
- Johnson JR., Kuskowski MA., Menard M. Gajewski A., Xercavins M., Garau, J. 2006 Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. *J Infect Dis* 194: 71-78.
- Johnson JR., Menard M., Johnston B., Kuskowski MA., Nichol K., Zhanel GG. 2009. Epidemic clonal groups of *Escherichia Coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother* 53(7): 2733-2739.

- Jorgensen JH., McElmeel ML., Fulcher LC., Zimmer BL. 2010. Detection of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) by testing with MicroScan overnight and ESBL confirmation panels. *J Clin Microbiol* 48(1): 120-123.
- Kar D., Bandyopadhyay S., Bhattacharyya D., Samanta I., Mahanti A., Nanda PK., Mondal B., Dandapat P., Das AK., Dutta TK., Bandyopadhyay S., Singh RK. 2015. Molecular and phylogenetic characterization of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from poultry and cattle in Odisha, India. *Infect Genet Evol* 29: 82-90.
- Kingsley SAJ., Verghese S. 2013. First Report of OXA-4, an ESBL Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* a South Indian Strain. *Indian J Microbiol* 53(3): 308-314.
- Knapp CCW., Zhang W., Sturm BSM., Graham DW. 2010. Differential fate of erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under different aquatic conditions. *Environ Pollut* 158(5): 1506-1512.
- Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsuhashi S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11(6): 315-317.
- Koh TH., Cao DYH., Chan KS., Wijaya L., Low SBG., Lam MS., Ooi EE., Hsu LY. 2012. blaOXA-181-positive *Klebsiella pneumoniae*, Singapore. *Emerg Infect Dis* 18(9): 1524-1525.
- Kojima A., Ishii Y., Ishihara K., Esaki H., Asai T., Oda C., Tamura Y., Takahashi T., Yamaguchi K. 2005. Extended-spectrum- β -lactamase producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3533-3537.
- Korzeniewska E., Harnisz M. 2013. Extended-spectrum betalactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. *J Environ Manage* 128: 904-911.
- Laube A., Friese C., von Salviati C., Guerra B., Rosler U. 2014. Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Vet Microbiol* 172(3-4): 519-527.
- Lautenbach E., Patel JB., Bilker WB., Edelstein PH., Fishman NO. 2001 Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 32: 1162-1171.
- Leistner R., Gurntke S., Sakellariou C., Denkel LA., Bloch A., Gastmeier P., Schwab F. 2014. Bloodstream infection due to extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *K. pneumoniae* and *E. coli*: an analysis of the disease burden in a large cohort. *Infection* 42: 991-997.

- Leung E., Weil DE., Raviglione M., Nakatani H. 2011. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ* 89: 390-392.
- Livermore DM. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 36(Suppl 1): S11-23.
- Livermore DM. 2004. The need for new antibiotics. *Clin Microbiol Infect* 10(4): 1-9.
- Livermore DM., Woodford N., 2006. The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 14: 413-420.
- Livermore DM., Cantón R., Gniadkowski M., Nordmann P., Rossolini GM., Arlet G., Ayala J., Coque TM., Kern-Zdanowicz I., Luzzaro F., Poirel L., Woodford N. 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob. Chemother* 59: 165-174.
- Livermore DM. 2012. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram Negative Pathogens. *J Intern med* 27(2): 128-142.
- Lu SY., Zhang YL., Geng SN., Li TY., Ye ZM., Zhang DS., Zou F., Zhou HW., 2010. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Appl Environ Microbiol.* 76 : 5972-5976.
- Lübbert C., Straube L., Stein C., Makarewicz O., Schubert S., Mössner J., Pletz MW., Rodloff AC. 2015. Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in international travelers returning to Germany. *Int J Med Microbiol* 305 (1): 148-156.
- Mabilat C., Courvalin P. 1990. Development of oligotyping for characterization and molecular epidemiology of tem beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 34(11): 2210-2216.
- Machado E., Coque TM., Cantón R., Novais A., Sousa JC., Baquero F., Peixe L. Autoría conjunta: Grupo portugués de estudio de resistencias. 2007. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *J Antimicrob Chemother* 60(6): 1370-1374.
- Maddox TW., Clegg PD., Diggle PJ., Wedley AL., Dawson S., Pinchbeck GL., Williams NJ. 2012. Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 1: Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Equine Vet J* 44(3): 289-296.
- Mammeri H., Van De Loo M., Poirel L., Martínez-Martínez L., Nordmann P. 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 49(1): 71-76.
- Martínez-Martínez L., García I., Ballesta S., Benedi VJ., Hernández-Alles S., Pascual A. 1998. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 42(7): 1850-1852.

- Njage PM., Buys EM. 2015. Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC β -lactamases determinants to isolates from lettuce. *Microb Biotechnol* 8(3): 462-473.
- Nicolas-Chanoine MH., Blanco J., Leflon-Guibout V. 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 61: 273-281.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 17: 1791-1798.
- Ojer-Usoz E., González D., Vitas AI., Leiva J., García-Jalón I., Febles-Casquero A., Escolano MS. 2013. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Sci* 93(2): 316-321.
- Ojer-Usoz E., González D., García-Jalón I., Vitas AI. 2014. High dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in effluents from wastewater treatment plants. *Water Res* 56: 37-47.
- Oteo J., Navarro C., Cercenado E., Delgado-Iribarren A., Wilhelmi I., Orden B., García C., Miguelañez S., Pérez-Vázquez M., García-Cobos S., Aracil B., Bautista V., Campos J. 2006. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol* 44(7): 2359-2366.
- Oteo J., Campos J., Lázaro E., Cuevas O, García-Cobos S, Pérez-Vázquez M, de Abajo FJ., miembros españoles de la EARSS. 2008. Increased amoxicillin-clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* blood isolates, Spain. *Emerg Infect Dis* 14: 1259-1262.
- Oteo J., Diestra K., Juan C., Bautista V., Novais A., Pérez-Vázquez M., Moyá B., Miró E., Coque TM., Oliver A., Cantón R., Navarro F., Campos J. Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI). 2009. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents* 34(2):173-176.
- Oteo J., Cercenado E., Cuevas O., Bautista V., Delgado-Iribarren A., Orden B., Pérez-Vázquez M., García-Cobos S., Campos J. 2010. AmpC betalactamases 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* 67: 270-276.
- Pan YS., Liu JH., Hu H., Zhao JF., Yuan L., Wu H., Wang LF., Hu GZ. 2013. Novel arrangement of the bla(CTX-M-55) gene in an *Escherichia coli* isolate coproducing 16S rRNA methylase. *J Basic Microbiol* 53(11): 928-933.

- Pannaraj PS., Bard JD., Cerini C., Weissman SJ. 2015. Pediatric carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Los Angeles, California, a high-prevalence region in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 34(1):11-16.
- Pantel A., Boutet-Dubois A., Jean-Pierre H., Marchandin H., Sotto A., Lavigne JP., grupo CARB-LR. 2014. French regional surveillance program of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli: results from a 2-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33(12): 2285-2292.
- Paterson DL., Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18(4): 657-686.
- Pavlov D., de Wet CM., Grabow WO., Ehlers MM. 2004. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. *Int J Food Microbiol* 92(3): 275-287.
- Pérez F., Endimiani A., Hujer KM., Bonomo RA. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 7(5): 459-469.
- 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(6): 2153-2162.
- Perilli M., Segatore B., De Massis MR., Riccio ML., Bianchi C., Zollo A., Rossolini GM., Amicosante G. 2000. TEM-72, a new extended-spectrum beta-lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (9): 2537-2539.
- Peternel C., Galler H., Zarfel G., Luxner J., Haas D., Grisold AJ., Reinthaler FF., Feierl G. 2014. Isolation and characterization of multidrug-resistant bacteria from minced meat in Austria. *Food Microbiol* 44: 41-46.
- Philippon A., Labia R., Jacoby G. 1989. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 33(8): 1131-1136.
- Pitout JD., Nordmann P., Laupland KB., Poirel L. 2005. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 56: 52-59.
- Poirel L., Lebessi E., Castro M., Fevre C., Foustoukou M., Nordmann P. 2004. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 48(6): 2277-2279.
- Poirel L., Villa L., Bertini A., Pitout JD., Nordmann P., Carattoli A. 2007. Expanded-spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 13(5): 803-805.

- Poirel L., Potron A., Nordmann P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 67:1597-1606.
- Polsfuss S., Bloemberg GV., Giger J., Meyer V., Böttger EC., Hombach M. 2012. Evaluation of a diagnostic flow chart for detection and confirmation of extended spectrum β -lactamases (ESBL) in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 18(12): 1194-1204.
- Prats G., Mirelis B. 1996. Enterobacterias. Características generales. Enterobacterias oportunistas. *Escherichia coli*. En: García-Rodríguez, JA. y Picazo, JJ. ed. *Microbiología Médica* Madrid: Mosby/Doyma Libros: 223-238.
- Prescott y col., 2004. Microbiología. McGraw-Hill Interamericana, Madrid. 5ª ed.
- Prescott JF. 2008. Antimicrobial use in food and companion animals. *Anim Health Res Rev* 9(2): 127-133.
- Pruden A., Larsson DGJ., Amézquita A., Collignon P., Brandt KK., Graham DW., Lazorchak JM., Suzuki S., Silley P., Snape JR., Topp E., Zhang T., Zhu YG. 2013. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ Health Perspect* 121(8): 878-885.
- Pulcrano G., Lula DV., deLuca C., Roscetto E., Vollaro A., Rossano F., Catania MR., 2014. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST512 carrying blaKPC-3 in a hospital in southern Italy. *APMIS* 122: 42-46.
- Queenan A. M., Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile betalactamases. *Clin Microbiol Rev* 20(3): 440-458.
- Quiagen. Protocol: Pretreatment for Gram-Negative Bacteria. DNeasy® Blood & Tissue Handbook. pp.44 (<https://www.qiagen.com/es/>)
- Randall LP., Clouting C., Horton RA., Coldham NG., Wu G., Clifton-Hadley FA., Davies RH., Teale CJ. 2011. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum β -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J Antimicrob Chemother* 66: 86-95.
- Randall LP., Lemma F., Rogers JP., Cheney TE., Powell LF., Teale CJ. 2014. Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from pigs at slaughter in the UK in 2013. *J Antimicrob Chemother* 69(11): 2947-2950.
- Rasheed JK., Jay C., Metchock B., Berkowitz F., Weigel L., Crellin J., Steward C., Hill B., Medeiros AA., Tenover FC. 1997. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 41(3): 647-653.
- Reinthal FF., Feierl G., Galler H., Haas D., Leitner E., Mascher F., Melkes A., Posch, J., Winter I., Zarfel G., Marth E. 2010. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res* 44(6): 1981-1985.

- Reuland EA., Al Naiemi N., Raadsen SA., Savelkoul PH., Kluytmans JA., Vandenbroucke-Grauls CM. 2014. Prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in raw vegetables. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 33(10):1843-1846.
- Richmond M.H., Sykes R.B. 1973. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 9: 31-88.
- Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby GA., Macielag M., Abbanat D., Park CH., Bush K., Hooper DC. 2006. Fluoroquinolone modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12(1): 83-88.
- Romero L., López L., Rodríguez-Baño J., Ramón Hernández J., Martínez-Martínez L., Pascual A. 2005. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 11: 625-631.
- Rodríguez-Baño J., Navarro MD., Romero L., Martínez-Martínez L., Muniaín MA., Perea EJ. 2004. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 42(3): 1089-1094.
- Rodríguez-Baño J., Pascual A. 2008. Clinical significance of extended spectrum beta-lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6: 671-683.
- Rodríguez-Baño J., Picón E., Gijón P., Hernández JR., Cisneros JM., Peña C., Almela M., Almirante B., Grill F., Colomina J., Molinos S., Oliver A., Fernández-Mazarrasa C., Navarro G., Coloma A., López-Cerero L., Pascual A. 2010. Risk factors and prognosis of nosocomial bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 48: 1726-1731.
- Rodríguez-Baño J., Mingorance J., Fernández-Romero N., Serrano L., López-Cerero L., Pascual A., Autoría conjunta: ESBL-REIPI Grp. 2012. Virulence profiles of bacteremic extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: association with epidemiological and clinical features. *PLoS One* 7(9): e44238.
- Rodríguez-Siek KE., Giddings CW., Doetkott C., Johnson TJ., Fakhur MK., Nolan LK. 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 151: 2097-2110.
- Rodríguez-Villalobos H., Glupczynski Y. 2014. Emergence and dissemination of multi-resistant Gram negative *Enterobacteriaceae*: lessons to be learnt from local and national surveillance programs in Belgium. *Acta Clin Belg Suppl* 70(1): 1-10.
- RUMA (*Responsible Use of Medicines in Agriculture Alliance*) (<http://www.ruma.org.uk/antimicrobials.htm>) Documentos consultados: "Responsible use of antimicrobials in poultry production", "Responsible use of antimicrobials in pig

- production" y "Responsible use of antimicrobials in dairy and beef cattle production".
Último acceso: 10 Abril 2015.
- Sabaté M., Navarro F., Miró E., Campoy S., Mirelis B., Barbé J., Prats G. 2002. Novel complex sul1-type integron in *Escherichia coli* carrying blaCTX-M-9. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2656-2661.
- Sabaté M., Prats G., Moreno E., Ballesté E., Blanch AR., Andreu A. 2008. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Res Microbio* 159: 288-293.
- Sancho, J. 2000. Epidemiología y etiología quirúrgica de las complicaciones infecciosas postoperatorias. En: Álvarez, F. ed. *Complicaciones infecciosas en el postoperatorio de cirugía abdominal*. Ediciones Ergon, S.A. (España): 3-20.
- Sanz S., Olarte C., Martínez-Olarte R., Navajas-Benito EV., Alonso CA., Hidalgo-Sanz S., Somalo S., Torres C. 2015. Airborne dissemination of *Escherichia coli* in a dairy cattle farm and its environment. *Int J Food Microbiol* 97: 40-44.
- Sawai T., Mitsuhas S., Yamagish S. 1968. Drug resistance of enteric bacteria, comparison of beta-lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to alpha-aminobenzylpenicillin. *JPN J Microbiol* 12(4): 423-434.
- Schmiedel J., Falgenhauer L., Domann E., Bauerfeind R., Prenger-Berninghoff E., Imirzalioglu C., Chakraborty T. 2014. Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiol* 14: 187
- Silbergeld EK., Graham J., Price LB. 2008. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu Rev Public Health* 29: 151-169.
- Silva J., Castillo G., Callejas L., López H., Olmos J., 2006. Frequency of transferable multiple antibiotic resistance amongst coliform bacteria isolated from a treated sewage effluent in Antofagasta, Chile. *Electron J Biotechnol* 9(5): 533-540.
- Simoes RR., Poirel L., Da Costa PM., Nordmann P. 2010. Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 16: 110-112.
- Smet A., Martel A., Persoons D., Dewulf J., Heyndrickx M., Catry B., Herman L., Haesebrouck F., Butaye P. 2008. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob Agents Chemother* 52(4): 1238-1243.
- Soto SM. 2006. Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24(8): 479-480.
- Sousa M., Torres C., Barros J., Somalo S., Igrejas G., Poeta P. 2011. Gilthead seabream (*Sparus aurata*) as carriers of SHV-12 and TEM-52 extended-spectrum beta-

