



Universidad de Granada
Departamento de Microbiología

**Patrones de sensibilidad a antibióticos en
aislados clínicos de *Escherichia coli*
productores de betalactamasas de
espectro extendido y su relación con la
expresión de porinas**

Antonio Salmerón García
Granada, 2007



D. JOSÉ GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ, Profesor Titular del Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada, **D. ANTONIO SORLÓZANO PUERTO**, Doctor en Medicina, y **D. FERNANDO MARTÍNEZ CHECA**, Doctor en Farmacia, investigadores contratados de la Universidad de Granada

CERTIFICAN:

Que la memoria para optar al grado de Doctor en Farmacia titulada **“PATRONES DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS CLÍNICOS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORES DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE PORINAS”** realizada por **D. ANTONIO SALMERÓN GARCÍA**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne los requisitos suficientes para su juicio y calificación.

Fdo: D. José Gutiérrez Fernández

Fdo: D. Antonio Sorlózano Puerto

Fdo: D. Fernando Martínez Checa

Durante el desarrollo del presente trabajo hay muchas personas, que de una manera u otra, me han prestado su ayuda de forma desinteresada, haciendo posible la culminación de la presente Tesis Doctoral y a las que deseo expresar mi gratitud:

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores, los doctores: José Gutiérrez Fernández, Antonio Sorlózano Puerto y Fernando Martínez Checa, la confianza que han depositado en mí, el tiempo invertido hasta la culminación del trabajo, así como la elevada capacidad de trabajo, superación y pasión por la investigación que me han transmitido y espero aplicar de ahora en adelante.

Aunque suene a tópico, sin vosotros este trabajo no hubiese salido adelante, millones de gracias.

A los facultativos del Servicio de Farmacia del Hospital "San Cecilio": Pepe, Inma, Paco, Mari Carmen, Miguel, José María y M^a Sol, por todos los momentos compartidos, por permitirme aprender de cada uno de ellos y por crear un ambiente agradable en el trabajo.

A mis amigas y compañeras de residencia, las mayores, Gema y Mercedes, y a las no tan chicas, Eva, Sol, M^a José y Cristina. Por todos los buenos ratos pasados y hacerme desconectar de la ciencia y el trabajo. A los técnicos, auxiliares, administrativos, D.U.E y becarias del Servicio: Fernán, Loli, Mari Angus, las Maribeles, Celia, Mari, las Anas (V y G), Gracia, Encarnita, Aurora, Mercedes, Víctor, Luis, Ángel, Eli y Elena, entre otros, por confiar siempre en mí y levantarme el ánimo y la autoestima en todo momento.

A mis amigos y amigas de la carrera y de fuera de este mundillo, a mi familia, que siempre están ahí, compartiendo mis buenos y malos momentos, mis éxitos y fracasos.

Al doctor Juan de Dios Luna, por su inestimable ayuda en el campo de la Estadística.

A la "Fundación Hospital Clínico", por favorecer, en el ámbito del Hospital "San Cecilio", la realización de trabajos de investigación.

A los doctores Emilia Quesada y Fernando Martínez Checa, del departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, por prestarnos sus medios e instalaciones para la extracción y separación de proteínas.

Y a todos aquellos que la falta de memoria me ha llevado a dejaros en el tintero, y que deberíais aparecer, también os lo agradezco y pido perdón.

*A mi Madre,
A mis hermanas,
A Ana.*

ÍNDICE

	Págs.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. BACTERIAS DEL GÉNERO <i>ESCHERICHIA</i>	2
1.2. FACTORES DE VIRULENCIA EN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	4
1.3. INFECCIONES PRODUCIDAS POR <i>ESCHERICHIA COLI</i>	7
1.3.1. Infección del tracto urinario	7
1.3.2. Meningitis neonatal	8
1.3.3. Infecciones respiratorias	9
1.3.4. Bacteriemia	9
1.3.5. Infecciones intraabdominales	10
1.3.6. Infecciones entéricas	11
<i>1.3.6.1. E. coli enterotoxigénico</i>	12
<i>1.3.6.2. E. coli enteroinvasivo</i>	13
<i>1.3.6.3. E. coli enteropatógeno</i>	13
<i>1.3.6.4. E. coli enteroagregativa</i>	14
<i>1.3.6.5. E. coli enterohemorrágico</i>	14
1.3.7. Otras infecciones	15
1.4. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR <i>ESCHERICHIA COLI</i>	16
1.5. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA	18
1.5.1. Resistencia adquirida debida a mutaciones	19

	Págs.
1.5.2. Resistencia mediada por intercambio genético	20
1.5.3. Mecanismos bioquímicos de expresión de resistencia	21
1.6. INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA POR BETALACTAMASAS	22
1.7. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEEs)	24
1.7.1. Introducción e historia	24
1.7.2. Principales tipos de BLEEs	26
<i>1.7.2.1. Betalactamasas tipo TEM</i>	<i>27</i>
<i>1.7.2.2. Betalactamasas tipo SHV</i>	<i>28</i>
<i>1.7.2.3. Betalactamasas tipo CTX-M</i>	<i>29</i>
1.7.3. Epidemiología	31
1.7.4. Asociación de resistencias a otros antibióticos	40
1.7.5. Tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de BLEEs	43
1.8. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD	46
1.8.1. Proteínas de membrana externa	46
1.8.2. Papel de las porinas en la permeabilidad de la membrana externa	49
1.8.3. Resistencia a antibióticos por alteraciones de la membrana externa	52

	Págs.
1.8.4. Porinas y resistencia antibiótica	54
1.8.5. Modificación estructural de la porina y resistencia antibiótica	56
1.8.6. Expresión de porinas y resistencia antibiótica	58
1.8.7. Poliaminas y resistencia	60
1.8.8. Asociación de impermeabilidad y mecanismos de inactivación o eliminación	60
2. OBJETIVOS	65
3. MATERIAL Y MÉTODOS	68
3.1. SELECCIÓN DE LOS AISLADOS BACTERIANOS	69
3.2. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD	71
3.2.1. Método de microdilución	72
3.2.2. Estudio de sensibilidad a tigeciclina	80
<i>3.2.2.1. Método de difusión con disco</i>	80
<i>3.2.2.2. Prueba de Epsilon (E-test)</i>	81
3.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PORINAS DE LA MEMBRANA EXTERNA	84
3.3.1. Selección de los aislados	84
3.3.2. Estudio de sensibilidad en medio Nutrient-Broth	84
3.3.3. Determinación de la expresión de porinas	85

	Págs.
3.3.3.1. <i>Extracción de porinas de la membrana externa</i>	86
3.3.3.2. <i>Separación de porinas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida</i>	89
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92
3.4.1. Relación entre la sensibilidad antibiótica de los 115 aislados productores de BLEEs y el tipo de enzima presente	92
3.4.2. Relación entre expresión de porinas, medio de cultivo y sensibilidad antibiótica	92
3.4.2.1. <i>En medio NB</i>	92
3.4.2.2. <i>En medio MH</i>	93
3.4.2.3. <i>Interacción entre el tipo de porinas y el medio de cultivo sobre el valor de CMI</i>	94
APÉNDICE	96
4. RESULTADOS	99
4.1. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUCTORES DE BLEEs	100
4.1.1. Actividad de los diferentes antibióticos ensayados	100

	Págs.
4.1.2. Relación entre el método de difusión con disco y la prueba Epsilon, para la determinación de la actividad de tigeciclina	126
4.2. VALORES DE CMI DE LOS 50 AISLADOS EN MEDIOS NUTRIENT-BROTH Y MUELLER-HINTON	129
4.3. EXPRESIÓN DE PORINAS EN MEDIOS NUTRIENT-BROTH Y MUELLER-HINTON	135
4.4. PATRONES DE EXPRESIÓN DE PORINAS	137
4.5. VALORES DE CMI PARA CADA PATRÓN DE EXPRESIÓN DE PORINAS	140
4.6. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE PORINAS Y SENSIBILIDAD DE LOS AISLADOS	141
4.6.1. En medio NB	141
<i>4.6.1.1. Amoxicilina-ácido clavulánico</i>	142
<i>4.6.1.2. Piperacilina-tazobactam</i>	143
<i>4.6.1.3. Cefoxitina</i>	144
<i>4.6.1.4. Ceftazidima</i>	145
<i>4.6.1.5. Cefepima</i>	146
<i>4.6.1.6. Imipenem</i>	147
<i>4.6.1.7. Meropenem</i>	148

	Págs.
<i>4.6.1.8. Ertapenem</i>	149
<i>4.6.1.9. Amikacina</i>	150
<i>4.6.1.10. Tobramicina</i>	151
<i>4.6.1.11. Ciprofloxacino</i>	152
<i>4.6.1.12. Levofloxacino</i>	153
4.6.2. En medio MH	154
<i>4.6.2.1. Amoxicilina-ácido clavulánico</i>	155
<i>4.6.2.2. Piperacilina-tazobactam</i>	157
<i>4.6.2.3. Cefoxitina</i>	159
<i>4.6.2.4. Ceftazidima</i>	161
<i>4.6.2.5. Cefepima</i>	163
<i>4.6.2.6. Imipenem, meropenem, ertapenem y amikacina</i>	165
<i>4.6.2.7. Tobramicina</i>	168
<i>4.6.2.8. Ciprofloxacino</i>	171
<i>4.6.2.9. Levofloxacino</i>	173
4.6.3. Influencia del tipo de porinas y el medio de cultivo sobre el valor de CMI	175
<i>4.6.3.1. Amoxicilina-ácido clavulánico</i>	178
<i>4.6.3.2. Piperacilina-tazobactam</i>	178
<i>4.6.3.3. Cefoxitina</i>	179
<i>4.6.3.4. Ceftazidima</i>	179
<i>4.6.3.5. Cefepima</i>	180

	Págs.
4.6.3.6. <i>Imipenem</i>	180
4.6.3.7. <i>Meropenem</i>	181
4.6.3.8. <i>Ertapenem</i>	181
4.6.3.9. <i>Amikacina</i>	182
4.6.3.10. <i>Tobramicina</i>	182
4.6.3.11. <i>Ciprofloxacino</i>	183
4.6.3.12. <i>Levofloxacino</i>	183
5. DISCUSIÓN	184
5.1. ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE DIVERSOS ANTIBIÓTICOS FRENTE A <i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUCTORES DE BLEEs	185
5.1.1. Actividad de amoxicilina-clavulánico	186
5.1.2. Actividad de piperacilina-tazobactam	187
5.1.3. Actividad de cefoxitina	187
5.1.4. Actividad de cefepima	188
5.1.5. Actividad de ceftazidima	189
5.1.6. Actividad de los antibióticos carbapenémicos	189
5.1.7. Actividad de los aminoglucósidos	190
5.1.8. Actividad de fluorquinolonas	191
5.1.9. Actividad de tigeciclina	193
5.2. REPERCUSIÓN DE OmpC Y OmpF EN LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS	195

	Págs.
5.2.1. Antibióticos betalactámicos	197
5.2.2. Aminoglucósidos	200
5.2.3. Fluorquinolonas	200
6. CONCLUSIONES	202
7. BIBLIOGRAFÍA	207

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BACTERIAS DEL GÉNERO *ESCHERICHIA*

El género *Escherichia*, y, en concreto, la especie *Escherichia coli*, es un bacilo gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae*, móvil y capaz de fermentar la lactosa y la glucosa, con la producción de gases y ácidos diversos. Son bacilos poco exigentes en cuanto a las necesidades nutritivas y relativamente resistentes a los agentes externos, crecen bien en medios comunes, incluso a temperaturas de 45°C, lo que permite diferenciarlos del resto de coliformes. Como *E. coli* no es una bacteria fijadora, requiere nitrógeno soluble, como el sulfato de amonio (Madigan *et al.*, 2000).

El análisis de ARNr 16S muestra que pertenece a la clase γ -*Proteobacteria*, muy relacionada con otras proteobacterias (α , β , δ) y con las cianobacterias (Logan, 1994). La clase γ -*Proteobacteria*, incluye, además, a otros organismos patógenos humanos como *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. y *Haemophilus* spp.

Generalmente, se considera que el hábitat "normal" de *Escherichia coli* es el colon de organismos de sangre caliente (aves y mamíferos) (Souza *et al.*, 1999), y que, aunque se pueden localizar en el medio externo, tradicionalmente se ha considerado que su presencia representa contaminación fecal, ya que se sospechaba que no se podían reproducir en el medio exterior (Atlas, 1990). Sin embargo, diversos estudios indican que esto es falso. Existen *E. coli* que viven en otras

zonas, además del tracto digestivo, como los *E. coli* patógenos, que pueden habitar en la sangre y en el tracto urogenital. Adicionalmente, es posible encontrar poblaciones de *E. coli* en vertebrados de sangre fría. Por otro lado, también se han encontrado cepas en ambientes acuáticos, especialmente aquellos que son ricos en compuestos orgánicos, como en los desagües (Parveen *et al.*, 1999).

La densidad de *E. coli* en el intestino grueso es de 10^6 - 10^7 células por gramo de colon, encontrándose en grandes cantidades en la región de la válvula ileocecal. Esto hace de *E. coli* un componente importante de la microbiota, predominantemente anaerobia, de esta parte del intestino, donde la densidad bacteriana total es de unas 10^{11} células por gramo de tejido (Selander *et al.*, 1987). Como parte de la microbiota normal impide el desarrollo de organismos proteolíticos y sintetiza vitaminas del complejo B.

E. coli es una de las primeras especies que coloniza al mamífero recién nacido, adquiriendo las primeras cepas desde el canal del parto y de las heces de la madre (Bettelheim, 1994). Las colonizaciones posteriores se deben, por lo general, a la ingestión de alimentos contaminados. Usualmente hay una cepa dominante de *E. coli* por hospedador, sin embargo, la aparición de nuevos genotipos, ya sea por mutación, o por ingestión, hace que este dominio sea sólo temporal y que la dinámica esté dictada por procesos tanto aleatorios, como adaptativos

(Levin, 1981).

En el intestino se estima que hay una bipartición al día, mientras que en un medio de cultivo adecuado, en el laboratorio, se tienen 6 biparticiones al día (Selander *et al.*, 1987), muy bajo, si se considera que tiene capacidad para dividirse cada 18 minutos o un tiempo de generación igual a 3,3. Se considera que en condiciones pobres en nutrientes como en agua o en lodo, el tiempo de bipartición de *E. coli* es aún menor que en el intestino.

1.2. FACTORES DE VIRULENCIA EN *ESCHERICHIA COLI*

Existen alrededor de 700 tipos antigénicos (serotipos) basándonos en los antígenos O, H y K, que nos han permitido clasificar a las distintas cepas patógenas.

E. coli es el principal responsable, o participa, en diferentes infecciones en humanos: infecciones de las vías urinarias, meningitis neonatal y enfermedades intestinales, entre otras. Estos tres cuadros dependen de la presencia de factores de virulencia, que son determinantes a la hora de ocasionar estas enfermedades.

Existen diferentes tipos de factores de virulencia que permiten la conversión de *E. coli* en cepa patógena, como son las adhesinas (fimbriales y afimbriales), movilidad mediante flagelos, invasinas (hemolisinas y sideróforos), toxinas, propiedades superficiales

antifagocitarias, defensa frente a reacciones bactericidas del suero del hospedador, defensa frente a la respuesta inmunológica, y atributos genéticos como plásmidos de resistencia a antibióticos y otros plásmidos de virulencia (Blanco *et al.*, 1991a; Blanco *et al.*, 1991b; Blanco *et al.*, 1992).

Los factores de virulencia de las diferentes cepas, en las diferentes situaciones clínicas, se detallan en las tablas 1 y 2 (Nataro y Kaper, 1998).

Tabla 1: Factores de virulencia de *E. coli* causantes de infecciones del tracto urinario, bacteriemias y meningitis en humanos (infecciones extraintestinales)

- Fimbria P (Pap): Fimbrias asociadas especialmente a cepas causantes de pielonefritis.
- Fimbrias P-like (Prs): Relacionadas genéticamente con la fimbria P.
- Fimbria S (Sfa): Asociadas con cepas causantes de sepsis y meningitis. No obstante, también son frecuentes en cepas uropatogénicas.
- Fimbria F1C: Está relacionada genéticamente con la fimbria S.
- Adhesinas afimbriales AFA-I a V y relacionadas (hemaglutinina Dr o adhesina OX75).
- Las fimbrias P, P-like, S y AFA causan hemaglutinación resistente a la manosa (MRHA) y se encuentran codificadas en los operones *pap*, *sfa*, *afa*.
- Factor necrosante citotóxico tipo 1 (CNF1).
- Alfa-hemolisina Hly.
- Se han identificado islas de patogenicidad cromosómicas que llevan los genes que codifican para la fimbria P (Pap), fimbrias P-like (Prs), CNF1 y/o Hly.
- Sideróforo aerobactina para la captación de hierro.
- Resistencia a la actividad lítica del suero y a la fagocitosis: Se ha asociado con algunas proteínas de la membrana externa y determinados antígenos O y K (especialmente el K1).

Tabla 2: Factores de virulencia de *E. coli* diarreagénicos humanos

***E. coli* enteropatógenicos (EPEC)**

- Adhesina BFP codificada en el plásmido *EAF*, responsable de la adhesión, a distancia, de la bacteria al enterocito y de la adhesión localizada a células HEp-2
- Locus cromosómico LEE, con los genes: *eae*, *tir*, *esp* y *sep*, responsable de la adhesión íntima de la bacteria y de la lesión de adhesión y borrado del microvilli intestinal

***E. coli* enterotoxigénicos (ETEC)**

- Factores antigénicos de colonización (CFA/I, II, III y IV)
- Enterotoxinas: termolábil (LT) y termoestable (ST)
- Tanto los CFAs como las enterotoxinas se encuentran codificadas en plásmidos

***E. coli* enteroinvasivos (EIEC)**

- Plásmido de elevado peso molecular (140 KDa) que lleva genes implicados en la invasividad

***E. coli* verotoxigénicos (ECVT) ó enterohemorrágicos (EHEC)**

- Verotoxinas (VT1 y VT2) o shiga-like toxinas (Stx1 y Stx2) codificadas en profagos
- Locus cromosómico LEE, con genes: *eae*, *tir*, *esp* y *sep*
- Plásmido de 60 KDa que codifica para una enterohemolisina (EntHly) y una adhesina fimbrial que puede estar implicada en la colonización intestinal

***E. coli* enteroagregativos (EAEC o ECEA)**

- Adhesión agregativa a células HEp-2 mediada por las fimbrias plasmídicas AAF/I y AAF/II.
- Enterotoxina termoestable EAST1 (plasmídica)
- Citotoxina de 108 KDa que provoca lesiones destructivas a nivel intestinal

1.3. INFECCIONES PRODUCIDAS POR *ESCHERICHIA COLI*

1.3.1. Infección del tracto urinario

E. coli es la causa más frecuente de infecciones del tracto urinario en humanos, produciendo una amplia variedad de procesos, desde uretritis no complicadas, hasta cistitis sintomáticas, pielonefritis o sepsis. La menor longitud de la uretra en el sexo femenino y la frecuente colonización proximal por bacterias entéricas, condicionan que las infecciones no complicadas del tracto urinario se observen, sobretodo, en mujeres. Las infecciones complicadas (pielonefritis y sepsis) se asocian, generalmente, a obstrucciones del flujo urinario (hipertrofia prostática, litiasis, anomalías congénitas) o a la presencia de material protésico en las vías (cateterización uretral), y por ello se observan con una frecuencia similar en ambos sexos, no requiriendo, de forma específica, la existencia de factores de virulencia por parte de *E. coli* (Brumfitt, 1991).

Las infecciones no complicadas se observan, sobretodo, en mujeres sexualmente activas, con colonización intestinal por una cepa uropatógena de *E. coli*. La existencia de factores de adherencia hace que se colonice la zona periuretral y durante el acto sexual pueda producirse una progresión hasta la vejiga de dicho microorganismo. El factor de adherencia relacionado con las cepas de *E. coli* uropatogénico es la fimbria P, capaz de unirse al antígeno P, que está presente en las células uroepiteliales del 99% de la población. Otros factores de virulencia que

se han relacionado con la patogénesis de las infecciones urinarias son la hemolisina, la colicina V y la resistencia al efecto bactericida sérico dependiente del complemento. Las fimbrias tipo 1 pueden mediar en la adherencia a las células de la vejiga urinaria y contribuir a la virulencia cuando se expresan en una cepa uropatogénica de *E. coli*; sin embargo, esta capacidad no es exclusiva de estas cepas (Johnson, 1991).

La mayoría de infecciones urinarias están causadas por un número reducido de serogrupos O (O4, O6, O75), aunque los mismos son los más prevalentes en el tracto digestivo. Además, la presencia de antígeno K se relaciona con infecciones del tracto urinario superior.

1.3.2. Meningitis neonatal

La meningitis neonatal afecta a 1/2.000-4.000 recién nacidos, con una mortalidad superior al 80%. El 80% de las cepas de *E. coli* involucradas presentan el antígeno capsular K1, mientras que en los aislados intestinales sólo está presente en el 20-40%.

La presencia del antígeno capsular K1 es el factor de virulencia de *E. coli* asociado con la meningitis neonatal, a diferencia de lo observado en la población adulta. El mecanismo de patogenicidad no está bien estudiado, aunque se conoce que existe una mayor colonización durante el embarazo por estas cepas de *E. coli*, y que la existencia de las mismas en el tracto digestivo de los neonatos podría condicionar una bacteriemia

y la meningitis subsiguiente (Sarff *et al.*, 1975).

1.3.3. Infecciones respiratorias

Las infecciones respiratorias por *E. coli* son consideradas como oportunistas y se observan, sobretodo, en pacientes debilitados o inmunodeprimidos, a menudo durante su estancia en el hospital. No se han identificado factores de virulencia específicos de *E. coli* asociados con las infecciones respiratorias.

La mayoría de las neumonías por *E. coli* se producen como consecuencia de microaspiraciones de secreciones faríngeas que están colonizadas por este microorganismo. Son, en general, de adquisición nosocomial, aunque también pueden afectar a pacientes diabéticos, alcohólicos o bronquíticos crónicos a nivel comunitario. Clínicamente se produce una bronconeumonía de lóbulos inferiores, acompañada de empiema en un tercio de los casos y de bacteriemia en otro tercio. La mortalidad puede superar el 50% debido a la gravedad de las enfermedades de base de los pacientes afectados (Bordow *et al.*, 2003).

1.3.4. Bacteriemia

E. coli es uno de los microorganismos que más frecuentemente causan bacteriemia. Las bacteriemias de adquisición comunitaria se originan en su mayoría en infecciones complicadas del tracto urinario, particularmente cuando existe una obstrucción al flujo de orina, y, en

menor grado, en infecciones del tracto biliar. *E. coli* ocasiona un número importante de sepsis de adquisición nosocomial, siendo sus focos primarios el material protésico, en forma de catéteres endovenosos o tubos endotraqueales, o los tractos urogenital, gastrointestinal o respiratorio (Gransden *et al.*, 1990).

Los pacientes granulocitopénicos graves por quimioterapia, los sometidos a ventilación mecánica en las unidades de vigilancia intensiva y, en menor grado, los cirróticos, tienen un riesgo elevado de presentar bacteriemias primarias por *E. coli* y otras bacterias entéricas, sin evidencia de infección a dicho nivel, por un mecanismo denominado de traslocación bacteriana. La utilización de pautas de descontaminación selectiva con antibióticos orales no absorbibles, se han encaminado a reducir estas bacteriemias nosocomiales, aunque su uso no es generalizado y su eficacia no está absolutamente demostrada

1.3.5. Infecciones intraabdominales

E. coli se aísla con frecuencia en pacientes con apendicitis perforadas o inflamadas, abscesos secundarios a diverticulitis perforadas, abscesos subfrénicos posquirúrgicos o infartos mesentéricos. En todas estas circunstancias, generalmente, la infección es polimicrobiana y *E. coli* se acompaña de otras bacterias de origen entérico (otras enterobacterias, enterococos y, especialmente, anaerobios) (Almirante,

2002).

E. coli es una de las etiologías más frecuentes de las infecciones de la vía biliar, ocasionando episodios de colecistitis, colangitis o, incluso, abscesos hepáticos múltiples por colonización ascendente. La existencia de litiasis en el árbol biliar o las manipulaciones previas del mismo, por endoscopia o cirugía, son los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de las infecciones a dicho nivel.

Los pacientes cirróticos presentan, con relativa frecuencia, cuadros de peritonitis bacteriana espontánea, siendo *E. coli* el agente causal implicado en un mayor número de episodios. La quimioprofilaxis diaria con fluorquinolonas, después de un primer episodio, reduce, de forma sustancial, las frecuentes recidivas de esta infección en la cirrosis hepática.

1.3.6. Infecciones entéricas

Se conocen cinco tipos de *E. coli* que pueden ocasionar enfermedades diarreicas: *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), *E. coli* enteropatógeno (EPEC), y *E. coli* enteroagregativo (EAEC). Cada uno clasificado dentro de un subgrupo serológico y con diferentes características patogénicas (Nataro y Kaper, 1998).

1.3.6.1. E. coli enterotoxigénico

ETEC es un agente que causa, con frecuencia, diarrea en niños y viajeros a países subdesarrollados o lugares donde existen malas condiciones higiénicas. La diarrea cursa sin fiebre y sin inflamación de la mucosa intestinal. La enfermedad se puede presentar en varias formas, que van desde un ligero malestar, hasta un síndrome severo similar al cólera. Se adquiere por ingestión de agua y alimentos contaminados, y, lógicamente, los adultos de las regiones endémicas están inmunizados (Ericsson, 1998). La enfermedad requiere la colonización y posterior síntesis de una o más enterotoxinas, que están codificadas en plásmidos (tabla 2).

Las enterotoxinas sintetizadas por ETEC son la toxina termolábil (LT) y/o la toxina termoestable (ST), los genes que las codifican pueden estar en el mismo o en plásmidos separados. La toxina LT es muy parecida a la toxina colérica, tanto estructuralmente, como en el mecanismo de acción. La toxina ST es de naturaleza peptídica y de muy pequeño tamaño (2 KDa), lo que explica por qué no se inactiva por el calor. ST actúa aumentando el GMPc citoplasmático por unión con la guanilato ciclasa de las membranas de las células hospedador, así se aumenta la secreción de fluidos y electrolitos dando lugar a la diarrea.

1.3.6.2. *E. coli* enteroinvasivo

Las cepas EIEC son capaces de producir invasión celular, y por ello, son distintas a otras cepas de *E. coli*, que se limitan a la superficie mucosa. Como consecuencia de ello, se ocasiona una importante respuesta inflamatoria asociada con una destrucción de la mucosa intestinal. Clínicamente, el cuadro resultante es similar a la disentería bacteriana causada por *Shigella dysenteriae*, con fiebre elevada, dolor cólico abdominal y diarrea abundante con moco, sangre y pus en las heces. Esta forma de la enfermedad es poco frecuente en países industrializados y, al igual que se observa en las cepas de ETEC, la infección está causada por un número limitado de serogrupos, que poseen una capacidad invasiva codificada genéticamente por un plásmido de gran tamaño.

EIEC actúa de forma invasiva y, a diferencia de *Shigella*, no produce toxinas.

1.3.6.3. *E. coli* enteropatogénico

EPEC induce una diarrea aguda (y gran mortandad en niños menores de 2 años, en países en vías de desarrollo) similar a ETEC, pero no presenta los mismos factores de virulencia que favorecen la colonización y la producción de toxinas. EPEC produce una adhesina de naturaleza no fimbrial (intimina) (Jerse *et al.*, 1990), pili BFP, y una

enterotoxina similar a la que produce *Shigella* (Nataro y Kaper, 1998).

Las causas de la aparición de diarrea en individuos infectados con bacterias que pertenecen a serotipos correspondientes a EPEC y EHEC son multifactoriales, por ejemplo, la activación de dos cinasas: PKC, que induce cambios en la secreción de agua y electrolitos por el epitelio, y la fosforilación de la miosin cinasa, que lleva a un aumento de la permeabilidad de la membrana. Estos fenómenos, junto con el borramiento de las microvellosidades del epitelio, que impide la función de absorción, son los responsables de la aparición de la diarrea intensa (Nataro y Kaper, 1998).

1.3.6.4. E. coli enteroagregativa

Las cepas EAEC se caracterizan por presentar un patrón agregativo de adherencia a las células tisulares Hep-2. La capacidad de ocasionar esta adherencia, así como de producir una enterotoxina (toxina EAST), está mediada genéticamente por un plásmido. Esta particular cepa de *E. coli* se ha asociado con cuadros diarreicos persistentes en niños de países en desarrollo (Eisenstein *et al.*, 2000).

1.3.6.5. E. coli enterohemorrágico

EHEC está representado por una cepa del serotipo O157:H7, que produce toxiinfecciones alimentarias caracterizadas por heces

sanguinolentas y ausencia de fiebre. Constituye una enfermedad emergente, en el mundo en general, y Europa en particular. Han aparecido brotes de casos muy graves en niños de diversos países (EEUU, Canadá, Gran Bretaña, Japón, Chile, Argentina, Sudáfrica), por el consumo de carne, agua o algún otro alimento contaminado con este serotipo. Por lo que respecta a España, la incidencia es mucho menor a la existente en otros países (Margall *et al.*, 1997).

La enfermedad causada por esta cepa es especialmente virulenta, ya que induce una toxemia generalizada con diarrea hemorrágica y, en los casos más graves, la muerte, que se debe a un síndrome urémico hemolítico con fracaso renal (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas EHEC tienen el mismo mecanismo de adhesión y la misma "isla de patogenicidad" que las EPEC, sin embargo, debido a la presencia de un plásmido de 60 KDa, estas cepas producen una toxina hemolítica. Las EHEC son capaces de invadir la célula eucariota, entrar en la corriente sanguínea y secretar toxinas similares a las de *Shigella* (stxA, stxB) (Nataro y Kaper, 1998).

1.3.7. Otras infecciones

E. coli puede producir abscesos en cualquier localización. Son de moderada frecuencia los localizados a nivel del tejido celular subcutáneo secundarios a la infección de las heridas quirúrgicas, a isquemia arterial

de las extremidades inferiores o a lesiones repetidas por inyecciones subcutáneas de insulina u otros medicamentos. En general, la etiología es polimicrobiana y la presencia de *E. coli* ocasiona, de forma característica, la producción de gas en los tejidos, que se detecta por crepitación o por estudios radiológicos.

E. coli ocasiona, de forma excepcional, un gran número de infecciones, como artritis sépticas, endoftalmitis, tiroiditis supurativa, abscesos cerebrales, endocarditis, osteomielitis, prostatitis, sinusitis y tromboflebitis séptica, entre otras.

1.4. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR *ESCHERICHIA COLI*

El tratamiento antibiótico de las infecciones por *E. coli* depende de su localización, de su gravedad y de los resultados de las pruebas de sensibilidad de la cepa aislada, si los mismos están disponibles.

En la diarrea infecciosa, la rehidratación y el aporte de electrolitos es la terapéutica de elección. Los antibióticos, fundamentalmente las quinolonas, se reservan para los casos de duración prolongada de la sintomatología o para aquellos pacientes con cuadros graves de la enfermedad.

Las infecciones no complicadas de las vías urinarias generalmente evolucionan de forma favorable con un tratamiento en dosis única o

durante tres días de antibióticos del tipo de cotrimoxazol, amoxicilina-ácido clavulánico o fosfomicina. En los casos de infecciones complicadas, la duración del tratamiento antibiótico no debe ser inferior a los siete días, siendo recomendable una pauta de entre 10 y 15 días. En el momento actual, en nuestro medio geográfico, hasta un 20% de las cepas de *E. coli* muestran resistencia a las quinolonas, debido, fundamentalmente, al uso indiscriminado de estos antibióticos, tanto en humanos como en veterinaria, por lo que no se recomienda su uso como terapia empírica de las infecciones urinarias de la comunidad (Daza *et al.*, 2001).

Las infecciones graves por *E. coli* requieren, a menudo, de tratamiento con cefalosporinas de espectro ampliado, como cefotaxima o ceftriaxona, o con otros betalactámicos que tienen una excelente actividad frente a dicho microorganismo y buena penetración tisular.

Los aminoglucósidos, como gentamicina o tobramicina, debido a su posible toxicidad, se reservan para la terapia de infecciones en pacientes neutropénicos o en casos de neumonías graves, siempre en asociación con un betalactámico. La mayor eficacia de esta combinación, frente a la monoterapia con un betalactámico, no ha sido demostrada.

En los abscesos de diferentes localizaciones es fundamental el drenaje asociado al tratamiento antibiótico.

Cada vez es más frecuente la presencia de cepas de *E. coli*

productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), procedentes tanto del medio intrahospitalario como de la comunidad, como consecuencia de la presión antibiótica y la fácil transmisión de este carácter de resistencia, lo cual nos conduce a replantearnos el tratamiento antibiótico de las infecciones causadas por *E. coli* productor de BLEEs.

1.5. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

La base del desarrollo de la resistencia bacteriana está en la selección de cepas. Es una interferencia en el proceso de selección natural. Donde antes se seleccionaban las bacterias más aptas para la supervivencia en el sitio del organismo de que se trate, en presencia del antibiótico, sobrevivirán solamente aquellas variantes capaces de resistir a las concentraciones del mismo presentes en ese lugar. El antibiótico se convierte en el primer factor de selección (Hawkey, 1998).

Tras la introducción en la clínica de cada nuevo antibiotico, es un proceso probablemente inevitable, que en un plazo variable de tiempo, aparezcan variantes resistentes de la bacteria contra la que se pretende luchar con el nuevo fármaco. Esto no implica que, con el uso racional no se pueda limitar al máximo la emergencia de resistencias (MacDougall y Polk, 2005).

Es necesario tener en cuenta la existencia de dos tipos de resistencia, la natural y la adquirida. La primera es constitutiva de la

bacteria, por ejemplo, las diferencias de la membrana de grampositivos y gramnegativos hace que algunos antibióticos no encuentren su diana adecuada donde ejercer su efecto (Hawkey, 1998).

Por otro lado, el origen de la resistencia adquirida es genético. El inicio es una mutación puntual en el material genético que permite el cambio de alguna cualidad que afecta al antimicrobiano o a su diana y finalmente dicha cepa será la seleccionada de entre todas las existentes para perpetuarse. También es muy importante la transferencia de material genético entre bacterias, siendo muy destacable en bacterias gramnegativas, donde ocurre con facilidad (Davies, 1997; Hawkey, 1998).

1.5.1. Resistencia adquirida debida a mutaciones

Este tipo de resistencia se genera por mutaciones en los genes del microorganismo que controlan las estructuras o funciones sobre las que actúan los distintos antibióticos, modificando la sensibilidad del microorganismo a los fármacos. Esta forma de resistencia por mutación puede aparecer en una generación (resistencia en un solo escalón) o en el transcurso de varias generaciones (resistencia en varios escalones). En el caso de la resistencia en un solo escalón, el microorganismo, que era inicialmente sensible a un determinado antibiótico, se vuelve resistente en la próxima generación. En cambio, en el caso de la resistencia en

varios escalones, la sensibilidad a los antibióticos va disminuyendo progresivamente a medida que se forman nuevas generaciones, y llega un momento en el que el microorganismo se vuelve totalmente resistente al fármaco (Davies, 1997; Hawkey, 1998).

1.5.2. Resistencia mediada por intercambio genético

La capacidad de resistencia se transmite por transferencia de genes mediante transformación, transducción y/o conjugación. La forma más eficaz y poderosa de propagación de la información genética se da por intermedio de los plásmidos (plásmidos R o factores R) (Hawkey, 1998).

Los factores R son plásmidos conjugativos que confieren a los microorganismos resistencia frente a fármacos. El factor R posee dos componentes diferentes: el factor de transferencia de resistencia (FTR), que controla el proceso de conjugación, y el determinante *r*, que está formado por uno, o más genes, que confieren la resistencia frente a drogas específicas. Los determinantes FTR y *r* son replicones independientes que se unen para formar el factor R, pero los determinantes *r* sólo confieren resistencia a la célula que los posee. El factor FTR codifica la formación de pili específicos por los cuales se lleva a cabo el proceso de conjugación. También existen plásmidos que otorgan a los microorganismos la capacidad de resistencia frente a

antibióticos y no poseen el factor FTR, por lo que no son conjugativos o "autotransferibles". Estos tipos de plásmidos son incapaces de iniciar la conjugación, y no codifican el pili sexual. Generalmente, son transferidos por transducción o por plásmidos conjugativos corresidentes. La transferencia de genes que codifican la resistencia antibiótica también se puede realizar mediante transposones e integrones (Hawkey, 1998).

1.5.3. Mecanismos bioquímicos de expresión de resistencia

Desde el punto de vista molecular y bioquímico, existen, básicamente, cinco mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente a los antibióticos (Davies, 1997; Hawkey, 1998):

- Inactivación enzimática
- Barrera de impermeabilidad
- No activación enzimática del pro-fármaco
- Expulsión activa
- Alteración de la diana

Es necesario tener en cuenta que los cinco mecanismos pueden coexistir simultáneamente en la misma bacteria.

En nuestro caso, vamos a tener en consideración los dos primeros, centrándonos, exclusivamente, en la inactivación enzimática por betalactamasas, y en las alteraciones de la permeabilidad de *E. coli*.

1.6. INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA POR BETALACTAMASAS

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico de todos los antibióticos betalactámicos, perdiendo capacidad de unión a las PBPs, y dando así lugar a compuestos sin actividad antibacteriana.

Desde un punto de vista clínico es esencial conocer la identidad del microorganismo que produce la betalactamasa, la localización del gen productor del enzima (plásmido o cromosoma), el carácter inducible o constitutivo de su expresión y el fenotipo de resistencia que determina (capacidad que tienen para hidrolizar los diferentes substratos betalactámicos y la mayor o menor inhibición de la que son objeto por parte de los inhibidores de betalactamasas). Estas características, así como el punto isoelectrico y el peso molecular, se han empleado en la clasificación de las diferentes betalactamasas.

También es necesario conocer la secuencia de aminoácidos, sobretudo la de su centro activo. Según éste existen cuatro clases de enzimas: A, B, C, y D (Ambler, 1980). Las enzimas de clase A, C y D poseen serina en su centro activo, que reacciona con el anillo betalactámico, abriéndolo irreversiblemente e inactivando el antibiótico; mientras que las enzimas de clase B poseen Zinc en su centro activo (metalobetalactamasas), que reacciona con el grupo carbonil del enlace amida del betalactámico, inactivándolo (Samaha-Kfoury y Araj, 2003).

1. Introducción

Tabla 3: Clasificación de las betalactamasas (modificada de Bush *et al.*, 1995)

Grupo	Clase	Substrato preferido	Inhibido por ácido clavulánico	Inhibido por EDTA	Genes	Enzimas	Microorganismo
1	C	Cefalosporinas	-	-	Crom Plas	Amp C MIR-1, MOX-1, FOX-1	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>
2a	A	Penicilinas	+	-	Crom / Plas	<i>S. aureus</i> (A, B, C, D)	<i>S. aureus</i>
2b	A	Penicilinas Cefalosporinas 1 ^a	+	-	Plas	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Enterobacterias <i>H. influenzae</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>P. aeruginosa</i>
2be	A	Penicilinas Cefalosporinas 1 ^a a 3 ^a Monobactámicos	+	-	Plas Crom	TEM 3-29, 43, 44, 50, 51, 52 SHV-2 a 10, 12 SHV-1 K1 <i>K. oxytoca</i>	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i>
2br	A	Penicilinas Inhibidores betalactamasas	+ / -	-	Plas	TEM-30 a 42, 45	Enterobacterias
2c	A	Penicilinas Carbenicilina	+	-	Plas	PSE-1, 3, 4	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2d	D	Penicilinas Cloxacilina	+ / -	-	Plas	OXA-1 a 10	Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
2de	D	Penicilinas Cloxacilina Cefalosporinas 1 ^a a 3 ^a	+ / -	-	Plas	OXA 11 a 21	<i>P. aeruginosa</i>
2e	A	Cefalosporinas 1 ^a a 3 ^a	+	-	Crom	Cefuroximasa	<i>P. vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas Cefalosporinas 1 ^a a 3 ^a Carbapenemas	+	-	Crom	NMC-A Sme-1 IMI-1	<i>E. cloacae</i> <i>S. marcescens</i>
3	B	Penicilinas Cefalosporinas 1 ^a a 3 ^a Carbapenemas	-	+	Crom Crom / Plas Plas	L-1 CcrA IMP-1	<i>S. maltophilia</i> <i>B. fragilis</i> Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i>
4		Penicilinas	-	?	Crom Plas	Nd SAR-2	<i>B. cepacia</i> <i>E. coli</i>

En la actualidad, las betalactamasas se clasifican según la propuesta de Bush, Jacoby y Medeiros (Bush *et al.*, 1995) que unifican criterios de clasificaciones anteriores (tabla 3).

1.7. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEEs)

1.7.1. Introducción e historia

La primera betalactamasa que se describió en una bacteria, concretamente en *E. coli*, lo fue incluso antes de que el primer betalactámico, la penicilina, fuese usado en la práctica médica (Abraham y Chain, 1940). La primera betalactamasa codificada por plásmidos en microorganismos gramnegativos, la enzima TEM-1, fue descrita a principios de la década de los 60 (Datta y Kontomichalon, 1965). Fue encontrada en un aislamiento de *E. coli* procedente de un hemocultivo de una paciente llamada “Temoniera” en Grecia, de ahí la designación de la enzima como TEM. El hecho de que esta enzima esté mediada por plásmidos y transposones ha facilitado el paso de la misma a otras especies bacterianas. Así, años después de este primer aislamiento, la betalactamasa TEM-1 puede encontrarse en múltiples especies de la familia *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae*.

Otra betalactamasa comúnmente encontrada en *K. pneumoniae* y *E. coli* es SHV-1 (de “sulphydryl variable”). La betalactamasa SHV-1

está codificada por el cromosoma en la mayoría de los aislamientos de *K. pneumoniae*, pero usualmente es de origen plasmídico en *E. coli*.

En los últimos 20 años se han incorporado nuevos antibióticos betalactámicos con la finalidad de ser resistentes a la hidrólisis por las betalactamasas. Sin embargo, con cada nuevo antibiótico que se ha venido usando para los tratamientos de los pacientes, nuevas betalactamasas han aparecido causando resistencia a este grupo de fármacos (Bush, 1989). Presumiblemente, la presión selectiva del uso de nuevos antibióticos en el tratamiento de las infecciones ha seleccionado nuevas variantes de betalactamasas. Una de estas nuevas clases han sido las oxiiimino-cefalosporinas, que desde la década de los 80 comenzaron a extender su uso para el tratamiento de las infecciones graves por bacterias gramnegativas.

La primera descripción de una betalactamasa plasmídica con un perfil de resistencia a cefalosporinas de tercera generación y sensibles a cefoxitina se realizó en Europa, en Alemania (Knothe *et al.*, 1983). El análisis de estas cepas demostró, con posterioridad, que la resistencia era debida a la producción de una betalactamasa plasmídica transferible derivada de SHV-1, y que se denominó SHV-2 (Kliebe *et al.*, 1985). El incremento de espectro que generaba este descubrimiento, especialmente frente a las oxiiimino-cefalosporinas, hizo que se las denominara betalactamasas de espectro ampliado, por hidrolizar un rango de

betalactámicos más amplio que las enzimas plasmídicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Hoy se las denomina, con mayor propiedad, betalactamasas de espectro extendido o BLEEs (Philippon *et al.*, 1989). Hay descritas diferentes BLEEs, por todo el mundo, en diferentes especies de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*.

Las BLEEs están codificadas por plásmidos (Jacoby y Sutton, 1991). La mayor parte de ellas pertenecen a la clase molecular A, y sus características principales son poseer el aminoácido serina en su centro activo, tener un peso molecular de 29 KDa y llevar a cabo la hidrólisis preferentemente de penicilinas (Medeiros *et al.*, 1988). Utilizando el esquema propuesto por Bush, Jacoby y Medeiros (Bush *et al.*, 1995) las BLEEs son definidas como betalactamasas capaces de hidrolizar oxiiimino-cefalosporinas, son inhibidas por ácido clavulánico y quedan incluidas en el grupo funcional 2be de esta clasificación (tabla 3).

1.7.2. Principales tipos de BLEEs

Muchas de las BLEEs derivan de las enzimas TEM o SHV, aunque no todas. Mutaciones puntuales en el gen que las codifica incrementan el espectro fenotípico. Nosotros, aquí, nos vamos a centrar en los tres tipos más frecuentes en nuestro medio.

1.7.2.1. *Betalactamasas tipo TEM*

La expresión de una betalactamasa tipo TEM-1 es el mecanismo más común de resistencia a los betalactámicos entre las bacterias gramnegativas (Du Bois *et al.*, 1995). Por encima del 90% de la resistencia a ampicilina en *E. coli* es debida a la producción de una TEM-1 (Sanders, 1987). Este mecanismo de resistencia ha sido habitualmente descrito entre *Enterobacteriaceae*, pero no está confinado sólo a este grupo de bacterias. El gen responsable se localiza en un transposón cuya transposición hace que este gen también se haya descrito en otras especies bacterianas como *H. influenzae*, *Vibrio* spp. o *N. gonorrhoeae*.

TEM-2, la primera enzima derivada de TEM-1, presenta una única sustitución, la de glutamina en la posición 39 a lisina respecto a la secuencia de TEM-1 (Barthélémy *et al.*, 1985). Esto genera un cambio del punto isoelectrico (pI) de 5,4 de TEM-1 a 5,6 en TEM-2, pero no se modifica el perfil de substrato. La prevalencia de TEM-2 entre plásmidos en enterobacterias resistentes a betalactámicos no supera el 4%. TEM-3, originalmente descrita en 1988, fue la primera betalactamasa tipo TEM que mostró un fenotipo propio de una BLEE (Sougakoff *et al.*, 1988).

Las sustituciones en los aminoácidos que ocurren en la secuencia de la enzima TEM se producen en un número limitado de posiciones. La combinación de estos cambios de aminoácidos produce la aparición de los fenotipos BLEEs, tales como la capacidad de hidrolizar oxiimino-

cefalosporinas como ceftazidima y cefotaxima, o un cambio en el punto isoeléctrico, que va desde 5,2 a 6,5. Algunos de estos cambios son especialmente importantes a la hora de generar un fenotipo BLEE. Por ejemplo, la sustitución de glutamato por lisina en la posición 104 de TEM-1 (TEM-17), arginina por serina en la posición 164 de TEM-1 (TEM-12) o glicina por serina en la posición 238 de TEM-1 (TEM-19).

La presión ejercida por el uso de las cefalosporinas hace que se vayan seleccionando nuevas enzimas como consecuencia de múltiples mutaciones en la secuencia de aminoácidos, para ir creando enzimas cada vez más eficaces en la hidrólisis de las cefalosporinas.

1.7.2.2. *Betalactamasas tipo SHV*

La betalactamasa SHV-1 generalmente se encuentra en *K. pneumoniae*, siendo responsable de más del 20% de la resistencia a ampicilina mediada por plásmidos en esta especie (Tzouveleki y Bonomo, 1999). Sin embargo, en muchas cepas de *K. pneumoniae* el gen *bla_{SHV}* se encuentra integrado en el cromosoma bacteriano (Livermore, 1995). El gen que codifica SHV-1 comparte un 65% de identidad con el de TEM-1 (Huletsky *et al.*, 1990). No está claro por qué TEM-1 es más prevalente que SHV-1, con un 80% de plásmidos que codifican resistencia a betalactámicos en enterobacterias frente a un 5% para SHV-1 (Du Bois *et al.*, 1995), posiblemente se deba a que el transposón que

contiene a TEM-1 es más móvil.

Al contrario que las betalactamasas tipo TEM, existen relativamente pocas betalactamasas derivadas de SHV-1. La mayor parte de las variantes SHV poseen un fenotipo BLEE que está generado por la sustitución de un aminoácido serina en lugar de glicina en la posición 238 de su secuencia. Esta mutación está asociada con un gran incremento de la CMI de cefotaxima, y un incremento moderado de la CMI de ceftazidima respecto a las CMIs de SHV-1 para estos mismos antibióticos.

Hoy día la mayor parte de las enzimas SHV poseen un fenotipo de BLEE. Sin embargo, una variante, SHV-10, tiene un fenotipo de betalactamasa resistente a inhibidores de betalactamasas (IRT). Esta enzima, derivada de SHV-5, contiene una sustitución adicional en la posición 130, glicina en lugar de serina (Primarakis *et al.*, 1997).

1.7.2.3. *Betalactamasas tipo CTX-M*

En los últimos años ha ido surgiendo una nueva familia de BLEEs denominada CTX-M, caracterizadas por conferir resistencia de alto nivel a cefuroxima, cefotaxima y cefepime, prácticamente sin incrementar las CMIs de ceftazidima, ya que la actividad hidrolítica frente a este último antibiótico es mínima comparada con la de las otras cefalosporinas. Además de la rápida hidrólisis de cefotaxima, otra característica de estas

enzimas es que son inhibidas mejor por tazobactam que por sulbactam o ácido clavulánico (Tzouvelekis *et al.*, 2000). Principalmente, estas enzimas se han descrito en cepas de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Tzouvelekis *et al.*, 1998) y en *E. coli*, pero también se han descrito en otras especies de *Enterobacteriaceae*. El residuo serina en la posición 237, que está presente en todas las CTX-M, juega un papel importante en la actividad tipo BLEE de estas betalactamasas.

Estas enzimas no están estrechamente relacionadas con las betalactamasas TEM o SHV, mostrando sólo un 40% de proximidad genética con estas dos (Tzouvelekis *et al.*, 2000). Sin embargo, hay un alto grado de parecido entre la betalactamasa cromosómica de *Kluyvera ascorbata* (Klu-1 y Klu-2) y las enzimas tipo CTX-M, lo que sugiere un posible origen en esa especie (Humeniuk *et al.*, 2002). Sin embargo, se han expresado una alta variedad de variantes de las enzimas CTX-M, por lo que es muy improbable que estas enzimas tengan un mismo origen filogenético (Bradford, 2001).

Cepas en las que se han aislado enzimas tipo CTX-M han aparecido por múltiples partes del mundo, pero sobretodo se han asociado con brotes focales en el este de Europa, Suramérica y Japón. En menos ocasiones se han descrito aislamientos en el oeste de Europa, y generalmente en pacientes inmigrantes procedentes de las zonas donde se han descrito brotes. Sin embargo, aquí cabe destacar la alta incidencia de

aislamientos de enterobacterias con estas betalactamasas en España, lo que puede sugerir una zona endémica en el oeste de Europa. En las zonas donde se han descrito brotes epidémicos los laboratorios describen que los aislamientos con CTX-M son los más frecuentes del grupo de BLEEs (Sabaté *et al.*, 2000).

1.7.3. Epidemiología

Las enterobacterias productoras de BLEEs se han aislado con mayor frecuencia en muestras procedentes de pacientes hospitalizados, pero también pueden encontrarse en muestras de origen comunitario. Estos aislamientos pueden aparecer de forma esporádica, o dar lugar a brotes nosocomiales.

La codificación plasmídica de este tipo de resistencia hace que sea fácilmente transferible, por conjugación, entre diversas especies bacterianas. Así, podemos detectar brotes debidos a la diseminación de un plásmido, o bien a la diseminación de una cepa resistente (epidemia clonal). Además, estos plásmidos pueden llevar asociada resistencia a otros grupos de antibióticos (aminoglucósidos, tetraciclinas, trimetoprim-sulfametoxazol, entre otros) por lo que nos podemos encontrar con microorganismos multirresistentes. Todo ello determina que las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por bacterias que producen BLEEs sean limitadas.

El tubo digestivo actúa como reservorio de estos microorganismos; además es el nicho ecológico adecuado para que la resistencia se transmita a otras especies bacterianas.

El microorganismo en el que más frecuentemente se han descrito brotes nosocomiales de BLEEs es *K. pneumoniae*. Probablemente está relacionado con el hecho de que esta especie forma parte de la microbiota normal, sobrevive durante bastante tiempo sobre la piel y los fómites y acepta, con cierta facilidad, plásmidos conjugativos. Las primeras epidemias de infección hospitalaria por *K. pneumoniae* productor de BLEEs fueron descritas en Francia a finales de los ochenta (Legrand *et al.*, 1989). Desde entonces se han documentado por todo el mundo, incluida España, numerosos brotes nosocomiales causados por enterobacterias productoras de BLEEs.

Durante muchos años, por tanto, el problema predominante con relación a las BLEEs ha sido la observación de brotes epidémicos nosocomiales de infecciones por *K. pneumoniae*, especialmente en las unidades de cuidados intensivos, otras áreas hospitalarias, residencias geriátricas y orfanatos (Legrand *et al.*, 1989; Meyers *et al.*, 1993; Peña *et al.*, 2001; Weill *et al.*, 2004; Wiener *et al.*, 1999). Por otra parte, se han observado también infecciones esporádicas por *K. pneumoniae* intra o extrahospitalarias (Lautenbach *et al.*, 2001a).

Es un hecho reconocido la relación existente entre la observación

de estos brotes epidémicos y un amplio consumo de antibióticos, especialmente de cefalosporinas de tercera generación. El consumo elevado de estos antibióticos favorecería la aparición de estos clones de *K. pneumoniae* productores de BLEEs, que se diseminarían con particular facilidad en centros o unidades con factores predisponentes para la transmisión cruzada entre pacientes (Paterson y Yu, 1999).

Los brotes nosocomiales por *E. coli* y otras enterobacterias han sido, sin embargo, menos frecuentes (Paterson *et al.*, 2001b) aunque se refieren cada vez más infecciones producidas por estos microorganismos que son de carácter endémico o esporádicas, tanto nosocomiales como de aparente adquisición en la comunidad. Así, el problema se ha extendido de forma muy notable a *E. coli* y, en menor medida, a otras enterobacterias (Winokur *et al.*, 2001). Los datos de resistencia antibiótica proporcionados por el proyecto SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program), procedentes de aislamientos en pacientes hospitalizados desde 1997 hasta 1999 y englobando hospitales de Norteamérica, Latinoamérica, Europa y el sudeste asiático, han puesto de manifiesto la amplia distribución mundial de estas infecciones, aunque con grandes diferencias según las áreas geográficas (Winokur *et al.*, 2001). Como puede observarse en la figura 1 y en la tabla 4, el mayor porcentaje corresponde a América Latina, con el 45% de los aislados de *K. pneumoniae* productor de BLEEs, seguido de la región del Sudeste

asiático y de Europa, con el 25% y el 22%, respectivamente, siendo la incidencia mucho menor en Estados Unidos o Canadá, con cifras del 8% y el 5%. Teniendo en cuenta ésto, los autores plantean la posibilidad de que en estas áreas la presión selectiva ejercida por el abuso de cefalosporinas de tercera generación podría ser la explicación. Los datos que este estudio aporta sobre la presencia de BLEEs en Europa son similares a los aportados por el grupo GEIH para España.

Figura 1: Prevalencia de enterobacterias con fenotipo BLEEs en América, Europa y Asia. Estudio SENTRY. (Winokur *et al.*, 2001)

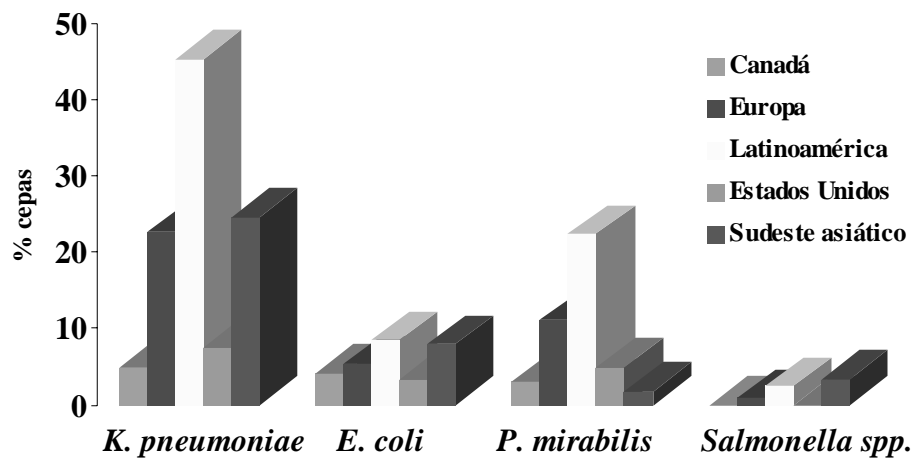


Tabla 4: Distribución de los microorganismos productores de BLEEs en las zonas del estudio SENTRY (Winokur *et al.*, 2001)

Organismo, país o región (número de aislamientos estudiados)	Número (%) de aislamientos con fenotipo BLEE			
	Todos los substratos ¹	Ceftazidima ²	Ceftriaxona ²	Aztreonam ²
<i>K. pneumoniae</i>				
Canadá (n=368)	18 (4.9)	15 (83.3)	9 (50.0)	14 (77.8)
Europa (n=946)	214 (22.6)	204 (95.3)	192 (89.7)	199 (93.0)
Latinoamérica (n=897)	407 (45.4)	397 (97.5)	385 (94.6)	371 (91.2)
Estados Unidos (n=2.017)	153 (7.6)	133 (86.9)	111 (72.5)	113 (73.9)
Sudeste asiático (n=560)	138 (24.6)	134 (97.1)	128 (92.8)	129 (93.5)
<i>E. coli</i>				
Canadá (n=1.203)	51 (4.2)	40 (78.4)	20 (39.2)	33 (64.7)
Europa (n=3.822)	202 (5.3)	160 (79.2)	125 (61.9)	154 (76.2)
Latinoamérica (n=2.026)	173 (8.5)	164 (94.8)	146 (84.4)	157 (90.8)
Estados Unidos (n=4.966)	166 (3.3)	117 (70.5)	83 (50.0)	128 (77.1)
Sudeste asiático (n=1.104)	87 (7.9)	79 (90.8)	62 (71.3)	80 (92.0)
<i>P. mirabilis</i>				
Canadá (n=97)	3 (3.1)	2 (66.7)	2 (66.7)	1 (33.3)
Europa (n=442)	49 (11.1)	42 (85.7)	34 (69.4)	23 (46.9)
Latinoamérica (n=196)	44 (22.4)	26 (59.1)	39 (88.6)	28 (63.6)
Estados Unidos (n=589)	29 (4.9)	21 (72.4)	12 (41.4)	16 (55.2)
Sudeste asiático (n=111)	2 (1.8)	1 (50.0)	1 (50.0)	1 (50.0)
<i>Salmonella spp.</i>				
Canadá (n=11)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Europa (n=128)	1 (0.8)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Latinoamérica (n=125)	3 (2.4)	3 (100.0)	2 (66.7)	2 (66.7)
Estados Unidos (n=79)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Sudeste asiático (n=88)	3 (3.4)	3 (100.0)	3 (100.0)	3 (100.0)

¹ CMI de ceftazidima, ceftriaxona o aztreonam > 2 µg/ml

² CMI > 2 µg/ml. Porcentajes calculados sobre el total de aislamientos con fenotipo BLEE detectado por cualquiera de los tres antibióticos

La primera epidemia por bacterias poseedoras de BLEEs conocida en nuestro país (1988-1990) incluyó aislamientos de *K. pneumoniae* (61%), *S. marcescens* (31%), *K. oxytoca* (5%) y *E. coli* (3%). Estos aislados también eran resistentes a aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfamidas y tetraciclinas (Fernández-Rodríguez *et al.*,

1992).

Hasta hace poco tiempo se desconocía la frecuencia de enterobacterias productoras de BLEEs en España. Por este motivo, el Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) inició un estudio prospectivo multicéntrico para conocer la prevalencia real de los dos principales patógenos productores de BLEEs, *K. pneumoniae* y *E. coli*, en diferentes áreas geográficas de nuestro país (Hernández *et al.*, 2003). En este estudio participaron 40 hospitales nacionales y los resultados quedan resumidos en la tabla 5. Se remitieron 352 aislados clínicos: 262 *E. coli*, 81 *K. pneumoniae* y 9 aislamientos de otras especies. De los 352 aislados se confirmó la producción de BLEEs en 240 (68%). De éstos, 170 (71%) se identificaron como *E. coli* y 70 (29%) como *K. pneumoniae*. Estos valores indican que el porcentaje de aislados productores de BLEEs, del total de cada especie recibidos, fue del 64,9% (170/262) en el caso de *E. coli* y del 86,4% (70/81) en el de *K. pneumoniae*. Se aislaron *E. coli* productores de BLEEs en 33 hospitales de los 40 participantes (82,5%) y *K. pneumoniae* productores de BLEEs en 17 (42,5%). En conjunto, se aislaron bacterias productoras de BLEEs de una u otra especie en el 90% de los hospitales participantes. *E. coli* productores de BLEEs supusieron el 0,5% del total de esta especie aislada en todos los centros. En el caso de *K. pneumoniae* este porcentaje

fue de 2,7%, existiendo mayor dispersión geográfica en los centros con mayores tasas de aislamientos de BLEEs que en el caso de *E. coli*.

Cabe destacar que los 4 hospitales con mayor porcentaje de *E. coli* productor de BLEEs se encuentran en la comunidad autónoma de Andalucía y destaca el elevado porcentaje detectado en el Hospital Virgen de la Candelaria de Tenerife (16,7%).

El 51% de las muestras en las que se aisló *E. coli* productor de BLEEs fueron extrahospitalarias, mientras que el 93% de las muestras de *K. pneumoniae* productor de BLEEs fueron intrahospitalarias.

En el caso de *E. coli* productor de BLEEs los datos obtenidos en este estudio indican que, en España, este microorganismo se aísla, principalmente, en muestras de orina (66%).

K. pneumoniae sigue siendo un problema principalmente nosocomial y los servicios donde se encuentran principalmente son las UCIs, tanto de adultos como pediátricas

Tabla 5: Frecuencia de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs en hospitales españoles (Hernández *et al.*, 2003)

HOSPITAL	CIUDAD	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Txagorritxu	Vitoria (Álava)	0	0
Marina Baixa	Villajoyosa (Alicante)	0,8	0
Vega Baja	Orihuela (Alicante)	0,19	2,17
Severo Ochoa	Cangas del Narcea (Asturias)	0	0
General de Asturias	Oviedo (Asturias)	0,93	0
Mérida	Mérida (Badajoz)	0,43	0
Son Dureta	Palma de Mallorca (Baleares)	0	0,8
Bellvitge	Barcelona	0,33	4,97
Clínic	Barcelona	0,68	1,75
Vall d'Hebron	Barcelona	0,26	1'42
General Yagüe	Burgos	0,22	0
Puerta del Mar	Cádiz	0	7
Marqués de Valdecilla	Santander (Cantabria)	0,36	0
La Mancha Centro	Alcázar San Juan (Ciudad Real)	0,7	0
Reina Sofía	Córdoba	2,02	1,69
Doctor Negrín	Gran Canaria	0,16	4,39
Virgen de las Nieves	Granada	2,38	0
San Cecilio	Granada	0,59	2,53
Ntra Señora de Aránzazu	San Sebastián (Guipúzcoa)	0,05	0
General Ciudad de Jaén	Jaén	1,23	11,11
Juan Canalejo	A Coruña	0,22	2,4
Arquitecto Marcide	Ferrol (A Coruña)	0,59	0
Ramón y Cajal	Madrid	1,01	1,51
Gregorio Marañón	Madrid	0,76	5,66
12 de Octubre	Madrid	ND	ND
Alcorcón	Alcorcón (Madrid)	0,1	0
Virgen del Camino	Pamplona (Navarra)	1,16	0
Navarra	Pamplona (Navarra)	0,26	3,57
Santa María Nai	Orense	ND	ND
Provincial de Pontevedra	Pontevedra	0,09	0
Xeral Cíes	Vigo (Pontevedra)	0,34	0
Clínico	Salamanca	0	0
Virgen Macarena	Sevilla	2,37	0
San Camilo	S. Pere de Ribas (Barcelona)	0,17	0
Virgen de la Candelaria	Tenerife	1	16,67
Alcañiz	Teruel	0,3	0
Parapléjicos	Toledo	0	7,32
Basurto	Bilbao-Vizcaia	0	0
Lozano Blesa	Zaragoza	0,62	0
Miguel Servet	Zaragoza	0,33	0

ND: No determinado por no disponer de los datos de aislamientos totales.

Hasta hace poco, se consideraba que los microorganismos productores de BLEEs causantes de infecciones eran un problema casi exclusivamente nosocomial, que afectaba a pacientes ingresados con enfermedades debilitantes, tratamiento antimicrobiano de amplio espectro y estancia hospitalaria prolongada, especialmente en UCI y cirugía (Coque *et al.*, 2002). Posiblemente el uso abusivo de los tratamientos con cefalosporinas orales a nivel extrahospitalario ha favorecido su aparición a nivel comunitario.

Los datos del trabajo del GEIH indican una prevalencia global en España de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs del 0,5% y el 2,7%, respectivamente, datos acordes con los de estudios multicéntricos publicados hasta ahora en países de nuestro entorno, como Francia (De Champs *et al.*, 2000) o Italia (Spanu *et al.*, 2002).