- lactamases-containing *Escherichia coli* isolates. *Foodborne Pathog Dis* 8(10): 1139-1141.
- Suárez C., Gudíol F. 2009. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27(2): 116-129.
- Tacão M., Correia A., Henriques I. 2012. Resistance to broadspectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of blaCTX-M-like genes. *Appl Environ Microbiol* 78 : 4134-4140.
- Tacão M., Moura A., Correia A., Henriques I. 2014. Coresistance to different classes of antibiotics among ESBL producers from aquatic systems. *Water Res* 48: 100-107.
- Tham J., Odenholt I., Walder M., Brolund A., Ahl J., Melander, E. 2010. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in patients with travellers' diarrhoea. *Scand J Infect Dis* 42(4): 275-280.
- Tängdén T., Adler M., Cars O., Sandegren L., Löwdin E. 2013. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an *in vitro* pharmacokinetic model. *J. Antimicrob Chemother* 68(6): 1319-1326.
- Tartof SY., Solberg OD., Manges AR., Riley LW. 2005. Analysis of an uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 43(12): 5860-5864.
- Tissera S., Lee SM., 2013. Isolation of extended spectrum b-lactamase (ESBL) producing bacteria from urban surface waters in Malaysia. *Malays J Med Sci* 20(3): 14-22.
- Thomas C., Moore L., Elamin N., Doumith M., Zhang J., Maharjan S., Warner M., Perry C., Turton J., Johnstone C., Jepson A., Duncan N., Holmes A., Livermore DM., Woodford N. 2013. Early (2008-2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *Int J Antimicrob Ag* 42(6): 531-536.
- Thomson KS. 2010. Extended-Spectrum-β-Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *J Clin Microbiol* 48(4): 1019-1025.
- Torres C., Zarazaga M. 2007. ESBL in animals and their importance in transmission to humans. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 25(Suppl. 2): 29–37.
- Tzouvelekis LS., Bonomo RA. 1999. SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des* 5(11): 847-864.
- Valentin L., Sharp H., Hille K., Seibt U., Fischer J., Pfeifer Y., Michael GB., Nickel S., Schmiedel J., Falgenhauer L., Friese A., Bauerfeind R., Roesler U., Imirzalioglu C., Chakraborty T., Helmuth R., Valenza G., Werner G., Schwarz S., Guerra B., Appel B., Kreienbrock L., Käsbohrer A. 2014. Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and

- human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *Int J Med Microbiol* 304(7): 805-816.
- Valverde A., Coque TM., Sánchez-Moreno MP., Rollán A., Baquero F., Cantón R. 2004. Dramatic Increase in Prevalence of Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* during Nonoutbreak Situations in Spain. *J Clin Microbiol* 42 (10): 4769-4775.
- Vieira AR., Collignon P., Aarestrup FM., McEwen SA., Hendriksen RS., Hald T., Wegener HC. 2011. Association Between Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Food Animals and Blood Stream Isolates from Humans in Europe: An Ecological Study. *Foodborne Pathog Dis* 8(12): 1295-1301.
- Walsh T., Toleman M., Poirel L., Nordmann P. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm. *Clin Microbiol Rev* 18(2): 306-325.
- Wang HH., Manuzon M., Lehman M., Wan K., Luo H., Wittum TE., Yousef A., Bakaletz LO. 2006. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 254(2): 226-231.
- Wang Y., Wu CM., Zhang QJ., Qi J., Liu HB., Wang Y., He T., Ma LC., Lai J., Shen ZQ., Liu YQ., Shen JZ. 2012. Identification of New Delhi Metallo-beta-lactamase 1 in *Acinetobacter Iwoffii* of Food Animal Origin. *PLoS One* 7(5): e37152.
- Wang J., Stephan R., Karczmarczyk M., Yan QQ., Hachler, H., Fanning S. 2013. Molecular characterization of bla(ESBL)-harboring conjugative plasmids identified in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and healthy humans. *Front Microbiol* 4: 188.
- Wasiński B., Róžańska H., Osek J. 2014. Antimicrobial resistance of ESBL and AmpC-producing *Escherichia coli* isolated from meat. *Bull Vet Inst Pulawy* 58: 567-571.
- Webster DP., Gaulton T., Woodford N. 2010. Emergence of carbapenem resistance due to porin loss in an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* strain during meropenem therapy. *Int J Antimicrob Agents* 36(6): 575-576.
- Wilson M. 2008. Bacteriology of humans, an ecological perspective. Oxford. Blackwell Publishing.
- Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler LH., Karch H., Reeves PR., Maiden M. C., Ochman H., Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60(5): 1136-1151.
- Woerther PL., Burdet C., Chachaty E., Andremont A. 2013. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev* 26(4): 744-758.

- Wolf, MK. 2000. Bacterial infections of the small intestine and colon. *Curr Opin Gastroenterol* 16(1): 4.
- Woodford N., Fagan EJ., Ellington MJ. 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 57(1): 154-155.
- World Health Organization (WHO). 1999. Containing antimicrobial resistance. Review of the literature and report of a WHO workshop on the development of a global strategy for the containment of antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland. WHO/CDS/CSR/DRS/99.2.
- World Health Organization (WHO). 2000. WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. WHO/CDS/CSR/APH/2000.4. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). 2001. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. WHO/CDS/CDR/DRS/2001.2. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). 2007 Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Categorization for the Development of Risk Management Strategies to Contain Antimicrobial Resistance Due to Non-Human Antimicrobial Use. Report of the Second WHO Expert Meeting. Copenhagen. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland (<http://www.who.int/drugresistance/e>) Último acceso: 24 Abril 2015.
- Zarfel G., Galler H., Luxner J., Petternel C., Reinthaler FF., Haas D., Kittinger C., Grisold AJ., Pless P., Feierl G. 2014. Multiresistant bacteria isolated from chicken meat in Austria. *Int J Environ Res Publ Health* 11(12): 12582-12593.
- Zhang L., Li X., Poole K. 2001. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 3497-3503.
- Zhang XX., Zhang T., Fang HH., 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 82(3): 397-414.
- Zhang J., Zheng B., Zhao L., Wei Z., Ji J., Li L., Xiao Y. 2014. Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. *BMC Infect Dis* 14: 659.
- Zurfluh K., Hächler H., Nüesch-Inderbinen M., Stephan R. 2013. Characteristics of extended spectrum β -lactamase and carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* isolates from rivers and lakes in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 79(9): 3021-3026.

Zurfluh K., Nüesch-Inderbilen M., Morach M., Berner AZ., Hächler H., Stephan R. 2015. Extended-spectrum β -lactamase-producing-*Enterobacteriaceae* in vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand and Vietnam. *Appl Environ Microbiol* 81(9): 3115-3120.

ANEXO I



Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain

Elena Ojer-Usoz^a, David González^{a,*}, Ana Isabel Vitas^a, José Leiva^b, Isabel García-Jalón^a, Alejandro Febles-Casquero^b, María de la Soledad Escolano^b

^a Department of Microbiology and Parasitology, Microbiological Food and Water Laboratory, C.I.F.A. University of Navarra, C/Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Spain

^b Department of Microbiology and Parasitology, Clínica Universidad de Navarra, University of Navarra, Pamplona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2012

Received in revised form 7 September 2012

Accepted 12 September 2012

Keywords:

Enterobacteriaceae

Extended spectrum β -lactamase

ESBL

Meat products

ABSTRACT

Patterns of resistance in β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* family were investigated in isolates from 141 meat products (beef, poultry and pork) purchased in Spain. The strains that grow in ChromID ESBL agar plates were confirmed using the paired disk diffusion method. Resistance to amoxicillin/clavulanic acid, ceftazidime, ceftriaxone, aztreonam, cefpodoxime, gentamicin, doxycycline, cotrimoxazol, norfloxacin, piperacillin/tazobactam, fosfomicin and cefoxitin were tested following CLSI recommendations. Minimum inhibitory concentrations were determined by the MicroScan® NM37 panel and β -lactamase genes were detected using multiplex PCR and sequencing. Results show poultry as the meat product having the highest prevalence (84%), with *Escherichia coli* being the predominant bacteria (71.3%). Predominant β -lactamase types were CTX-M (37.8%), followed by CTX-M+TEM combination (20.7%), TEM (17%), SHV (12.2%), TEM+SHV combination (10.9%) and OXA (1.2%). 93.9% of the strains were resistant to one or more β -lactam antibiotics. Results indicate a widespread distribution of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in meat products, with a high rate of β -lactam resistance and a low rate of AmpC cephalosporinase-producing strains.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The *Enterobacteriaceae* family is used as a hygiene indicator in foodstuff processing. The use of antimicrobial agents in animal production (disease treatment and growth promotion) has caused an increase in the resistance in this family, with the most important mechanism of resistance being the production of β -lactamases which hydrolyze the beta-lactam ring (Smet et al., 2008) and inactivate the beta-lactams. The extended spectrum β -lactamases (ESBL) were initially defined by Philippon, Arlet, and Lagrange (1994) as plasmid-encoded β -lactamases capable of hydrolyzing first-, second-, third- and fourth-generation cephalosporins and monobactams. In recent years, an evolution of ESBLs by mutation mechanisms, involving a rapid acquisition of resistance and a high capacity of spread, has been described (Gniadkowski, 2008). In addition, the production of more than one type of ESBL by a particular microorganism is not uncommon. This issue deserves special attention and action due to its significant consequences on public health (Allen et al., 2010).

Recent studies suggest that animals could act as a reservoir of these ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (Carattoli, 2008). In Spain, these studies were performed on both healthy and sick animals (Briñas et al., 2005), while the study performed by Jouini et al. (2007) in Tunisia showed the presence of ESBL-producing bacteria associated with

resistance genes in different animal products such as beef, poultry and turkey. The possibility that these *Enterobacteriaceae* of animal origin, resistant to antimicrobials, were being transmitted to humans through the food chain has been considered (Aarestrup, 1999; Wang et al., 2006). In addition, evidence of a link between the use of antimicrobials in food-producing animals and the resistance observed in humans has been reported (Angulo, Nargund, & Chiller, 2004).

Numerous studies have described ESBL-producing *Enterobacteriaceae* isolates in clinical environments (Lewis, Herrera, Wickes, Patterson, & Jorgensen, 2007; Mattar & Martínez, 2007), and more recently in food, especially in meat products (Bergenholtz, Jorgensen, Hansen, Jensen, & Hasman, 2009; Carattoli, 2008; Carneiro et al., 2010; Cortes et al., 2010; Dierikx, van Essen-Zandbergen, Veldman, Smith, & Mevius, 2010; Escudero, Vinué, Teshager, Torres, & Moreno, 2010). Among clinical isolations, TEM, SHV and CTX-M are the most frequently reported ESBL families (Paterson & Bonomo, 2005), and, CTX-M- β -lactamases have become the most prevalent ESBLs in human *Enterobacteriaceae* worldwide (Livermore et al., 2007; Pitout, Gregson, Church, Elsayed, & Laupland, 2005; Pitout, Nordmann, Laupland, & Poirel, 2005). The reported prevalence of the ESBL subtypes CTX-M-1, CTX-M-14, TEM-52 and SHV-12 in food-producing animals and foods in Europe (EFSA, 2011) suggests transmission of ESBL-producing isolates from food to humans; however, there are very few studies which report this way of spread (Leverstein-van Hall et al., 2011).

The purpose of this study was to evaluate the presence and concentration of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains in meat products

* Corresponding author. Tel.: +34 948 425600x806386; fax: +34 948 425652.
E-mail address: dgonzalez@unav.es (D. González).

purchased in different markets in Navarra (Spain), as well as to characterize their patterns of antimicrobial resistance. Comparative studies among clinical isolates and food isolates from the same area will provide more information regarding possible transmission of resistant strains from food to humans.

2. Materials and methods

2.1. Collection of meat samples

A total of 141 samples of animal origin (beef $n = 49$; poultry $n = 45$; pork $n = 47$) were collected from 50 shops in Navarra, ensuring that they did not belong to the same distribution chain. When it was possible, three different meat products, presented in the form of plain hamburger, sausages or minced meat were purchased in each shop. Samples were transported to the laboratory immediately after being collected in a portable cooler, maintained at refrigeration temperatures. Microbiological analysis was carried out within 24 h of arrival of the samples, which were stored at 3 ± 2 °C.

2.2. Isolation and identification of strains

Homogenization of the products was performed in a Stomacher (Lab-Blender 400, Seward Medical, England) by adding 225 ml of buffered peptone water (BPW, Merck, Darmstadt, Germany) to each 25 g sample. On the one hand, a direct count was carried out spreading 1 ml of this homogenate onto two ChromID ESBL agar plates (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) at 0.5 ml per plate. On the other hand, a first pre-enrichment of BPW (37 ± 1 °C, 24 h) was performed, and a second enrichment transferring 1 ml of pre-incubated BPW to 10 ml of EE Mossel (Difco, Le Pont de Claix, France) (37 ± 1 °C, 24 h). Next, isolation of resistant strains was performed on ChromID ESBL plates (37 ± 1 °C, 24 h). This medium contains rich nutrients with a mixture of antibiotics, including Cefpodoxime which is the marker of choice for this resistance mechanism. In addition, the chromogenic components of ChromID ESBL medium provide a preliminary rapid identification genus of suspicious ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains by the coloration of colonies. In this sense, *Escherichia coli* (β -glucuronidase-producing colonies) show pink to burgundy coloration; *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (β -glucosidase-producing colonies) are green/blue to brownish-green colored; and *Proteaeae* (*Proteus*, *Providencia*, *Moraganelia*) show dark to light brown coloration due to deaminase activity. Suspicious ESBL-producing *Enterobacteriaceae* colonies on ChromID ESBL agar plates were isolated on nutrient agar (Biolife, Milano, Italy) and identified by oxidase test, KIA, API 10S (Biomérieux) and VITEK GN cards (Biomérieux) in cases where API 10S was not discriminatory.