En cuanto a los datos epidemiológicos referidos a nuestro ámbito (Hospital Universitario “San Cecilio” y su área sanitaria), en un estudio reciente (Sorlózano, 2004) realizado en el servicio de Microbiología de este Hospital entre aislados de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, se determinó que la prevalencia de aislados productores de BLEEs era del 14%, 1,5% y 4,6% para cada especie, respectivamente. Así, el 10,2% de los aislados de estas tres especies identificados en dicho servicio hospitalario producían una BLEE.

Destacó el predominio de *E. coli* (92,6% de los aislados productores de BLEEs), y como origen las muestras extrahospitalarias (80%), siendo el 97,5% orinas y el 2,5% secreciones uretrales. Entre las muestras hospitalarias (20%) se redujeron los aislamientos de *E. coli* en las de orina (60%) y se incrementaron en las de secreciones de heridas (30%) y de vulva (10%). El 53,6% de las BLEEs detectadas fueron del tipo CTX-M9 (todas en *E. coli*) y el 46,4% restante fueron enzimas SHV (82,8% en *E. coli*, 13,8% en *K. pneumoniae* y 3,4% en *K. oxytoca*)

En este mismo trabajo, tras realizar estudio de clonalidad entre los aislados hospitalarios, por electroforesis en campo pulsado, no se observaron patrones compatibles con una posible diseminación clonal intrahospitalaria.

1.7.4. Asociación de resistencias a otros antibióticos

Además de su codificación plasmídica, las BLEEs forman parte, frecuentemente, de transposones o integrones, lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a cotrimoxazol, aminoglucósidos, tetraciclinas y otros antibióticos (Lautenbach *et al.*, 2001a).

Se ha observado una asociación frecuente entre la presencia de BLEEs y la resistencia a fluorquinolonas en aislados de *K. pneumoniae*, a pesar de que la codificación de la resistencia se ubica en el caso de las

BLEEs en un plásmido, y en el de las quinolonas en el cromosoma (Paterson *et al.*, 2000). Algunos estudios indican que hasta un 55% de los aislados productores de BLEEs son resistentes a fluorquinolonas.

Según Lautenbach *et al* (2001b), la resistencia a fluorquinolonas en *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs es más frecuente entre los aislados de pacientes que han recibido fluorquinolonas en los 30 días previos a la infección y también entre los pacientes procedentes de residencias. Se desprende también que la resistencia a aminoglucósidos está significativamente asociada con la resistencia a quinolonas en microorganismos productores de BLEEs, lo cual puede ser debido a que el uso de aminoglucósidos puede causar alteración de la permeabilidad de membrana y eso puede ayudar a la resistencia a fluorquinolonas.

Los estudios del GEIH en España y el estudio internacional SENTRY ofrecen cifras de resistencia asociada a otros antibióticos en aislamientos productores de BLEEs como muestran las tablas 6 y 7, respectivamente.

Tabla 6: CMI de los aislados productores de BLEEs para gentamicina, amikacina y ciprofloxacino (Hernández *et al.*, 2003)

Especie y tipo de BLEE	Gentamicina		Amikacina		Ciprofloxacino	
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>P. mirabilis</i>						
TEM	>256	>256	4	128	16	>32
<i>P. stuartii</i>						
TEM	4	64	16	64	>32	>32
<i>K. pneumoniae</i>						
TEM	1	64	2	32	≤ 0.125	>32
SHV	2	16	2	32	≤ 0.125	2
TEM y SHV	2	32	4	32	≤ 0.125	>32
no-TEM/no-SHV	4	32	1	4	≤ 0.125	4
<i>E. coli</i>						
TEM	4	>256	2	8	0.25	>32
SHV	2	16	2	32	≤ 0.125	16
<i>E. aerogenes</i>						
TEM	1	16	64	64	>32	>32
SHV	2	64	8	16	2	>32

Tabla 7: Otras resistencias en aislados productores de BLEEs (Winokur *et al*, 2001)

Organismo, país o región (aislamientos con fenotipo BLEE)	Porcentaje de resistencia en los aislados					
	Tobramicina	Gentamicina	Amikacina	Tetraciclina	TMP-SMZ	Ciprofloxacino
<i>K. pneumoniae</i>						
Canadá (n=18)	16.7	16.7	5.6	61.1	5.6	22.2
Europa (n=214)	80.8	65.0	54.2	49.5	6.4	24.3
Latinoamérica (n=407)	83.5	66.3	66.1	52.0	12.1	23.1
Estados Unidos (n=153)	54.2	49.0	11.1	44.4	17.0	34.6
Sudeste asiático (n=138)	72.5	58.7	37.7	55.1	25.4	44.2
<i>E. coli</i>						
Canadá (n=51)	13.7	15.7	5.9	45.1	5.9	13.7
Europa (n=202)	32.2	25.7	10.9	61.4	8.9	34.2
Latinoamérica (n=173)	68.8	57.8	48.0	70.5	19.7	52.6
Estados Unidos (n=166)	21.7	21.1	7.8	48.8	6.0	19.3
Sudeste asiático (n=87)	69.0	75.9	11.5	77.0	26.4	65.5
<i>P. mirabilis</i>						
Canadá (n=3)	33.3	77.7	33.3	100.0	0.0	77.7
Europa (n=49)	59.2	61.2	24.5	93.9	8.2	61.2
Latinoamérica (n=44)	84.1	90.9	47.7	97.7	18.2	79.5
Estados Unidos (n=29)	24.1	34.5	3.4	100.0	6.9	34.5
Sudeste asiático (n=2)	50.0	100.0	0.0	100.0	0.0	50.0
<i>Salmonella spp.</i>						
Canadá (n=0)	-	-	-	-	-	-
Europa (n=1)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Latinoamérica (n=3)	66.7	66.7	33.3	33.3	66.7	0.0
Estados Unidos (n=0)	-	-	-	-	-	-
Sudeste asiático (n=3)	33.3	33.3	0.0	100.0	66.7	66.7

1.7.5. Tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de BLEEs

Los carbapenémicos son los únicos antibióticos betalactámicos que presentan actividad frente a la totalidad de cepas productoras de BLEEs. A pesar de ello, se ha descrito, recientemente, el aislamiento de una cepa de *E. coli* productora de una enzima CTX-M2, que presenta un alto nivel de resistencia frente a ertapenem por pérdida de porinas, con la

consiguiente incapacidad de este antibiótico para penetrar al interior de la célula bacteriana (Lartigue *et al.*, 2007). Además, la terapia con carbapenémicos no está exenta de complicaciones, ya que puede estar asociada con una mayor selección de cepas resistentes a esta familia de antibióticos, en especies de *Pseudomonas* spp. o en *A. baumannii* y/o con superinfección por otros patógenos intrínsecamente resistentes como *S. maltophilia* (Rupp y Fey, 2003).

Otros betalactámicos que pueden presentar actividad *in vitro* frente a estos aislados son las cefamicinas y las cefalosporinas de cuarta generación. Sin embargo, se ha descrito fracaso terapéutico cuando se han usado cualquiera de ellas, de ahí que su uso no se recomiende (Paterson *et al.*, 2001a).

A pesar de que se ha recomendado el tratamiento con betalactámicos más inhibidores de betalactamasas (Samaha-Kfoury y Araj, 2003), se ha observado que la actividad *in vitro* frente al microorganismo productor de BLEEs no se correlaciona con su actividad *in vivo* (Paterson *et al.*, 2004). Únicamente se debería considerar el tratamiento con estas combinaciones de antibióticos en infecciones con inóculos pequeños de microorganismos y/o en localizaciones en las que estos agentes alcanzaran concentraciones elevadas, como es el caso de las infecciones urinarias no complicadas. No obstante, esto implica la necesidad de la información por parte del laboratorio de microbiología

acerca de la concentración inhibitoria mínima para la BLEE aislada, así como de un conocimiento exhaustivo de las relaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas de este grupo de antibióticos.

Los aminoglucósidos pueden presentar una actividad limitada frente a la mayoría de cepas productoras de BLEEs, siendo gentamicina el menos activo dentro de esta familia (Stürenburg y Mack, 2003). La explicación radica en que, con frecuencia, estas cepas contienen plásmidos que codifican adicionalmente resistencia a los aminoglucósidos.

Las quinolonas también pueden presentar una actividad limitada frente a los microorganismos productores de BLEEs. Aunque la resistencia a esta familia de antibióticos se codifica en el cromosoma, se ha observado una asociación frecuente entre la producción de BLEEs y la presencia de resistencia a estos antibióticos (Tolun *et al.*, 2004).

Recientemente se ha aprobado la comercialización de un nuevo antibiótico, tigeciclina, que presenta actividad frente a BLEEs (Sorlózano *et al.*, 2006b). En estos momentos se están desarrollando péptidos sintéticos con la esperanza de que en el futuro puedan ocupar el lugar de otros antibióticos que han perdido actividad en el tratamiento de infecciones por microorganismos gramnegativos, incluyendo las cepas productoras de BLEEs (Ferrández *et al.*, 2005).

1.8. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD

1.8.1. Proteínas de membrana externa

La pared celular de las bacterias gramnegativas está constituida por una capa delgada de peptidoglucano rodeada por una bicapa lipídica asimétrica que forma la membrana externa. Entre esta membrana y la membrana interna o citoplasmática se encuentra el espacio periplásmico, donde se localizan la mureina y proteínas como las betalactamasas y polisacáridos aniónicos. La membrana citoplasmática actúa de barrera para la penetración de moléculas hidrófilas al citoplasma.

La membrana externa posee dos láminas lipídicas, una interna formada por fosfolípidos y otra externa que contiene el lipopolisacárido (LPS), de ahí la asimetría anteriormente referida. El LPS, por su composición de ácidos grasos saturados, contribuye a dificultar la difusión a través de esta membrana.

La estructura de la membrana externa constituye una barrera para la difusión de muchos compuestos nocivos para la bacteria (antibióticos y enzimas líticas, entre otros compuestos), pero también dificulta la penetración de nutrientes y eliminación de detritos. Para obviar esta situación, posee unos poros, de naturaleza proteica, que permiten el paso de compuestos hidrófilos.

Aproximadamente la mitad de la membrana externa está compuesta por proteínas, de las que cada especie posee entre 50 y 100

tipos diferentes. De estas proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins*, OMP), solo unas pocas (menos de 5 a 10 tipos) tienen un número de copias en torno a 100.000 por bacteria, por lo que se denominan OMPs principales. Estas OMPs principales incluyen varios tipos funcionales de proteínas, que son lipoproteínas, que contribuyen a la estabilidad de la membrana externa, y las proteínas formadoras de poros hidrófilos, entre las que distinguimos las que forman poros inespecíficos (porinas), y los poros específicos (como OprD2 en *P. aeruginosa*, LamB en *E. coli*, entre otras), que facilitan la difusión de determinados compuestos, como la maltosa (Nikaido, 2003)

En 10 familias de bacterias gramnegativas, se han identificado y caracterizado más de 40 porinas en más de 32 especies bacterianas. A parte, se han descrito también en mitocondrias, cloroplastos y micobacterias (Schulz, 1993). Se ha observado que su estructura es muy similar en todas ellas, incluso entre bacterias taxonómicamente diferentes. Las porinas son unas proteínas ácidas con pI (punto isoeléctrico) cercano a 5, dispuestas en laminas β , con una parte hidrófoba (en contacto con el interior de la membrana externa), y otra hidrófila que forma unos canales acuosos de difusión, permitiendo la entrada de solutos hidrofílicos. El interior del canal de la porina contiene aminoácidos cargados, cuyo número y posición determina la selectividad de los iones que lo atraviesan. Pueden ser selectivos de cationes o

aniones. Esta selectividad refleja la mayor o menor facilidad de penetración de los antibióticos cargados. Las porinas suelen presentarse en forma de trímeros y el tamaño del monómero suele oscilar entre 30 y 50 KDa. Están asociadas por enlaces hidrófobos al LPS y al peptidoglicano y son muy estables, resistiendo la disociación por calor y detergentes como el dodecilsulfato sódico (Hancock, 1987). El control de la producción de estas proteínas está estrechamente regulado por las condiciones ambientales. Así, en medios de elevada osmolaridad, como son los medios ricos en sales biliares, predominarán aquellas porinas de estrecha luz de poro, que impiden el paso de solutos al interior celular, mientras que en medios no hostiles predominaran las porinas de mayor diámetro de luz de poro (Martínez-Martínez *et al.*, 1996).

En *E. coli* se han estudiado múltiples OMPs (OmpA, OmpF, OmpC, LamB, PhoE, NmpC, OmpL, OmpG), de las que solamente se consideran OmpF, OmpC y PhoE como porinas clásicas, por ser las primeras en ser descritas y la ausencia de especificidad por sustrato (Nikaido, 2003). Estas porinas presentan preferencia por la carga y tamaño de los solutos, así, OmpF y OmpC presentan preferencia por solutos catiónicos, mientras que PhoE presenta preferencia por los solutos aniónicos. Por otra parte, OmpF permite la penetración de solutos ligeramente más grandes que OmpC (Nikaido, 2003).

En otras especies de enterobacterias se han descrito múltiples tipos de OMPs, muchas de ellas similares a las de *E. coli*, que, en principio, podrían ser las mismas porinas, como es el caso de las porinas OmpK35 y OmpK36 de *K. pneumoniae*, que se corresponden con OmpF y OmpC de *E. coli* respectivamente (Hernández-Allés *et al.*, 1999).

También se han identificado las porinas en especies como *N. gonorrhoeae*, *Aeromonas salmonicida*, *Brucella* spp., *Chlamydia trachomatis*, *Rhodopseudomonas capsulata*, *P. aeruginosa* (Nikaido, 1985). En *P. aeruginosa*, la principal OMP es una porina denominada OprF, muy diferente a las clásicas porinas triméricas. Es una porina definida como lenta, ya que resulta poco eficaz, y, en la mayoría de los casos, impide la difusión de moléculas a su través. Sin embargo, la OprD2 de *P. aeruginosa* es la proteína más importante desde el punto de vista de resistencia antibiótica (su pérdida confiere resistencia a imipenem), y funciona como un poro específico, permitiendo el paso de aminoácidos dibásicos (Trias y Nikaido, 1990).

1.8.2. Papel de las porinas en la permeabilidad de la membrana externa

En la mayoría de los trabajos sobre permeabilidad de membrana externa se ha asumido el papel de las OMPs como porinas, tras su estudio mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, pero, en pocas

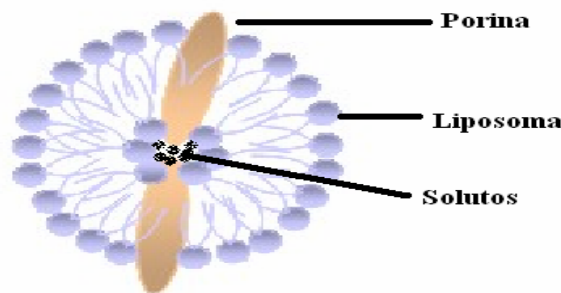
ocasiones, se obtienen preparaciones purificadas de OMPs que permitan estudiar verdaderamente sus propiedades funcionales y demostrar que la OMP perdida es realmente una porina.

Las porinas se pueden aislar por diferentes métodos, para posteriormente ser estudiadas más a fondo. Nurminen (1978) describió un método de aislamiento de porinas, basado en la resistencia de éstas a la tripsina. Posteriormente, Nikaido y Rosenberg (1983) utilizaron un nuevo método de purificación de porinas que se basó en la asociación no covalente de éstas al peptidoglicano. Martínez-Martínez *et al* (1996), combinaron ambos métodos para identificar las porinas de cuatro aislamientos de *K. pneumoniae* productor de BLEEs. Se comprobó como el material asociado al peptidoglucano, y resistente a la acción de la tripsina, al separarlo por cromatografía y someterlo a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posterior tinción con Azul de Coomassie, contenía una sola OMP de 35 KDa, correspondiente a OmpK35. Para confirmar que la porina había quedado aislada observó, mediante electroforesis SDS-PAGE teñida con plata, que no contenía restos de LPS, por lo que se pudo demostrar la naturaleza proteica de estas OMPs.

Una vez lograda la purificación de las OMPs, el ensayo más utilizado para conocer la permeabilidad de la porina, es el de “hinchazón del liposoma”. Consiste en preparar proteoliposomas que contengan la

porina purificada y que en su interior contengan solutos a los que la porina es impermeable (figura 2). Cuando estos liposomas se introducen en una solución isotónica de un soluto (azúcares, iones, antibióticos, etc) permeable para la porina, la penetración del mismo, arrastrando agua, produce la hinchazón de los liposomas, que conduce a una modificación del índice de refracción de la suspensión en la que se encuentra, que puede ser medida por espectrofotometría.

Figura 2: Proteoliposoma conteniendo soluto impermeable a la porina (modificada de Merino, 2005).



Otra forma de demostrar el papel de las OMPs como porinas, es mediante estudios de clonaje, como el realizado por Martínez-Martínez *et al* (1996), el cual confirmó el papel de la OMP como porina, clonando el gen codificador en una cepa de *K. pneumoniae* sin porinas y comprobando que la expresión de ésta hacia que la bacteria, inicialmente resistente a cefalosporinas, se transformara en sensible.

Otro ejemplo, con *E. coli*, es el trabajo de Van der Ley (1987), en el que estudiaron la relación entre estructura y actividad de OmpC y PhoE en *E. coli K12* mediante la síntesis de genes híbridos *phoE-ompC*.

1.8.3. Resistencia a antibióticos por alteraciones de la membrana externa

La penetración de los antibióticos a través de las porinas depende, en gran medida, de sus propiedades físico-químicas, y, en particular, de la hidrofobicidad, del tamaño y de la carga eléctrica neta. El proceso no requiere energía y su velocidad es directamente proporcional a la concentración de antimicrobiano en el medio extrabacteriano (Nikaido, 2003).

Desde un punto de vista teórico, y considerando datos experimentales, es fácil asumir que, antibióticos de pequeño volumen (betalactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol y fluorquinolonas) utilizan mayoritariamente las porinas para su penetración en el interior celular, al menos en la familia *Enterobacteriaceae*, que posee porinas de gran permeabilidad. Por el contrario, antibióticos de gran volumen, de naturaleza lipófila, como rifamicinas, macrólidos, novobiocina y ácido fusídico, tienen dificultades para atravesar por el canal de las porinas, y por lo tanto, la difusión a través de la bicapa lipídica no llega a ser

significativa (Nikaido, 2003). Los betalactámicos menos hidrófobos, como son las cefalosporinas, penetran mejor a través de las porinas.

El tamaño del antibiótico y de la porina es un factor importante en la difusión a través de estos canales proteicos. El efecto negativo del tamaño es mayor en las porinas de menor diámetro: se ha comprobado experimentalmente que, ceftazidima, cefoperazona y ceftriaxona, que difunden bien a través de OmpF, lo hacen peor a través de OmpC, ya que ésta tiene menor diámetro (Nikaido, 2003).

La penetración también depende de la carga eléctrica de la molécula. Las cargas aniónicas inhiben el paso de las cefalosporinas, y este efecto es aún mayor al considerar las células completas. En cambio, moléculas pequeñas zwitteriónicas como ampicilina, y, especialmente imipenem, penetran fácilmente.

Existen otras vías de difusión a través de la membrana externa. El LPS de la membrana externa permite la penetración de los antibióticos que tienen cierto grado de lipofilia (por ejemplo, algunas quinolonas, tetraciclinas, etc.), penetrando solamente la fracción no cargada. Cuando se producen alteraciones del LPS, como la disrupción producida por aminoglucósidos o polimixina, la resistencia disminuye, pero hay pocos casos en los que la alteración del LPS está directamente relacionada con la resistencia a antibióticos (Martínez-Martínez *et al.*, 1996).

Otra posibilidad de difusión es la penetración por autopromoción. Los policationes como la polimixina 13, interaccionan con los puentes de unión entre moléculas contiguas de LPS mediado por cationes divalentes (Nikaido, 2003), de modo que los desplazan de forma competitiva rompiendo la disposición fisiológica del LPS e incrementando la permeabilidad de gran número de moléculas, incluida la de ellos mismos.

Se ha propuesto que los aminoglucósidos difunden a través de la membrana en *P. aeruginosa* mediante alteración del LPS (autopromoción), de un modo similar a como lo hace la polimixina (Hancock *et al.*, 1981).

1.8.4. Porinas y resistencia antibiótica

Se ha sugerido que la disminución en el número o tamaño de las proteínas de la membrana externa de las bacterias produce una disminución de la permeabilidad celular dando lugar a resistencia a diversos grupos antibióticos, por ello la evaluación de la permeabilidad de las OMPs es indispensable para estudiar la eficacia de los antibióticos betalactámicos (Novelli, 1995). No obstante hay que considerar que un microorganismo nunca pierde completamente todas sus porinas, lo que no permitiría su viabilidad, y que la existencia de un número bajo de copias de porina podría aún permitir la penetración suficiente de antibiótico para actuar sobre su diana.

Existen numerosos ejemplos de incremento de resistencia como consecuencia de la pérdida de porinas, como para ser descritos de forma exhaustiva. Uno es el incremento de resistencia a betalactámicos de *E. coli* como consecuencia de mutaciones en el gen *ompF* por el empleo abusivo de estos antibióticos (Harder *et al.*, 1981)

En *P. aeruginosa*, a pesar de poseer porinas de grandes dimensiones, estos poros están abiertos en pequeña proporción (Nikaido, 2003), siendo ésta la razón predominante de la alta resistencia intrínseca que exhibe dicha especie frente a antibióticos betalactámicos (Nicas y Hancock, 1983).

La membrana externa de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *P. cepacia* es del orden de diez a cien veces menos permeable a azúcares y antibióticos que la membrana externa de *E. coli* (Nikaido, 2003). Sato y Nakae (1991) realizaron un estudio en el que se determinó el coeficiente de permeabilidad a las cefalosporinas zwitteriónicas (cefalexina, cefaclor, cefazolina, etc.) en la membrana externa, en la cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 19606, observando que es de 2 a 7 veces menor que el coeficiente de permeabilidad del mismo antibiótico para *P. aeruginosa*, deduciendo que la membrana externa de *Acinetobacter* spp. es, incluso, menos permeable que la de *Pseudomonas* spp. Observaron que esta cepa posee dos OMPs minoritarias (*minor*), una de ellas de 45 KDa, que aparecen en una cantidad menor del 5% del total de sus

proteínas de membrana externa. Mediante el estudio del “hinchazón del liposoma” identificaron estas OMPs como porinas y observaron que el porcentaje de difusión de carbapenémicos y cefalosporinas zwitteriónicas hacia el liposoma que contiene la OMP es de 1-3%, si se compara con la membrana externa de *E. coli*. Estudiaron el tamaño del poro mediante la difusión de diversos azúcares hacia dicho liposoma, observando que esta difusión es de un 10% respecto a OmpF de *E. coli*. Con estos resultados confirmaron su hipótesis de que la baja permeabilidad de *Acinetobacter* spp. a los antibióticos era debida a que poseen unas porinas de pequeño diámetro, producidas en una cantidad minoritaria, estando ambos fenómenos relacionados (Sato y Nakae, 1991).

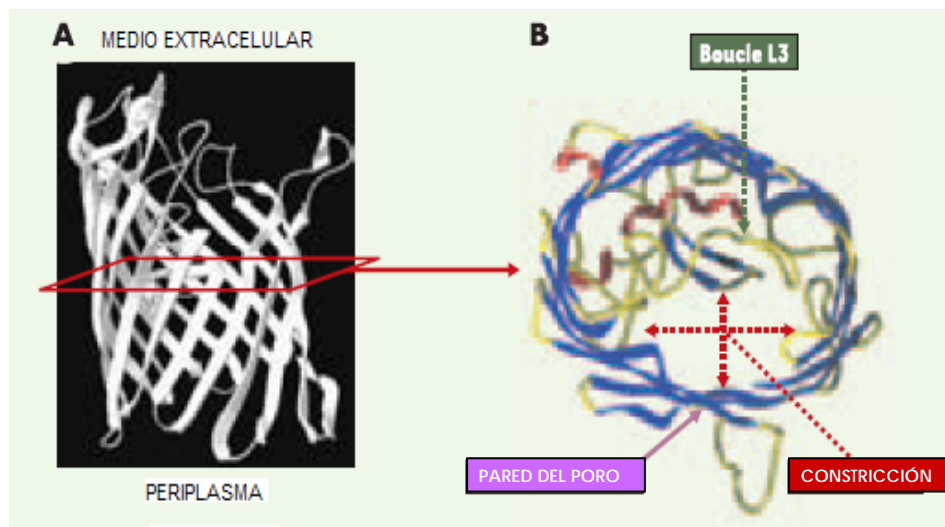
Obara y Nakae (1991), de nuevo, hablan de una disminución de la permeabilidad de la membrana externa hacia solutos hidrofílicos relacionada con la presencia de un bajo número de porinas de tamaño pequeño. Seleccionaron aislamientos mutantes resistentes a cefoxitina, cefoperazona y ceflazidima y compararon las porinas de éstos con las de las cepas nativas, comprobando que existía una disminución de las porinas de 46,5 KDa en todos los mutantes.

1.8.5. Modificación estructural de la porina y resistencia antibiótica

Como se ha indicado anteriormente, la resistencia por pérdida de porinas limita la viabilidad de la bacteria en su hábitat, ya que reduce la

incorporación de sustratos necesarios para su supervivencia. Con objeto de solventar este problema, algunas bacterias han desarrollado otro método que no las compromete tanto, como es el caso de cepas mutantes de *Enterobacter aerogenes* resistentes a antibióticos por modificación de la estructura de la porina. En concreto, por mutaciones que conducen a una reducción de tamaño o redistribución de cargas en la luz del poro, por sustituciones de aminoácidos en el bucle-L3 (Gly→Asp), dando lugar a una limitación en la entrada de compuestos aniónicos (figura 3) (Mallea *et al.*, 1998).

Figura 3: Estructura terciaria de OmpF: A, vista longitudinal; B, vista cenital de la región de constricción del canal (modificado de Pagés, 2004)



Se sabe que, en *E. coli*, sustituciones en la luz del poro (G119D y G119E) introduciendo una cadena ácida, se disminuye la sensibilidad a cefepima y colicina. Por otra parte, la sustitución en R132A y R132D, cambiando una zona de cargas positivas, mejora la penetración de

cefepima, sin afectar a la colicina. Se ha propuesto que la sustitución G119E provoca un enlace de hidrógeno que dividiría el poro en dos, mientras que las dos sustituciones R132 ensanchan el poro (Simonet *et al.*, 2000).

Por otra parte, se ha logrado aumentar la sensibilidad a ciertos betalactámicos mediante modificación de los residuos cargados negativamente situados en el bucle-L3 (D113, E117, y D121) de la porina OmpF de *E. coli* (D113→D113a; D121→D121a). La sustitución en D113 aumenta la sensibilidad a ampicilina, cefoxitina y ceftazidima (Vidal *et al.*, 2005).

Por último, es interesante mencionar la existencia de un residuo de Tyr en el bucle-L3 de OmpK37 de *K. pneumoniae* que reduce el tamaño del canal, impidiendo la entrada de antibióticos (Domenech-Sánchez *et al.*, 1999).

1.8.6. Expresión de porinas y resistencia antibiótica

Una cuestión importante, que es necesario tener en cuenta, es la capacidad de regulación que permite disminuir la presencia de las porinas en la membrana externa de las bacterias gramnegativas.

La capacidad de regulación rápida se ha demostrado en *E. aerogenes* aislada de un paciente en tratamiento con imipenem. Se observó que la administración de este antibiótico producía la

desaparición de la porina de la superficie bacteriana y se observó que tras el cese del tratamiento la bacteria se transformó en sensible a expensas de volver a expresar las porinas en superficie (Bornet *et al.*, 2000).

En varias bacterias, la desaparición de las porinas se debe a la intervención del operon *mar*, el cual a través del pequeño ADN antisentido *micF*, desestabiliza el ARNm de la porina (Aleskun y Levy, 1999; Delihis y Frost, 2001).

Otra forma de regulación, que puede afectar a la resistencia, es el sistema de osmorregulación, que regula la expresión de OmpF-OmpC en *E. coli*, a través los componentes *ompR-envZ* (Pratt *et al.*, 1996).

Por otra parte, la expresión de la proteína OmpX disminuye la síntesis de las porinas en *E. aerogenes*, *E. cloacae* y *K. pneumoniae*. Otros procesos que también se han asociado a la disminución de la expresión de porinas son las cascadas de regulación genética (mediante *soxS*, *ramA*, IHF).

Junto a los posibles mecanismos genéticos de regulación existen otros factores estructurales que pueden afectar a la expresión de porinas, como son, el ensamblaje al LPS, el transporte y la inserción en la membrana externa, así como las chaperonas, que intervienen en el plegamiento proteico. Factores externos (pH, osmolaridad, fuente de carbono, concentración de O₂) en el lugar de la colonización o crecimiento, pueden también producir la desaparición de las porinas y

aumentar la resistencia a ciertos antibióticos (Pagés, 2004). Este hecho es importante tenerlo en cuenta a la hora de seleccionar el medio de cultivo donde se realizará el antibiograma, ya que, en función de la osmolaridad del medio, y dependiendo del antibiótico y de la cepa a testar, podemos obtener un valor de CMI.

1.8.7. Poliaminas y resistencia

Las poliaminas son moléculas sintetizadas por la bacteria en condiciones particulares (tensión, fase estacionaria de crecimiento). Estos pequeños compuestos llevan grupos amino que pueden interaccionar con aminoácidos localizados en el canal de la porina. Distintos trabajos han demostrado la capacidad de la espermina y la espermidina de bloquear la difusión de solutos y la cefaloridina (cefalosporina de 1ª generación) a través de las porinas de *E. coli* (De la Vega y Delcour, 1996; Samartzidou y Delcour, 1999). La espermina limita de forma muy importante la penetración de cefepima y norfloxacino en *Enterobacter cloacae* (Chevalier *et al.*, 2000).

1.8.8. Asociación de impermeabilidad y mecanismos de inactivación o eliminación

La disminución de la permeabilidad de la membrana externa no tiene por que producir, necesariamente, un aumento de la CMI, si el

antibiótico no está inactivado y/o eliminado por otros mecanismos. El efecto de la disminución de la permeabilidad se incrementa por la presencia de un mecanismo enzimático efectivo, como es la producción de betalactamasas, uno de los mecanismos de complementación de la impermeabilidad de la membrana externa que mejor se ha estudiado (Reguera *et al.*, 1991).

Que un antibiótico llegue con éxito a la diana, se calcula mediante el índice de acceso a la diana (*target access index*, TAI). Este índice refleja el balance entre la barrera de permeabilidad y la producción de betalactamasas (por ejemplo), es directamente proporcional al coeficiente de permeabilidad de la droga, e inversamente proporcional al porcentaje de inactivación del antibiótico en el periplasma. A su vez se relaciona con la CMI de la siguiente forma:

$$CMI = C_{inh} (TAI^{-1} + 1)$$

Donde C_{inh} es una constante de cada antibiótico para cualquier especie, que indica la concentración de droga necesaria para inhibir la diana (Nikaido y Normark, 1987).

Por lo tanto, no se pueden obtener conclusiones respecto a que la disminución de OMPs sea la causa de una elevación en la CMI, sólo por constatar que los mutantes deficientes de porinas elevan este valor, ya que puede ocurrir que tales mutantes no aumenten la CMI hasta el punto

en el que sea detectado como resistencia; para ello habría que analizar cada caso de forma cuantitativa, utilizando el TAI (Nikaido, 1989).

Las betalactamasas hidrolizan al betalactámico que llega al periplasma impidiendo que alcance concentraciones suficientes para inhibir de forma efectiva las PBPs. Este mecanismo explicaría que con frecuencia, las cepas deficientes en porinas sean más resistentes a los betalactámicos que a otros grupos de antibióticos.

La resistencia de *E. cloacae* y *P. aeruginosa* a carbapenémicos o el incremento de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *K pneumoniae* productor de BLEEs con frecuencia se debe a este doble mecanismo (Lee *et al.*, 1991; Trías y Nikaido, 1990).

En el caso de *Acinetobacter* spp., Joly-Guillou y Bergogne-Berezin (1987) intentaron explicar la multirresistencia en cepas betalactamasa negativas, como una alteración de las OMPs. Al mismo tiempo, la actividad betalactamasa que presentaba la mayoría de las cepas estudiadas no era suficiente para explicar el alto grado de resistencia a betalactámicos de amplio espectro, por lo que consideraron que este último mecanismo podría ser el principal factor que contribuye a la resistencia a betalactámicos. Finalmente, este mismo autor consideró que la resistencia intrínseca de *Acinetobacter* spp. a los betalactámicos se podría interpretar como una asociación entre la producción constitutiva

de betalactamasas y una disminución de la permeabilidad de la membrana externa.

En el caso de *E. coli*, existen trabajos similares que abordan simultáneamente el problema de las BLEEs y las porinas. En el de Ananthan y Subha (2005), encuentran que las cepas que expresan la porina OmpF son sensibles a cefoxitina, mientras que las resistentes dejan de expresarla. Otros estudios han relacionado un aumento de la CMI de amoxicilina-clavulánico como consecuencia de la asociación entre la expresión de betalactamasas y el déficit de porinas (Reguera *et al.*, 1991).

Por otra parte, trabajos recientes han asociado la resistencia a carbapenémicos con la producción de betalactamasas y pérdida de porinas simultáneamente. Esta relación de resistencia y disminución de la permeabilidad se ha puesto de manifiesto en trabajos como el desarrollado por Poirel *et al* (2004) sobre cuatro aislados clínicos de *E. coli* en el cual se relaciona la resistencia a imipenem y cefalosporinas de amplio espectro con la producción de la cefalosporinasa CMY-2 y la pérdida de OmpC y OmpF. Finalmente, en otros trabajos también se ha relacionado la resistencia de *E. coli* a carbapenémicos con la hiperproducción de AmpC y pérdida de porinas (Low *et al.*, 2001; Nordmann y Poirel, 2002; Odeh *et al.*, 2002; Stapleton *et al.*, 1999), o

con la producción de una enzima hidrolizante de carbapenémicos KPC-3
(Hong *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

La aparición de las betalactamasas de espectro extendido ha sido uno de los principales problemas de resistencia a los antibióticos betalactámicos durante las dos últimas décadas.

La codificación plasmídica de este tipo de resistencia otorga a estas enzimas algunas características importantes, como la asociación de resistencia a otros grupos de antibióticos, por lo que nos encontramos con microorganismos multirresistentes. Por tanto, las betalactamasas de espectro extendido constituyen un problema sanitario de gran trascendencia clínica, ya que las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por microorganismos productores de estas enzimas son muy limitadas.

Por otro lado, en *Escherichia coli* se ha relacionado la pérdida de porinas con resistencia a diversos grupos de antibióticos. No obstante, el efecto de la disminución de la permeabilidad se podría incrementar por la presencia, en el mismo aislado, de otros mecanismos de resistencia. En este sentido, sería interesante abordar, simultáneamente, los efectos que sobre la CMI ejercerían la producción de betalactamasas de espectro extendido y la disminución de la expresión de porinas.

Además, factores dependientes de la composición del medio de cultivo podrían regular la expresión de porinas en estos aislados, al mismo tiempo que modular la actividad de los antibióticos.

2. Objetivos

Por todo lo anteriormente expuesto, nos hemos planteado los siguientes objetivos en nuestro trabajo:

1. Determinar, en aislados clínicos de la especie *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido, la actividad que mostraron diferentes antibióticos, relacionando dicha actividad con el tipo de betalactamasa presente y los procedimientos de laboratorio para el estudio de la sensibilidad *in vitro*.
2. Determinar, en estos mismos aislados, los patrones de expresión de porinas tras cultivo en dos medios diferentes y relacionarlos con la actividad de los diversos antibióticos evaluada, también, en ambos medios.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SELECCIÓN DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

El presente estudio se realizó en 115 aislados clínicos de *E. coli* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), obtenidos a partir de muestras clínicas procesadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario “San Cecilio” de Granada, y que forman parte de un estudio más amplio que se está realizando sobre aislamientos clínicos de esta especie, productores de BLEEs; algunos de cuyos resultados han sido previamente publicados.

De entre los resultados previos de dicho estudio, cabe destacar los siguientes:

1. Elevada presencia, en nuestro medio (Hospital “San Cecilio” y su área sanitaria de referencia, cifrada en 485.000 habitantes), de aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs, con una prevalencia del 14% en esta especie (Sorlózano *et al.*, 2004a) y el 10,2% si consideramos, además, las especies *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. Estos datos son reflejo de la actual tendencia ascendente de las cifras descritas en diversas publicaciones nacionales e internacionales.
2. Presencia de BLEEs de los tipos CTX-M9 y SHV, con un predominio importante de la primera (Sorlózano *et al.*, 2004b). Esta distribución es coincidente con estudios realizados en otros centros hospitalarios del país, en los que se ha descrito un aumento de la presencia de enzimas del grupo CTX-M.

3. La mayor parte de los aislados se obtuvieron a partir de muestras de origen extrahospitalario (77,4%), con un predominio de la orina (86,1%) y de enfermos del género femenino (Sorlózano *et al.*, 2006a).
4. Los estudios de clonalidad de los aislados hospitalarios de *E. coli* pusieron de manifiesto la ausencia de una distribución clonal, incluso entre aislados productores de la misma BLEE y procedentes del mismo servicio hospitalario (Sorlózano *et al.*, 2006a).

Por tanto, los 115 aislados de *E. coli* productores de BLEEs, pertenecientes al estudio actual, habían sido previamente caracterizados mediante procedimientos bioquímicos y moleculares (isoelectroenfoque, reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis en gel por campo pulsado o PFGE) con la finalidad de detectar la betalactamasa presente (Sorlózano, 2004). En la tabla 8 aparece la identificación de los 115 aislados clínicos, con el tipo de betalactamasa que producen. Sesenta y siete aislados fueron productores de BLEEs del tipo CTX-M9 y 48 del tipo SHV. Todos ellos, posteriormente, fueron conservados a -20°C hasta la realización de los procedimientos que forman parte del presente estudio.

3. Material y métodos

Tabla 8: Caracterización molecular de los 115 aislados del estudio

Aislado	BLEE	Aislado	BLEE	Aislado	BLEE	Aislado	BLEE	Aislado	BLEE
1	CTX-M9	124	CTX-M9	177	CTX-M9	214	SHV	253	CTX-M9
16	SHV	132	CTX-M9	178	SHV	217	SHV	254	CTX-M9
25	CTX-M9	134	SHV	179	SHV	218	SHV	255	SHV
26	CTX-M9	135	CTX-M9	180	SHV	219	SHV	258	CTX-M9
27	CTX-M9	136	CTX-M9	181	SHV	220	SHV	260	CTX-M9
41	CTX-M9	137	CTX-M9	183	SHV	221	CTX-M9	261	SHV
42	CTX-M9	138	CTX-M9	185	CTX-M9	224	SHV	265	SHV
46	SHV	139	CTX-M9	186	CTX-M9	226	SHV	266	SHV
47	CTX-M9	140	CTX-M9	187	CTX-M9	227	SHV	267	SHV
51	CTX-M9	141	CTX-M9	189	SHV	228	SHV	268	SHV
54	SHV	145	CTX-M9	190	SHV	229	SHV	269	SHV
56	CTX-M9	149	CTX-M9	191	CTX-M9	230	CTX-M9	270	CTX-M9
58	CTX-M9	150	SHV	192	CTX-M9	231	SHV	272	SHV
62	SHV	151	CTX-M9	193	CTX-M9	232	CTX-M9	273	CTX-M9
63	CTX-M9	153	CTX-M9	195	CTX-M9	233	CTX-M9	274	CTX-M9
65	CTX-M9	159	CTX-M9	196	SHV	235	CTX-M9	276	SHV
101	SHV	161	CTX-M9	198	CTX-M9	237	CTX-M9	277	SHV
102	SHV	162	SHV	200	CTX-M9	240	CTX-M9	280	SHV
112	CTX-M9	163	CTX-M9	204	CTX-M9	242	SHV	282	SHV
115	CTX-M9	165	CTX-M9	207	CTX-M9	245	CTX-M9	284	SHV
118	SHV	169	CTX-M9	208	SHV	246	CTX-M9	285	SHV
121	SHV	170	CTX-M9	210	CTX-M9	248	CTX-M9	288	SHV
122	CTX-M9	171	CTX-M9	211	CTX-M9	249	SHV	290	CTX-M9

3.2. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD

A los 115 aislados de *E. coli* se les realizó un ensayo de sensibilidad a diversos antibióticos de uso habitual frente a microorganismos gramnegativos de tipo enterobacteria, mediante un procedimiento estandarizado de microdilución. Posteriormente, se evaluó, en los mismos, la actividad de tigeciclina mediante un método de difusión con discos y otro de Epsilon-test.

3.2.1. Método de microdilución

Los procedimientos de dilución son los métodos de referencia para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de un antibiótico respecto de un aislado bacteriano. En función de los valores de CMI obtenidos por estos métodos podemos conocer la actividad de un antibiótico sobre un microorganismo, y las categorías clínicas (sensible, intermedio o resistente) de un microorganismo respecto a un determinado antibiótico.

Dichos procedimientos se basan en la determinación del crecimiento de un microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antibiótico, que se encuentra diluido en un medio de cultivo (caldo o agar).

En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antibiótico en progresión geométrica en base 2, utilizando un medio de cultivo adecuado. Posteriormente, dicho medio se inocula con el microorganismo en cuestión, y tras la correspondiente incubación, para permitir el crecimiento del mismo, se realiza la lectura.

La CMI se define como la menor concentración de antibiótico que, a simple vista, inhibe completamente el crecimiento del microorganismo estudiado.

Como se ha comentado, la determinación de la actividad antibiótica mediante técnicas de dilución se realiza utilizando una escala

discontinua (habitualmente concentraciones crecientes en base 2), por lo que, los valores de CMI reales de un determinado antibiótico, se encontrarán en algún valor situado entre la CMI experimentalmente obtenida y la concentración inmediatamente inferior. Desde el punto de vista clínico, la diferencia entre los valores real y experimental de CMI no suelen ser trascendentes.

Los antibióticos a usar en las técnicas de dilución deben obtenerse de los correspondientes fabricantes. Para los estudios *in vitro* no es adecuado utilizar las preparaciones de uso clínico, sino que deben emplearse sustancias valoradas de las que se conozcan la potencia (mg de sustancia pura por cada mg de sustancia valorada), la fecha de caducidad y el lote de preparación. Las sustancias valoradas deben conservarse siguiendo estrictamente las indicaciones del proveedor, por lo general, en frigorífico o en congelador.

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda, para la mayoría de los microorganismos, utilizar, como medio de cultivo, caldo Mueller-Hinton (MH), al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. El medio debe tener un pH de 7,2 a 7,4 y estar ajustado en las concentraciones de iones calcio (20-25 mg/l) y magnesio (10-12,5 mg/l). Esta cantidad de iones divalentes asegura la reproducibilidad de los valores de CMI de aminoglucósidos y de tetraciclinas frente a la gran

mayoría de microorganismos, al compararlos con los que se obtienen con agar MH (Picazo, 2000).

En nuestro caso, para el estudio de sensibilidad de los 115 aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs, se realizó un procedimiento de microdilución en caldo MH ensayando los siguientes antibióticos: amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefoxitina, ceftazidima, cefepima, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino, levofloxacino (Sigma-Aldrich, España), meropenem (AztraZeneca Farmacéutica, España), imipenem y ertapenem (MSD, España).

Cada antibiótico fue disuelto en suero fisiológico, obteniéndose una dilución de almacenamiento que se conservó a -80° y se fue usando, sucesivamente, en los distintos ensayos.

Para obtener estas diluciones de almacenamiento se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- La pureza de la sustancia activa suministrada por el fabricante:
 - Amoxicilina: 88,5%.
 - Clavulánico: 100%.
 - Piperacilina: 100%.
 - Tazobactam: 100%.
 - Cefoxitina: 98,1%.
 - Ceftazidima: 99,4%.

- Cefepima: 100%.
 - Tobramicina: 67,1%.
 - Amikacina: 71,7%.
 - Ciprofloxacino: 100%.
 - Levofloxacino: 99,7%.
 - Meropenem: 100%.
 - Imipenem: 50%.
 - Ertapenem: 95,6%.
- La menor dilución a ensayar para cada antibiótico, ya que, la dilución de almacenamiento, debe estar cuatro veces más concentrada que la menor de las diluciones.
 - El volumen mínimo de antibiótico en almacenamiento para realizar todos los ensayos, sin tener que reconstituir más antibiótico, para, de esta forma, mejorar la reproducibilidad del método. Se calculó multiplicando el volumen de antibiótico que se usó para cada ensayo (50 µl) por el número total de aislados a ensayar (115), es decir, un volumen mínimo de 5,75 ml.

Para establecer las diluciones a ensayar con cada antibiótico, se tuvieron en cuenta los puntos de corte que definen las categorías clínicas de sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) según el CLSI (CLSI, 2005) para *E. coli* y cada uno de los antibióticos (tabla 9).

Tabla 9: Puntos de corte (en µg/ml) para los antibióticos ensayados en *E. coli*

Antibiótico	Categoría clínica		
	R	I	S
Amoxicilina-clavulánico	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Piperacilina-tazobactam	≥ 128/4	32/4 – 64/4	≤ 16/4
Cefoxitina	≥ 32	16	≤ 8
Ceftazidima	≥ 32	16	≤ 8
Cefepima	≥ 32	16	≤ 8
Tobramicina	≥ 16	8	≤ 4
Amikacina	≥ 64	32	≤ 16
Ciprofloxacino	≥ 4	2	≤ 1
Levofloxacino	≥ 8	4	≤ 2
Meropenem	≥ 16	8	≤ 4
Imipenem	≥ 16	8	≤ 4
Ertapenem	≥ 8	4	≤ 2

R: Resistente, I: Intermedio, S: Sensible

Para todos los antibióticos se estableció un rango de 11 diluciones, un control positivo (sin antibiótico) y un control negativo de crecimiento (sin microorganismo), y así, las diluciones ensayadas fueron las que se muestran en la tabla 10.

3. Material y métodos

Tabla 10: Rango de diluciones ensayadas para los diferentes antibióticos

Número del pocillo										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Amoxicilina-clavulánico										
R			I			S				
128/64	64/32	32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5	0,5/0,25	0,25/0,125	0,125/0,06
Piperacilina-tazobactam										
R			I		S					
256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	0,5/4	0,25/4
Cefoxitina										
R			I		S					
256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Ceftazidima										
R			I		S					
256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Cefepima										
R			I		S					
256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Imipenem										
I		S								
8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	0,008
Ertapenem										
R		I			S					
8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	0,008
Meropenem										
I		S								
8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	0,008
Tobramicina										
R			I		S					
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Amikacina										
R			I		S					
256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Ciprofloxacino										
R			I		S					
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Levofloxacino										
R			I		S					
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125

R: Punto de corte para resistente, I: Punto de corte para intermedio, S: Punto de corte para sensible

Para la realización del método de microdilución se sembraron los microorganismos en placas de agar sangre durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente, y tras comprobar la pureza del aislado, se resuspendieron

3. Material y métodos

varias colonias en suero fisiológico, hasta obtener una turbidez coincidente con el patrón 0,5 de MacFarland (10^5 - 10^6 UFC/ml).

Para cada microorganismo ensayado se preparó un tubo que contenía 8 ml de caldo MH (Becton Dickinson, E.E.U.U.) (volumen resultante de multiplicar el número de antibióticos a ensayar [12], por el número de diluciones de cada antibiótico más el control negativo [12], y por los 50 μ l de microorganismo en suspensión que se dispensan en cada pocillo, con un ligero exceso de caldo de cultivo).

A continuación se realizó una dilución al 1/100 del microorganismo suspendido en el suero fisiológico, en el caldo MH. Para ello se tomaron 80 μ l de la suspensión al 0,5 de McFarland y se añadieron en los 8 ml del tubo con caldo MH.

Se preparó una placa de microtitulación con fondo en “U”. En cada fila se realizaron las 11 diluciones para cada antibiótico y el pocillo número 12 se usó como control negativo. Así, para cada aislado, el número total de filas necesarias fue de 12 (una por cada antibiótico ensayado).

En cada pocillo de la placa se dispensaron, inicialmente, 50 μ l de caldo MH. Posteriormente, en el primer pocillo de cada fila, se dispensaron 50 μ l del antibiótico (concentración en almacenamiento). Se pipetearon 50 μ l del pocillo 1 y se dispensaron en el pocillo 2. Se mezcló bien con la pipeta, se recogieron 50 μ l del pocillo 2 y se dispensaron en

3. Material y métodos

el pocillo 3, y así, sucesivamente, hasta llegar al pocillo número 12, del cual se desecharon 50 μ l. De esta forma, se diluyó el antibiótico en los sucesivos pocillos, obteniendo, en cada uno de ellos, una dilución que fue la mitad de la del pocillo anterior (diluciones crecientes en base 2).

Una vez realizada la dilución del antibiótico se dispensaron 50 μ l de caldo MH, con el microorganismo suspendido, en los pocillos del 1 al 11. En el pocillo 12 se dispensaron 50 μ l de caldo MH sin microorganismo, constituyendo este pocillo el control negativo. De esta forma, en cada pocillo, el volumen final obtenido fue de 100 μ l, y la dilución final, la esperada, según la tabla 10.

Como control positivo se utilizó el volumen restante de caldo MH sembrado con el microorganismo.

Una vez inoculadas las placas, se incubaron a 37°C durante 24 horas, apiladas en torres de 5 placas y cubiertas con papel film, tiempo tras el cual se realizó la lectura, determinándose el valor de la CMI de cada antibiótico para cada uno de los 115 aislados.

Se comprobó que había crecimiento bacteriano en el control positivo y que no lo había en el control negativo.

Se usaron, en todos los ensayos, las cepas de referencia aconsejadas por el CLSI (CLSI, 2005): *Escherichia coli* ATCC 25922, control para procedimientos de sensibilidad antibiótica en bacterias

gramnegativas; y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, control para dichos procedimientos en enterobacterias productoras de BLEEs.

3.2.2. Estudio de sensibilidad a tigeciclina

3.2.2.1. Método de difusión con disco

Este procedimiento consiste en colocar discos de papel de filtro, conteniendo una cantidad conocida de antibiótico, en la superficie de una placa de medio de cultivo previamente inoculada con el microorganismo problema. Habitualmente, los discos tienen 6 mm de diámetro y se pueden colocar tantos como antibióticos se quieran estudiar, respetando siempre un número de discos por placa que permita leer los halos de inhibición sin que interfieran unos con otros. Cuando el disco entra en contacto con el medio de cultivo, absorbe agua de éste e inmediatamente el antibiótico comienza a difundir de forma radial, formando un gradiente de concentración inversamente proporcional a la distancia hasta el borde del disco. En aquellas zonas donde la concentración alcance un valor suficiente, el microorganismo, previamente inoculado, no podrá crecer, y tras un periodo de incubación adecuado aparecerá un halo de inhibición de crecimiento alrededor de los discos. El diámetro del halo de inhibición se relaciona con el grado de sensibilidad del microorganismo al correspondiente antibiótico.

Este método no permite establecer la CMI, al menos de forma directa. El CLSI ha establecido los puntos de corte en milímetros de los halos de inhibición de los antibióticos habitualmente usados en clínica, que permiten establecer las categorías clínicas de sensible, intermedio y resistente.

Las ventajas del método de difusión con discos son su sencillez, flexibilidad y bajo coste, razones que han asegurado su permanencia durante años en los laboratorios. Si el método se estandariza correctamente, su fiabilidad es muy elevada. Por otra parte, los halos de inhibición se pueden medir con menos de 0,5 mm de error y con ± 2 mm de reproducibilidad.

En el actual estudio se realizó la difusión en placas de agar MH (bioMérieux, Francia) inoculadas con una suspensión bacteriana ajustada al patrón 0,5 de McFarland. Sobre ellas, y para cada uno de los 115 aislados bacterianos, se colocó un disco impregnado con 15 μ g de tigeciclina (Becton Dickinson) y se incubó a 37°C, realizándose la lectura transcurridas 24 horas.

3.2.2.2. Prueba de Epsilon (E-test)

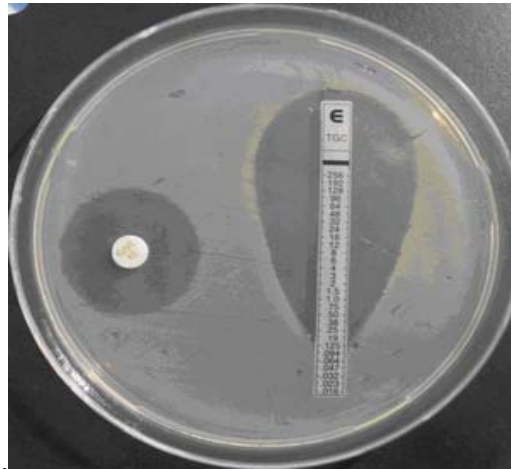
Se basa en el mismo fundamento de la difusión con disco pero, en este caso, se utilizan tiras de plástico no poroso de 5 cm de largo y 5 mm de ancho, en lugar de discos. La tira contiene un gradiente de

concentración del antibiótico y una de las superficies de la tira tiene marcadas las distintas concentraciones del gradiente. Tras aplicar la tira a una placa previamente inoculada, e incubar ésta adecuadamente, la intersección de la elipse de crecimiento del microorganismo con la tira permite una determinación directa de la CMI. Diversos estudios han demostrado que, para la mayoría de los microorganismos de interés clínico, los valores de CMI obtenidos con este método son similares (en ± 1 dilución) a los que se obtienen con los métodos convencionales de dilución (Baker *et al.*, 1991).

En las mismas placas en las que se realizó la prueba de la difusión con disco, y, por tanto, en paralelo para los 115 aislados, se realizó el E-test (figura 4). Para ello, se colocó con ayuda de unas pinzas, a una distancia razonable para evitar interferencias, una tira impregnada con tigeciclina (IZASA S.A., España), cuya concentración osciló entre 256 $\mu\text{g/ml}$ y 0,016 $\mu\text{g/ml}$.

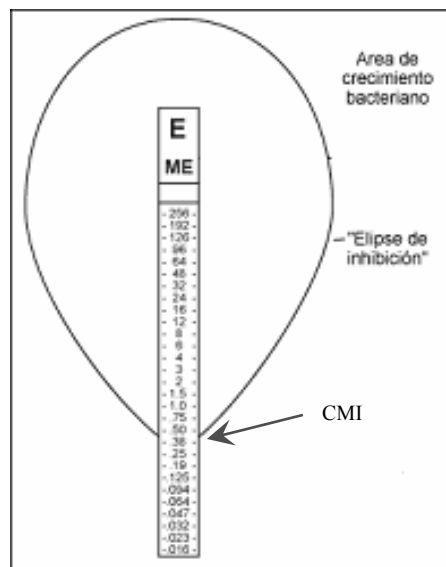
Los puntos de corte para definir la sensibilidad a tigeciclina en *Enterobacteriaceae* por este procedimiento, según la Food and Drug Administration (FDA) son: Sensible ($\leq 2 \mu\text{g/ml}$), Intermedio (4 $\mu\text{g/ml}$) y Resistente ($\geq 8 \mu\text{g/ml}$) (Wyeth Pharmaceuticals, 2006).

Figura 4: Procedimiento de difusión con disco y E-test



La CMI fue interpretada como el punto de intersección de la elipse de inhibición del crecimiento con el borde de la tira, como muestra la figura 5.

Figura 5: Interpretación de la prueba de Epsilon



3.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PORINAS DE LA MEMBRANA EXTERNA

3.3.1. Selección de los aislados

Para realizar el estudio de la expresión de porinas de la membrana externa, se seleccionaron 50 de los 115 aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs. Está descrito que, en aislados de miembros de la Familia *Enterobacteriaceae* productores de BLEEs, la resistencia a cefoxitina puede ser debida, entre otros mecanismos, a la deficiencia de porinas (Pangon *et al.*, 1989). Por esta razón se seleccionaron todos aquellos aislados que presentaron algún grado de resistencia a cefoxitina, y se completó hasta 50 con el resto de aislados necesarios (sensibles a cefoxitina), seleccionados aleatoriamente.

3.3.2. Estudio de sensibilidad en medio Nutrient-Broth

Antes de determinar la expresión de porinas, y puesto que este procedimiento, como veremos, se realizó tras cultivo de los aislados en dos medios diferentes, Nutrient-Broth (NB) y Mueller-Hinton (MH), se realizó un procedimiento previo de microdilución en NB con la finalidad de determinar la sensibilidad antibiótica de los 50 aislados, en este medio.

La finalidad de este procedimiento fue comparar la sensibilidad, *in vitro*, de los aislados, en dos medios diferentes, los mismos en los que

se determinaría, posteriormente, la expresión de porinas, y así poder establecer si, los posibles cambios en la expresión de porinas entre ambos medios se relacionan, o no, con cambios en la CMI.

Para ello se siguieron las directrices propias de cualquier procedimiento de microdilución, con los mismos antibióticos utilizados previamente en MH (apartado 3.2.1.), y los mismos rangos (tabla 10). Se determinó el valor de CMI teórico de cada antibiótico en medio NB, para cada uno de los 50 aislados seleccionados.

Dicho estudio de sensibilidad no incluyó la determinación de la categoría clínica (S, I, o R), puesto que el medio NB no es un medio estandarizado para realizar estudios de sensibilidad *in vitro*.

3.3.3. Determinación de la expresión de porinas

Con objeto de separar e identificar las porinas inespecíficas de membrana externa, OmpC y OmpF, se procedió a la separación de la membrana externa e interna, con la posterior extracción de las porinas de la membrana externa, y separación de estas últimas mediante electroforesis.

3.3.3.1. Extracción de porinas de la membrana externa

La separación de las membranas externa e interna se puede realizar por dos procedimientos: la ultracentrifugación en gradiente o la solubilización diferencial.

El primero se basa en la diferente composición de ambas membranas. La membrana externa está constituida por fosfolípidos, lipopolisacáridos y proteínas, y se puede separar, por ultracentrifugación en gradiente de la membrana interna, constituida solamente por fosfolípidos y proteínas.

La solubilización diferencial se basa en que, como consecuencia de la diferente composición de la membrana externa e interna, éstas podrán solubilizarse con diferentes detergentes bajo condiciones diferentes. Éste es el método que hemos adoptado, dada su mayor simplicidad.

El dodecil-sulfato-sódico (SDS), el sarcosil y otros detergentes, en condiciones apropiadas, pueden solubilizar todas las proteínas de la membrana con excepción de las porinas, las cuales podrán recogerse mediante centrifugación, formando un “pellet”.

Para la realización de la técnica se sembraron los aislados, por separado, y en paralelo, en 5 ml de caldo NB (Becton Dickinson) y en 5 ml de caldo MH, a 37 °C durante 18-24 horas, en agitación (200 rpm). A

continuación se recogieron las bacterias mediante centrifugación (4.000 rpm, 4°C, 15 minutos).

A partir de aquí, todos los procedimientos se realizaron en paralelo, para cada aislado, sembrando en los dos medios de cultivo, ya que ha sido descrito previamente (Doménech-Sánchez y Benedí, 2000) que en los medios con baja osmolaridad (Nutrient-Broth) se incrementa la expresión de OmpF y disminuye la de OmpC; mientras, que, sin embargo, en los medios de elevada osmolaridad (Mueller-Hinton), el proceso ocurre al contrario, disminuye la expresión de OmpF.

El pellet bacteriano se resuspendió en 200 µl de Tris-HCl 10 mM y se agitó en vórtex.

La rotura celular necesaria para la obtención de las envueltas se realizó mediante el uso de un sonicador de pistilo para pequeñas muestras (UP 200s Ultraschallprozessor, Dr. Hielscher GmbH, Alemania). La sonicación se realizó sometiendo cada suspensión bacteriana a dos ciclos, uno de 1 minuto (0,5 segundos de sonicación, 60 pulsos, con una amplitud del 100%), y otro de 30 segundos (0,5 segundos de sonicación, 30 pulsos, 100% de amplitud) con intervalos de tiempo de descanso entre ciclos de, al menos, 1 minuto, manteniendo siempre el botón celular en hielo para evitar la desnaturalización proteica.

3. Material y métodos

Las suspensiones, una vez sonicadas, se centrifugaron a $3.000 \times g$, a 4°C , durante 10 minutos, para eliminar las células que no se hubieran roto, repitiendo la sonicación si el pellet era demasiado grande.

A continuación se recogió el sobrenadante (constituido por las membranas externa e interna y por el contenido citoplasmático), con precaución de no arrastrar nada de pellet, y se transfirió a otro tubo eppendorf. Se realizó una ultracentrifugación a 13.000 rpm, a 4°C , durante 45 minutos, para recoger las membranas celulares, descartando el sobrenadante (contenido citoplasmático y otros residuos).

El pellet, constituido por las membranas externa e interna, se resuspendió en 500 μl de sarcosil al 2% (Sigma-Aldrich) disuelto en Tris-HCl 10 mM y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. De esta forma se solubilizó la membrana interna.

Seguidamente, se procedió a una nueva ultracentrifugación en las mismas condiciones (13.000 rpm, 4°C , 45 minutos), con el objetivo de recoger la membrana externa, insoluble en sarcosil, desechando el sobrenadante, que contiene las membranas internas.

El pellet así obtenido se lavó con 10-15 μl de Tris-HCl (10 mM, pH 6,8) y se resuspendió finalmente en 10 μl del mismo Tris-HCl, conservándolo a 4°C hasta su comprobación, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, usando el método SDS-PAGE.

3.3.3.2. Separación de porinas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

El método empleado para la separación y determinación del perfil de expresión de porinas fue la electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil-sulfato-sódico al 0,1% (SDS-PAGE).

Para la realización del gel separador o “*separating gel*” (apéndice) se utilizaron concentraciones de acrilamida (12%), bisacrilamida (0,4%) y urea (6M). Tras la separación electroforética, las proteínas se identificaron mediante tinción con azul de Coomassie (Bio-Rad, E.E.U.U.).

La separación de las diferentes porinas de *E. coli* por electroforesis no es sencilla, ya que los pesos moleculares de OmpC y OmpF (38,284 kDa y 37,061 kDa, respectivamente) son muy similares, lo que dificulta su resolución. Para facilitar la identificación diferencial de ambas porinas se empleó urea en el gel de poliacrilamida. Las porinas OmpC y OmpF de *E. coli* migran de forma diferente en geles que contienen urea (mayor osmolaridad) respecto a los que no la tienen (menor osmolaridad): en geles con urea, OmpC migra más lentamente que OmpF debido a su mayor peso molecular (Hernández-Allés *et al.*, 1999).

Para la elaboración de los geles se utilizaron los “*casting stand*” (Bio-Rad) con espaciadores de 0,75 mm de espesor, que permitieron

obtener 2 geles de 6 x 8 cm. El llenado de la solución de acrilamida se realizó con la ayuda de una pipeta pasteur. A continuación, sobre la solución de acrilamida, se dispensó una mezcla saturada de isobutanol en agua sobre la superficie de cada gel, con objeto de eliminar las posibles burbujas y linealizar el gel. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 20 minutos y se eliminó la mezcla agua/isobutanol lavando con agua destilada y posterior secado con papel de filtro (Whatman, España), eliminando los posibles restos de agua. A continuación se añadió la solución de acrilamida menos concentrada "*stacking gel*" (apéndice) intercalando los peines entre los cristales para modelar 10 pocillos. Se dejó polimerizar la solución 25 minutos a temperatura ambiente, y se retiraron los peines. Por último, se lavaron los pocillos con la solución de tampón de migración "*running buffer*" (apéndice), se colocaron los geles en la cubeta de electroforesis y se vertieron 300 ml de "*running buffer*" en la cubeta.

Una vez preparados los geles se cargaron los pocillos con 5-10 μ l de muestra, constituida por una mezcla, a partes iguales, del producto resultante de la extracción y tampón de carga con β -mercaptoetanol (SDS loading *Buffer* 2X, apéndice), la cual se llevó a ebullición previa durante 4 minutos a 95°C y se dejó enfriar antes de adicionar a los pocillos.

3. Material y métodos

En cada uno de los ensayos, uno de los pocillos se cargó con la muestra extraída de la cepa de referencia *E. coli* K12 (JF568) (Foulds y Chai, 1978), y el resto se cargó con las de las cepas problema.

Una vez cargados los pocillos, los geles se sometieron a electroforesis durante 1 hora y 15 minutos. Para ello se utilizó una cubeta electroforética (Mini Protean 3 Cell, Bio-Rad) con una fuente de alimentación (Power Pac 3000, Bio-Rad) con una diferencia de potencial constante de 200 V (figura 6).

Figura 6: Preparación de geles y cámara de electroforesis



Tras la separación electroforética se procedió al revelado con la solución de tinte o "*staining solution*" (apéndice) durante 20 minutos, y a continuación se procedió a la decoloración con una solución de

decoloración o "*destaining solution*" (apéndice), hasta que se obtuvo un gel completamente transparente.

Para la conservación de los resultados obtenidos, los geles se escanearon situándolos entre láminas transparentes de papel de acetato.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.4.1. Relación entre la sensibilidad antibiótica de los 115 aislados productores de BLEEs y el tipo de enzima presente

Se utilizó la prueba exacta de Fisher para tablas $r \times s$ para comparar entre sí la distribución de CMIs y categorías clínicas de cada antibiótico, entre los dos grupos de aislados productores de BLEEs (CTX-M9 y SHV). Se consideró hipótesis alternativa (H_1) la presencia de diferencia entre los grupos, comparados en cuanto a las dos variables, e hipótesis nula (H_0) la ausencia de diferencia.