2.3. ESBL production and antimicrobial susceptibility

Isolates were tested for ESBL production using the disk approximation method described by Jarlier, Nicolas, Fournier, and Philippon (1988). An inoculum with a turbidity equivalent to 0.5 McFarland standards was spread over a Mueller Hinton agar plate (Becton Dickinson). The amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 30 μ g) was placed in the center of the plate, and the following disks of β -lactam antibiotics were placed 20 mm apart from the center in order to observe the synergistic effect: ceftazidime (CAZ, 30 μ g), ceftriaxone (CRO, 30 μ g), aztreonam (AZT, 30 μ g), and cefpodoxime (CPD, 10 μ g). ESBL presence was confirmed by demonstrating synergy between cephalosporin with reduced halo and clavulanic acid.

The antimicrobial susceptibility to other antibiotics commonly used in clinical treatments was evaluated by the standard disk diffusion method (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1966). The resistance to gentamicin (GM, 10 μ g), doxycycline (D, 30 μ g), cotrimoxazole (SXT, 23.75/1.25 μ g), norfloxacin (NOR, 10 μ g), piperacillin/tazobactam

(TZP, 110 μ g), fosfomicin (FOT, 200 μ g) and ceftazidime (FOX, 30 μ g) was assessed. The susceptibility to each antibiotic (sensitive, resistant or intermediate) was determined according to the diameter of the area of inhibition and was interpreted as recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010). All antibiotic disks were purchased from Becton Dickinson (BD and Company, United States), with the exception of fosfomicin and cefpodoxime (Oxoid).

The autoSCAN®-4 System (Siemens) processes panels in seconds and tested multiple antimicrobials. In this study, Neg Mic Panel Type 37 (MicroScan® NM37) was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs). The system includes Lab Pro® 3.5 Information Management software for analysis. This method has provided interesting results for the study of ESBL-producing bacteria (Komatsu et al., 2003). Panels including cefotaxime (0.5–128 μ g/ml), cefotaxime/clavulanic acid (0.12/4 to 16/4 μ g/ml), ceftazidime (0.5–128 μ g/ml), ceftazidime/clavulanic acid (0.12/4 to 16/4 μ g/ml), cefepime (1–32 μ g/ml), aztreonam (0.5–64 μ g/ml), ceftazidime (2–32 μ g/ml), cefpodoxime (0.5–64 μ g/ml), piperacillin (16–64 μ g/ml), imipenem (0.5–16 μ g/ml), meropenem (0.5–16 μ g/ml), ertapenem (0.5–4 μ g/ml), ampicillin (2–16 μ g/ml), mezlocillin (16, 64 μ g/ml), cefazoline (8–16 μ g/ml), cefuroxime (1, 4–16 μ g/ml), amoxicillin/clavulanic acid (8/4–16/8 μ g/ml), piperacillin/tazobactam (8–16, 64 μ g/ml) and ampicillin/sulbactam (8/4–16/8 μ g/ml) were used. After inoculation with a standardized suspension of fresh organisms (0.5 McFarland turbidity), and following incubation at 35 °C for a minimum of 16 h, the panels were read using the autoSCAN®-4 system. ESBL production was judged to have occurred when there was ≥ 3 two-fold concentration decrease in an MIC for any one of the drugs tested in combination with clavulanic acid versus its MIC when tested alone.

The MIC₅₀ and MIC₉₀ (minimum concentration required to inhibit the growth of 50% and 90% of organisms, respectively) were used for evaluating antibiotic sensitivities. Quality control was performed using *E. coli* ATCC 25922 as negative control and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 as positive controls.

2.4. Characterization of β -lactamase genes

In order to characterize the β -lactamase (*bla*) genes involved in the ESBL production, two different types of multiplex-PCR were used. Bacterial isolates were grown overnight on nutrient agar plates (Biolife) at 37 °C. Individual colonies were suspended in 300 μ l of water and boiled for 5–10 min. This heat treatment was used to prepare the template DNA from samples in order to use it in the PCR experiments.

For the detection of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{OXA-1} genes, the multiplex-PCR described by Colom et al. (2003) was used. Briefly, the amplification was performed in a final volume of 25 μ l, containing 2 μ l of template DNA and 23 μ l of the reaction mixture, with the following composition: 2.5 μ l of buffer (10 \times / μ l), 1 μ l 50 mM MgCl₂, 1.5 μ M of OXA-1 and 1 μ M of TEM and SHV primers (Sigma-Aldrich), 0.2 mM of dNTP mix (Bioline) and 1 U of Taq-polymerase (Bioline). The amplification conditions used were as described by Colom.

The presence of genes encoding CTX-M β -lactamase was studied using a modification of the multiplex-PCR used by Woodford, Fagan, and Ellington (2006). Similar to that which was reported previously, the amplification was performed in a final volume of 25 μ l, containing 2 μ l of template DNA and 23 μ l of the reaction mixture, whose composition was as follows: 2.5 μ l of buffer (10 \times / μ l), 1 μ l 50 mM MgCl₂, 1 μ M of each primer (Sigma-Aldrich), 0.2 mM of dNTP mix (Bioline) and 1 U of Taq-polymerase (Bioline). The amplification conditions used had been modified using an initial denaturation at 94 °C for 5 min; followed by 30 cycles of DNA denaturation at 94 °C for 45 s, primer annealing at 55 °C for 30 s, primer extension at 72 °C for 50 s; and a final elongation at 72 °C for 6 min.

Positive and negative controls from the bacterial collection of the University of La Rioja were included in all the PCR assays, and a 1 kb ladder (Invitrogen) was used as a molecular size standard.

2.5. Direct sequencing of the *bla*_{CTX-M}/*bla*_{OXA}/*bla*_{SHV}/*bla*_{TEM} amplicons

PCR products of *bla* genes were subjected to bidirectional nucleotide sequencing using PCR primers to determine their molecular types. All sequencing was performed by the EZ-Seq purification service of MacroGen. The amino acid sequences obtained were compared with those included in the GenBank database as well as with those deposited at the web site <http://www.lahey.org/Studies/> (Jacoby & Bush, 2012), in order to ascribe the specific type of β -lactamase gene.

2.6. Statistical analysis

The results were subjected to statistical processing with the SPSS 15 software, applying chi square test for comparison of meat procedure ESBL isolates with a level of significance of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Identification and sensitivity profiles of suspicious ESBL-producing *Enterobacteriaceae*

A total of 115 suspicious isolates were recovered in the ChromID ESBL agar medium from 46 of the 50 establishments (in one or more meat products), which represents 92% of the analyzed facilities. It should be noted that in 16 butcher shops, resistant strains were isolated in all the tested products. With regard to incidence in meat samples, suspicious ESBL-producing *Enterobacteriaceae* were isolated in 93 of the 141 analyzed samples (66%). Table 1 shows the identity of the 115 suspicious ESBL-producing *Enterobacteriaceae* isolated. A high prevalence of *E. coli* strains was found, with *Serratia fonticola* in second place. The rest of the strains were identified as *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus penneri*, *Proteus mirabilis*, *Hafnia alvei* and *Rahnella aquatilis*.

3.2. Sensitivity profiles of isolated strains

The antimicrobial susceptibility tests using the standard disk diffusion method confirmed the presence of 108 ESBL-producing strains from the 115 isolates recovered in ChromID ESBL agar plates, including all identified species except *H. alvei* (Table 1). The β -lactam sensitivity patterns showed a high resistance against cefpodoxime (93% of isolates were resistant and 7% intermediate) and ceftriaxone (67% resistant, 24% intermediate and only 8% were sensitive). The high resistance to cefpodoxime could be due to the components used in the

Table 1
ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains isolated on ChromID ESBL agar plates and confirmed strains by antimicrobial tests and PCR analysis.

Species	Number of ESBL-producing strains (%)			
	Suspicious in ChromID ESBL agar	Confirmed by standard disk diffusion method	Confirmed by MicroScan® NM37 and Lab Pro® soft	Confirmed by PCR and sequencing
<i>E. coli</i>	82 (71.3)	80 (74.1)	79 (88.7)	76 (92.7)
<i>S. fonticola</i>	16 (13.9)	15 (13.9)	0 (0)	1 (1.2)
<i>P. vulgaris</i>	6 (5.2)	4 (3.7)	4 (4.5)	0 (0)
<i>C. koseri</i>	3 (2.6)	3 (2.8)	3 (3.3)	1 (1.2)
<i>K. pneumoniae</i>	2 (1.7)	2 (1.8)	2 (2.2)	1 (1.2)
<i>E. cloacae</i>	2 (1.7)	1 (0.9)	0 (0)	2 (2.4)
<i>P. penneri</i>	1 (0.9)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)
<i>P. mirabilis</i>	1 (0.9)	1 (0.9)	1 (1.1)	1 (1.2)
<i>H. alvei</i>	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>R. aquatilis</i>	1 (0.9)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)
Total	115	108	89	82

ChromID ESBL medium as selective agents. The remaining sensitive patterns were as follows: ceftazidime, 27.7% resistant and 54% sensitive; aztreonam, 36% resistant and 47% sensitive; and amoxicillin/clavulanic, 43% resistant and 28% sensitive. On the other hand, 5 of the 7 isolated strains confirmed as non-ESBL-producing *Enterobacteriaceae* showed resistance or intermediate susceptibility to ceftaxime (FOX^R,¹), which is associated with inducible AmpC cephalosporinase. With regard to the second group of antibiotics tested, the more relevant resistance patterns were against doxycycline (57% resistant and 13% intermediate); cotrimoxazole (43% resistant and 3% intermediate) and norfloxacin (39% resistant and 1.9% intermediate). In contrast, approximately 90% of the strains were sensitive against fosfomicin, gentamicin, piperacillin/tazobactam and ceftaxime (94.8%, 92%, 90% and 86%, respectively).

Analysis of the 115 isolates by the MicroScan® NM37 panel of Siemens showed 89 ESBL positive strains (Table 1), 7 negative and 19 isolates with inconclusive results because they were species that were not covered by the software database (*S. fonticola*, *H. alvei*, *R. aquatilis* and *P. penneri*). A summary of the MIC₅₀ and MIC₉₀ results obtained by this method is shown in Table 2. Most of the strains showed increased MICs (≥ 2 $\mu\text{g/ml}$) of cefpodoxime, cefotaxime, ceftazidime and aztreonam; therefore, they should be considered to be ESBL-harboring candidates. In addition, most of the strains (with the exception of *E. cloacae*) showed a decrease in the MIC₅₀ and MIC₉₀ for cefotaxime (CTX) with the addition of clavulanic acid, confirming these strains as ESBL positives. On the other hand, all of the confirmed ESBL isolates showed very low MICs for carbapenems (ertapenem, meropenem and imipenem), while the combination of ampicillin and sulbactam resulted in higher MICs than the ampicillin tested alone. Furthermore, these strains showed a pattern of resistance to ampicillin, piperacillin, mezlocillin, cefazoline, cefuroxime and cefepime antibiotics.

Finally, most of the strains were resistant to tetracycline and sensitive to chloramphenicol, fosfomicin, tigecycline, amikacin, gentamicin, tobramycin and levofloxacin, while different patterns of resistance were observed for moxifloxacin, ciprofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole antibiotics (data not shown).

3.3. Characterization of ESBL genes

One or more β -lactamase genes were detected in 82 (71.3%) of the 115 isolated strains. Tables 3 and 4 show the β -lactamase genes identified among *E. coli* and other isolates, respectively. A clear prevalence of the CTX-M type was found in *E. coli* (46 isolates) followed by a TEM type (37 isolates) and a SHV type (19 isolates). CTX-M14 was the most frequent ESBL type found alone or in combination with TEM β -lactamase (46.4%); it was also present in a *S. fonticola* isolate. CTX-M8 and CTX-M15 were always found together with a TEM type beta-lactamase gene. TEM β -lactamase was detected alone in 14 isolates (11 *E. coli*, 1 *K. pneumoniae* and 2 *E. cloacae*) and SHV-12 ESBL was only detected in *E. coli* isolates (alone or in combination with TEM type β -lactamase). Regarding other species, a TEM-type was found in *E. cloacae* ($n=2$) and *K. pneumoniae* ($n=1$), OXA-1 was found in *C. koseri* ($n=1$), and CTX-M1 was found in *P. mirabilis* ($n=1$). Finally, 33 isolates (6 *E. coli*, 15 *S. fonticola*, 1 *K. pneumoniae*, 2 *C. koseri*, 1 *P. penneri*, 6 *P. vulgaris*, 1 *R. aquatilis* and 1 *H. alvei*) were negative by using all primer sets tested in PCR in the presence of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} and *bla*_{CTX-M} genes (Table 1). Five of these isolates showed resistance or intermediate susceptibility to ceftaxime which is associated with inducible AmpC cephalosporinase production.

3.4. Prevalence and concentration of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in meat products

Using the standard disk diffusion method, 91 of the 141 samples were confirmed positive for the presence of one or more ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (64.5%), with significant differences in the three types of meat. Prevalence in poultry products (84%) was

Table 2
MICs of antimicrobial agents for ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains isolated from meat products.

Antimicrobials	<i>E. cloacae</i>		<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>S. fonticola</i>	
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ampicillin	>16	<16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Piperacillin	≤8	≤8	>64	>64	>64	>64	>64	>64	64	64
Mezlocillin	≤16	≤16	>64	>64	>64	>64	>64	>64	64	64
Cefazoline	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefuroxime	>16	>16	>16	>16	16	16	>16	>16	>16	>16
Cefoxitin	>16	>16	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8
Cefpodoxime	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4
Cefotaxime	≤1	≤1	>32	>32	32	32	>32	>32	16	>32
Cefotaxime/CA	4	4	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Ceftazidime	≤1	≤1	2	>16	2	2	≤1	≤1	≤1	≤1
Cefepime	≤1	≤1	8	>16	8	8	8	>16	8	8
Aztreonam	8	8	16	>16	8	8	≤1	>16	8	8
Amoxicillin/CA	>16/8	>16/8	≤8/4	16/8	16/8	16/8	≤8/4	16/8	≤8/4	>16/8
Ampicillin sulbactam	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	16/8	>16/8	16/8	>16/8
Piperacillin tazobactam	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8	≤8
Ertapenem	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Meropenem	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Imipenem	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2

higher than in pork (55%) or beef (59%) ($p=0.006$). The concentration of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* was grouped into five concentration ranges (Fig. 1). Despite the fact that the majority of the samples (55.7%) had a concentration lower than 100 CFU/g, 30% of the evaluated samples showed levels ranging between 10^2 and 10^3 CFU/g. In addition, 14.3% of the samples had concentrations greater than 10^3 , some of which were even greater than 10^4 CFU/g. *E. coli* and *S. fonticola* were the bacteria responsible for these high counts considering the different colony coloration obtained on ChromID ESBL plates and subsequent identification by biochemical tests.