3.4.2. Relación entre expresión de porinas, medio de cultivo y sensibilidad antibiótica

3.4.2.1. En medio NB

Hammel *et al* (2006) demostraron que, el análisis con datos censurados, es el adecuado cuando queremos realizar un análisis estadístico con los valores de CMI (la CMI es la concentración mínima que inhibe el crecimiento bacteriano; a la concentración inmediatamente

inferior, ya no existe tal inhibición), puesto que, el clásico, da lugar a tasas de error mayores a las deseadas.

Por esa razón, con objeto de estudiar si existían diferencias en los valores de CMI de cada antibiótico, entre las cepas que expresaban distinto tipo de porinas en medio NB, se llevó a cabo un análisis de regresión con datos censurados por intervalos (Long y Freese, 2006).

3.4.2.2. En medio MH

Para medir la asociación entre la sensibilidad de los aislados (en función de la categoría clínica, y considerando a los aislados sensibles o con algún grado de resistencia) y el perfil de expresión de porinas en MH, se aplicó, a cada una de las tablas de contingencia, el prueba exacta de Fisher para tablas 2 x 2.

Por otro lado, con objeto de estudiar si existían diferencias en los valores de CMI de cada antibiótico, entre las cepas que expresaban distinto tipo de porinas en medio MH, se llevó a cabo, también, en este caso, un análisis de regresión con datos censurados por intervalos.

3.4.2.3. Interacción entre el tipo de porinas y el medio de cultivo sobre el valor de CMI

El valor de CMI es un tipo de dato particular. Es un valor que está truncado por los lados, es decir, realmente no se conoce el valor exacto de CMI, sino que el valor exacto está entre dos valores. El análisis que se empleó en este caso fue la generalización del método tobit (Long, 1997) en forma de modelo de regresión para datos truncados por ambos lados en puntos variables, pero conocidos.

En la situación de datos apareados, en la que cada aislado posee un valor de CMI para cada medio de cultivo, se consideraron siempre dos factores, el número de porinas expresadas en cada uno de los medios (NB y MH) y si tal número de porinas coincidía en ambos medios, o no.

Se realizó, en primer lugar, un test de interacción entre el tipo de porinas expresadas y el medio. Si este test dio significativo se pasó a realizar las comparaciones por parejas entre cada uno de los grupos de número de porinas y cada uno de los medios, penalizando por Bonferroni. Si, por el contrario, el test de la interacción no dio significativo, se pasó a comparar las medias marginales del número de porinas por un lado y de los medios por otro.

En todos los casos se hizo un estudio exhaustivo de los residuos de los modelos ajustados buscando dos cosas: detectar desviaciones de la normalidad de tales residuos (recuérdese que se estaban empleando

generalizaciones de los modelos tobit, que son casos particulares de modelos probit en los que subyace la normalidad de la variable de base), llegándose a aplicar el test de normalidad de Shapiro-Wilks a tales residuos, y la detección de valores extremos o influyentes que ajustaran un modelo desviado. En ningún caso rechazamos la normalidad de los residuos y tampoco encontramos valores lo suficientemente extremos (residuo estandarizado, mayor, en valor absoluto, de 3,5) como para que tuviéramos que plantearnos el rechazo de la observación o la comparación entre un modelo ajustado con ella y otro sin ella.

En una primera fase se empleó el programa SPSS 14.1, y en el caso de los modelos para datos doblemente censurados se empleó el paquete STATA 9.2. y, dentro de él, los programas INTREG e XTINTREG, con las opciones posteriores de análisis de residuos.

En todos los análisis estadísticos se declaró un contraste significativo cuando el nivel de significación del mismo fue inferior a 0,05, y se habló de indicios de significación cuando el nivel de significación estuvo entre 0,10 y 0,05, debido a que es muy posible encontrar significación al aumentar el tamaño de muestra.

APÉNDICE

Soluciones de almacenamiento

1. Tris-HCl 1,5 M, pH 8,3

Conservar a temperatura ambiente

2. SDS 10% (Sigma-Aldrich)

3. Acrilamida 30% / bisacrilamida 0,8%, ratio 37,5:1 (Bio-Rad)

Conservar a 4°C

4. Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8

Conservar a temperatura ambiente

5. 0,1% N,N',N,N'-tetrametil etilendiamina (Sigma-Aldrich)

6. 10% persulfato amónico (Bio-Rad)

Preparación extemporánea

Gel de electroforesis

- "Separating gel" constituido por:

- ✓ 2,5 ml de la solución 1

- ✓ 0,1 ml de la solución 2

- ✓ 4 ml de la solución 3

- ✓ 3,6 g de Urea (Sigma-Aldrich) para obtener una concentración 6 M

La urea se disolvió en la solución 1 con calor y agitación y posteriormente se adicionó agua destilada hasta conseguir 10 ml de dilución

- ✓ 5 µl de la solución 5
- ✓ 50 µl de la solución 6
- "Stacking gel": constituido por:
 - ✓ 2,5 ml de la solución 1
 - ✓ 0,1 ml de la solución 2
 - ✓ 1,3 ml de la solución 4
 - ✓ 6,1 ml de agua destilada
 - ✓ 10 µl de la solución 5
 - ✓ 50 µl de la solución 6

Tampón de electroforesis ("running buffer 5X")

Compuesto por:

- ✓ Tris Base 9 g (0,125 M)
- ✓ Glicina 43,2 g (0,96 M) (Bio-Rad)
- ✓ SDS 3 g (0,5%)
- ✓ Agua destilada c.s.p. 600 ml

Tampón de carga de la muestra ("SDS loading Buffer 2X")

Compuesto por:

- ✓ Tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8
- ✓ SDS 0,4% 2,13 ml
- ✓ SDS 1 g

- ✓ Glicerol 5 ml (Panreac)
- ✓ β -mercaptoetanol 2,56 ml (Sigma-Aldrich)
- ✓ Trazas de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich)

Conservar a -20°C

Soluciones de revelado

- "*Staining solution*" (solución de teñido):
 - ✓ Azul de Coomassie brilliant R-250 2,5 g (0,25%) (Bio-Rad)
 - ✓ Metanol 500 ml
 - ✓ Ácido acético glacial 100 ml
 - ✓ Agua destilada c.s.p. 1 l

Conservar a temperatura ambiente y protegido de la luz

- "*Destaining solution*" (solución de decoloración):
 - ✓ Ácido acético glacial (10%) 100 ml
 - ✓ Metanol 150 ml
 - ✓ Agua destilada c.s.p. 1 l

Conservar a temperatura ambiente y protegido de la luz

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORES DE BLEEs

4.1.1. Actividad de los diferentes antibióticos ensayados

En la tabla 11 aparece la relación completa de los aislados estudiados, con los valores de CMI y categorías clínicas, según el CLSI, obtenidos para cada uno de los antibióticos ensayados por microdilución, en MH.

En la tabla 12 se muestra, para tigeciclina, la relación completa de aislados, con el valor del diámetro de inhibición de crecimiento, según el método de difusión con disco, y los valores de CMI y categorías clínicas según la prueba Epsilon.

En la tabla 13 se representan los rangos de las CMIs detectadas, los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀, y el porcentaje de sensibilidad de los 115 aislados clínicos, para cada uno de los antibióticos ensayados. De la misma forma, en las tablas 14 y 15 aparecen descritos estos mismos valores en los 67 aislados productores de enzimas CTX-M9 y los 48 productores de enzimas SHV, respectivamente. Cabe destacar que, imipenem, meropenem, ertapenem, amikacina y tigeciclina fueron los cinco antibióticos activos frente el 100% de los aislados, y que, de entre todos estos, meropenem presentó los valores más bajos de CMI₅₀ y CMI₉₀ entre los aislados productores de ambos tipos de enzimas.

4. Resultados

Tabla 11: Valor de CMI y categoría clínica, según el CLSI, para cada uno de los antibióticos ensayados, en los 115 aislados de *E. coli* productores de BLEEs

Aislado	CMI AMC	CC AMC	CMI PTZ	CC PTZ	CMI FOX	CC FOX	CMI CAZ	CC CAZ
1	8/4	S	1/4	S	16	I	1	S
16	8/4	S	4/4	S	8	S	32	R
25	4/2	S	2/4	S	2	S	0,5	S
26	32/16	R	2/4	S	8	S	1	S
27	8/4	S	2/4	S	4	S	≤ 0,25	S
41	8/4	S	1/4	S	4	S	2	S
42	8/4	S	1/4	S	4	S	0,5	S
46	16/8	I	4/4	S	16	I	32	R
47	8/4	S	4/4	S	16	I	1	S
51	4/2	S	1/4	S	4	S	1	S
54	16/8	I	4/4	S	4	S	8	S
56	8/4	S	1/4	S	2	S	0,5	S
58	4/2	S	0,5/4	S	2	S	0,5	S
62	32/16	R	32/4	I	32	R	≤ 0,25	S
63	4/2	S	2/4	S	2	S	1	S
65	8/4	S	2/4	S	16	I	2	S
101	8/4	S	64/4	I	4	S	> 256	R
102	16/8	I	2/4	S	4	S	> 256	R
112	8/4	S	≤ 0,25/4	S	2	S	1	S
115	32/16	R	32/4	I	16	I	0,5	S
118	8/4	S	0,5/4	S	8	S	64	S
121	8/4	S	1/4	S	2	S	64	S
122	4/2	S	1/4	S	8	S	≤ 0,25	S
124	8/4	S	1/4	S	8	S	≤ 0,25	S
132	4/2	S	1/4	S	8	S	0,5	S
134	2/1	S	≤ 0,25/4	S	1	S	8	S
135	8/4	S	0,5/4	S	2	S	16	I
136	8/4	S	0,5/4	S	4	S	1	S
137	8/4	S	1/4	S	4	S	1	S
138	32/16	R	8/4	S	8	S	0,5	S
139	32/16	R	128/4	R	4	S	1	S
140	8/4	S	4/4	S	4	S	0,5	S
141	8/4	S	0,5/4	S	8	S	0,5	S
145	8/4	S	≤ 0,25/4	S	4	S	2	S
149	8/4	S	1/4	S	2	S	4	S
150	2/1	S	1/4	S	2	S	16	I
151	4/2	S	0,5/4	S	8	S	1	S
153	16/8	I	1/4	S	8	S	8	S
159	8/4	S	2/4	S	8	S	0,5	S
161	8/4	S	1/4	S	4	S	2	S
162	8/4	S	0,5/4	S	4	S	128	R
163	8/4	S	0,5/4	S	2	S	4	S
165	8/4	S	1/4	S	4	S	2	S
169	16/8	I	2/4	S	4	S	2	S

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica
 AMC: Amoxicilina-clavulánico; PTZ: Piperacilina-tazobactam; FOX: Cefoxitina; CAZ: Ceftazidima

Tabla 11 (continuación)

Aislado	CMI AMC	CC AMC	CMI PTZ	CC PTZ	CMI FOX	CC FOX	CMI CAZ	CC CAZ
170	16/8	I	4/4	S	8	S	16	I
171	8/4	S	4/4	S	4	S	1	S
177	8/4	S	1/4	S	4	S	2	S
178	8/4	S	2/4	S	2	S	32	R
179	4/2	S	16/4	S	8	S	> 256	R
180	4/2	S	2/4	S	2	S	32	R
181	8/4	S	≤ 0,25/4	S	2	S	32	R
183	8/4	S	8/4	S	8	S	64	R
185	8/4	S	2/4	S	16	I	16	I
186	4/2	S	1/4	S	1	S	0,5	S
187	4/2	S	1/4	S	4	S	1	S
189	32/16	R	8/4	S	32	R	32	R
190	4/2	S	2/4	S	4	S	4	S
191	8/4	S	2/4	S	8	S	1	S
192	16/8	I	4/4	S	8	S	2	S
193	8/4	S	1/4	S	2	S	0,5	S
195	8/4	S	2/4	S	4	S	0,5	S
196	8/4	S	1/4	S	2	S	32	R
198	32/16	R	2/4	S	8	S	4	S
200	8/4	S	1/4	S	8	S	2	S
204	8/4	S	2/4	S	4	S	1	S
207	8/4	S	≤ 0,25/4	S	4	S	1	S
208	4/2	S	1/4	S	4	S	64	R
210	8/4	S	1/4	S	2	S	1	S
211	8/4	S	1/4	S	4	S	≤ 0,25	S
214	2/1	S	2/4	S	8	S	128	R
217	4/2	S	0,5/4	S	8	S	64	R
218	32/16	R	2/4	S	8	S	256	R
219	32/16	R	1/4	S	4	S	128	R
220	2/1	S	0,5/4	S	4	S	8	S
221	8/4	S	0,5/4	S	8	S	1	S
224	32/16	R	8/4	S	8	S	8	S
226	8/4	S	2/4	S	4	S	64	R
227	8/4	S	4/4	S	4	S	128	R
228	4/2	S	1/4	S	1	S	16	I
229	8/4	S	4/4	S	2	S	16	I
230	8/4	S	2/4	S	0,5	S	≤ 0,25	S
231	4/2	S	1/4	S	2	S	32	R
232	32/16	R	64/4	I	8	S	1	S
233	4/2	S	4/4	S	4	S	1	S
235	8/4	S	8/4	S	8	S	1	S
237	8/4	S	16/4	S	32	R	8	S
240	4/2	S	8/4	S	4	S	≤ 0,25	S
242	8/4	S	0,5/4	S	4	S	4	S
245	4/2	S	8/4	S	4	S	4	S

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica
 AMC: Amoxicilina-clavulánico; PTZ: Piperacilina-tazobactam; FOX: Cefoxitina; CAZ: Ceftazidima

Tabla 11 (continuación)

Aislado	CMI AMC	CC AMC	CMI PTZ	CC PTZ	CMI FOX	CC FOX	CMI CAZ	CC CAZ
246	4/2	S	4/4	S	2	S	≤ 0,25	S
248	8/4	S	8/4	S	1	S	2	S
249	16/8	I	2/4	S	2	S	16	I
253	2/1	S	2/4	S	1	S	2	S
254	4/2	S	1/4	S	2	S	≤ 0,25	S
255	4/2	S	1/4	S	16	I	32	R
258	8/4	S	1/4	S	4	S	4	S
260	8/4	S	1/4	S	2	S	≤ 0,25	S
261	32/16	R	16/4	S	8	S	64	R
265	4/2	S	0,5/4	S	8	S	64	R
266	4/2	S	2/4	S	4	S	32	R
267	4/2	S	8/4	S	2	S	32	R
268	8/4	S	0,5/4	S	4	S	128	R
269	8/4	S	8/4	S	8	S	2	S
270	8/4	S	4/4	S	8	S	1	S
272	32/16	R	8/4	S	4	S	32	R
273	8/4	S	2/4	S	8	S	2	S
274	8/4	S	2/4	S	8	S	1	S
276	8/4	S	1/4	S	2	S	2	S
277	4/2	S	1/4	S	4	S	32	R
280	4/2	S	1/4	S	4	S	64	R
282	4/2	S	1/4	S	4	S	2	S
284	4/2	S	16/4	S	4	S	0,5	S
285	4/2	S	0,5/4	S	2	S	≤ 0,25	S
288	4/2	S	2/4	S	2	S	32	R
290	4/2	S	2/4	S	4	S	1	S

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica
 AMC: Amoxicilina-clavulánico; PTZ: Piperacilina-tazobactam; FOX: Cefoxitina; CAZ: Ceftazidima

Tabla 11 (continuación)

Aislado	CMI FEP	CC FEP	CMI IPM	CC IPM	CMI MEM	CC MEM	CMI ETP	CC ETP
1	8	S	0,03	S	0,03	S	0,03	S
16	2	S	0,125	S	0,03	S	0,016	S
25	4	S	0,125	S	0,03	S	≤ 0,008	S
26	16	I	0,25	S	0,03	S	0,125	S
27	2	S	0,06	S	0,016	S	0,016	S
41	16	I	0,125	S	≤ 0,008	S	0,03	S
42	4	S	0,125	S	0,016	S	≤ 0,008	S
46	64	R	0,125	S	0,03	S	0,25	S
47	16	I	0,125	S	0,016	S	0,06	S
51	8	S	0,06	S	0,016	S	0,016	S
54	8	S	0,06	S	0,016	S	0,03	S
56	4	S	0,125	S	≤ 0,008	S	≤ 0,008	S
58	4	S	0,06	S	≤ 0,008	S	≤ 0,008	S
62	0,5	S	0,06	S	≤ 0,008	S	0,016	S
63	4	S	0,06	S	0,016	S	0,03	S
65	16	I	0,125	S	0,016	S	0,06	S
101	16	I	0,125	S	0,016	S	0,06	S
102	32	R	0,125	S	0,016	S	0,06	S
112	8	S	0,06	S	≤ 0,008	S	0,03	S
115	32	R	0,125	S	0,03	S	0,125	S
118	16	I	0,03	S	0,016	S	0,125	S
121	4	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
122	4	S	0,125	S	0,016	S	0,06	S
124	8	S	0,06	S	0,016	S	0,03	S
132	8	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
134	≤ 0,25	S	0,06	S	≤ 0,008	S	≤ 0,008	S
135	2	S	0,06	S	0,016	S	0,016	S
136	≤ 0,25	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
137	4	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
138	4	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
139	4	S	0,06	S	0,016	S	0,03	S
140	1	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
141	2	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
145	4	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
149	4	S	0,125	S	0,03	S	0,03	S
150	≤ 0,25	S	0,06	S	≤ 0,008	S	≤ 0,008	S
151	4	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
153	4	S	0,25	S	0,03	S	0,06	S
159	4	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
161	8	S	0,25	S	0,016	S	0,03	S
162	1	S	0,25	S	0,016	S	0,03	S
163	4	S	0,25	S	0,016	S	0,016	S
165	8	S	0,125	S	≤ 0,008	S	0,016	S
169	16	I	0,125	S	0,03	S	0,016	S

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica

FEP: Cefepima; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; ETP: Ertapenem

Tabla 11 (continuación)

Aislado	CMI FEP	CC FEP	CMI IPM	CC IPM	CMI MEM	CC MEM	CMI ETP	CC ETP
170	128	R	0,25	S	0,06	S	0,125	S
171	16	I	0,25	S	0,03	S	0,03	S
177	8	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
178	1	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
179	32	R	0,25	S	0,03	S	0,125	S
180	2	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
181	0,5	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
183	4	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
185	32	R	0,125	S	0,03	S	0,06	S
186	1	S	0,125	S	0,03	S	≤ 0,008	S
187	4	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
189	32	R	0,125	S	1	S	0,5	S
190	8	S	0,25	S	0,03	S	0,06	S
191	32	R	0,125	S	≤ 0,008	S	0,06	S
192	4	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
193	2	S	0,125	S	0,016	S	≤ 0,008	S
195	8	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
196	0,5	S	0,125	S	0,016	S	≤ 0,008	S
198	32	R	0,125	S	0,03	S	0,125	S
200	8	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
204	2	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
207	2	S	0,25	S	0,03	S	0,016	S
208	≤ 0,25	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
210	2	S	0,125	S	0,03	S	≤ 0,008	S
211	2	S	0,125	S	0,016	S	≤ 0,008	S
214	0,5	S	0,06	S	≤ 0,008	S	≤ 0,008	S
217	0,5	S	0,125	S	0,016	S	≤ 0,008	S
218	4	S	0,125	S	0,016	S	0,06	S
219	8	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
220	≤ 0,25	S	0,125	S	0,016	S	≤ 0,008	S
221	4	S	0,25	S	0,016	S	0,03	S
224	32	R	0,125	S	0,016	S	0,25	S
226	16	I	0,125	S	0,016	S	0,016	S
227	128	R	0,25	S	0,03	S	0,125	S
228	4	S	0,25	S	0,016	S	0,016	S
229	2	S	0,25	S	0,03	S	0,016	S
230	8	S	0,25	S	0,03	S	0,016	S
231	0,5	S	0,25	S	0,016	S	≤ 0,008	S
232	4	S	0,25	S	0,016	S	0,03	S
233	4	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
235	16	I	0,125	S	0,016	S	0,03	S
237	64	R	0,125	S	0,016	S	0,125	S
240	8	S	0,125	S	≤ 0,008	S	≤ 0,008	S
242	1	S	0,25	S	0,016	S	0,016	S
245	4	S	0,125	S	0,03	S	0,03	S

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica
 FEP: Cefepima; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; ETP: Ertapenem

Tabla 11 (continuación)

Aislado	CMI FEP	CC FEP	CMI IPM	CC IPM	CMI MEM	CC MEM	CMI ETP	CC ETP
246	1	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
248	4	S	0,25	S	0,016	S	0,016	S
249	0,5	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
253	1	S	0,25	S	0,03	S	0,016	S
254	1	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
255	1	S	0,25	S	0,016	S	≤ 0,008	S
258	2	S	0,125	S	0,016	S	≤ 0,008	S
260	2	S	0,03	S	0,016	S	0,03	S
261	2	S	0,125	S	0,016	S	0,06	S
265	0,5	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
266	1	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
267	1	S	0,25	S	0,016	S	≤ 0,008	S
268	4	S	0,25	S	0,016	S	0,03	S
269	4	S	0,25	S	0,016	S	0,03	S
270	4	S	0,25	S	0,016	S	0,06	S
272	4	S	0,25	S	0,016	S	0,03	S
273	8	S	0,125	S	0,016	S	0,03	S
274	8	S	0,125	S	0,016	S	0,06	S
276	8	S	2	S	0,25	S	0,125	S
277	16	I	0,25	S	0,125	S	0,5	S
280	2	S	0,125	S	0,016	S	0,016	S
282	2	S	0,25	S	0,016	S	0,03	S
284	4	S	0,25	S	0,016	S	0,03	S
285	2	S	0,25	S	0,016	S	0,03	S
288	1	S	0,125	S	0,016	S	≤ 0,008	S
290	2	S	0,25	S	0,03	S	0,06	S

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica
 FEP: Cefepima; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; ETP: Ertapenem

Tabla 11 (continuación)

Aislado	CMI AK	CC AK	CMI TO	CC TO	CMI CIP	CC CIP	CMI LEV	CC LEV
1	1	S	0,5	S	16	R	8	R
16	8	S	16	R	64	R	16	R
25	1	S	0,25	S	8	R	4	R
26	2	S	0,5	S	32	R	16	R
27	1	S	0,25	S	≤ 0,125	S	1	S
41	2	S	2	S	32	R	8	R
42	4	S	8	I	16	R	4	I
46	4	S	16	R	64	R	16	R
47	2	S	0,5	S	1	S	1	S
51	2	S	4	S	≤ 0,125	S	0,25	S
54	8	S	32	R	64	R	8	R
56	0,5	S	0,25	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
58	1	S	0,25	S	4	R	4	I
62	1	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
63	0,5	S	0,25	S	32	R	8	R
65	1	S	0,5	S	8	R	8	R
101	2	S	16	R	8	R	8	R
102	0,5	S	16	R	8	R	8	R
112	1	S	0,25	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
115	1	S	128	R	8	R	4	I
118	≤ 0,25	S	4	S	16	R	8	R
121	1	S	0,25	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
122	1	S	1	S	0,5	S	1	S
124	1	S	4	S	0,5	S	0,5	S
132	1	S	0,25	S	32	R	16	R
134	1	S	0,5	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
135	1	S	0,25	S	32	R	64	R
136	0,5	S	0,5	S	32	R	16	R
137	0,5	S	8	I	16	R	8	R
138	1	S	2	S	8	R	4	I
139	2	S	1	S	32	R	16	R
140	0,5	S	0,25	S	4	R	4	I
141	2	S	0,25	S	8	R	4	I
145	2	S	0,5	S	32	R	16	R
149	1	S	0,25	S	1	S	2	S
150	0,5	S	0,25	S	16	R	> 128	R
151	2	S	4	S	32	R	16	R
153	1	S	32	R	16	R	8	R
159	1	S	0,5	S	64	R	16	R
161	2	S	0,25	S	32	R	8	R
162	0,5	S	0,5	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
163	2	S	0,5	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
165	1	S	0,25	S	≤ 0,125	S	1	S
169	1	S	0,5	S	0,5	S	0,5	S

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica
 AK: Amikacina; TO: Tobramicina; CIP: Ciprofloxacino; LEV: Levofloxacino

Tabla 11 (continuación)

Aislado	CMI AK	CC AK	CMI TO	CC TO	CMI CIP	CC CIP	CMI LEV	CC LEV
170	2	S	8	I	32	R	16	R
171	2	S	1	S	≤ 0,125	S	0,25	S
177	1	S	0,25	S	8	R	4	I
178	0,5	S	4	S	32	R	16	R
179	2	S	8	I	64	R	16	R
180	0,5	S	4	S	32	R	16	R
181	1	S	4	S	64	R	16	R
183	4	S	1	S	32	R	16	R
185	1	S	0,25	S	32	R	16	R
186	0,5	S	≤ 0,125	S	0,25	S	0,25	S
187	1	S	0,5	S	≤ 0,125	S	0,25	S
189	8	S	32	R	128	R	16	R
190	1	S	0,25	S	≤ 0,125	S	0,25	S
191	1	S	0,5	S	32	R	16	R
192	1	S	0,25	S	64	R	16	R
193	2	S	0,5	S	≤ 0,125	S	0,25	S
195	1	S	0,5	S	64	R	16	R
196	1	S	8	I	32	R	16	R
198	0,5	S	0,5	S	0,25	S	0,25	S
200	1	S	0,25	S	128	R	32	R
204	2	S	0,5	S	32	R	16	R
207	1	S	≤ 0,125	S	64	R	16	R
208	2	S	0,5	S	32	R	32	R
210	1	S	0,25	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
211	1	S	0,25	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
214	4	S	0,5	S	0,25	S	≤ 0,125	S
217	1	S	0,5	S	16	R	8	R
218	2	S	8	I	128	R	32	R
219	1	S	0,25	S	16	R	8	R
220	1	S	0,25	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
221	1	S	0,5	S	32	R	16	R
224	4	S	16	R	128	R	8	R
226	1	S	0,25	S	32	R	8	R
227	≤ 0,25	S	0,25	S	16	R	8	R
228	0,5	S	≤ 0,125	S	16	R	8	R
229	1	S	0,5	S	16	R	8	R
230	1	S	0,25	S	32	R	8	R
231	2	S	0,5	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
232	2	S	0,5	S	64	R	16	R
233	1	S	0,25	S	8	R	4	I
235	4	S	0,5	S	0,5	S	0,5	S
237	4	S	1	S	32	R	32	R
240	2	S	0,5	S	4	R	8	R
242	1	S	0,25	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
245	1	S	0,25	S	32	R	16	R

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica
 AK: Amikacina; TO: Tobramicina; CIP: Ciprofloxacino; LEV: Levofloxacino

Tabla 11 (continuación)

Aislado	CMI AK	CC AK	CMI TO	CC TO	CMI CIP	CC CIP	CMI LEV	CC LEV
246	4	S	0,5	S	≤ 0,125	S	≤ 0,125	S
248	2	S	0,5	S	32	R	16	R
249	4	S	0,5	S	32	R	8	R
253	1	S	0,25	S	32	R	4	I
254	4	S	0,5	S	64	R	32	R
255	2	S	4	S	8	R	8	R
258	4	S	1	S	16	R	8	R
260	4	S	0,5	S	8	R	4	I
261	4	S	0,5	S	32	R	16	R
265	1	S	1	S	16	R	8	R
266	2	S	0,5	S	32	R	8	R
267	8	S	1	S	4	R	4	I
268	4	S	1	S	0,5	S	1	S
269	1	S	1	S	1	S	4	I
270	8	S	1	S	32	R	8	R
272	8	S	0,5	S	16	R	8	R
273	2	S	0,5	S	8	R	8	R
274	2	S	1	S	4	R	4	I
276	2	S	0,5	S	32	R	16	R
277	2	S	1	S	32	R	8	R
280	4	S	0,5	S	8	R	4	I
282	1	S	0,25	S	32	R	16	R
284	1	S	0,5	S	32	R	16	R
285	1	S	0,5	S	32	R	16	R
288	2	S	0,5	S	≤ 0,125	S	0,25	S
290	4	S	1	S	32	R	16	R

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica
 AK: Amikacina; TO: Tobramicina; CIP: Ciprofloxacino; LEV: Levofloxacino

Tabla 12: Valores del diámetro de inhibición de crecimiento, CMI y categoría clínica, según el CLSI, para tigeciclina, en los 115 aislados de *E. coli* productores de BLEEs

Aislado	Diámetro de inhibición	CMI Tigeciclina	CC Tigeciclina
1	23	0,25	S
16	19	0,75	S
25	25	0,094	S
26	24	0,125	S
27	23	0,19	S
41	25	0,094	S
42	23	0,38	S
46	23	0,125	S
47	21	0,38	S
51	25	0,094	S
54	26	0,094	S
56	25	0,19	S
58	21	0,75	S
62	27	0,094	S
63	29	0,047	S
65	23	0,25	S
101	24	0,19	S
102	25	0,094	S
112	25	0,094	S
115	24	0,125	S
118	28	0,094	S
121	24	0,19	S
122	23	0,19	S
124	24	0,125	S
132	23	0,25	S
134	24	0,125	S
135	25	0,125	S
136	24	0,19	S
137	25	0,094	S
138	23	0,38	S
139	26	0,094	S
140	25	0,19	S
141	27	0,064	S
145	24	0,19	S
149	26	0,094	S
150	27	0,064	S
151	25	0,125	S
153	26	0,094	S
159	27	0,094	S
161	27	0,064	S
162	27	0,094	S
163	28	0,094	S
165	26	0,094	S
169	28	0,094	S

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica

Tabla 12 (continuación)

Aislado	Diámetro de inhibición	CMI Tigeciclina	CC Tigeciclina
170	27	0,064	S
171	25	0,19	S
177	24	0,125	S
178	24	0,19	S
179	26	0,094	S
180	25	0,19	S
181	24	0,19	S
183	25	0,125	S
185	26	0,125	S
186	27	0,094	S
187	25	0,19	S
189	26	0,094	S
190	29	0,064	S
191	27	0,064	S
192	26	0,094	S
193	25	0,19	S
195	29	0,064	S
196	24	0,19	S
198	25	0,19	S
200	25	0,125	S
204	26	0,094	S
207	26	0,125	S
208	24	0,19	S
210	25	0,125	S
211	26	0,125	S
214	21	0,5	S
217	27	0,064	S
218	23	0,5	S
219	25	0,19	S
220	28	0,064	S
221	25	0,125	S
224	27	0,094	S
226	25	0,19	S
227	27	0,094	S
228	23	0,125	S
229	27	0,094	S
230	27	0,094	S
231	25	0,125	S
232	23	0,19	S
233	28	0,064	S
235	26	0,125	S
237	20	0,75	S
240	25	0,125	S
242	25	0,125	S
245	23	0,25	S

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica

Tabla 12 (continuación)

Aislado	Diámetro de inhibición	CMI Tigeciclina	CC Tigeciclina
246	25	0,125	S
248	25	0,125	S
249	26	0,094	S
253	27	0,064	S
254	20	0,75	S
255	24	0,25	S
258	23	0,25	S
260	22	0,38	S
261	21	0,38	S
265	22	0,38	S
266	22	0,38	S
267	22	0,38	S
268	22	0,25	S
269	22	0,38	S
270	22	0,25	S
272	22	0,25	S
273	24	0,25	S
274	21	0,75	S
276	25	0,19	S
277	27	0,094	S
280	19	0,75	S
282	20	0,75	S
284	20	0,5	S
285	23	0,5	S
288	22	0,38	S
290	22	0,5	S

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CC: Categoría clínica

4. Resultados

Tabla 13: Valores de rango, CMI₅₀, CMI₉₀ y porcentaje de sensibilidad a los diferentes antibióticos ensayados, frente a los 115 aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs

Antibióticos	Rango (µg/ml)	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	Aislados sensibles (%)
Amoxicilina-clavulánico	2/1 – 32/16	8/4	32/16	81,7
Piperacilina-tazobactam	≤ 0,25/4 - 128/4	2/4	8/4	95,7
Cefoxitina	0,5 - 32	4	8	91,3
Ceftazidima	≤ 0,25 - >256	2	64	67,8
Cefepima	≤ 0,25 - 128	4	32	80
Imipenem	0,03 - 2	0,125	0,25	100
Meropenem	≤ 0,008 - 1	0,016	0,03	100
Ertapenem	≤ 0,008 - 0,5	0,03	0,125	100
Amikacina	≤ 0,25 - 8	1	4	100
Tobramicina	≤ 0,125 - 128	0,5	8	87
Ciprofloxacino	≤ 0,125 - 128	16	64	27,8
Levofloxacino	≤ 0,125 - > 128	8	16	27
Tigeciclina	0,047-0,75	0,125	0,38	100

4. Resultados

Tabla 14: Valores de rango, CMI₅₀, CMI₉₀ y porcentaje de sensibilidad a los diferentes antibióticos ensayados, frente a los 67 aislados clínicos de *E. coli* productores de CTX-M9

Antibióticos	Rango (µg/ml)	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	Aislados sensibles (%)
Amoxicilina-clavulánico	2/1 – 32/16	8/4	16/8	85,1
Piperacilina-tazobactam	≤ 0,25/4 - 128/4	2/4	8/4	95,5
Cefoxitina	0,5 - 32	4	8	91
Ceftazidima	≤ 0,25 - 16	1	4	95,5
Cefepima	≤ 0,25 - 128	4	16	80,6
Imipenem	0,03 - 0,25	0,125	0,25	100
Meropenem	≤ 0,008 - 0,06	0,016	0,03	100
Ertapenem	≤ 0,008 - 0,125	0,03	0,06	100
Amikacina	0,5 - 8	1	4	100
Tobramicina	≤ 0,125 - 128	0,5	4	92,5
Ciprofloxacino	≤ 0,125 - 128	16	64	29,9
Levofloxacino	≤ 0,125 - 64	8	16	29,9
Tigeciclina	0,047-0,75	0,125	0,38	100

4. Resultados

Tabla 15: Valores de rango, CMI₅₀, CMI₉₀ y porcentaje de sensibilidad a los diferentes antibióticos ensayados, frente a los 48 aislados clínicos de *E. coli* productores de SHV

Antibióticos	Rango (µg/ml)	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	Aislados sensibles (%)
Amoxicilina-clavulánico	2/1 – 32/16	8/4	32/16	77,1
Piperacilina-tazobactam	≤ 0,25/4 - 64/4	2/4	16/4	95,8
Cefoxitina	1 - 32	4	8	91,7
Ceftazidima	≤ 0,25 - > 256	32	128	29,2
Cefepima	≤ 0,25 - 128	2	32	80
Imipenem	0,03 - 2	0,125	0,25	100
Meropenem	≤ 0,008 - 1	0,016	0,03	100
Ertapenem	≤ 0,008 - 0,5	0,016	0,125	100
Amikacina	≤ 0,25 - 8	1	8	100
Tobramicina	≤ 0,125 - 32	0,5	8	79,2
Ciprofloxacino	≤ 0,125 - 128	16	64	25
Levofloxacino	≤ 0,125 - > 128	8	16	22,9
Tigeciclina	0,064-0,75	0,19	0,5	100

En las tablas 16 a 27 se representa la distribución, en porcentajes, de los aislados clínicos de *E. coli* que presentaron cada valor de CMI (en $\mu\text{g/ml}$) para los diferentes antibióticos ensayados mediante el método de microdilución.

Tabla 16: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para amoxicilina-clavulánico

Tipo de BLEEs	CMI ($\mu\text{g/ml}$)				
	2/1	4/2	8/4	16/8	32/16
Productores de BLEEs	4,3	27,8	49,6	6,7	11,3
Productores de CTX-M9	1,5	22,5	61	6	9
Productores de SHV	8	35,7	33,6	8	14,7

Para amoxicilina-clavulánico los aislados presentaron, más frecuentemente, valores de CMIs comprendidos entre 4/2 y 8/4 $\mu\text{g/ml}$.

4. Resultados

Tabla 17: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para piperacilina-tazobactam

Tipo de BLEEs	CMI (µg/ml)									
	≤0,25/4	0,5/4	1/4	2/4	4/4	8/4	16/4	32/4	64/4	128/4
Productores de BLEEs	4,3	13	30,4	23,5	11,3	9,6	3,5	1,7	1,7	0,9
Productores de CTX-M9	4,5	10,4	34,3	25,3	11,9	7,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Productores de SHV	4,2	16,6	25	20,8	10,4	12,5	6,2	2,1	2,1	0

En el caso de piperacilina / tazobactam los valores de CMIs más frecuentes, para el total de las cepas, se encontró comprendido entre 0,5/4 y 4/4 µg/ml.

Tabla 18: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para cefoxitina

Tipo de BLEEs	CMI (µg/ml)						
	0,5	1	2	4	8	16	32
Productores de BLEEs	0,87	4,4	22,6	36,5	27	6,1	2,6
Productores de CTX-M9	1,5	4,5	19,4	35,8	29,8	7,5	1,5
Productores de SHV	0	4,2	27	37,4	22,9	4,2	4,2

4. Resultados

Para cefoxitina, más del 85% de aislados presentaron valores de CMI comprendidos entre 2 y 8 µg/ml. Comparando los aislados productores de BLEEs tipo CTX-M9 y SHV entre sí, vemos, como los productores de SHV presentaron valores de CMI en torno a una dilución inferior respecto a los productores de CTX-M9 (entre 2 y 4 µg/ml para SHV, frente a 4 y 8 µg/ml para CTX-M9).

Tabla 19: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para ceftazidima

Tipo de BLEEs	CMI (µg/ml)											
	<0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Productores de BLEEs	9,6	12,2	20	13,1	6,1	5,2	6,1	12,2	7,8	4,4	0,9	2,6
Productores de CTX-M9	13,4	19,4	34,3	19,9	7,5	3	4,5	0	0	0	0	0
Productores de SHV	4,2	2,1	0	6,2	4,2	8,3	8,3	29,1	18,7	10,4	2,1	6,2

Frente a ceftazidima, respecto al total de aislados clínicos, existió una distribución irregular de frecuencias, que se despeja cuando analizamos por tipo de BLEE. Se puede observar como los aislados productores de BLEEs tipo CTX-M9 presentaron una distribución de CMIs más bajas que los aislados productores de SHV.

4. Resultados

Tabla 20: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para cefepima

Tipo de BLEEs	CMI ($\mu\text{g/ml}$)									
	$\leq 0,25$	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Productores de BLEEs	4,3	7	10,4	15,7	27	15,7	9,6	7	1,7	1,7
Productores de CTX-M9	1,5	0	7,5	16,4	34,3	20,9	10,4	6	1,5	1,5
Productores de SHV	8,3	16,6	14,6	14,6	16,6	8,3	8,3	8,3	2,1	2,1

Respecto a cefepima, más del 50% de aislados, independientemente del tipo de BLEE que expresaran, presentaron CMIs comprendidas entre 1 y 8 $\mu\text{g/ml}$. Al comparar por tipo de BLEE, se observó que los aislados que expresaron BLEEs tipo CTX-M9 presentaron CMIs mayores.

4. Resultados

Tabla 21: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para imipenem

.Tipo de BLEEs	CMI ($\mu\text{g/ml}$)				
	0,03	0,06	0,125	0,25	2
Productores de BLEEs	2,6	11,3	58,3	27	0,9
Productores de CTX-M9	3	11,9	64,1	21	0
Productores de SHV	2,1	10,4	49,9	35,4	2,1

Tabla 22: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para meropenem

Tipo de BLEEs	CMI ($\mu\text{g/ml}$)						
	$\leq 0,008$	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	1
Productores de BLEEs	9,6	67	20	0,9	0,9	0,9	0,9
Productores de CTX-M9	10,4	62,6	25,4	1,5	0	0	0
Productores de SHV	8,3	72,8	12,5	0	2,1	2,1	2,1

Tabla 23: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para ertapenem

Tipo de BLEEs	CMI ($\mu\text{g/ml}$)						
	$\leq 0,008$	0,016	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5
Productores de BLEEs	17,4	28,7	30,4	12,2	7,8	1,7	1,7
Productores de CTX-M9	15	26,8	37,2	13,4	7,5	0	0
Productores de SHV	20,8	31,2	20,8	10,4	8,3	4,2	4,2

En el caso de los antibióticos carbapenémicos se puede observar que el mayor porcentaje de aislados presentaron CMIs comprendidas entre: 0,125-0,25; 0,016-0,03 y 0,06-0,03 ($\mu\text{g/ml}$) frente a imipenem, meropenem y ertapenem, respectivamente.

Tabla 24: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para amikacina

Tipo de BLEEs	CMI ($\mu\text{g/ml}$)					
	$\leq 0,25$	0,5	1	2	4	8
Productores de BLEEs	1,7	11,3	42,6	25,2	13,9	5,2
Productores de CTX-M9	0	10,4	47,7	28,3	11,9	1,5
Productores de SHV	4,2	12,5	35,4	20,8	16,6	10,4

4. Resultados

En lo que respecta a amikacina, el mayor porcentaje de aislados se encontró comprendido en valores de CMI que van de 1 a 4 $\mu\text{g/ml}$, independientemente del tipo de BLEE que expresaran.

Tabla 25: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para tobramicina

Tipo de BLEEs	CMI ($\mu\text{g/ml}$)									
	$\leq 0,125$	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	128
Productores de BLEEs	3,5	27,8	34,8	12,2	1,7	7	5,2	4,3	2,6	0,9
Productores de CTX-M9	3	34,3	35,8	11,9	3	4,5	4,5	0	1,5	1,5
Productores de SHV	4,2	18,7	33,3	12,5	0	10,4	6,2	10,4	4,2	0

En el caso de tobramicina, los valores de CMI fueron más bajos que en el caso de amikacina, estando comprendidos la mayoría de los aislados entre 0,25 y 1 $\mu\text{g/ml}$. Los que expresaron CTX-M9 presentaron valores de CMIs más bajos que los que expresaron BLEEs tipo SHV.

4. Resultados

Tabla 26: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para ciprofloxacino

Tipo de BLEEs	CMI ($\mu\text{g/ml}$)									
	$\leq 0,125$	0,25	0,5	1	4	8	16	32	64	128
Productores de BLEEs	18,3	2,6	4,3	2,6	4,3	11,3	12,2	31,3	9,6	3,5
Productores de CTX-M9	17,9	3	6	3	6	13,4	7,5	32,8	8,9	1,5
Productores de SHV	18,7	2,1	2,1	2,1	2,1	8,3	18,7	29,1	10,4	6,2

Para ciprofloxacino se observó una distribución equitativa entre los diferentes valores de CMIs, con un mayor porcentaje de aislados en 32 $\mu\text{g/ml}$, tanto para el total de aislados, como para la diferenciación entre productores de CTX-M9 y SHV.

Tabla 27: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para levofloxacino

Tipo de BLEEs	CMI ($\mu\text{g/ml}$)										
	$\leq 0,125$	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>128
Productores de BLEEs	12,2	7	2,6	4,3	0,9	13,1	25,2	28,7	4,3	0,9	0,9
Productores de CTX-M9	8,9	8,9	4,5	6	1,5	17,9	17,9	28,3	4,5	1,5	0
Productores de SHV	16,6	4,2	0	2,1	0	6,2	35,4	29,1	4,2	0	2,1

Respecto a levofloxacin, el mayor porcentaje de aislados presentaron valores de CMI comprendidos entre 8 y 16 µg/ml, situación que se repitió tanto para los que expresaron BLEEs tipo CTX-M9 como SHV. En el caso de las cepas con SHV nos encontramos con valores de CMIs ligeramente superiores que frente a las CTX-M9.

En la tabla 28 se muestra, porcentualmente, la distribución de aislados de *E. coli* productores de BLEEs que presentaron cada valor de CMI (en µg/ml) de tigeciclina por el procedimiento de E-test. La mayor parte de los aislados presentaron CMIs entre 0,094 y 0,19 µg/ml. Los valores obtenidos indican una excelente actividad de tigeciclina frente a estos aislados clínicos, siendo valores similares los obtenidos para los aislados productores de enzimas CTX-M9 y SHV.

Tabla 28: Distribución (en porcentaje) de aislados clínicos que presentaron cada valor de CMI para tigeciclina

Tipo de BLEEs	CMI (µg/ml)								
	0,047	0,064	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,5	0,75
Productores de BLEEs	0,9	9,6	24,3	19,2	18,2	8,7	8,7	4,3	6,1
Productores de CTX-M9	1,5	10,4	23,9	23,9	16,4	10,4	6	1,5	6
Productores de SHV	0	8,3	24,9	12,5	20,9	6,3	12,5	8,3	6,3

En la tabla 29 podemos observar los resultados obtenidos en la prueba exacta de Fisher, al comparar los aislados productores de CTX-M9 y los productores de SHV, respecto del comportamiento de cada antibiótico, desde el punto de vista de la distribución de CMIs y también de la categoría clínica. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de enzimas para la actividad de ceftazidima en ambas variables de estudio ($p < 0,001$), de tal forma que ceftazidima fue más activa frente a los aislados productores de enzimas CTX-M9. También hubo diferencias significativas para cefepima en la distribución de CMIs ($p = 0,003$), siendo éstas más bajas entre los aislados productores de SHV. Y por último, también las hubo para tobramicina, pero exclusivamente en la distribución por categorías clínicas ($p = 0,049$), siendo mayor el porcentaje de resistencia entre los aislados productores de enzimas SHV.

Tabla 29: Resultados de la prueba exacta de Fisher al comparar la actividad de los diversos antibióticos frente a los aislados productores de CTX-M9 vs SHV

Antibióticos	Distribución de CMIs	Categorías clínicas
Amoxicilina-clavulánico	0,065	0,342
Piperacilina-tazobactam	0,810	1,000
Cefoxitina	0,828	1,000
Ceftazidima	<0,001	<0,001
Cefepima	0,003	1,000
Imipenem	0,289	1,000
Meropenem	0,263	1,000
Ertapenem	0,178	1,000
Amikacina	0,102	1,000
Tobramicina	0,086	0,049
Ciprofloxacino	0,609	0,674
Levofloxacino	0,128	0,523
Tigeciclina	0,135	1,000

En negrita aparecen los resultados estadísticamente significativos

4.1.2. Relación entre el método de difusión con disco y la prueba Epsilon, para la determinación de la actividad de tigeciclina

Los valores de rango, CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) obtenidos mediante E-test, y rango, media (en mm) y desviación estándar obtenidos mediante el método de difusión con disco para tigeciclina, en los 115 aislados de *E. coli* productores de BLEEs, se reflejan en la tabla 30.

Tabla 30: Valores de rango, CMI₅₀ y CMI₉₀ (en µg/ml) obtenidos mediante E-test; y rango, media (mm) y desviación estándar obtenidos mediante el método de difusión con disco para tigeciclina en los 115 aislados de *E. coli* productores de BLEEs

Tipo de BLEEs	E-test			Difusión con disco		
	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	Media	Desviación estándar
Productores de BLEEs	0,047-0,75	0,125	0,38	19-29	24,5	2,2
Productores de CTX-M9	0,047-0,75	0,125	0,38	20-29	24,8	2
Productores de SHV	0,064-0,75	0,19	0,5	19-29	24,2	2,4

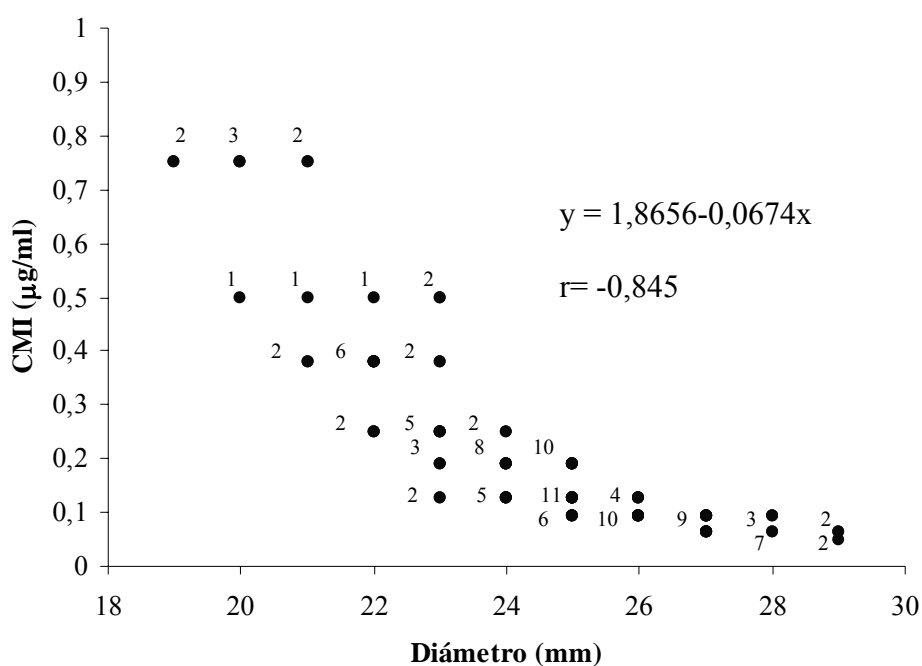
Considerando los puntos de corte para definir las categorías clínicas establecidos por la FDA para tigeciclina en *Enterobacteriaceae* en el año 2005, el 100% de los aislados de *E. coli* se mostraron sensibles a tigeciclina, y todos los microorganismos fueron inhibidos por una concentración $\leq 0,75$ µg/ml, presentando un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco ≥ 19 mm.

Por otra parte, en la figura 7 se representa, en el eje de abscisas, el diámetro del halo de inhibición del crecimiento (en mm), y, en ordenadas, las CMIs (en µg/ml), indicándose, sobre cada punto, el número de aislados que obtuvieron el mismo valor.

La ecuación que relaciona los valores de CMI (y) con los diámetros del halo de inhibición del crecimiento alrededor de los discos

de 15 µg (x) fue, $y=1,8656-0,0674x$ y el coeficiente de correlación fue $r=-0,845$ que muestra una importante relación entre ambas variables.

Figura 7: Diagrama que relaciona los valores de CMI (y), determinados mediante E-test, y los halos de inhibición del crecimiento alrededor del disco de 15 µg de tigeclina (x) para el total de aislados de *E. coli* productores de BLEEs



4.2. VALORES DE CMI DE LOS 50 AISLADOS EN MEDIOS NUTRIENT-BROTH Y MUELLER-HINTON

En la tabla 31 aparece la relación completa de los 50 aislados de *E. coli* productores de BLEEs en los que se realizó un procedimiento de microdilución en NB, con los valores de CMI obtenidos para cada uno de los antibióticos ensayados por microdilución.

Por su parte, en las tablas 32 y 33 se representan los rangos de las CMIs detectadas y los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀, de los 50 aislados clínicos, para cada uno de los antibióticos ensayados, en NB y MH, respectivamente.

4. Resultados

Tabla 31: Valor de CMI para cada uno de los antibióticos ensayados, en NB, en los 50 aislados de *E. coli* productores de BLEEs en los que se realizó extracción de porinas

Aislado	CMI AMC	CMI PTZ	CMI FOX	CMI CAZ	CMI FEP	CMI IPM	CMI MEM	CMI ETP
1	8/4	2/4	8	0,5	2	0,016	0,016	0,03
25	4/2	4/4	2	1	4	0,03	0,03	0,03
26	16/8	4/4	4	1	16	≤ 0,008	0,03	0,03
27	16/8	4/4	4	0,5	2	0,016	0,016	0,03
41	8/4	2/4	2	0,5	4	0,016	0,016	0,06
46	8/4	8/4	4	16	16	≤ 0,008	0,016	0,016
47	8/4	4/4	8	1	8	0,016	0,016	0,03
51	8/4	2/4	4	0,5	2	0,03	0,016	0,016
58	4/2	2/4	1	0,5	4	≤ 0,008	≤ 0,008	0,03
62	16/8	4/4	1	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,008	≤ 0,008	0,016
65	8/4	2/4	16	2	16	≤ 0,008	≤ 0,008	0,06
101	4/2	4/4	2	32	4	≤ 0,008	0,016	0,03
102	16/8	4/4	4	16	32	0,016	0,016	0,06
115	32/16	32/4	8	1	32	≤ 0,008	0,03	0,125
122	8/4	4/4	8	0,5	8	0,016	0,03	0,06
124	8/4	2/4	4	0,5	8	0,016	0,016	0,03
134	2/1	0,5/4	2	16	0,5	0,016	0,016	0,03
140	8/4	4/4	2	0,5	0,5	0,016	0,016	0,016
141	16/8	2/4	8	0,5	4	≤ 0,008	0,016	0,03
153	16/8	4/4	16	4	8	0,016	0,03	0,06
159	8/4	2/4	8	0,5	4	0,016	0,016	0,03
169	16/8	4/4	4	1	32	≤ 0,008	0,016	0,03
179	8/4	32/4	8	128	32	0,016	0,03	0,125
180	8/4	4/4	2	64	4	0,016	0,03	0,06
185	8/4	1/4	16	4	32	≤ 0,008	0,016	0,06
187	4/2	1/4	2	0,5	4	≤ 0,008	0,03	0,06
189	16/8	4/4	16	16	32	≤ 0,008	0,125	0,125
190	2/1	2/4	2	8	8	0,016	0,03	0,06
191	8/4	4/4	8	2	32	≤ 0,008	0,016	0,125
195	8/4	2/4	2	1	8	≤ 0,008	0,016	0,125
198	8/4	4/4	8	2	32	≤ 0,008	0,016	0,06
200	8/4	2/4	4	1	16	≤ 0,008	0,016	0,03
207	8/4	1/4	4	0,5	4	≤ 0,008	0,016	0,06
217	4/2	1/4	2	32	1	≤ 0,008	0,016	0,03
219	16/8	4/4	4	128	8	≤ 0,008	0,03	0,06
224	16/8	8/4	4	8	16	≤ 0,008	0,016	0,03
226	8/4	2/4	4	64	8	0,016	0,03	0,06
232	32/16	16/4	8	2	8	0,016	0,03	0,03
235	8/4	4/4	4	1	16	≤ 0,008	0,03	0,06
237	16/8	8/4	16	8	64	≤ 0,008	0,016	0,125

Tabla 31 (continuación)

Aislado	CMI AK	CMI TO	CMI CIP	CMI LEV
1	0,5	0,25	8	8
25	0,5	0,25	4	4
26	≤ 0,25	≤ 0,125	8	8
27	0,5	≤ 0,125	0,25	1
41	≤ 0,25	≤ 0,125	16	8
46	≤ 0,25	0,25	64	16
47	≤ 0,25	≤ 0,125	2	1
51	≤ 0,25	≤ 0,125	≤ 0,125	0,25
58	≤ 0,25	≤ 0,125	0,25	0,25
62	≤ 0,25	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125
65	0,5	0,25	8	8
101	0,5	0,5	4	4
102	≤ 0,25	1	16	8
115	0,5	32	8	4
122	≤ 0,25	≤ 0,125	0,5	1
124	≤ 0,25	≤ 0,125	1	0,5
134	≤ 0,25	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125
140	0,5	0,25	2	2
141	≤ 0,25	≤ 0,125	4	4
153	0,5	32	16	8
159	≤ 0,25	≤ 0,125	16	16
169	≤ 0,25	≤ 0,125	1	1
179	≤ 0,25	≤ 0,125	32	16
180	0,5	0,25	64	32
185	≤ 0,25	≤ 0,125	32	16
187	≤ 0,25	≤ 0,125	0,5	2
189	≤ 0,25	0,25	128	32
190	≤ 0,25	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125
191	≤ 0,25	≤ 0,125	16	16
195	≤ 0,25	≤ 0,125	32	16
198	≤ 0,25	≤ 0,125	0,25	0,25
200	≤ 0,25	≤ 0,125	64	32
207	≤ 0,25	≤ 0,125	32	16
217	≤ 0,25	≤ 0,125	8	8
219	≤ 0,25	≤ 0,125	4	4
224	0,5	0,25	128	32
226	≤ 0,25	0,25	32	8
232	≤ 0,25	≤ 0,125	16	8
235	≤ 0,25	≤ 0,125	0,25	0,25
237	≤ 0,25	≤ 0,125	8	16

Tabla 31 (continuación)

Aislado	CMI AMC	CMI PTZ	CMI FOX	CMI CAZ	CMI FEP	CMI IPM	CMI MEM	CMI ETP
245	4/2	4/4	4	1	4	≤ 0,008	0,016	0,03
246	8/4	4/4	2	0,5	2	≤ 0,008	0,016	0,03
255	8/4	4/4	8	32	2	≤ 0,008	0,016	0,03
258	8/4	2/4	4	1	8	≤ 0,008	≤ 0,008	0,016
260	16/8	2/4	4	2	4	≤ 0,008	0,016	0,06
274	16/8	4/4	8	1	8	≤ 0,008	0,03	0,06
276	8/4	1/4	2	4	2	≤ 0,008	≤ 0,008	0,06
285	8/4	2/4	2	1	4	0,016	0,03	0,06
288	4/2	2/4	2	32	2	≤ 0,008	0,03	0,03
290	4/2	2/4	4	2	4	0,016	0,016	0,03

Tabla 31 (continuación)

Aislado	CMI AK	CMI TO	CMI CIP	CMI LEV
245	≤ 0,25	≤ 0,125	1	1
246	≤ 0,25	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125
255	≤ 0,25	≤ 0,125	2	1
258	≤ 0,25	≤ 0,125	4	4
260	≤ 0,25	≤ 0,125	1	1
274	≤ 0,25	≤ 0,125	2	2
276	≤ 0,25	≤ 0,125	1	1
285	≤ 0,25	≤ 0,125	16	8
288	≤ 0,25	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125
290	≤ 0,25	≤ 0,125	8	8

Tabla 32: Valores de rango, CMI₅₀ y CMI₉₀ de los diferentes antibióticos ensayados, en NB, frente a los 50 aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs en los que se realizó extracción de las porinas

Antibióticos	Rango (µg/ml)	CMI₅₀ (µg/ml)	CMI₉₀ (µg/ml)
Amoxicilina-clavulánico	2/1 - 32/16	8/4	16/8
Piperacilina-tazobactam	0,5/4 - 32/4	4/4	8/4
Cefoxitina	1 - 16	4	8
Ceftazidima	≤ 0,25 - 128	1	32
Cefepima	≤ 0,25 - 64	8	32
Imipenem	≤ 0,008 - 0,03	≤ 0,008	0,016
Meropenem	≤ 0,008 - 0,125	0,016	0,03
Ertapenem	0,016 - 0,125	0,03	0,125
Amikacina	≤ 0,25 - 0,5	≤ 0,25	0,5
Tobramicina	≤ 0,125 - 32	≤ 0,125	0,25
Ciprofloxacino	≤ 0,125 - 128	4	32
Levofloxacino	≤ 0,125 - 32	4	16

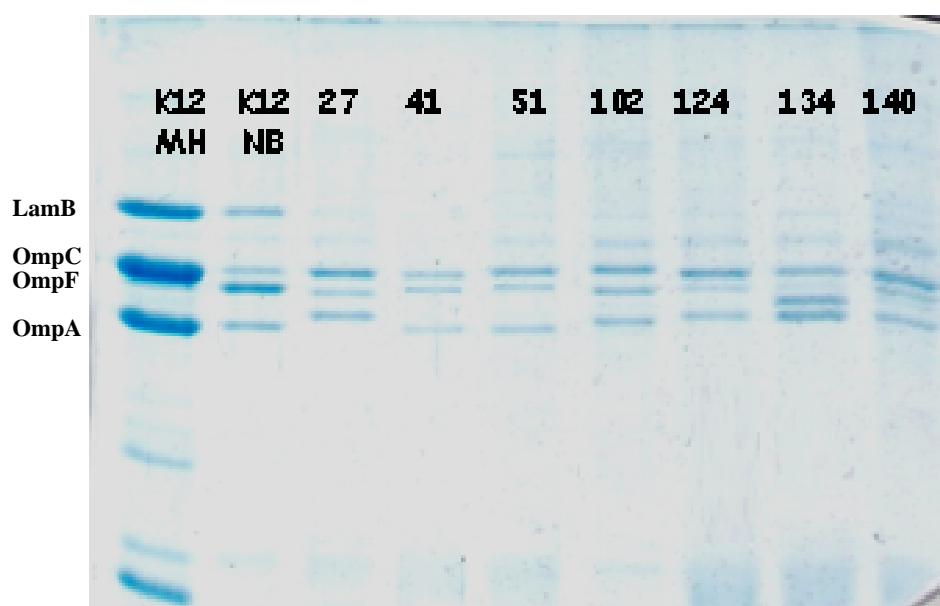
Tabla 33: Valores de rango, CMI₅₀ y CMI₉₀ de los diferentes antibióticos ensayados, en MH, frente a los 50 aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs en los que se realizó extracción de las porinas

Antibióticos	Rango (µg/ml)	CMI₅₀ (µg/ml)	CMI₉₀ (µg/ml)
Amoxicilina-clavulánico	2/1 - 32/16	8/4	32/16
Piperacilina-tazobactam	≤ 0,25/4 - 64/4	2/4	16/4
Cefoxitina	1 - 32	4	16
Ceftazidima	≤ 0,25 - > 256	1	64
Cefepima	≤ 0,25 - 64	8	32
Imipenem	0,03 - 2	0,125	0,25
Meropenem	≤ 0,008 - 1	0,016	0,03
Ertapenem	≤ 0,008 - 0,5	0,03	0,125
Amikacina	0,5 - 8	1	4
Tobramicina	≤ 0,125 - 128	0,5	16
Ciprofloxacino	≤ 0,125 - 128	8	64
Levofloxacino	≤ 0,125 - 32	8	16

4.3. EXPRESIÓN DE PORINAS EN MEDIOS NUTRIENT-BROTH Y MUELLER-HINTON

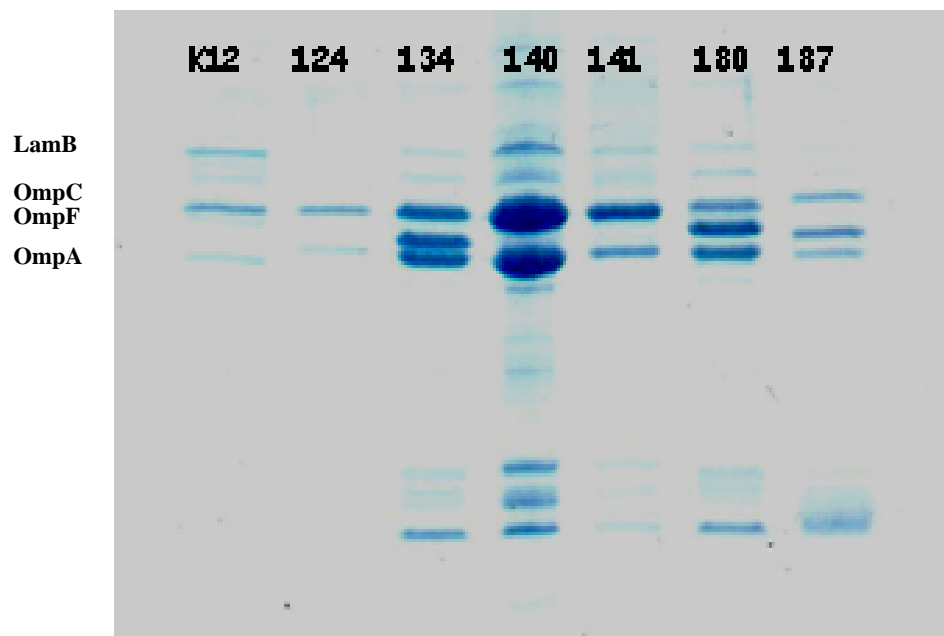
En las figuras 8 y 9 podemos observar las porinas expresadas en ambos medios (NB y MH)

Figura 8: Expresión de porinas en medio Nutrient-Broth.



Los carriles 1 y 2 muestran la cepa de referencia *E. coli* K12 crecida en MH y NB, observándose como en MH no se expresa la porina OmpF, que sí se expresa en el resto de los aislados, crecidos en NB.

Figura 9: Expresión de porinas en medio Mueller-Hinton.



El carril 1 muestra la cepa de referencia *E. coli* K12 crecida en MH. Se observa como los aislados 134, 180 y 187 expresan una banda entre OmpA y OmpC que se corresponde con OmpF, que no aparece en los aislados 124, 140 y 141.

4.4. PATRONES DE EXPRESIÓN DE PORINAS

En la tabla 34 aparecen los 50 aislados en los que se estudió la presencia/ausencia de las porinas OmpF y OmpC en medios NB y MH. El 66% de los aislados eran productores de BLEEs tipo CTX-M9 y el 34% del tipo SHV.

La presencia de porinas se expresó con el símbolo “+” y la ausencia con el símbolo “-“. Se creó una tercera columna (categoría Omp F/C), para aquellos casos en los que no fue posible distinguir, con los medios disponibles, si la porina presente en cada medio fue OmpF u OmpC. Ésto sucedió en 8 aislados en los que, en ambos medios, se expresó un solo tipo de porina, que no se pudo identificar dada la similitud de pesos moleculares y antigenicidad.