4. Discussion

Several methods have been used for detecting ESBL-producing *Enterobacteriaceae* isolated from meat samples. From 115 isolates, 108 were identified as ESBL-producers using the standard disk diffusion method, 89 using the MicroScan® NM37 panel of Siemens and the Lab Pro® 3.5 software, and 82 were identified as β -lactamase producers using PCR and sequencing. The differences observed among the three methods can be explained in terms of procedure limitations. The Lab Pro® 3.5 data analysis software is based on the information provided by *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* and *E. coli* clinical isolates. This fact can explain the inconclusive results obtained in the MicroScan® NM37 panel of Siemens with the *S. fonticola*, *H. alvei*, *R. aquatilis*, *P. penneri* and *C. koseri* species isolated. Similarly, some negative results obtained in PCR and sequencing could be because the target strains used in the multiplex-PCR development

were *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. mirabilis*, *Morganella* spp. and *Enterobacter* spp. On the other hand, it is possible that several of these isolates may have a rare ESBL because during the last few years, less frequent class A and D β -lactamases, including SFO, PER, BEL, BES, TLA, GES, and VEB types (Naas, Poirel, & Nordmann, 2008), have been discovered. Despite the inconclusive results, it is necessary to consider these strains as suspicious ESBL-producers due to the typical antimicrobial profile of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* shown when the disk approximation method was used. In addition, the decrease in the MIC for cefotaxime plus clavulanic acid in these strains reinforces this decision. Additional studies are needed to clarify the specific genes implicated in the resistance to these strains.

Therefore, 108 isolates were identified as ESBL producers using the standard disk diffusion method, and 7 strains had a resistance mechanism to second, third, and fourth-generation cephalosporins, showing a high frequency of these resistant bacteria in raw meat (76%). Thus, the higher prevalence found in poultry products (84%) rather than in pork or beef could be consistent with the abundant use of antimicrobials on poultry broiler farms (Hughes, Hermans, & Morgan, 2008; Smet et al., 2009). On the other hand, the fact that ESBL confirmed strains were found in 92% of the points of sale (different shops and different animal husbandry), and the presence of two or more different resistant microorganisms in 18% of the samples shows the wide dissemination of these resistant microorganisms, that could be explained by a plasmid transmission, with resistance genes between closely related species (Philippon et al., 1994). Moreover, the high percentage of shops (66%) with ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in two or

Table 3
Identified β -lactamase genes in *E. coli* (number of isolates for each type).

β -Lactamase	<i>E. coli</i>
TEM	11
SHV-12	10
OXA-1	0
CTX-M1	4
CTX-M14	25
TEM + SHV-12	9
TEM + CTX-M1	2
TEM + CTX-M8	1
TEM + CTX-M14	13
TEM + CTX-M15	1
Negative	6
Total	82

Table 4
Identified β -lactamase genes in isolates different from *E. coli* and the number of isolates for each type.

β -Lactamase	<i>S. fonticola</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>C. koseri</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>H. alvei</i>	<i>R. aquatilis</i>
TEM	0	1	2	0	0	0	0
OXA-1	0	0	0	1	0	0	0
CTX-M 1	0	0	0	0	1	0	0
					<i>P. mirabilis</i>		
CTX-M14	1	0	0	0	0	0	0
Negative	15	1	0	2	7	1	1
					1 <i>P. penneri</i> , 6 <i>P. vulgaris</i>		
Total	16	2	2	3	8	1	1

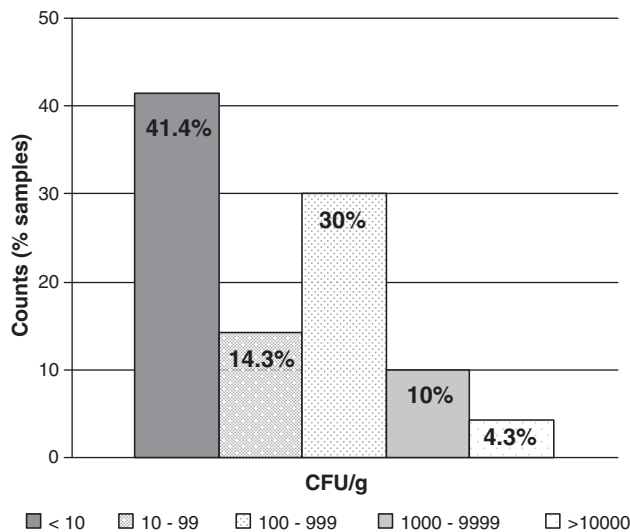


Fig. 1. Concentration of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (CFU/g) in meat products (percentage of samples in each range of concentration).

more of their products indicates a possible cross contamination during preparation of the products (sausages, hamburgers, etc.).

E. coli was the predominant ESBL producer, coinciding with the results obtained in other studies (Costa et al., 2009; Kojima et al., 2005; Vinué et al., 2009). However, *S. fonticola* is the second frequently isolated species in the present study, which contrasts with the predominance of *Klebsiella* spp. in the clinical samples after *E. coli* (Paterson, 2006; Qin et al., 2008).

With regard to the antimicrobial study, the greatest resistances were observed against cefpodoxime, ceftriaxone and ceftazidime (third-generation cephalosporins), which are extensively used beta-lactams in veterinary medicine in Spain (Torres & Zarazaga, 2007). Despite the fact that cefpodoxime was the selective agent used on ChromID ESBL plates, 7 isolated strains showed intermediate susceptibility to this antimicrobial. These results point to the expression of inducible AmpC cephalosporinases. On the other hand, a multi-resistant pattern which associated ESBL production with AmpC expression was found. The most common bacteria isolated in this study (*E. coli* and *S. fonticola*) have similar resistance patterns to beta-lactams. Both species have greater hydrolytic activity against cefpodoxime and ceftriaxone than against aztreonam. However, 36.6% of *E. coli* strains show resistance against CAZ, while *S. fonticola* is sensitive to this antimicrobial. The highest hydrolytic activity against ceftriaxone and the lowest against ceftazidime in *E. coli* are indicative of CTX-M type β -lactamases, a fact that was confirmed by PCR and sequencing.

In Spain, an increase in the prevalence of CTX-M producing *E. coli* among community-acquired infections has been reported (Romero et al., 2005). Similarly, molecular characterization showed that CTX-M was the most extended ESBL type in our food isolates (46.4%). These data are consistent with other publications which describe the predominance of this ESBL type from animal origin isolates (Briñas et al., 2003; Jouini et al., 2007; Smet et al., 2008) and also from clinical isolates (Hernández, Martínez-Martínez, Cantón, Coque, & Pascual, 2005; Mugnaioli et al., 2006; Oliver et al., 2005; Romero et al., 2005; Vinué et al., 2009). On the other hand, TEM-type beta-lactamases are commonly found in *E. coli* and *K. pneumoniae* (Bradford, 2001), and this type was found in 46.6% of isolated strains. More specifically, it was mostly found in *E. coli* strains found in combination with SHV or CTX-M ESBL (66.7%). Finally, the percentage of SHV-type ESBL detected by PCR and sequencing (22.6%) is similar to that reported by several authors (Blanco et al., 2009; Díaz et al., 2010), with the unique presence of SHV-12.

It is noteworthy that isolates showed a significant resistance to doxycycline, cotrimoxazole and norfloxacin, antimicrobials commonly used in human medicine. These results coincide with the report on antimicrobial resistance in zoonotic bacteria originating from animals and food in the EU released by the European Food Safety Authority (EFSA, 2010), in which the EFSA warns about the presence and persistence of resistances against standard antibiotics for human use. However, resistances to fosfomicin, piperacillin–tazobactam, gentamicin, and ceftiofur were significantly lower in the present study, suggesting that these antibiotics would be a good option for the treatment of diseases occasionally caused by these microorganisms.

The study was conducted on raw meats that suffer thermal processing prior to consumption (lethal to *Enterobacteriaceae*) and the majority of the positive samples (55.7%) had levels of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* lower than 10^2 CFU/g, which does not affect consumers from a safety standpoint. However, 14.3% of the samples showed counts that were higher than 10^3 CFU/g, which could cause a serious health problem if any of these microorganisms survive the cooking procedure. In addition, it is essential to observe hygienic measures in meat distribution and processing in order to avoid proliferation of these microorganisms and prevent cross-contamination. Temperature control throughout the entire food chain should be inflexible (≤ 7 °C according to Spanish legislation) (BOE, 2003). In addition, good practices in food handling and proper cooking of meat products are essential. For more extensive knowledge regarding consumer exposure to these bacteria, it would be interesting to conduct studies of ESBL prevalence in ready-to-eat products (RTE) similar to those performed by (Amador, Fernandes, Prudencio, and Brito (2009).

In conclusion, the high prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in meat products suggests a possible transfer of resistances from animals to humans through the food chain. The predominant ESBL-producing *Enterobacteriaceae* found in meat from shops in Navarra was CTX-M 14, followed by TEM + CTX-M, TEM + SHV-12 and SHV-12 types, in correlation with the prevalent ESBL types isolated from clinical samples in Spain (72% belonged to the CTX-M type, 26.8% belonged to the SHV type, and 1.2% belonged to the TEM type) (Díaz et al., 2010). Further investigations are required to evaluate the presence of these bacteria in a range of foods, for clarifying the mechanism of transmission of ESBL resistance genes from food to humans and for preventing the spread of these resistances among the *Enterobacteriaceae* family.

Acknowledgments

We would like to give special thanks to the Department of Clinical Microbiology (Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain) for the use of their facilities and excellent technical assistance. We wish to thank Carmen Torres for providing some of the control strains included in this study. English support provided by Laura Stokes is especially acknowledged.

This study has been supported by PIUNA (Research Plan of the University of Navarra) with the project title: “Prevalencia de enterobacterias productoras de beta lactamasas de espectro extendido en muestras clínicas, ambientales y de alimentos: implicaciones epidemiológicas.”

References

- Aarestrup, F. M. (1999). Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(4), 279–285.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 251–259.
- Amador, P., Fernandes, R., Prudencio, C., & Brito, L. (2009). Resistance to beta-lactams in bacteria isolated from different types of Portuguese cheese. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(4), 1538–1551.

- Angulo, F. J., Nargund, V. N., & Chiller, T. C. (2004). Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 51(8–9), 374–379.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493–496.
- Bergenholtz, R. D., Jorgensen, M. S., Hansen, L. H., Jensen, L. B., & Hasman, H. (2009). Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1), 207–209.
- Blanco, M., Alonso, M. P., Nicolas-Chanoine, M. H., Dahbi, G., Mora, A., Blanco, J. E., et al. (2009). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Lugo (Spain): Dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(6), 1135–1141.
- BOE (2003). Real decree 1376/2003 (7 November 2003) on the conditions for production, storage and marketing of meat and meat establishments in retail trade. *BOE no. 273, 14/11/2003*. Madrid, Spain: Boletín Oficial de Estado.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933–951 (table of contents).
- Briñas, L., Moreno, M. A., Teshager, T., Sáenz, Y., Porrero, M. C., Domínguez, L., et al. (2005). Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), 1262–1264.
- Briñas, L., Moreno, M. A., Zarazaga, M., Porrero, C., Sáenz, Y., García, M., et al. (2003). Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(6), 2056–2058.
- Carattoli, A. (2008). Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(Suppl. 1), 117–123.
- Carneiro, C., Araujo, C., Goncalves, A., Vinué, L., Somalo, S., Ruiz, E., et al. (2010). Detection of CTX-M-14 and TEM-52 extended-spectrum beta-lactamases in fecal *Escherichia coli* isolates of captive ostrich in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(8), 991–994.
- CLSI (2010). Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S20. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 21th informational supplement*. Wayne, PA: CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Colom, K., Pérez, J., Alonso, R., Fernández-Arangui, A., Larino, E., & Cisterna, R. (2003). Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, bla(SHV) and blaOXA-1 genes in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiology Letters*, 223(2), 147–151.
- Cortes, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, M., et al. (2010). Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), 2799–2805.
- Costa, D., Vinué, L., Poeta, P., Coelho, A. C., Matos, M., Sáenz, Y., et al. (2009). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*, 138(3–4), 339–344.
- Díaz, M. A., Hernández-Bello, J. R., Rodríguez-Baño, J., Martínez-Martínez, L., Calvo, J., Blanco, J., et al. (2010). Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: Second nationwide study. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), 2840–2845.
- Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Smith, H., & Mevius, D. (2010). Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Veterinary Microbiology*, 145(3–4), 273–278.
- EFSA (2010). The community summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004–2007. *EFSA Journal*, Vol. 8. (pp. 1309). European Food Safety Authority.
- EFSA (2011). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal*, 9. (pp. 2322). European Food Safety Authority.
- Escudero, E., Vinué, L., Teshager, T., Torres, C., & Moreno, M. A. (2010). Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain. *Research in Veterinary Science*, 88(1), 83–87.
- Gniadkowski, M. (2008). Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(Suppl. 1), 11–32.
- Hernández, J. R., Martínez-Martínez, L., Cantón, R., Coque, T. M., & Pascual, A. (2005). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 2122–2125.
- Hughes, L., Hermans, P., & Morgan, K. (2008). Risk factors for the use of prescription antibiotics on UK broiler farms. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(4), 947–952.
- Jacoby, G., & Bush, K. (2012). β -Lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. (2012), <http://www.lahey.org/Studies/>. Tuesday, July 17, 2012
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4), 867–878.
- Jouini, A., Vinué, L., Slama, K. B., Saenz, Y., Klibi, N., Hammami, S., et al. (2007). Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5), 1137–1141.
- Kojima, A., Ishii, Y., Ishihara, K., Esaki, H., Asai, T., Oda, C., et al. (2005). Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3533–3537.
- Komatsu, M., Aihara, M., Shimakawa, K., Iwasaki, M., Nagasaka, Y., Fukuda, S., et al. (2003). Evaluation of MicroScan ESBL confirmation panel for *Enterobacteriaceae*-producing, extended-spectrum beta-lactamases isolated in Japan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46(2), 125–130.
- Leverstein-van Hall, M. A., Dierikx, C. M., Cohen Stuart, J., Voets, G. M., van den Munckhof, M. P., van Essen-Zandbergen, A., et al. (2011). Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(6), 873–880.
- Lewis, J. S., II, Herrera, M., Wickes, B., Patterson, J. E., & Jorgensen, J. H. (2007). First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4015–4021.
- Livermore, D. M., Cantón, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., et al. (2007). CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 165–174.
- Mattar, S., & Martínez, P. (2007). Emergence of antimicrobial resistance to extended-spectrum- β -lactamases (ESBL): Detection, clinic impact and epidemiology. *Asociación Colombiana de Infectología*, 11(1), 23–35.
- Mugnaioli, C., Luzzaro, F., De Luca, F., Brigante, G., Perilli, M., Amicosante, G., et al. (2006). CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: Molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(8), 2700–2706.
- Naas, T., Poirel, L., & Nordmann, P. (2008). Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(Suppl. 1), 42–52.
- Oliver, A., Coque, T. M., Alonso, D., Valverde, A., Baquero, F., & Cantón, R. (2005). CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1567–1571.
- Paterson, D. L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American Journal of Medicine*, 119(6 Suppl. 1), S20–28 (discussion S62–70).
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686.
- Philippon, A., Arlet, G., & Lagrange, P. H. (1994). Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 13(Suppl. 1), S17–S29.
- Pitout, J. D., Gregson, D. B., Church, D. L., Elsayed, S., & Laupland, K. B. (2005). Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the Calgary health region. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2844–2849.
- Pitout, J. D., Nordmann, P., Laupland, K. B., & Poirel, L. (2005). Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 52–59.
- Qin, X., Zerr, D. M., Weissman, S. J., Englund, J. A., Denno, D. M., Klein, E. J., et al. (2008). Prevalence and mechanisms of broad-spectrum beta-lactam resistance in *Enterobacteriaceae*: A children's hospital experience. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 3909–3914.
- Romero, L., López, L., Rodríguez-Baño, J., Ramón Hernández, J., Martínez-Martínez, L., & Pascual, A. (2005). Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(8), 625–631.
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Catry, B., et al. (2008). Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1238–1243.
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Herman, L., et al. (2009). Broad-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: Molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 295–316.
- Torres, C., & Zarazaga, M. (2007). ESBL in animals and their importance in transmission to humans. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(Suppl. 2), 29–37.
- Vinué, L., Saenz, Y., Martínez, S., Somalo, S., Moreno, M. A., Torres, C., et al. (2009). Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(10), 954–957.
- Wang, H. H., Manuzon, M., Lehman, M., Wan, K., Luo, H., Wittum, T. E., et al. (2006). Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 254(2), 226–231.
- Woodford, N., Fagan, E. J., & Ellington, M. J. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(1), 154–155.

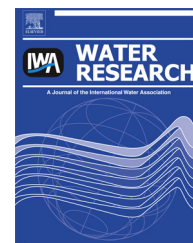
ANEXO II



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

High dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in effluents from wastewater treatment plants

Elena Ojer-Usoz*, David González, Isabel García-Jalón, Ana Isabel Vitas

Department of Microbiology and Parasitology, Microbiological Food and Water Laboratory, C.I.F.A., University of Navarra, C/Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 October 2013

Received in revised form

20 February 2014

Accepted 21 February 2014

Available online 6 March 2014

Keywords:

Enterobacteriaceae

Extended-spectrum beta lactamase

ESBL

Resistance

Wastewater treatment plant

ABSTRACT

Water environments play an important role in the dissemination of antibiotic-resistant bacteria among humans, animals and agricultural sources. In order to assess the spread of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*, we analyzed 279 effluent samples from 21 wastewater treatment plants in Navarra (northern Spain). A total of 185 cefpodoxime-resistant bacteria were isolated on ChromID ESBL agar plates, with high predominance of *Escherichia coli* among isolated species (73%). ESBL production was determined by different methods, concluding its presence in 86.5% of the isolates by the combination disk test, 75.7% by double-disk synergy test and 73.5% by MicroScan[®] NM37 automated system. PCR and sequencing analysis showed that the predominant β -lactamases (*bla*) genes were *bla*_{CTX-M} (67.4%) followed by *bla*_{TEM} (47%), *bla*_{SHV} (17.4%) and *bla*_{OxA} (8.3%); furthermore, two or more β -lactamases genes were found in 34.9% of the isolates. The results demonstrate the high prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in effluent water from wastewater treatment plants and confirm the need to optimize current disinfection procedures and to improve management of wastewater in an effort to minimize reservoirs of resistant bacteria. Further studies are needed for examining the presence of these bacteria in other environments and for determining the potential dissemination routes of these resistances as well as their impact on human health.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Antibiotic-resistant bacteria (ARB) are currently considered to be one of the major Public Health concerns throughout the world (Wise et al., 1998; WHO, 2007). ARB has been isolated not only from clinical environments (Levy and Marshall, 2004), but also from food-producing animals (Vieira et al., 2011; Cogliani et al., 2011), food products (McDermott et al., 2002) and aquatic environments (Amaya et al., 2012; Baquero et al., 2008; Li et al.,

2009), showing that pathogenic ARB are not restricted to clinical settings alone. This emergence in livestock farming and environment suggests a successful selection and dissemination of ARB and antibiotic resistant genes (ARGs) despite the efforts to restrict antibiotic use. One of the latest measures promoted by the Food and Drug Administration (FDA, 2012) in this regard is to ban certain uses of cephalosporin in food-producing animals in an attempt to slow down the spread of these resistances.

* Corresponding author. Tel.: +34 948425600x806386; fax: +34 948425652.
E-mail address: eojeruso@alumni.unav.es (E. Ojer-Usoz).

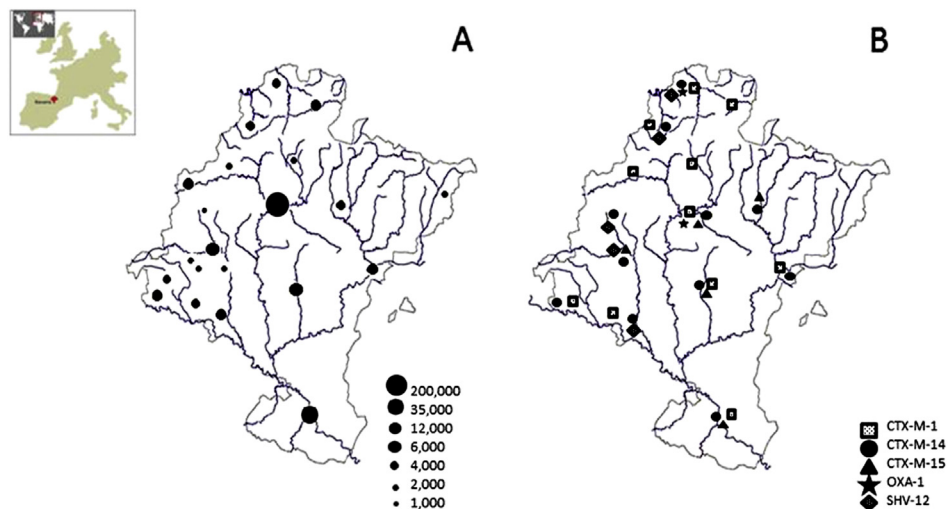


Fig. 1 – Geographical location of WWTPs. A. WWTPs providing samples and population corresponding to each area; B. Distribution of *bla* genes.

Beta-lactams are the most important therapeutic choice for treating infections in both humans and animals (Damoa-Siakwan, 2005; Torres and Zarazaga, 2007). Therefore, the selective pressure caused by the use and misuse of these antimicrobials has led to the increase of resistances to these antibiotics over the past twenty years, with the production of β -lactamases which hydrolyze the beta-lactam ring being the most relevant mechanism of resistance (Medeiros, 1997). Resistances to β -lactams mediated by extended-spectrum β -lactamases (ESBL) are especially relevant among *Enterobacteriaceae*. These ESBL enzymes were initially described by Philippon et al. (1994); currently, Paterson and Bonomo (2005) define the ESBL as β -lactamases capable of hydrolyzing third-generation cephalosporins and aztreonam, and inhibited by clavulanic acid. In recent years, a great evolution of these enzymes has been described (Gniadkowski, 2008), involving a high capability of dissemination, especially in clinical environments (Paterson and Bonomo, 2005; Machado et al., 2007). CTX-M is the most extended group among ESBL enzymes (Livermore et al., 2007), and due to its increasing prevalence (higher than TEM and SHV), some authors have announced the “CTX-M ESBL pandemic” (Cantón et al., 2006). The prevalent ESBL genes observed among clinical samples in Spain are $bla_{CTX-M-9}$, $bla_{CTX-M-14}$, $bla_{CTX-M-10}$ and bla_{TEM-4} (Valverde et al., 2004; Hernández et al., 2005). It should be pointed out that an increase of $bla_{CTX-M-15}$ gene has been detected in Spain as well as in other European regions over the last decade (Livermore et al., 2007; Oteo et al., 2006). In addition, a co-production of non-ESBL class A β -lactamases (TEM-1, SHV-1), class D β -lactamases like OXA and class C especially AmpC in *Escherichia coli* strains has been documented (Doi and Paterson, 2007).

Aquatic environments have special relevance regarding the emergence and dispersion of resistances. In water, bacteria from different origins (human, animal and environmental) are able to mix, encouraging the exchange of ARGs and genetic platforms (Baquero et al., 2008). In consequence, water constitutes not only a route for the dissemination of ARG among human and animal populations, but it is also a route by which

ARGs are introduced into natural bacterial ecosystems, transforming nonpathogenic bacteria into reservoirs of resistance genes and platforms (Dolejska, 2011). The presence of ESBL-producing bacteria in rivers and lakes (Lu et al., 2010; Tacão et al., 2012; Zurfluh et al., 2013; Hu et al., 2013), and sludge (Reinthal et al., 2010) has been reported, taking into account the different anthropogenic activities that come together and are considered to be sources of contamination (hospital, municipal, industrial, agricultural and animal production effluents). In the last year, several authors have documented the presence of ESBL in municipal urban waters, representing a potential risk of infection and a public health problem (Korzeniewska and Harnisz, 2013; Tissera and Lee, 2013).

The presence of ARG in drinking water has also been reported by several authors (Armstrong et al., 1982; Pavlov et al., 2004; Zhang et al., 2009). However, few studies have been reported in Spain with regard to the prevalence of ESBL-producing bacteria in aquatic systems (Alcaide and Garay, 1984; Gómez et al., 2010).

Therefore, the purpose of the current study was to determine the presence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in effluents from wastewater treatment plants (WWTPs) in Navarra, a small region in northern Spain, in order to determine the impact of this treated water on the dissemination of ESBL genes in natural environments. Specific goals were (i) to isolate and identify cefpodoxime-resistant *Enterobacteriaceae*, determining antibiotic susceptibility among ESBL producing strains and (ii), to characterize the ESBL genes responsible for the resistances in order to compare them with those observed among clinical samples in Spain.

2. Materials and methods

2.1. WWTP selection and sample collection

A total of 21 wastewater treatment plants (WWTPs) were selected in Navarra (northern Spain) in terms of population,

with all of them processing a pollution load equivalent equal to or greater than 1000 inhabitants (Fig. 1A). At least four visits were made to each treatment plant throughout the period of study (March 2011 to October 2012), collecting an independent 100 ml sample of effluent water from each treatment plant on each visit. A total of 279 samples were collected, and each sample was poured into 100 ml sterile bottles. The water samples were immediately transported to the laboratory in a portable cooler at refrigeration temperatures; upon arrival, they were stored at 3 ± 2 °C. Microbiological analysis was carried out within the first 24 h after the samples had arrived at the laboratory.

2.2. Enumeration and identification of cefpodoxime-resistant bacteria

In order to determine the presence of cefpodoxime-resistant bacteria, each 5 ml water sample was transferred to 5 ml of double concentration EE Mossel broth (Difco, Le Pont de Claix, France), and incubated during 24 h at 37 ± 1 °C. Isolation of resistant strains was performed on ChromID ESBL plates (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) (37 ± 1 °C, 24 h) containing a mixture of antibiotics including cefpodoxime, which is the marker of choice for this resistance mechanism. In addition, the chromogenic components of ChromID ESBL medium provide a preliminary rapid identification of cefpodoxime-resistant *Enterobacteriaceae* strains by the coloration of colonies. In this sense, *E. coli* (β -glucuronidase-producing colonies) show pink to burgundy coloration; *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, and *Citrobacter* (β -glucosidase-producing colonies) show a bluish-green to brownish-green coloring; and finally, *Proteaeae* (*Proteus*, *Providencia*, *Moraganella*) show dark to light brown coloration due to deaminase activity. Suspicious resistant bacteria were then isolated on nutrient agar (Biolife, Milano, Italy) and identified by carrying out the oxidase test, Kligler Iron Agar (KIA) and API 20E (Biomérieux).

Furthermore, in order to determine the proportion of cefpodoxime-resistant bacteria in relation to the total *Enterobacteriaceae* population, 1 ml of water was spread parallelly onto ChromID ESBL agar plates and violet red bile glucose agar plates (VRBG, Merck, Darmstadt, Germany), and then incubated at 37 ± 1 °C for 24 h. Typical colonies on each medium were enumerated and following confirmation tests, the final concentration (CFU/ml) was determined.

2.3. Antimicrobial susceptibility testing and identification of ESBL production

Antimicrobial resistance patterns were determined by using different phenotypic methods. In each case, quality control was carried out using *E. coli* ATCC 25922 as negative control and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 as positive controls.

The following antimicrobials have been tested (specific agents and concentrations are described in each method description): amikacin (AK), amoxicillin/clavulanic acid (AMC), ampicillin (AMP), ampicillin/sulbactam (AMS), aztreonam (AZT), cefazolin (CZ), cefepime (FEP) cefepime/clavulanic acid (FEP/CA), cefotaxime (CTX), cefotaxime/clavulanic acid

(CTX/CA), ceftazidime (FOX), cefpodoxime (CPD), ceftazidime (CAZ), ceftazidime/clavulanic acid (CAZ/CA), ceftriaxone (CRO), cefuroxime (CXM), chloramphenicol (CHL), ciprofloxacin (CIP), colistin (COL), ertapenem (ETP), fosfomycin (FOT), gentamicin (GM), imipenem (IMP), levofloxacin (LV), meropenem (MER), mezlocillin (MZ), moxifloxacin (MXF), nitrofurantoin (FM), norfloxacin (NOR), piperacillin (PIP), piperacillin/tazobactam (TZP), tetracycline (TET), tigecycline (TIG), tobramycin (TO), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT).

2.3.1. Combination disk test (CDT)

Following recommendations made by the Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), disks of CAZ (30 μ g), CAZ/CA (30/10 μ g), CTX (30 μ g), CTX/CA (30/10 μ g), FEP (30 μ g) and FEP/CA (30/10 μ g) were placed over a Mueller Hinton agar plate (MH) (Oxoid, Wesel, Germany) with an inoculum of 0.5 McFarland. The test was considered positive for ESBL production if there was a ≥ 5 mm increase in the inhibition zone size among the combined disks compared to the disk of cephalosporin alone.