Analizando la expresión de OmpC y OmpF en NB, observamos que ambas porinas se expresaron en 42 de los 50 aislados (84%). Por otra parte, en 8 casos (16%) se expresó únicamente una porina, que puede corresponder tanto a OmpC como a OmpF.

En MH, OmpC estuvo presente en 42 de los 50 aislados (84%). Sin embargo, OmpF se expresó sólo en 13 aislados (26%). Al igual que sucedió en NB, en 8 casos (los mismos aislados en ambos medios) no pudimos diferenciar si se trataba de OmpC u OmpF.

4. Resultados

Tabla 34: Relación de aislados en los que se estudió la presencia de las porinas OmpF y OmpC en medios NB y MH

Aislado	OmpC (NB)	OmpF (NB)	OmpF/C (NB)	OmpC (MH)	OmpF (MH)	OmpF/C (MH)
1	+	+		+	+	
25	+	+		+	-	
26	+	+		+	-	
27	+	+		+	-	
41	+	+		+	-	
46	+	+		+	-	
47	+	+		+	-	
51	+	+		+	-	
58	+	+		+	+	
62	+	+		+	+	
65			+			+
101	+	+		+	-	
102	+	+		+	-	
115			+			+
122	+	+		+	-	
124	+	+		+	-	
134	+	+		+	+	
140	+	+		+	-	
141	+	+		+	-	
153			+			+
159	+	+		+	-	
169	+	+		+	+	
179	+	+		+	-	
180	+	+		+	+	
185			+			+
187	+	+		+	+	
189			+			+
190	+	+		+	+	
191			+			+
195	+	+		+	-	
198	+	+		+	-	
200	+	+		+	-	
207	+	+		+	-	
217	+	+		+	-	
219	+	+		+	-	
224			+			+
226	+	+		+	+	
232	+	+		+	-	
235	+	+		+	-	
237	+	+		+	-	
245	+	+		+	-	
246	+	+		+	-	
255			+			+
258	+	+		+	+	
260	+	+		+	+	
274	+	+		+	-	
276	+	+		+	+	
285	+	+		+	-	
288	+	+		+	+	
290	+	+		+	-	

En resumen, los patrones de expresión de porinas, en ambos medios, fueron los representados en la tabla 35.

Tabla 35: Patrones de expresión de las porinas OmpF y OmpC en medios NB y MH

Nutrient-Broth		Mueller-Hinton		
Expresión de:		Expresión de:		
1 porina (OmpF o C)	2 porinas (OmpF y C)	1 porina (OmpC)	1 porina (OmpF o C)	2 porinas (OmpF y C)
8*	42	29	8*	13

Fueron los mismos 8 aislados en ambos medios

4.5. VALORES DE CMI PARA CADA PATRÓN DE EXPRESIÓN DE PORINAS

En la tabla 36 se muestra el rango de CMI (en µg/ml) obtenido para cada antibiótico, en cada uno de los grupos de expresión de porinas, en ambos medios (NB y MH).

Tabla 36: Rango de CMI (en µg/ml) en los distintos grupos de expresión de porinas.

Antibióticos	2 en NB y 2 en MH (n=13)		1 en NB y 1 en MH (n=8)		2 en NB y 1 en MH (n=29)	
	NB	MH	NB	MH	NB	MH
Amoxicilina-clavulánico	2-16	2-32	8-32	4-32	4-32	4-32
Piperacilina-tazobactam	0,5-4	≤0,25-32	1-32	1-32	1-32	≤0,25-64
Cefoxitina	1-8	1-32	4-16	8-32	2-16	2-32
Ceftazidima	≤0,25-64	≤0,25-64	1-32	0,5-32	0,5-128	≤0,25->256
Cefepima	≤0,25-32	≤0,25-16	2-32	1-32	0,5-64	0,5-64
Imipenem	≤0,008-0,016	0,03-2	≤0,008-0,016	0,125-0,25	≤0,008-0,03	0,06-0,25
Meropenem	≤0,008-0,03	≤0,008-0,25	≤0,008-0,125	≤0,008-1	0,016-0,03	≤0,008-0,03
Ertapenem	0,016-0,06	≤0,008-0,125	0,03-0,125	≤0,008-0,5	0,016-0,125	≤0,008-0,25
Amikacina	≤0,25-0,5	0,5-4	≤0,25-0,5	1-8	≤0,25-0,5	0,5-4
Tobramicina	≤0,125-0,25	≤0,125-4	≤0,125-32	0,25-128	≤0,125-1	≤0,125-16
Ciprofloxacino	≤0,125-64	≤0,125-32	2-128	8-128	≤0,125-64	≤0,125-128
Levofloxacino	≤0,125-32	≤0,125-16	1-32	4-16	≤0,125-32	≤0,125-32

Se puede observar una importante variabilidad de los valores de CMI para cada antibiótico en todos los grupos, independientemente del medio de cultivo. Estos datos son acordes con la desviación típica de la CMI ajustada que observamos, más adelante, en la tabla 48.

4.6. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE PORINAS Y SENSIBILIDAD DE LOS AISLADOS

4.6.1. En medio NB

Los resultados de las pruebas estadísticas para establecer la relación entre la expresión de uno o dos tipos de porinas en NB, y la sensibilidad a los distintos antibióticos, en términos de CMI, se expresan en la tabla 37.

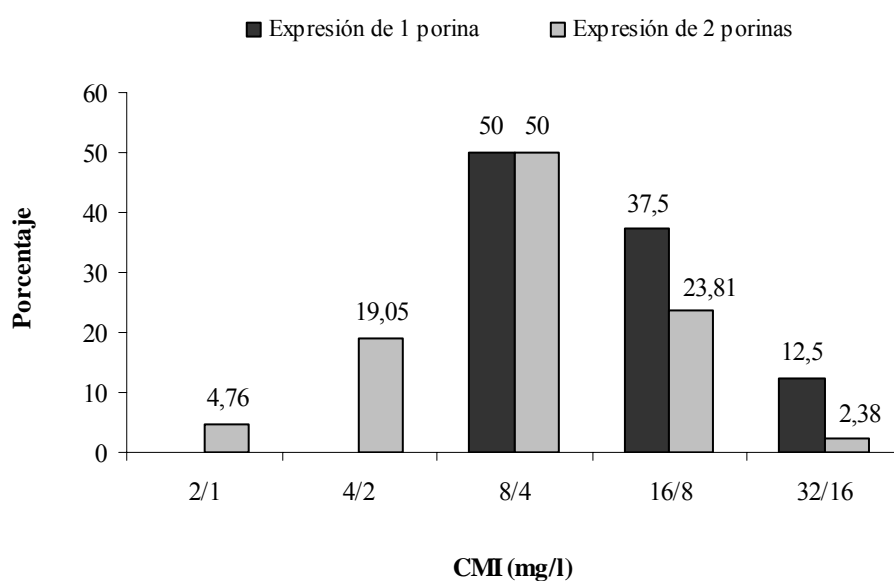
Tabla 37: Asociación estadística entre el valor de CMI y la expresión de uno o dos tipos de porinas en medio NB

Antibióticos	Expresión de porinas	Valores ajustados según el test estadístico		P
		Media	Desviación típica	
Amoxicilina-clavulánico	2 porinas	2,50	0,12703	0,053
	1 porina	3,13	0,29149	
Piperacilina-tazobactam	2 porinas	1,02	0,17122	0,164
	1 porina	1,63	0,39199	
Cefoxitina	2 porinas	1,33	0,13379	0,000
	1 porina	2,87	0,30708	
Ceftazidima	2 porinas	0,69	0,37541	0,262
	1 porina	1,75	0,86022	
Cefepima	2 porinas	1,88	0,24874	0,012
	1 porina	3,50	0,56999	
Imipenem	2 porinas	-7,37	0,08414	0,084
	1 porina	-6,99	0,19851	
Meropenem	2 porinas	-6,26	0,11139	0,323
	1 porina	-5,99	0,25281	
Ertapenem	2 porinas	-5,12	0,12080	0,017
	1 porina	-4,38	0,27670	
Amikacina	2 porinas	-2,16	8,36178	0,339
	1 porina	-2,00	0,06532	
Tobramicina	2 porinas	-3,24	0,22098	0,000
	1 porina	-1,12	0,50521	
Ciprofloxacino	2 porinas	0,88	0,42392	0,009
	1 porina	3,75	0,97134	
Levofloxacino	2 porinas	0,69	0,35986	0,026
	1 porina	2,75	0,82458	

4.6.1.1. Amoxicilina-ácido clavulánico

En la figura 10 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 10: Distribución de los aislados en función de la CMI para amoxicilina-ácido clavulánico

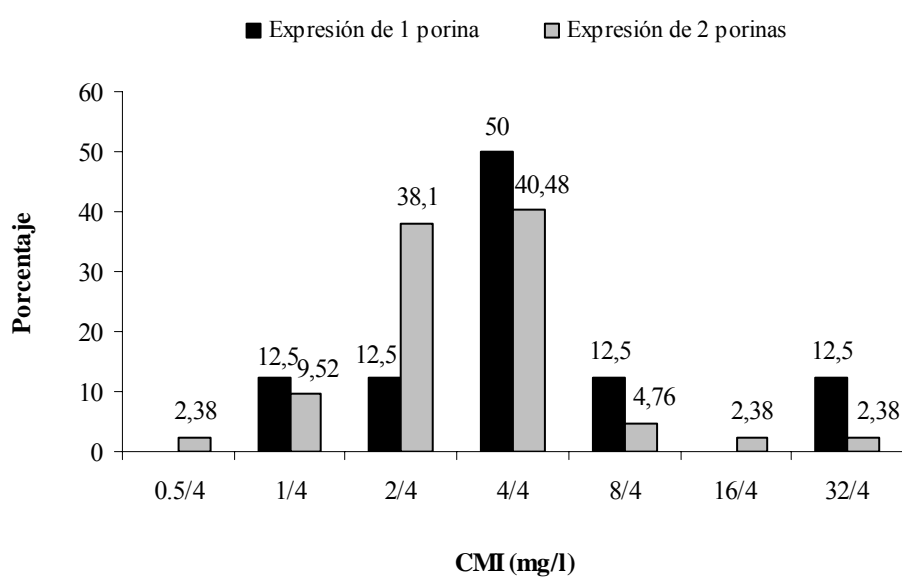


Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que, en este caso, las que expresaron una sola, presentaron indicios de una CMI media significativamente más elevada ($p=0,053$)

4.6.1.2. Piperacilina-tazobactam

En la figura 11 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 11: Distribución de los aislados en función de la CMI para piperacilina-tazobactam

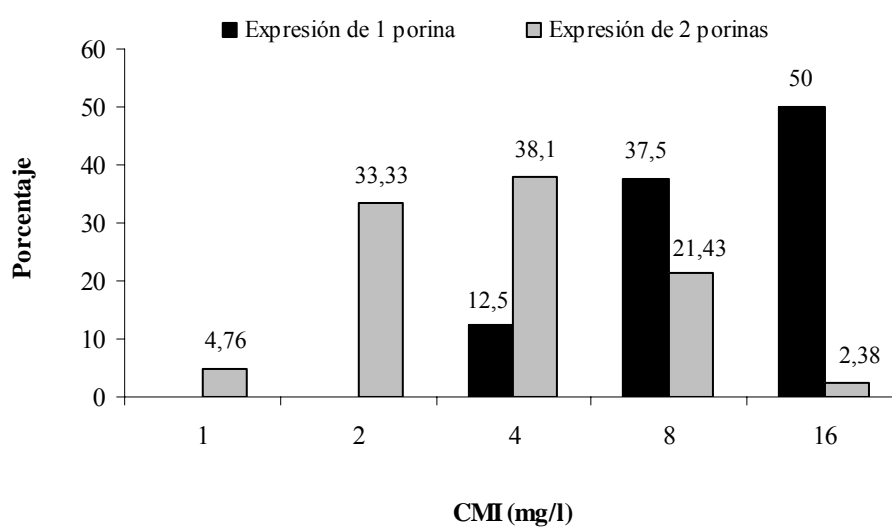


Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que, en este caso, no existieron diferencias entre las CMIs de ambos grupos ($p=0,164$)

4.6.1.3. Cefoxitina

En la figura 12 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 12: Distribución de los aislados en función de la CMI para cefoxitina

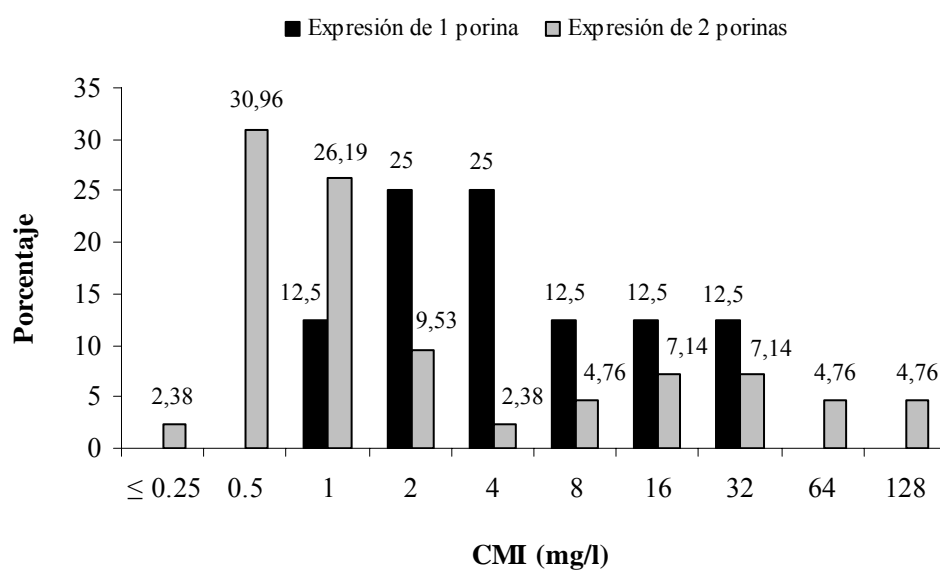


Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que, las que expresaron una sola, presentaron una CMI media significativamente más elevada ($p=0,000$)

4.6.1.4. Cefotaxima

En la figura 13 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 13: Distribución de los aislados en función de la CMI para cefotaxima

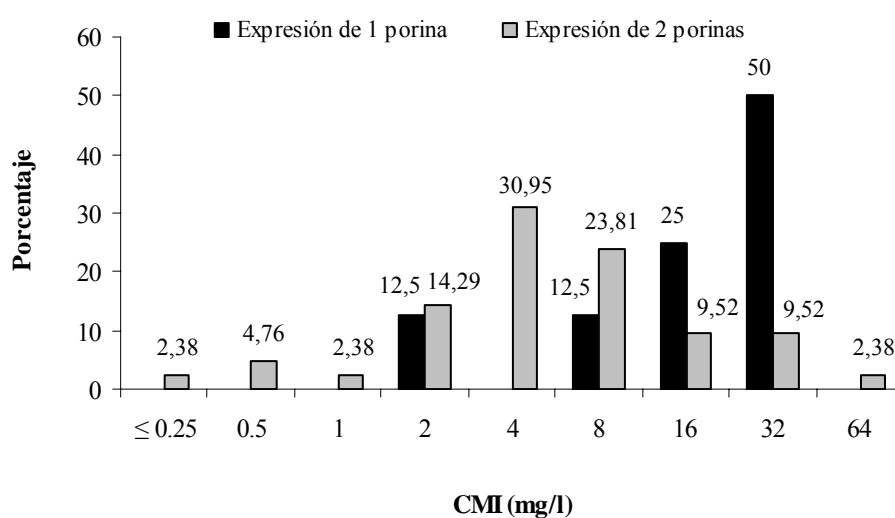


Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que no existieron diferencias entre las CMIs de ambos grupos ($p=0,262$)

4.6.1.5. Cefepima

En la figura 14 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 14: Distribución de los aislados en función de la CMI para cefepima

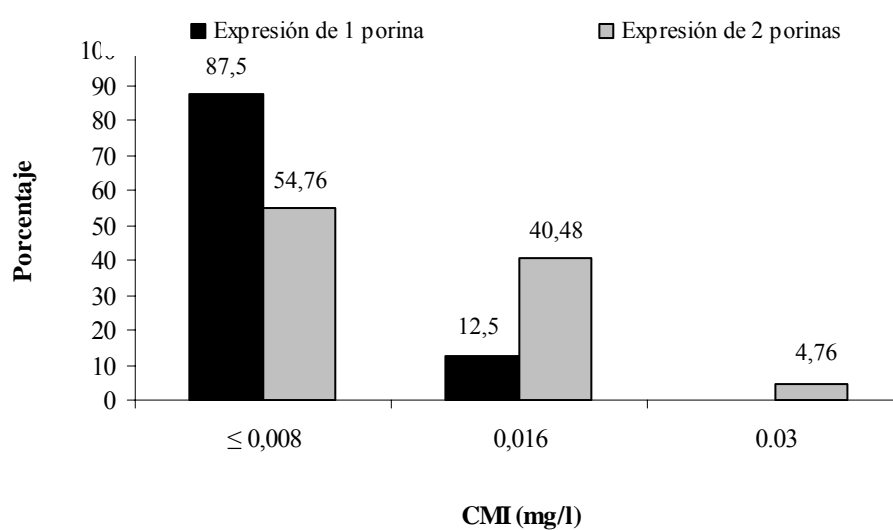


Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que las que expresaron una sola, presentaron una CMI media significativamente más elevada ($p=0,012$)

4.6.1.6. Imipenem

En la figura 15 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 15: Distribución de los aislados en función de la CMI para imipenem

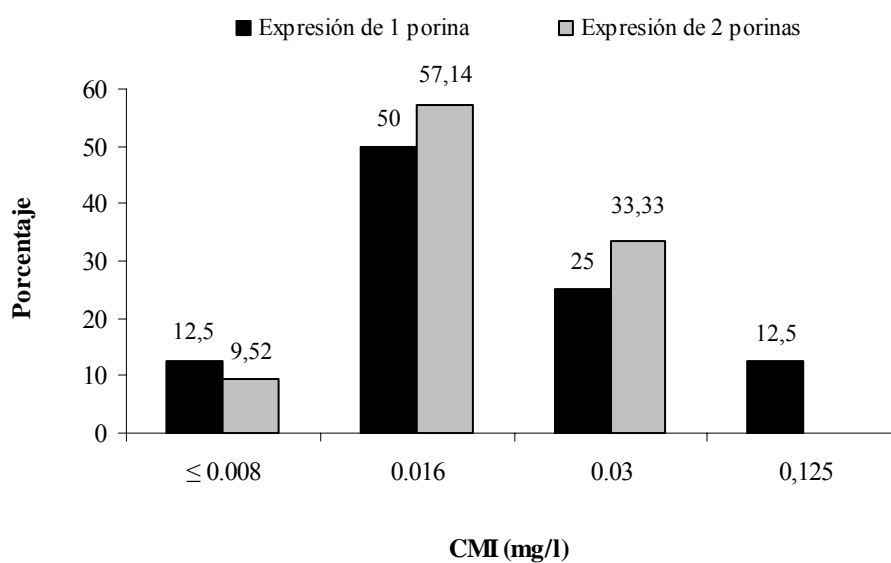


Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que, en este caso, las que expresaron una sola, presentaron indicios de una CMI media significativamente más elevada ($p=0,084$)

4.6.1.7. Meropenem

En la figura 16 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 16: Distribución de los aislados en función de la CMI para meropenem

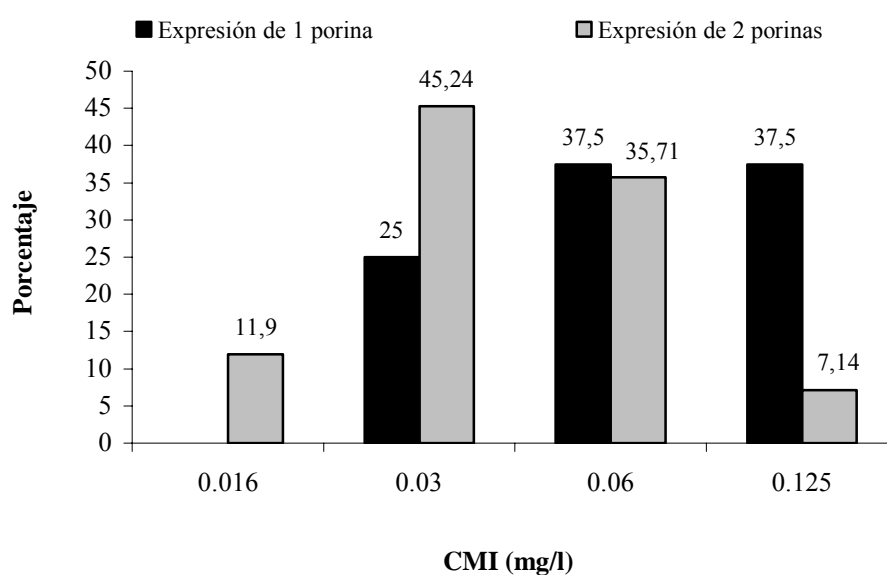


Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que no existieron diferencias entre las CMIs de ambos grupos ($p=0,323$)

4.6.1.8. Ertapenem

En la figura 17 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 17: Distribución de los aislados en función de la CMI para ertapenem

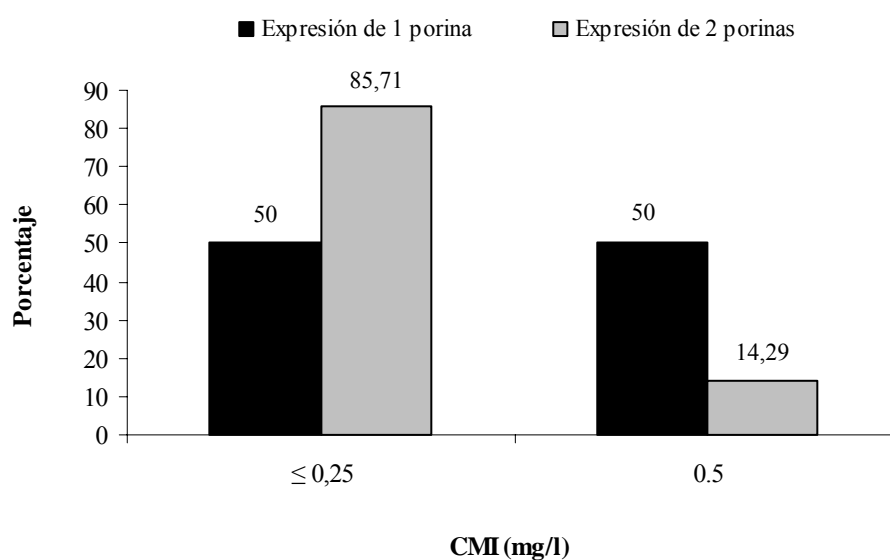


Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que las que expresaron una sola, presentaron una CMI media significativamente más elevada ($p=0,017$)

4.6.1.9. Amikacina

En la figura 18 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 18: Distribución de los aislados en función de la CMI para amikacina

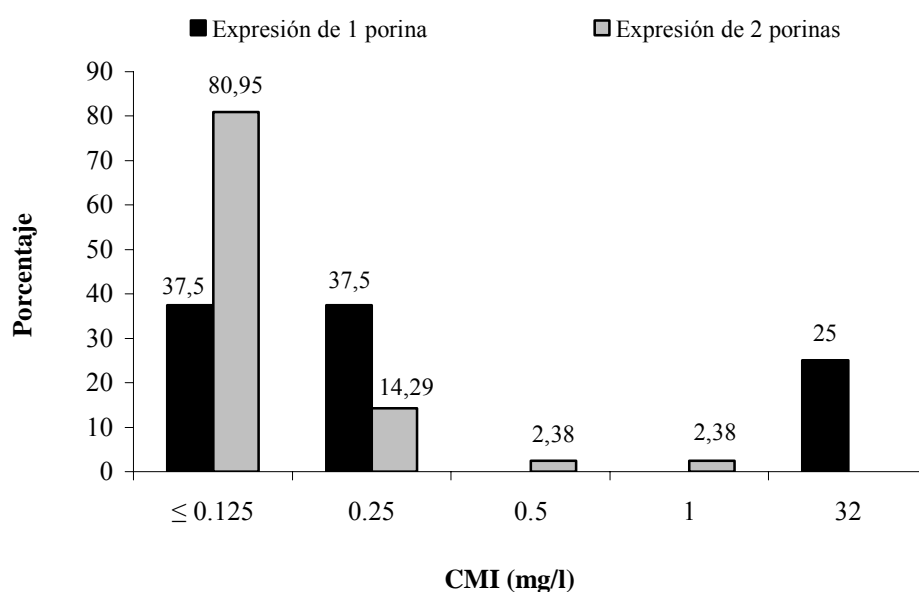


Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que, en este caso, no existieron diferencias entre las CMIs de ambos grupos ($p=0,339$)

4.6.1.10. Tobramicina

En la figura 19 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 19: Distribución de los aislados en función de la CMI para tobramicina

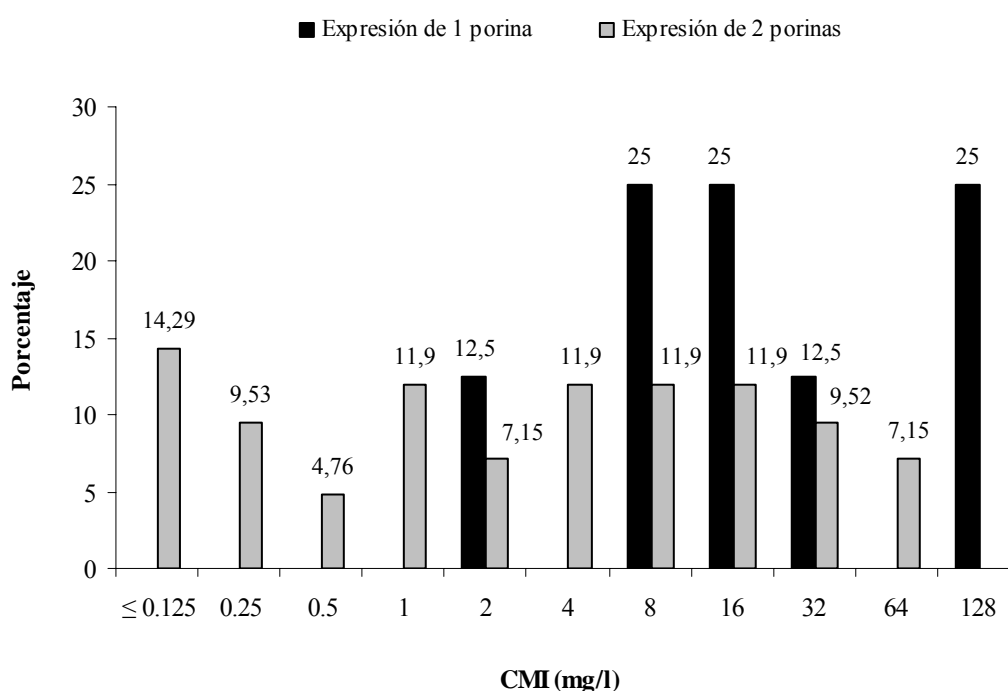


Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que las que expresaron una sola, presentaron una CMI media significativamente más elevada ($p=0,000$)

4.6.1.11. Ciprofloxacino

En la figura 20 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 20: Distribución de los aislados en función de la CMI para ciprofloxacino

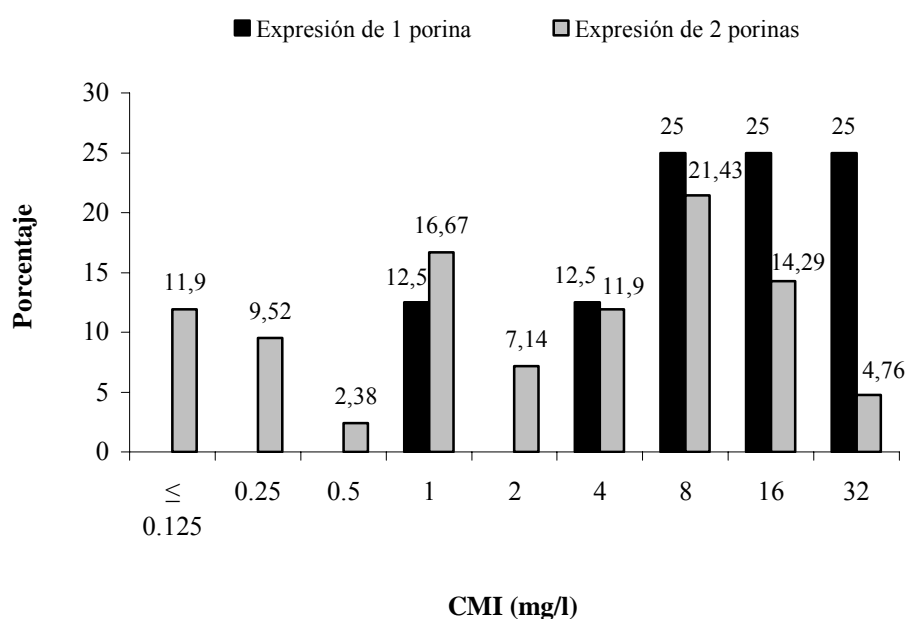


Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que las que expresaron una sola, presentan una CMI media significativamente más elevada ($p=0,009$)

4.6.1.12. Levofloxacinó

En la figura 21 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 21: Distribución de los aislados en función de la CMI para levofloxacinó



Comparando los 8 aislados que expresaron una sola porina respecto a los 42 que expresaron dos, encontramos que las que expresaron una sola, presentaron una CMI media significativamente más elevada ($p=0,026$)

4.6.2. En medio MH

Los resultados de las pruebas estadísticas para establecer la relación entre la expresión de uno o dos tipos de porinas en MH, y la sensibilidad a los distintos antibióticos, en términos de CMI, son los siguientes (tabla 38).

Tabla 38: Asociación estadística entre sensibilidad antibiótica y expresión de uno o dos tipos de porinas en medio MH

Antibióticos	Expresión de porinas	Valores ajustados según el test estadístico		P
		Media	Desviación típica	
Amoxicilina-clavulánico	2 porinas	2,69	0,1682	0,136
	1 porina	2,19	0,2839	
Piperacilina-tazobactam	2 porinas	1,00	0,2839	0,190
	1 porina	0,25	0,4917	
Cefoxitina	2 porinas	1,34	0,1762	0,007
	1 porina	2,31	0,2970	
Ceftazidima	2 porinas	1,68	0,9192	0,972
	1 porina	1,71	0,5418	
Cefepima	2 porinas	1,68	0,2833	0,185
	1 porina	2,47	0,5196	
Imipenem	2 porinas	-3,66	0,2479	0,303
	1 porina	-3,36	0,1477	
Meropenem	2 porinas	-5,79	0,3409	0,582
	1 porina	-6,00	0,1823	
Ertapenem	2 porinas	-5,72	0,4003	0,051
	1 porina	-4,82	0,2059	
Amikacina	2 porinas	-0,11	0,2541	0,479
	1 porina	0,10	0,1505	
Tobramicina	2 porinas	-1,41	0,6397	0,076
	1 porina	-0,08	0,3692	
Ciprofloxacino	2 porinas	2,87	0,8263	0,648
	1 porina	3,29	0,4008	
Levofloxacino	2 porinas	0,77	0,6076	0,064
	1 porina	2,08	0,3359	

4.6.2.1. Amoxicilina-ácido clavulánico

En la tabla 39 se muestra la relación entre los valores de las categorías clínicas frente a este antibiótico y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs en medio MH.

Tabla 39: Relación entre los valores de las categorías clínicas frente a amoxicilina-ácido clavulánico y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs

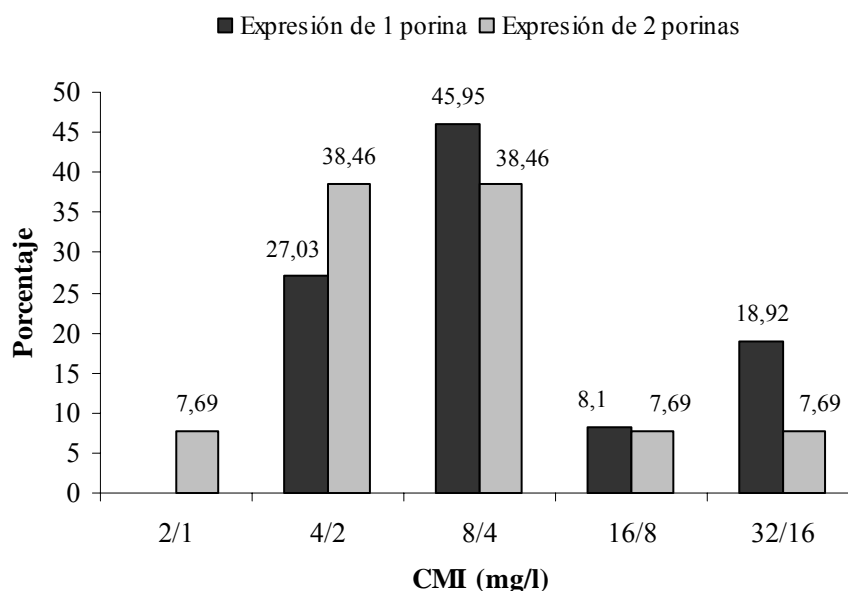
Amoxicilina/clavulánico		Patrón de expresión		
Categoría clínica		OmpF o C	OmpC	OmpF y C
Resistente	Recuento	3	4	1
	%	37,5%	50,0%	12,5%
Intermedio	Recuento	1	2	1
	%	25,0%	50,0%	25,0%
Sensible	Recuento	4	23	11
	%	10,5%	60,5%	28,9%
Total	Recuento	8	29	13
	%	16,0%	58,0%	26,0%

Si se analiza la influencia de la presencia de uno o dos tipos de porinas sobre la categoría clínica (R o S), encontramos que, en MH, no

existió asociación entre la resistencia a amoxicilina/clavulánico y la expresión de una sola porina ($p=0,480$).