2.3.2. Double-disk synergy test (DDST)

This assay was performed according to Jarlier et al. (1988) and Thomson and Sanders (1992). In addition, AmpC β -lactamase production was also tested with plates containing MH supplemented with cloxacillin (200 mg/L, Sigma Aldrich, Singapore) (Jarlier et al., 1984; Tan et al., 2009). The AMC disk (30 μ g) was placed in the center of the inoculated plates, and the following β -lactam disks were placed at a distance of 20 mm (center to center): CAZ (30 μ g), CRO (30 μ g), AZT (30 μ g), and CTX (10 μ g). All the antibiotic disks used were purchased from Rosco (Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark). After incubation at 35 °C for 16–18 h, a test result was considered to be positive when the inhibition zone was enhanced between cephalosporin disk and clavulanic acid, indicating synergy. When observing flattening of inhibition zones, the production of AmpC cephalosporinase could be suspect. In this case, it is necessary to compare the diameters of each antimicrobial in MH and in MH supplemented with cloxacillin. An organism that demonstrated an increased inhibition zone of ≥ 5 mm was considered to be an AmpC producer (Derbyshire et al., 2009).

2.3.3. Minimum inhibitory concentration (MIC)

The Siemens MicroScan[®] NM37 panel (Siemens AG, Germany) was used in combination with Lab Pro[®] 3.5 software for determining MICs. This automated method provided very interesting results for the study of ESBL-producing bacteria (Komatsu et al., 2003). Panels including the following antimicrobials (concentration in μ g/ml) were used: AK (8–32), AMC (74–16/8), AMP (2–16), AMS (8/4–16/8), AZT (1, 8–16), CZ (8–16), FEP (1, 8–16), CTX (1–32), FOX (8–16), CPD (1–4), CAZ (1–16), CXM (1, 4–16), CHL (8–16), CIP (0.5–2), COL (2–4), ETP (0.5–4), CTX/CA (0.5/4, 4/4), CAZ/CA (0.25/4, 2/4), FOT (32), GM (2–8), IMP (2–8), LV (1–4), MER (1–8), MZ (16,64), MXF (0.5–2), FM (32–64), NOR (4–8), PIP (8–16, 64), TZP (8–16, 64), TET (4–8), TIG (1–4), TO (2–8), SXT (2/38–4/76). Panels were inoculated with standardized suspensions of fresh organisms (0.5 McFarland turbidity) and after incubation at 35 °C during a

Table 1 – Detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae using phenotypic methods.

Species	No. of isolates	No. of confirmed ESBLs ^a	No. of positive ESBL strains by phenotypic methods		
			CDT	DDST	MicroScan
<i>E. coli</i>	135	132	132	127	127
<i>E. vulneris</i>	1	0	0	0	0
<i>S. odorifera</i>	8	5	5	5	0
<i>E. cloacae</i>	18	12	11	1	2
<i>E. aerogenes</i>	2	1	1	1	1
<i>C. braaki</i>	1	1	1	0	0
<i>C. freundii</i>	11	4	3	1	1
<i>C. koseri</i>	1	1	1	1	0
<i>C. farmeri</i>	1	1	1	1	1
<i>K. pneumoniae</i>	4	4	4	3	3
<i>K. oxytoca</i>	3	2	1	0	1
Total	185	163	160	140	136

^a Confirmed by at least one method.

minimum of 16 h; they were read using the autoSCAN-4 system (Siemens). ESBL production was considered to be positive if there was a decrease in MICs of ≥ 3 two-fold concentration with any of the drugs in the presence of clavulanic acid, versus its MIC when tested alone. The MIC₅₀ and MIC₉₀ (minimum concentration required to inhibit the growth of 50% and 90% of organisms, respectively) were used to evaluate antibiotic sensitivities.

2.4. Characterization of ESBL genes by molecular typing

ESBL-producer strains were screened for the presence of β -lactamase genes by two multiplex PCR assays. Pure isolated colonies on nutrient agar plates (Biolife, Milano, Italy) were suspended in 300 μ l of water and boiled during 5–10 min in order to prepare the DNA template for the PCR experiments.

Detection of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{OXA} genes was performed using the multiplex-PCR assay described by [Colom et al. \(2003\)](#). This procedure was selected to study the co-production of β -lactamases and other mechanisms of resistance as hyperproduction of plasmid-mediated non-ESBL TEM and production of OXA-1, due to the fact that these mechanisms of resistance are the most frequently reported. Briefly, the amplification was performed in a final volume of 25 μ l, containing 2 μ l of DNA template and 23 μ l of the reaction mixture with the following composition: 2.5 μ l of buffer 10 \times , 1 μ l MgCl₂ 50 mM, 1.5 μ M of OXA-1 and 1 μ M of TEM and SHV primers (Sigma–Aldrich), 0.2 mM of dNTP mix (Bioline) and 1U of Taq-polymerase (Bioline). The presence of *bla*_{CTX-M} genes was studied using a modification of the multiplex-PCR described by [Woodford et al. \(2006\)](#). In this case, the reaction mixture was composed as follows: 2.5 μ l of buffer 10 \times , 1 μ l MgCl₂ 50 mM, 1 μ M of each primer, 0.2 mM of dNTP mix, and 1U of Taq-polymerase. Amplification conditions were modified using an initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of DNA denaturation at 94 °C for 45 s, primer annealing at 55 °C for 30 s, primer extension at 72 °C for 50 s, and a final elongation at 72 °C for 6 min.

Both PCR amplification reactions were carried out on a DNA thermal cycler GeneAmp[®] PCR system 2700 (Applied

Biosystems Division, Foster City, CA, USA). Positive and negative controls from the bacterial collection from the University of La Rioja were included in all PCR assays, and 1 Kb ladder (Invitrogen) was used as a molecular size standard. After amplification, PCR products were separated by electrophoresis on 2% agarose gel in TBE1X buffer, stained with ethidium bromide and visualized by UV transillumination.

2.5. Nucleotide sequence analysis

Bidirectional DNA sequence analyses of the amplicons were performed in order to identify the specific *bla* genes detected in PCR assays. All sequencing was performed by MacroGen EZ-Seq purification service. Each amino acid sequence was compared with the known *bla* gene sequences included in GenBank and the web site <http://www.lahey.org/Studies/>, using the BLAST program.

3. Results

3.1. Isolation and identification of cefpodoxime-resistant Enterobacteriaceae

ESBL strains were isolated from 100% of the investigated WWTPs, although some differences were observed among the different WWTPs with regard to the number of positive samples found throughout the year. In one of these plants (the most important one in Navarra), 100% of the analyzed samples were found to be positive, while among the remaining plants, positive samples ranged from 34% to 90%.

Concerning the total number of analyzed samples, the mean of total *Enterobacteriaceae* counts was 5.6×10^2 CFU/ml (ranging from 9.7×10^2 to 8 CFU/ml), whereas the mean of cefpodoxime resistant *Enterobacteriaceae* counts was 2 CFU/ml (ranging from 50 to <1 CFU/ml). However, cefpodoxime-resistant strains were present in the 58.4% of effluent waters (163 out of 279 samples). As can be observed in [Table 1](#), most of the 185 isolates in ChromID ESBL agar medium were identified as *E. coli* (73%). With respect to the levels of these resistant

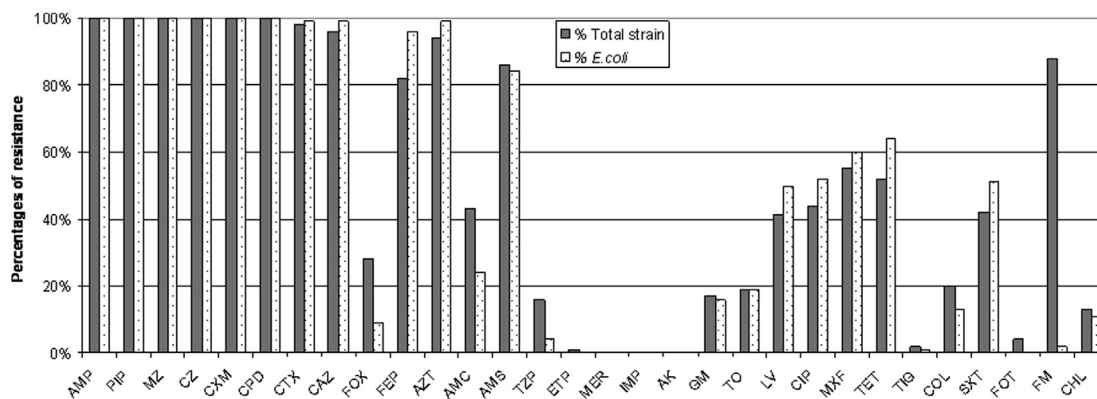


Fig. 2 – Antimicrobial resistance percentages (R + I) for all isolates and for *E. coli* strains. Amikacin, AK; amoxicillin clavulanic acid, AMC; Ampicillin, AMP; amoxicillin sulbactam, AMS; aztreonam, AZT; cefazolin, CZ; cefepime, FEP; cefotaxime, CTX; ceftazidime, CAZ; cefuroxime, CXM; chloramphenicol, CHL; ciprofloxacin, CIP; colistin, COL; ertapenem, ETP; (0.5–4 µg/ml), cefotaxime/clavulanic acid, CTX/CA; ceftazidime/clavulanic acid, CAZ/CA; fosfomycin, FOT; gentamicin, GM; imipenem, IMP; levofloxacin, LV; meropenem, MER; mezlocillin, MZ; moxifloxacin, MXF; nitrofurantoin, FM; norfloxacin, NOR; piperacillin, PIP; piperacillin tazobactam, TZP; tetracycline, TET; tigecycline, TIG; tobramycin, TO; trimethoprim sulfamethoxazole, SXT.

bacteria in effluents, 93% of the samples had a concentration lower than 1 CFU/ml, 4.3% showed levels ranging between 1 and 10 CFU/ml, and 2.7% showed levels between 10 and 100 CFU/ml. It should be pointed out that the *Enterobacteriaceae* counts in effluents remained constant during the entire sampling period, being higher than 1000 CFU/ml, except in January 2012 when they decreased to 10–100 CFU/ml (4.9%) and 100–1000 CFU/ml (3.1%), most likely due to low temperatures.

3.2. Detection of ESBL-producing strains

Among the 185 resistant isolates growth on ChromID ESBL agar, 163 were classified as ESBL-positive by at least one phenotypical method (Table 1). The combination disk test (CDT) confirmed the presence of extended-spectrum β -lactamases in 160 isolates (86.5%). Depending on the three different antibiotics used, CTX defined 150 isolates (81.3%) as ESBL producers, followed by FEP 137 isolates (74.2%) and CAZ 124 (67.2%). Almost all the *E. coli* isolates in ChromID ESBL agar 132 out of 135 (98%) were confirmed as ESBL producers using this method, while 127 out of 135 *E. coli* (94.1%) were confirmed as ESBL-producing strains by DDST and MicroScan procedures. It is important to note that MicroScan software has some limitations because it does not permit identification of *Enterobacteriaceae* other than *E. coli* and *Klebsiella spp.* Thus, the inconclusive results obtained by this method corresponded to species not covered by the software database.

3.3. Antimicrobial susceptibility

Based on MicroScan results, ESBL-producing isolates were categorized as sensitive and resistant (including “intermediate resistant” and “totally resistant”) according to the CLSI criteria. All the 185 isolates were resistant to the tested penicillins (AMP, PIP and MZ), first generation cephalosporins (CZ) and second generation (CXM). The percentages of resistance

for all the isolates and for *E. coli* are shown in Fig. 2. High levels of resistance (>96%) were also observed for third generation cephalosporins (CPD, CTX and CAZ) while 81.6% of the isolates were resistant to FEP (fourth generation). In addition, multi-resistance (defined as resistant to three or more classes of antibiotics, including β -lactams) was found in 97.3% of the strains. Most of the strains showed an increase in MICs values (Table 2) for CPD, CTX, CAZ and AZT; therefore, they should be considered ESBL-producing strains. Additionally, isolates showed a decrease in MIC values for CTX with the addition of CA; therefore, they should be confirmed as being ESBL-positive. Regarding *E. coli* isolates, a great diversity has been found among the 135 isolates (131 different profiles), whereas resistance to AMP, PIP, MZ, CZ, CXM, AMS and TET were the most common multi-resistance profiles (86 of 135 strains).

All the 185 isolates showed susceptibility to carbapenems (ETP, MER, IMP), in spite of the fact that 12 isolates had MIC values close to the breakpoint for ETP and IMP. In relation to monobactams, we have observed 100% resistance against AZT whereas the resistance against aminoglycosides was much reduced (0% against AK, 17% GM and 19% TO). Regarding quinolones and sulfonamides the percentage of resistance against these antimicrobials is about 50%. We have observed differences among TET resistance (64%) and TIG resistance (1%). Other antimicrobials as FOT, NIT and CHL present low percentage of resistance.

Isolates confirmed as non-ESBL-producing *Enterobacteriaceae* by MicroScan panels ($n = 39$) showed resistance to FOX which is associated with AmpC cephalosporinase activity. These strains were also resistant to β -lactams, AMC, AMS and CPD.

3.4. Resistance genes

PCR and sequencing showed that tested *bla* genes were present in 71.3% of the 185 isolates. The prevalent gene among the ESBL-producing isolates was *bla*_{CTX-M} (67.4%), followed by

Table 2 – MIC₉₀ for ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates.

Antimicrobials	<i>Escherichia coli</i>		<i>Serratia odorifera</i>		<i>Enterobacter spp.</i> ^a		<i>Klebsiella oxytoca</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Citrobacter spp.</i> ^a	
	MIC ₉₀		MIC ₉₀		MIC ₉₀		MIC ₉₀		MIC ₉₀		MIC ₉₀	
Ampicillin	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R
Piperacillin	>64	R	>64	R	>64	R	>64	R	>64	R	64	R
Mezlocillin	>64	R	>64	R	>64	R	>64	R	>64	R	64	R
Cefazoline	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R	>16	R
Cefuroxime	16	R	16	R	16	R	>16	R	>16	R	>16	R
Cefoxitin	≤8	S	≤8	S	16	R	≤8	S	≤8	S	>16	R
Cefpodoxime	>4	R	>4	R	>4	R	>4	R	>4	R	>4	R
Cefotaxime	16	R	32	R	>32	R	32	R	>32	R	16	R
Cefotaxime/CA	≤0.5	R	≤0.5	R	≤0.5	R	≤0.5	R	≤0.5	R	>4	R
Ceftazidime	≤1	R	2	R	>16	R	8	S	>16	R	16	R
Cefepime	≤1	S	≤1	S	≤1	S	>16	R	16	R	≤1	S
Aztreonam	8	S	8	S	16	R	>16	R	≤1	S	16	R
AMC	≤8/4	S	≤8/4	S	≥16/8	R	≥16/8	R	16/8	R	≥16/8	R
AMS	≤8/4	S	16/8	R	≥16/8	R	≥16/8	R	≥16/8	R	≥16/8	R
TZP	≤8	S	≤8	S	≤8	S	>64	R	16	S	≤8	S
Ertapenem	≤0.5	S	≤0.5	S	≤0.5	S	≤0.5	S	≤0.5	S	≤0.5	S
Meropenem	≤1	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S
Imipenem	≤2	S	≤2	S	≤2	S	≤2	S	≤2	S	≤2	S
Amikacin	≤8	S	≤8	S	≤8	S	≤8	S	≤8	S	≤8	S
Gentamicin	≤2	S	≤2	S	≤2	S	8	I	≤2	S	≤2	S
Tobramycin	≤2	S	≤2	S	≤2	S	>8	R	≤2	S	≤2	S
Levofloxacin	≤1	S	≤1	S	≤1	S	<4	R	≤1	S	≤1	S
Ciprofloxacin	≤0.5	S	≤0.5	S	≤0.5	S	<2	R	≤0.5	S	≤0.5	S
Moxifloxacin	≤0.5	S	≤0.5	S	≤0.5	S	>2	R	≤0.5	S	≤0.5	S
Tetracycline	≤4	S	≤4	S	≤4	S	>8	R	≤4	S	≤4	S
Tigecycline	≤1	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S
Colistin	≤2	S	≤2	S	≤2	S	≤2	S	≤2	S	≤2	S
Trimethoprim/sulfameth	≤2/38	S	≤2/38	S	≤2/38	S	>4/76	R	≤2/38	S	≤2/38	S
Fosfomycin	≤32	S	≤32	S	≤32	S	>32	R	≤32	S	≤32	S
Nitrofurantoin	≤32	S	≤32	S	≤32	S	≤32	S	≤32	S	≤32	S
Chloramphenicol	≤8	S	≤8	S	≤8	S	>16	R	≤8	S	≤8	S

Resistant (R) or susceptible (S) according to CLSI criteria.

^a *Enterobacter spp.* included *E. aerogenes*, *E. cloacae* and *E. vulneris*; *Citrobacter spp.* included *C. braaki*, *C. freundii*, *C. koseri*, and *C. farmeri*.

*bla*_{TEM} (47%) *bla*_{SHV} (17.4%) and *bla*_{OXA} (8.3%), as shown in Table 3. Genes encoding for *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8} and *bla*_{CTX-M-25} were studied but not detected in any of the isolates. In addition, 54 strains were negative for all primer sets tested in PCR for the presence of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} and *bla*_{CTX-M} genes. Sequence analysis demonstrates that genes from CTX-M-9 group were present in 30.3% of ESBL-producing isolates and all out of them corresponded to the *bla*_{CTX-M-14} gene; these strains exhibited a level of resistance to CIP, MX and TET over 50%. Furthermore, the CTX-M-1 group was detected in 37.1% of the isolates; within this group, *bla*_{CTX-M-1} gene was present in 22.7% of the isolates, *bla*_{CTX-M-15} gene appeared in 13.6% and *bla*_{CTX-M-55} gene was present in 0.8%. Isolates contained *bla*_{CTX-M-1} gene showed higher resistance to non-beta lactam antibiotics as SXT and TET with levels higher to 60%. The strains with *bla*_{CTX-M-15} gene exhibited a high level of resistance to CAZ (MIC₉₀ > 16 mg/ml), as well as resistance level higher to 60% against TO, LV, CIP and MX. With regard to *bla*_{OXA} genes, they were detected together with other β-lactamases genes in various strains and they were found alone in one strain of *Serratia odorifera*.

Analyzing resistance pattern profiles and identified genes we have detected 4 common clones, although with a very limited number of strains (*n* = 2). It should be pointed out that one of these clones was specifically isolated from one WWTP (Table 4).

3.5. Gene dissemination

CTX-M beta-lactamases (the most prevalent) were detected in all the samples taken from all the WWTPs in the region studied, with a different distribution depending on the *bla* genes (Fig. 1B). It should be pointed out that *bla*_{CTX-M} genes were detected in the majority of the treatment plants, but four of them have predominance of one specific *bla* gene among *E. coli* strains. In this sense, *bla*_{CTX-M-14} gene was the predominant in WWTP number 2 (4 out of 6 *E. coli* isolates) and number 15 (3 out of 5). In a similar way, *bla*_{CTX-M-1} gene was the most extended among WWTP number 6 (3 out of 5) and number 13 (9 out of 13).

With respect to the *bla*_{SHV-12} genes, they were identified in four WWTPs in the northern and western areas. However, *bla*_{OXA-1} genes were only detected in one WWTP located in the northern area and in the most important plant situated in the center of Navarra.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study carried out within the region of Navarra regarding the presence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in treated wastewater flowing into rivers.

Table 3 – Molecular characterization of ESBL genes.

β-lactamase genes	No. isolates (%)	No. isolates (%)	
		<i>E. coli</i>	Other species
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	27 (14.6)	26	1
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	22 (11.9)	22	0
<i>bla</i> _{TEM-1}	14 (7.6)	10	4
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-14}	9 (4.9)	9	0
<i>bla</i> _{TEM-42}	8 (4.3)	7	1
<i>bla</i> _{SHV-12}	8 (4.3)	5	3
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-1}	6 (3.2)	6	0
<i>bla</i> _{TEM-42} + <i>bla</i> _{SHV-12}	6 (3.2)	6	0
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-12}	5 (2.7)	5	0
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	4 (2.2)	3	1
<i>bla</i> _{TEM-42} + <i>bla</i> _{CTX-M-14}	3 (1.6)	3	0
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{OXA-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	2 (1.1)	1	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	5 (2.7)	4	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-1}	5 (2.7)	5	0
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{CTX-M-1}	1 (0.5)	1	0
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{OXA-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	1 (0.5)	0	1
<i>bla</i> _{TEM-42} + <i>bla</i> _{OXA-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	1 (0.5)	1	0
<i>bla</i> _{TEM-42} + <i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{OXA-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-1}	1 (0.5)	1	0
<i>bla</i> _{TEM-145} + <i>bla</i> _{CTX-M-14}	1 (0.5)	1	0
<i>bla</i> _{TEM-145} + <i>bla</i> _{SHV-12}	1 (0.5)	1	0
<i>bla</i> _{CTX-M-55}	1 (0.5)	1	0
<i>bla</i> _{OXA-1}	1 (0.5)	0	1
Non identified genes	54 (28.7)	18	35

The results of this study highlight the widespread dissemination of these bacteria because 100% of the analyzed WWTPs showed the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in one or more samples throughout the one-year surveillance period (58.4% positive effluent samples). It is important to note that we have considered cefpodoxime resistant all the 185 strains isolated on ChromID ESBL, but until they are not confirmed by CDT, DDST or MicroScan they are not being classified as ESBL producers. According to this, 88.1% of cefpodoxime resistant isolates was ESBL producer. In spite of this high prevalence of resistances, the concentration of ESBL-producing bacteria was <1 CFU/ml in 93% of the positive samples. The predominance of *E. coli* producing ESBL isolates over other species could be explained by the prevalence of this bacterium in the intestinal flora of human beings.

Previous studies reported an increase in antibiotic resistance levels in wastewater treatment plants with high percentages of multiresistant strains (Silva et al., 2006). In the present study, in addition to the high levels of resistance to CPD, CAZ and CTX shown on the part of ESBL isolates, all of these isolates were resistant to AMP, PIP, MZ, CZ and CXM, which is consistent with other previous reports (Zhang et al.,

2009) and reflects the alteration of water environments by human action (Baquero et al., 2008; Andersen and Sandaa, 1994). Nevertheless, our isolates showed susceptibility to carbapenems, in contrast with recent publications regarding the emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in *K. pneumoniae* from clinical and environmental samples (Isozumi et al., 2012; Koh et al., 2012; Thomas et al., 2013; Pulcrano et al., 2014). Although fluoroquinolones hold the fourth position on the European antibiotic market, with a maximum of 3.04 DID (defined daily dose/1000 inhabitants) (Sande-Bruinsma et al., 2008), we did not observe a high percentage of resistances against these antimicrobials. However, high resistance against quinolones has been detected among CTX-M-15 producing strains isolated in this study, the most widely disseminated genotype within the CTX-M family. These results are in accordance with authors that have described the connection between the presence of this beta lactamase and quinolone resistance (Shibl et al., 2012; Cerquetti et al., 2010). Furthermore, 8.3% of our isolates carried the *bla*_{OXA-1} gene, which has been associated to aminoglycosides and quinolones in some strains (Machado et al., 2006). The percentages of resistance observed among total strains and only in *E. coli* isolates were very similar except for FOX, FEP, AMC, TZP and FM (Fig. 2). In addition, a *K. pneumoniae* strain expressed the *bla*_{SHV-12} gene, one of the most prevalent enzyme producers associated with *K. pneumoniae* isolates in hospitals (Oteo et al., 2008) and another *K. pneumoniae* expressed *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{OXA-1} and *bla*_{CTX-M-15}, all of the genes studied in this report. The widespread presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in WWTPs and other aquatic resources (Allen et al., 2010; Machado et al., 2009) suggests the impact of human activity on the spread of these resistances from agricultural, livestock farming, municipal and clinical environments. In addition, the indiscriminate use of antibiotics in intensive livestock farming has led to the dissemination of antibiotic-resistances and may contribute to the environmental ESBL reservoir because of the extended used of manure for fertilization (Tacão et al., 2012). This could be one of the reasons for the widely presence of ESBL producing Enterobacteriaceae (CTX-M, SHV, FON...) on fresh vegetables, meat products and agricultural environment (Blaak et al., 2014; Ojer-Usoz et al., 2012). Furthermore, there is a need to improve treatments in raw hospital and urban wastewater (Huang et al., 2011; Akiyama and Savin, 2010) in order to remove undesirable biological contaminants. Combined disinfection systems should be applied for inactivating and preventing the spread of resistant microorganisms and genes that contribute to the global antibiotic resistome (Costa et al., 2006; Wright, 2010).

In order to apply the best procedure for determining ESBL production, three phenotypic methods were carried out. The

Table 4 – Antibiotic resistance profiles and genes among ESBL producing Escherichia coli clones.

Clone	WWTP origin	No. of isolates	ESBL genotype	Resistance profile
1	9, 12	2	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	AMP, PIP, MZ, CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP, AZT, AMS, TET
2	13	2	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	AMP, PIP, MZ, CZ, CXM, CPD, CTX, AMS
3	17, 18	2	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	AMP, PIP, MZ, CZ, CXM, CPD, CTX, FEP, AMS
4	2, 8	2	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	AMP, PIP, MZ, CZ, CXM, CPD, CTX, CAZ, FEP AZT, AMS, MXF, SXT

combination disk test recommended by CLSI identified the highest percentage of ESBL producers among cefpodoxime-resistant isolates in ChromID ESBL agar (86.5%). It should be pointed out that this method confirmed almost all ESBL-producing *E. coli*, demonstrating a high sensitivity for this species. In contrast, the double-disk synergy test had less sensitivity for identifying strains as ESBL producers (75.7%). Despite the fact that the MicroScan method also showed a low detection level of ESBL-producers (73.5%), the procedure confirmed AmpC activity in strains of *E. cloacae* that had been classified as non-ESBL producers by the other methods. Therefore, conventional methods based on agar diffusion showed better results for ESBL detection in Enterobacteriaceae than the MicroScan automated system, coinciding with information reported by other authors (Wiegand et al., 2007; Lezameta, 2010; Jorgensen et al., 2010). In our opinion, the combination disk test is the best choice for an initial screening of ESBL production, followed by molecular typing, in order to confirm the presence of *bla* genes.

ESBL characterization by PCR and sequencing confirmed the presence of *bla* genes in 70.8% of the strains, with the predominance of *bla*_{CTX-M-14}. In a previous study, we reported similar results in raw meat with presence of *bla* genes in 71.3% of strains and predominance of *bla*_{CTX-M-14} (46.4%) (Ojer-Usoz et al., 2012). This is also consistent with other studies which reported a high prevalence of CTX-M-14 in clinical samples in Spain with 27.3% and 20.5% of *bla*_{CTX-M-14} (Valverde et al., 2004; Hernández et al., 2005). In addition, other study reports an increasing detection of CTX-M-15 (30.8%) (Oteo et al., 2006), nevertheless our study only confirmed the presence of *bla*_{CTX-M-15} in 13.7% of strains. We observed a high resistance of these strains with *bla*_{CTX-M-15} genes against CAZ, CIP and LV that other authors have also described (Poirel et al., 2002; Cerquetti et al., 2010; Bonnet, 2004). In addition, a study about ESBL isolates from river waters (Tacão et al., 2014) presented high level of resistance against non-β lactams as tetracyclines, aminoglycosides and fluoroquinolones, however our results showed a level of resistance of 55%, 15% and 45%, respectively.

The observed combination of these *bla* genes with other β-lactamases genes, such as TEM, is due to ESBL-mediating plasmids that carry various resistance genes (Woodford et al., 2011). Since the first description of CTX-M in 1989, these enzymes have become the most prevalent among ESBLs (Livermore et al., 2007; Cantón et al., 2006; Lu et al., 2010), not only in clinical settings but also in other extra-hospital environments. In our study, CTX-M group was detected in 67.9% of the isolates with *bla* gene expression; therefore, we confirmed the predominance of CTX-M in aquatic environments and its role as a potential reservoir of resistance genes. In fact, we observed that the predominant CTX-M beta lactamases were presents throughout the entire region of study, meanwhile SHV and OXA were observed only in some WWTP. No differences were observed among the seasons.

With regard to non-ESBL producing *E. coli* isolates, confirmed as ESBL-producers by disk diffusion methods, very few of them could finally be characterized by PCR techniques, suggesting that the enzymes involved in the resistances were probably different from those studied in this report. The resistances to CPD, CTX, and CAZ, together with the decrease in MICs values for CTX versus CTX/CA acid observed in these

strains, reinforces the proposal to consider these isolates as ESBL producers. Therefore, it is necessary to search for other PCR protocols in order to detect other genes that were not included in the molecular assays performed in this study, such as the rare ESBL reported by Naas et al. (2008) (including SFO, PER, BEL, BES, TLA, GES, and VEB types).

Finally, it is interesting to note that ESBL and AmpC-β-lactamases co-production was detected in 4 strains (*Enterobacter cloacae*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii* and *Serratia odorifera*); said detection was evident due to an increase in the diameter of zone inhibition in MH supplemented with cloxacillin, and a clear resistance to FOX. However, only one strain (*C. koseri*) was confirmed as an ESBL-producer by molecular methods. Although other studies reported low percentages of AmpC producers (Randall et al., 2011), organisms that coproduce ESBLs and AmpC β-lactamases (especially Enterobacteriaceae) are now becoming more common (Moland et al., 2006; Thomson, 2010).

In conclusion, this study has demonstrated the widespread presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in effluent waters from WWTPs in Navarra (Spain), converting wastewater into an important reservoir of ESBL resistances. The presence of these bacteria in the region of study suggests that more efforts should be made to improve the disinfection of water from different human sources (including hospitals) and to control the presence of antibiotic resistances in wastewater before they flow into rivers. In this sense, *bla*_{CTX-M}-like genes could be used as an indicator for tracing resistance dissemination so that measures can be taken to reduce the consequential impact on human health. Further investigations are required to evaluate the diversity of ESBL Enterobacteriaceae in the environment and to study the clonality of these isolates. New studies are necessary for determining among *E. coli* the main phylogenetic groups and multilocus sequence typing (MLST) to compare allelic profiles and characterize the clonal diversification of our isolates. In addition, it is necessary to monitor ESBL-producing bacteria in environment for clarifying the transmission mechanism and for preventing the dissemination of these resistances among the Enterobacteriaceae family.

Acknowledgments

This work was supported by the PIUNA (Research Plan of the University of Navarra) Project titled “Prevalencia de Enterobacterias productoras de beta lactamasas de espectro extendido en muestras clínicas, ambientales y de alimentos: implicaciones epidemiológicas”, and a predoctoral grant from the “Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra”.

We wish to thank Dra. Carmen Torres for providing some of the control strains included in this study and expresses our gratitude to Laura Stokes for English support. WWTP Arazuri and WWTP Estella are especially acknowledged for providing water samples.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.041>.

REFERENCES

- Akiyama, T., Savin, M.C., 2010. Populations of antibiotic-resistant coliform bacteria change rapidly in a wastewater effluent dominated stream. *Sci. Total Environ.* 408 (24), 6192–6201.
- Alcaide, E., Garay, E., 1984. R-plasmid transfer in *Salmonella* spp. isolated from wastewater and sewage-contaminated surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (2), 435–438.
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Micro* 8 (4), 251–259.
- Amaya, E., Reyes, D., Paniagua, M., Calderón, S., Rashid, M.U., Colque, P., Kühn, I., Möllby, R., Weintraub, A., Nord, C.E., 2012. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from different aquatic environmental sources in León, Nicaragua. *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (9), E347–E354.
- Andersen, S.R., Sandaa, R.A., 1994. Distribution of tetracycline resistance among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (3), 908–912.
- Armstrong, J.L., Calomiris, J.J., Seidler, R.J., 1982. Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 308–316.
- Baquero, F., Martínez, J.L., Cantón, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotech.* 19, 260–265.
- Blaak, H., van Hoek, A., Veenman, C., van Leeuwen, A., Lynch, G., van Overbeek, W., de Roda Husman, A.M., 2014. Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *Int. J. Food Microbiol.* 168–169, 8–16.
- Bonnet, R., 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (1), 1–14.
- Cantón, R., Coque, T.M., 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr. Opin. Biotech.* 9 (5), 466–475.
- Cerquetti, M., Giufrè, M., García-Fernández, A., Accogli, M., Fortini, D., Luzzi, I., Carattoli, A., 2010. Ciprofloxacin-resistant, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 clone in extraintestinal infections in Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* 16 (10), 1555–1558.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Performance Standards for Antimicrobial. Document M100-S22. In: Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement, vol. 32(3). CLSI, Wayne, USA.
- Cogliani, C., Goossens, H., Greko, C., 2011. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microbe* 6 (6), 274–279.
- Colom, K., Perez, J., Alonso, R., Fernandez-Arangui, A., Larino, E., Cisterna, R., 2003. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, blaSHV and blaOXA 1 genes in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 147–151.
- Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C., 2006. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (6), 1311–1312.
- Damoia-Siakwan, S., 2005. Extended-spectrum beta lactamases: an overview. *J. Infect. Prev.* 6, 25–28.
- Derbyshire, H., Kay, G., Evans, K., Vaughan, C., Kavuri, U., Winstanley, T., 2009. A simple disc diffusion method for detecting AmpC and extended spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 497–501.
- Doi, Y., Paterson, D.L., 2007. Detection of plasmid-mediated class C β -lactamases. *Int. J. Infect. Dis.* 11, 191–197.
- Dolejska, M., 2011. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (12), 2784–2790.
- Food and Drug Administration (FDA), 2012. Cephalosporin Rule. FDA-2008-N-0326.
- Gniadkowski, M., 2008. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 (Suppl. 1), 11–32.
- Gómez, M., Díaz, M.T., Araujo, M., Sueiro, R., Garrido, J., 2010. Waste water treatment plants as redistributors of resistance genes in bacteria. *Water Pollut. X* 135, 83–94.
- Hernández, J.R., Martínez-Martínez, L., Cantón, R., Coque, T.M., Pascual, A., 2005. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (5), 2122–2125.
- Hu, Y.Y., Cai, J.C., Zhou, H.W., Chi, D., Zhang, X.F., Chen, W.L., Zhang, R., Chen, G.X., 2013. Molecular typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (19), 5988–5996.
- Huang, J.J., Hu, H.Y., Tang, F., Li, Y., Lu, S.Q., Lu, Y., 2011. Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 45 (9), 2775–2781.
- Isozumi, R., Yoshimatsu, K., Yamashiro, T., Hasebe, F., Nguyen, B., Ngo, T.C., Yasuda, S.P., Koma, T., Shimizu, K., Arikawa, J., 2012. blaNDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* from environment, Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 18 (8), 1383–1384.
- Jarlier, V., Philippon, A., Nicolas, M.H., Bismuth, R., Paul, G., Fuscuardi, J., 1984. *Enterobacter cloacae*. In vivo emergence of a variant resistant to new beta-lactams during treatment with lamoxactam-gentamicin. *Pathol. Biol. (Paris)* 32, 399–403.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G., Philippon, A., 1988. Extended broad-spectrum beta lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10 (4), 867–878.
- Jorgensen, J.H., McElmeel, M.L., Fulcher, L.C., Zimmer, B.L., 2010. Detection of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs) by testing with MicroScan overnight and ESBL confirmation panels. *J. Clin. Microbiol.* 48 (1), 120–123.
- Koh, T.H., Cao, D.Y.H., Chan, K.S., Wijaya, L., Low, S.B.G., Lam, M.S., Ooi, E.E., Hsu, L.Y., 2012. blaOXA-181-positive *Klebsiella pneumoniae*, Singapore. *Emerg. Infect. Dis.* 18 (9), 1524–1525.
- Komatsu, M., Aihara, M., Shimakawa, K., Iwasaki, M., Nagasaka, Y., Fukuda, S., Matsuo, S., Iwatani, Y., 2003. Evaluation of MicroScan ESBL confirmation panel for *Enterobacteriaceae*-producing, extended-spectrum beta-lactamases isolated in Japan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46 (2), 125–130.
- Korzeniewska, E., Harnisz, M., 2013. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. *J. Environ. Manage.* 128, 904–911.
- Levy, S.B., Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10 (12 Suppl.), S122–S129.
- Lezameta, L., 2010. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* 27 (3), 345–351.
- Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, J., Liu, R., Gu, X., Zhang, Y., Wang, Z., 2009. Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environ. Microbiol.* 11 (6), 1506–1517.

- Livermore, D.M., Cantón, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford, N., 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 59 (2), 165–174.
- Lu, S.Y., Zhang, Y.L., Geng, S.N., Li, T.Y., Ye, Z.M., Zhang, D.S., Zou, F., Zhou, H.W., 2010. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5972–5976.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Baquero, F., Sousa, J.C., Peixe, L., The Portuguese Resistance Study Group, 2006. 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.* 50 (9), 3220–3221.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Novais, A., Sousa, J.C., Baquero, F., Peixe, L., 2007. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1370–1374.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C., Silva, D., Ramos, M., Rocha, J., Ferreira, H., Peixe, L., 2009. Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63 (3), 616–618.
- McDermott, P.F., Zhao, S., Wagner, D.D., Simjee, S., Walker, R.D., White, D.G., 2002. The food safety perspective of antibiotic resistance. *Anim. Biotechnol.* 13 (1), 71–84.
- Medeiros, A., 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 24 (Suppl. 1), S19–S45.
- Moland, E.S., Hanson, N.D., Black, J.A., Hossain, A., Song, W., Thomson, K.S., 2006. Prevalence of newer β -lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. *J. Clin. Microbiol.* 44 (9), 3318–3324.
- Naas, T., Poirel, L., Nordmann, P., 2008. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 (Suppl. 1), 42–52.
- Ojer-Usoz, E., González, D., Vitas, A.I., Leiva, J., García-Jalón, I., Febles Casquero, A., Escolano, M.S., 2012. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products. *Meat Sci.* 93 (2), 316–321.
- Oteo, J., Garduño, E., Bautista, V., Cuevas, O., Campos, J., 2008. Antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Spain: analyses of 718 invasive isolates from 35 hospitals and report of one outbreak caused by an SHV-12-producing strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 61 (1), 222–224.
- Oteo, J., Navarro, C., Cercenado, E., Delgado-Iribarren, A., Wilhelmi, I., Orden, B., 2006. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J. Clin. Microbiol.* 44 (7), 2359–2366.
- Paterson, D.L., Bonomo, R.A., 2005. Extended-Spectrum β -Lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (4), 657–686.
- Pavlov, D., de Wet, C.M., Grabow, W.O., Ehlers, M.M., 2004. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. *Int. J. Food Microbiol.* 92 (3), 275–287.
- Philippon, A., Arlet, G., Lagrange, P.H., 1994. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13 (Suppl. 1), S17–S29.
- Poirel, L., Gniadkowski, M., Nordmann, P., 2002. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J. Antimicrob. Chemother.* 50 (6), 1031–1034.
- Pulcrano, G., Iula, D.V., deLuca, C., Roschetto, E., Vollaro, A., Rossano, F., Catania, M.R., 2014. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST512 carrying blaKPC-3 in a hospital in southern Italy. *APMIS* 122, 42–46.
- Randall, L.P., Clouting, C., Horton, R.A., Coldham, M.G., Wu, G., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H., Teale, C.J., 2011. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum β -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 86–95.
- Reinthaler, F.F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., Melkes, A., Posch, J., Winter, I., Zarfel, G., Marth, E., 2010. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res.* 44 (6), 1981–1985.
- Sande-Bruinsma, N., Grundmann, H., Verloo, D., Tiemersma, E., Monen, J., Goossens, H., Ferech, M., 2008. Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (11), 1722–1730.
- Shibl, A.M., Al-Agamy, M.H., Khubnani, H., Senok, A.C., Tawfik, A.F., Livermore, D.M., 2012. High prevalence of acquired quinolone-resistance genes among *Enterobacteriaceae* from Saudi Arabia with CTX-M-15 β -lactamase. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73 (4), 350–353.
- Silva, J., Castillo, G., Callejas, L., López, H., Olmos, J., 2006. Frequency of transferable multiple antibiotic resistance amongst coliform bacteria isolated from a treated sewage effluent in Antofagasta, Chile. *Electron J. Biotechnol.* 9 (5), 533–540.
- Tacão, M., Correia, A., Henriques, I., 2012. Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of blaCTX-M-like genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4134–4140.
- Tacão, M., Moura, A., Correia, A., Henriques, I., 2014. Co-resistance to different classes of antibiotics among ESBL-producers from aquatic systems. *Water Res.* 48, 100–107.
- Tan, T.Y., Ng, L.S., He, J., Koh, T.H., Hsu, L.Y., 2009. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (1), 146–149.
- Thomas, C., Moore, L., Elamin, N., Doumith, M., Zhang, J., Maharjan, S., Warner, M., Perry, C., Turton, J., Johnstone, C., Jepson, A., Duncan, N., Holmes, A., Livermore, D.M., Woodford, N., 2013. Early (2008–2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 42 (6), 531–536.
- Thomson, K.S., Sanders, C.C., 1992. Detection of extended spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 (9), 1877–1882.
- Thomson, K., 2010. Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J. Clin. Microbiol.* 48 (4), 1019–1025.
- Tissera, S., Lee, S.M., 2013. Isolation of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing bacteria from urban surface waters in Malaysia. *Malays. J. Med. Sci.* 20 (3), 14–22.
- Torres, C., Zarazaga, M., 2007. BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25 (2), 29–37.
- Valverde, A., Coque, T.M., Sánchez-Moreno, M.P., Rollán, A., Baquero, F., Cantón, R., 2004. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 42 (10), 4769–4775.
- Vieira, A.R., Collignon, P., Aarestrup, F.M., McEwen, S.A., Hendriksen, R.S., Hald, T., Wegener, H.C., 2011. Association between antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals and Blood stream isolates from humans in Europe: an ecological study. *Foodborne Pathog. Dis.* 8 (12), 1295–1301.
- Wiegand, I., Geiss, H.K., Mack, D., Stürenburg, E., Seifert, H., 2007. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among

- Enterobacteriaceae* by use of semiautomates Microbiology Systems and manual detection procedures. *J. Clin. Microbiol.* 45 (4), 1167–1174.
- Wise, R., Hart, T., Cars, O., Streulens, M., Helmuth, R., Huovinen, P., Sprenger, M., 1998. Antimicrobial resistance: is a major threat to public health. *Br. Med. J.* 5 (317), 609–610.
- Woodford, N., Fagan, E.J., Ellington, M.J., 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 57 (1), 154–155.
- Woodford, N., Turton, J.F., Livermore, D.M., 2011. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 736–755.
- World Health Organization (WHO), 2007. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Categorization for the Development of Risk Management Strategies to Contain Antimicrobial Resistance Due to Non-human Antimicrobial Use. Report of the Second WHO Expert Meeting. Copenhagen. May 29–31, 2007.
- Wright, G., 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.* 13 (5), 589–594.
- Zhang, X.X., Zhang, T., Fang, H.H., 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (3), 397–414.
- Zurfluh, K., Hächler, H., Nüesch-Inderbinen, M., Stephan, R., 2013. Characteristics of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates from rivers and lakes in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (9), 3021–3026.