En la figura 22 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 22: Distribución de los aislados en función de la CMI para amoxicilina-ácido clavulánico



Comparando las 37 cepas que expresaron una sola porina respecto a las 13 que expresaron dos, encontramos que, al igual que respecto a la categoría clínica, no existieron diferencias entre las CMIs de ambos grupos ($p=0,136$)

4.6.2.2. Piperacilina-tazobactam

En la tabla 40 se muestra la relación entre los valores de las categorías clínicas frente a este antibiótico y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs en medio MH.

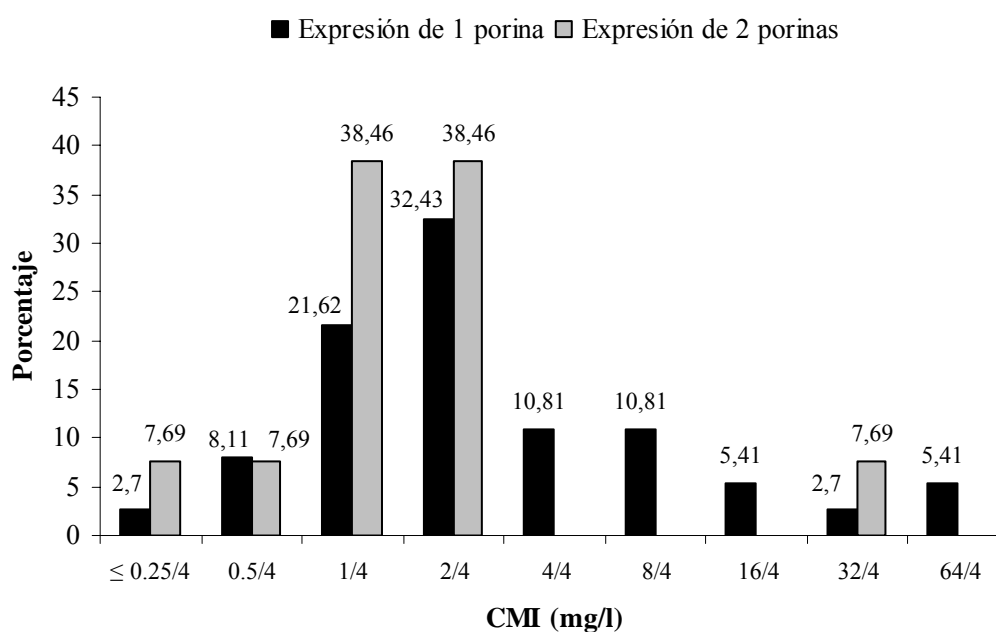
Tabla 40: Relación entre los valores de las categorías clínicas frente a piperacilina-tazobactam y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs

Piperacilina/tazobactam		Patrón de expresión		
Categoría clínica		OmpF o C	OmpC	OmpF y C
Intermedio	Recuento	1	2	1
	%	25,0%	50,0%	25,0%
Sensible	Recuento	7	27	12
	%	15,2%	58,7%	26,1%
Total	Recuento	8	29	13
	%	16,0%	58,0%	26,0%

Si se analiza la influencia de la presencia de uno o dos tipos de porinas sobre la categoría clínica (R o S), encontramos que, en MH, no existió asociación entre la resistencia a piperacilina-tazobactam y la expresión de una sola porina ($p=1,000$).

En la figura 23 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 23: Distribución de los aislados en función de la CMI para piperacilina-tazobactam



Comparando las 37 cepas que expresaron una sola porina respecto a las 13 que expresaron dos, encontramos que, al igual que respecto a la categoría clínica, no existieron diferencias entre las CMIs de ambos grupos ($p=0,190$)

4.6.2.3. Cefoxitina

En la tabla 41 se muestra la relación entre los valores de las categorías clínicas frente a este antibiótico y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs en medio MH.

Tabla 41: Relación entre los valores de las categorías clínicas frente a cefoxitina y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs

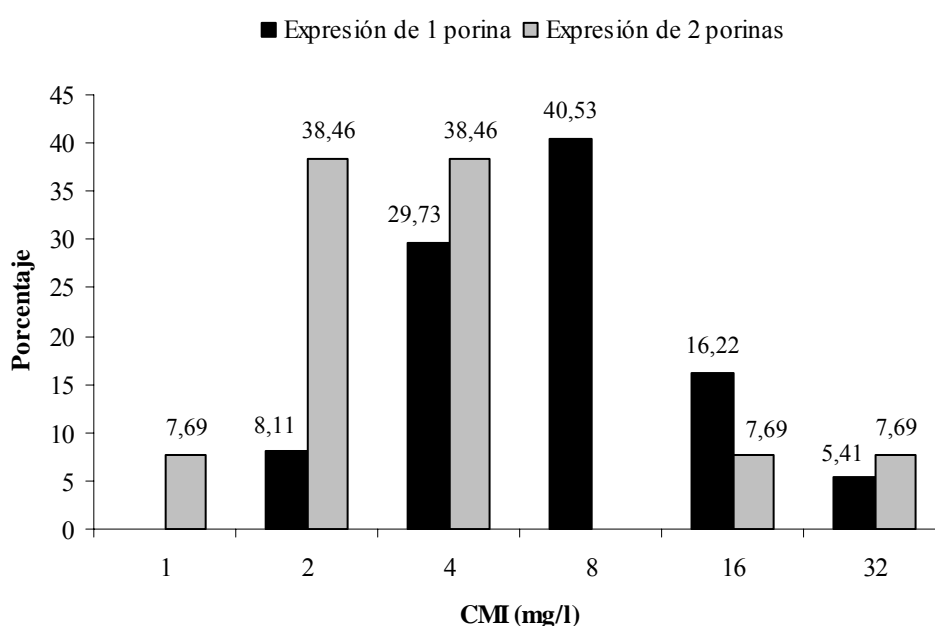
Cefoxitina		Patrón de expresión		
Categoría clínica		OmpF o C	OmpC	OmpF y C
Resistente	Recuento	1	1	1
	%	33,3%	33,3%	33,3%
Intermedio	Recuento	4	2	1
	%	57,1%	28,6%	14,3%
Sensible	Recuento	3	26	11
	%	7,5%	65,0%	27,5%
Total	Recuento	8	29	13
	%	16,0%	58,0%	26,0%

Si se analiza la influencia de la presencia de uno o dos tipos de porinas sobre la categoría clínica (R o S), encontramos que, en MH, no

existió asociación entre la resistencia a cefoxitina y la expresión de una sola porina ($p=1,000$).

En la figura 24 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 24: Distribución de los aislados en función de la CMI para cefoxitina



Sin embargo, comparando las 37 cepas que expresaron una sola porina respecto a las 13 que expresaron dos, encontramos que las que expresaron una sola, presentaron una CMI media significativamente más elevada ($p=0,007$)

4.6.2.4. Ceftazidima

En la tabla 42 se muestra la relación entre los valores de las categorías clínicas frente a este antibiótico y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs en medio MH.

Tabla 42: Relación entre los valores de las categorías clínicas frente a ceftazidima y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs

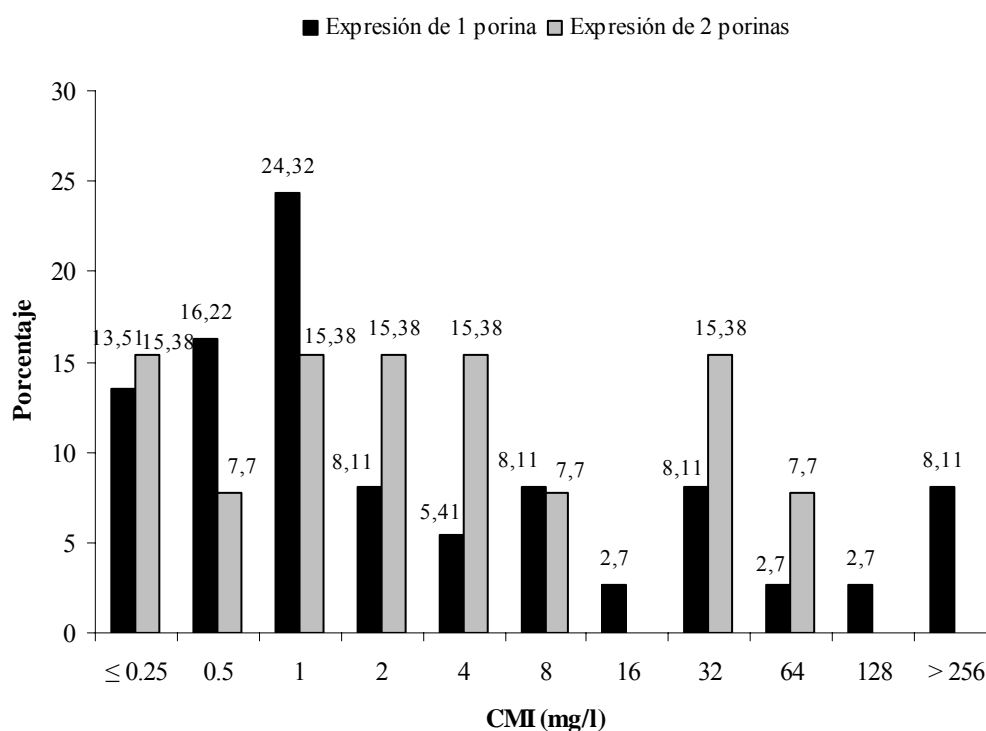
Ceftazidima		Patrón de expresión		
Categoría clínica		OmpF o C	OmpC	OmpF y C
Resistente	Recuento	2	6	3
	%	18,2%	54,5%	27,3%
Intermedio	Recuento	1	0	0
	%	100,0%	,0%	,0%
Sensible	Recuento	5	23	10
	%	13,2%	60,5%	26,3%
Total	Recuento	8	29	13
	%	16,0%	58,0%	26,0%

Si se analiza la influencia de la presencia de uno o dos tipos de porinas sobre la categoría clínica (R o S), encontramos que, en MH, no

existió asociación entre la resistencia a ceftazidima y la expresión de una sola porina ($p=1,000$).

En la figura 25 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 25: Distribución de los aislados en función de la CMI para ceftazidima



Comparando las 37 cepas que expresaron una sola porina respecto a las 13 que expresaron dos, encontramos que, al igual que respecto a la categoría clínica, no existieron diferencias entre las CMIs de ambos grupos ($p=0,972$)

4.6.2.5. Cefepima

En la tabla 43 se muestra la relación entre los valores de las categorías clínicas frente a este antibiótico y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs en medio MH.

Tabla 43: Relación entre los valores de las categorías clínicas frente a cefepima y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs

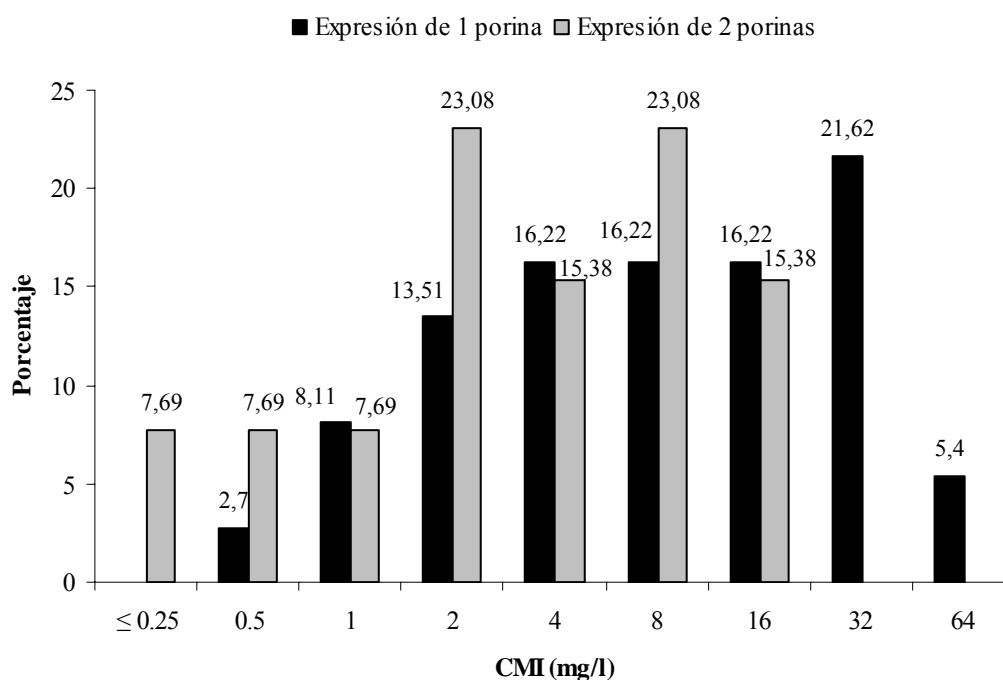
Cefepima		Patrón de expresión		
Categoría clínica		OmpF o C	OmpC	OmpF y C
Resistente	Recuento	5	5	0
	%	50,0%	50,0%	,0%
Intermedio	Recuento	1	5	2
	%	12,5%	62,5%	25,0%
Sensible	Recuento	2	19	11
	%	6,3%	59,4%	34,4%
Total	Recuento	8	29	13
	%	16,0%	58,0%	26,0%

Si se analiza la influencia de la presencia de uno o dos tipos de porinas sobre la categoría clínica (R o S), encontramos que, en MH, hubo

indicios de asociación entre la resistencia a cefepima y la expresión de una sola porina ($p=0,098$).

En la figura 26 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 26: Distribución de los aislados en función de la CMI para cefepima



Comparando las 37 cepas que expresaron una sola porina respecto a las 13 que expresaron dos, encontramos que, en este caso, no existieron diferencias entre las CMIs de ambos grupos ($p=0,185$)

4.6.2.6. Imipenem, meropenem, ertapenem y amikacina

En la tabla 44 se muestra la relación entre los valores de las categorías clínicas frente a estos antibióticos y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs en medio MH.

Tabla 44: Relación entre los valores de las categorías clínicas frente a imipenem, meropenem, ertapenem y amikacina y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs

Imipenem, meropenem, ertapenem y amikacina		Patrón de expresión		
		Categoría clínica	OmpF o C	OmpC
Sensible	Recuento	8	29	13
	%	16,0%	58,0%	26,0%
Total	Recuento	8	29	13
	%	16,0%	58,0%	26,0%

En el caso de imipenem, meropenem, ertapenem y amikacina, el 100% de las cepas fueron sensibles, luego, en ninguno de los supuestos estudiados, existió la posibilidad de medir la asociación entre la expresión de porinas y la categoría clínica.

En las figuras 27 a 30 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para cada uno de estos antibióticos.

Figura 27: Distribución de los aislados en función de la CMI para imipenem

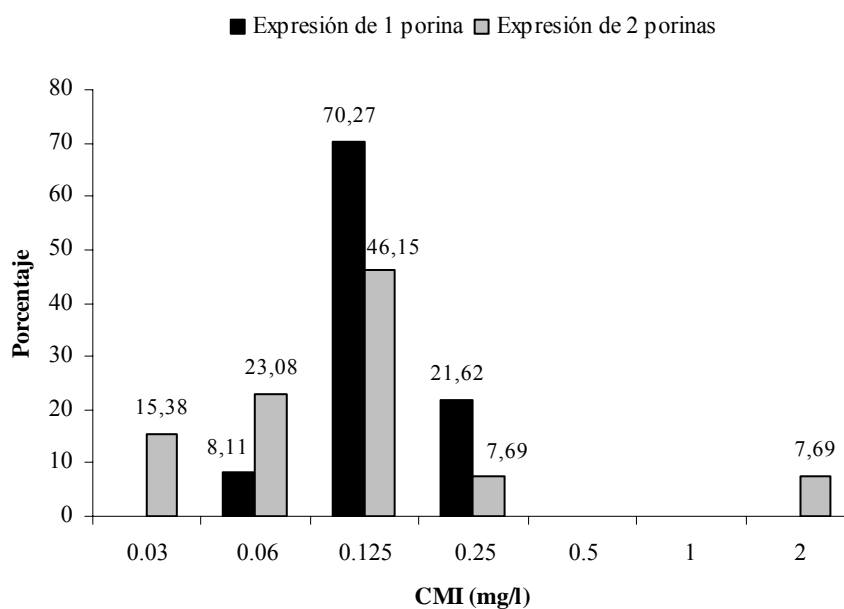


Figura 28: Distribución de los aislados en función de la CMI para meropenem

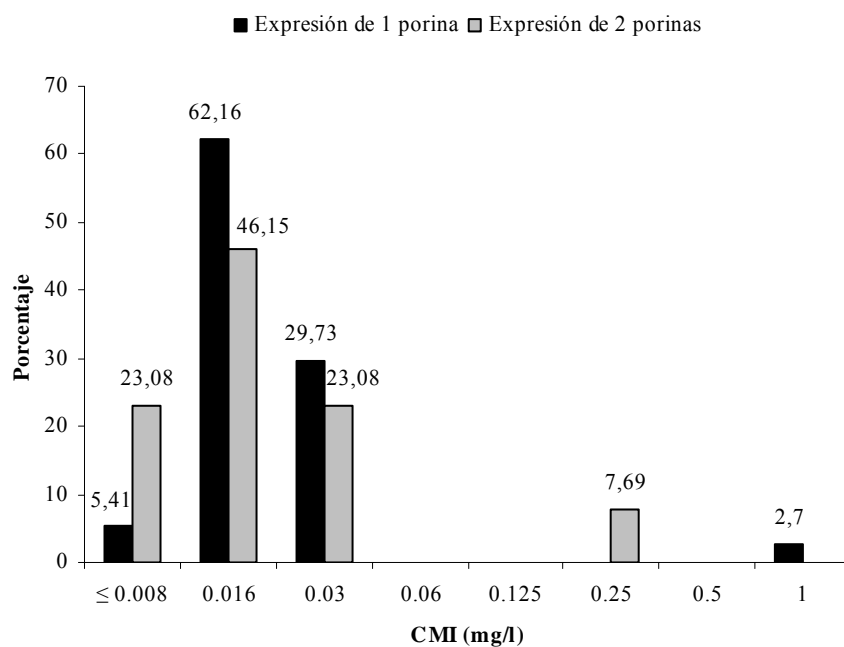


Figura 29: Distribución de los aislados en función de la CMI para ertapenem

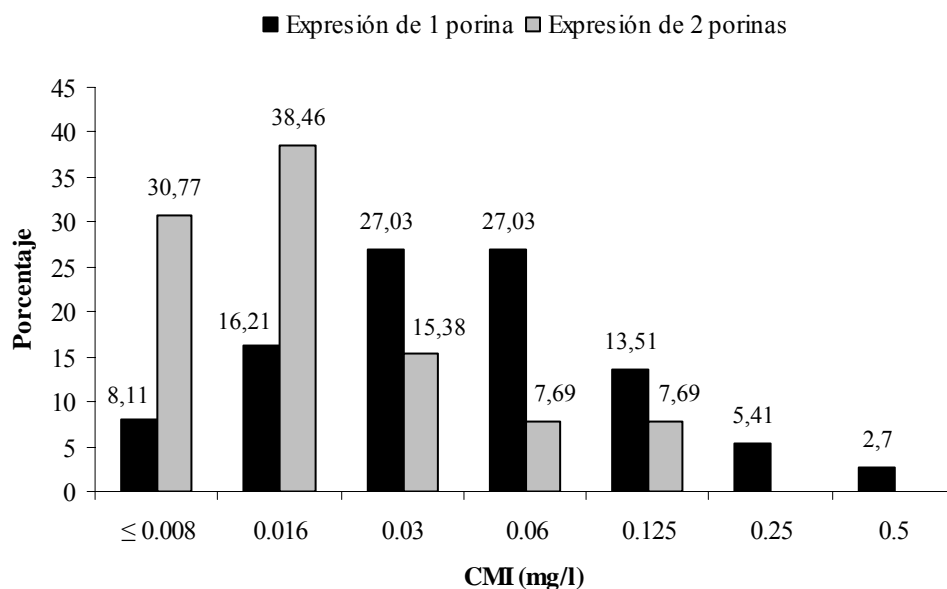
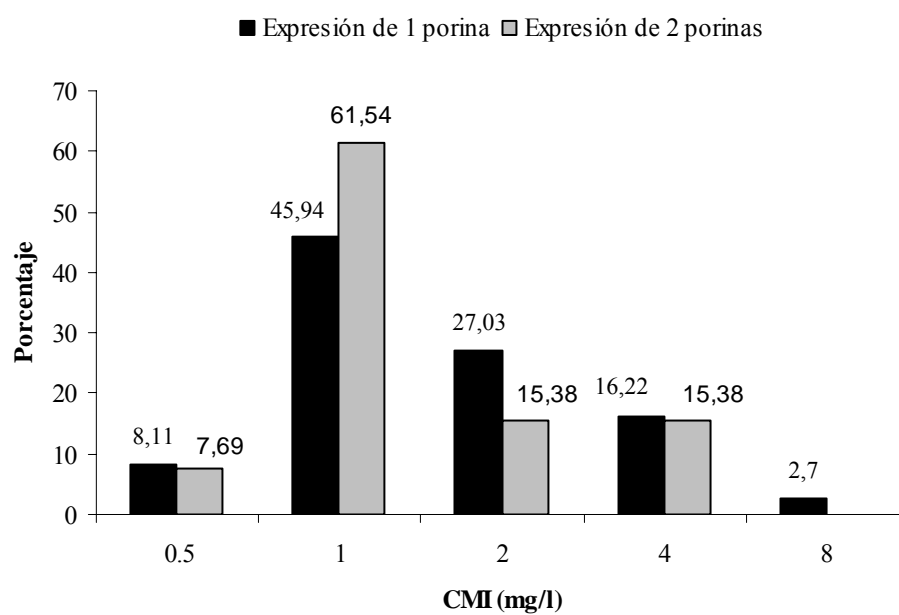


Figura 30: Distribución de los aislados en función de la CMI para amikacina



Comparando las 37 cepas que expresaron una sola porina respecto a las 13 que expresaron dos, encontramos que no existieron diferencias entre las CMI de ambos grupos para imipenem, meropenem y amikacina y la expresión de uno o dos tipos de porinas ($p=0,303$; $p=0,582$; $p=0,479$; $p=0,226$, respectivamente). Sin embargo, sí hubo indicios de asociación para ertapenem ($p= 0,051$), en el sentido en que las que expresaron una sola porina presentaron una CMI media más elevada

4.6.2.7. Tobramicina

En la tabla 45 se muestra la relación entre los valores de las categorías clínicas frente a este antibiótico y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs en medio MH.

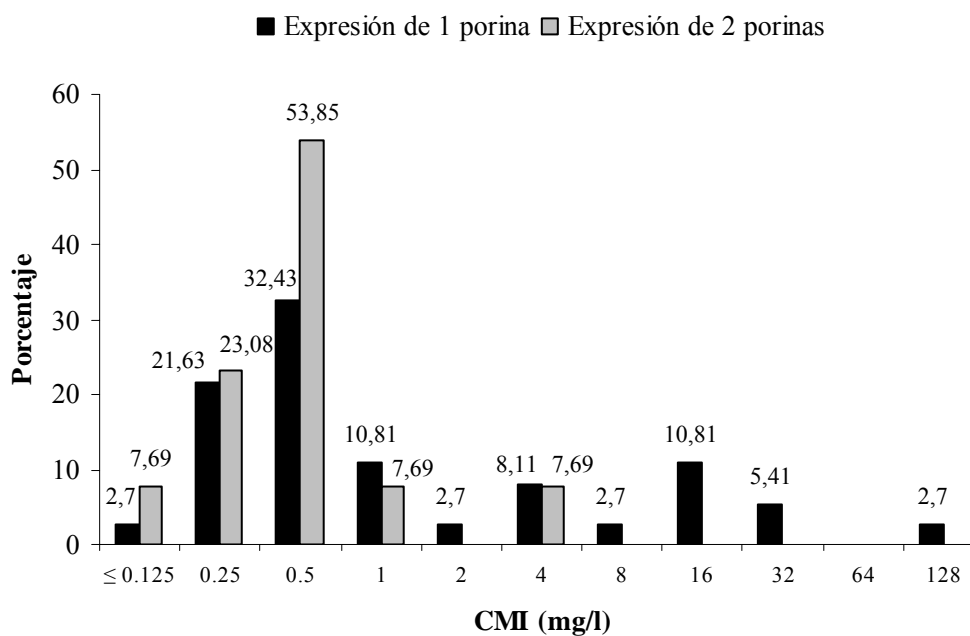
Tabla 45: Relación entre los valores de las categorías clínicas frente a tobramicina y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs

Tobramicina		Patrón de expresión		
		OmpF o C	OmpC	OmpF y C
Categoría clínica		OmpF o C	OmpC	OmpF y C
Resistente	Recuento	4	3	0
	%	57,1%	42,9%	0%
Intermedio	Recuento	0	1	0
	%	0%	100,0%	0%
Sensible	Recuento	4	25	13
	%	9,5%	59,5%	31,0%
Total	Recuento	8	29	13
	%	16,0%	58,0%	26,0%

Si se analiza la influencia de la presencia de uno o dos tipos de porinas sobre la categoría clínica (R o S), encontramos que, en MH, hubo indicios de asociación entre la resistencia a tobramicina y la expresión de una sola porina ($p=0,093$).

En la figura 31 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 31: Distribución de los aislados en función de la CMI para tobramicina



Comparando las 37 cepas que expresaron una sola porina respecto a las 13 que expresaron dos, encontramos, también, que las que expresaron una sola, presentaron indicios de una CMI media significativamente más elevada ($p=0,076$)

4.6.2.8. Ciprofloxacino

En la tabla 46 se muestra la relación entre los valores de las categorías clínicas frente a este antibiótico y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs en medio MH.

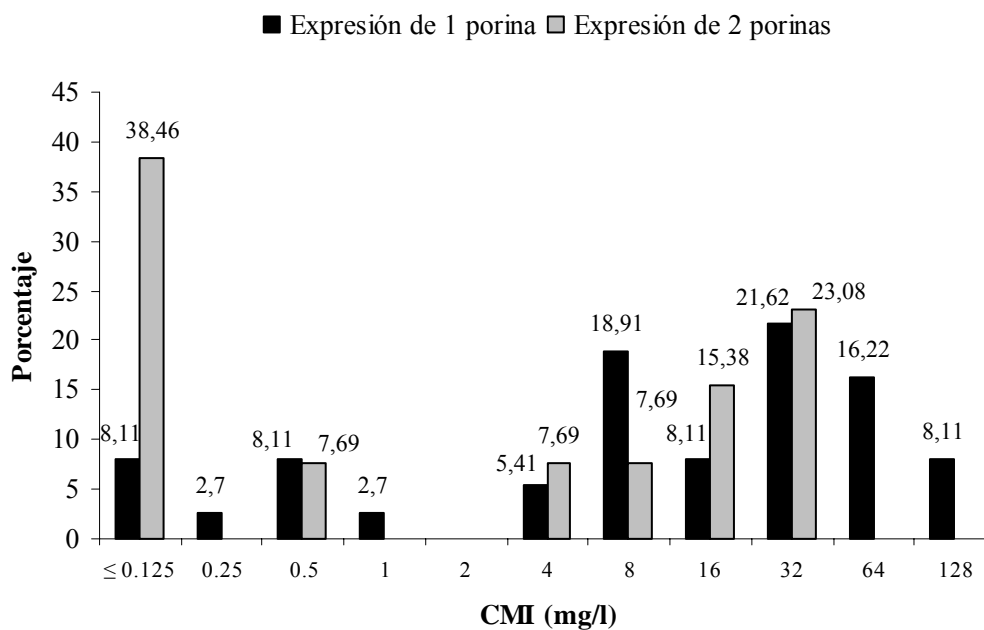
Tabla 46: Relación entre los valores de las categorías clínicas frente a ciprofloxacino y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs

Ciprofloxacino		Patrón de expresión		
Categoría clínica		OmpF o C	OmpC	OmpF y C
Resistente	Recuento	8	21	7
	%	22,2%	58,3%	19,4%
Sensible	Recuento	0	8	6
	%	0%	57,1%	42,9%
Total	Recuento	8	29	13
	%	16,0%	58,0%	26,0%

Si se analiza la influencia de la presencia de uno o dos tipos de porinas sobre la categoría clínica (R o S), encontramos que, en MH, no existió asociación entre la resistencia a ciprofloxacino y la expresión de una sola porina ($p=0,149$).

En la figura 32 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 32: Distribución de los aislados en función de la CMI para ciprofloxacino



Comparando las 37 cepas que expresaron una sola porina respecto a las 13 que expresaron dos, encontramos que, tampoco en este caso, hubo diferencias entre las CMIs de ambos grupos ($p=0,185$)

4.6.2.9. Levofloxacino

En la tabla 47 se muestra la relación entre los valores de las categorías clínicas frente a este antibiótico y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs en medio MH.

Tabla 47: Relación entre los valores de las categorías clínicas frente a levofloxacino y los patrones de expresión de porinas encontrados en los aislados de *E. coli* productores de BLEEs

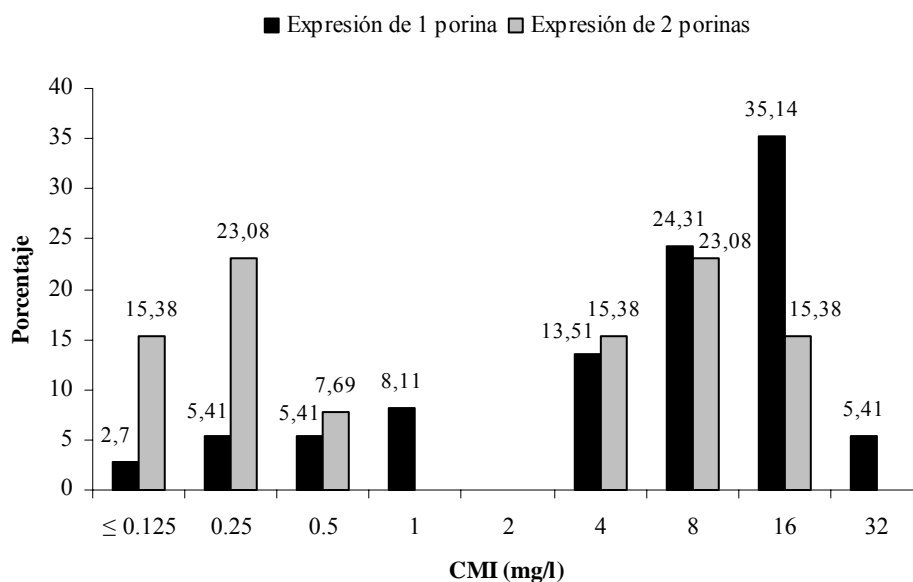
Levofloxacino		Patrón de expresión		
Categoría clínica		OmpF o C	OmpC	OmpF y C
Resistente	Recuento	7	18	5
	%	23,3%	60,0%	16,7%
Intermedio	Recuento	1	3	2
	%	16,7%	50,0%	33,3%
Sensible	Recuento	0	8	6
	%	0%	57,1%	42,9%
Total	Recuento	8	29	13
	%	16,0%	58,0%	26,0%

Si se analiza la influencia de la presencia de uno o dos tipos de porinas sobre la categoría clínica (R o S), encontramos que, en MH, no

hubo asociación entre la resistencia a levofloxacino y la expresión de una sola porina ($p=0,149$).

En la figura 33 observamos la distribución de los aislados, que expresaron uno o dos tipos de porinas, según el valor de CMI para este antibiótico.

Figura 33: Distribución de los aislados en función de la CMI para levofloxacino



Sin embargo, comparando las 37 cepas que expresaron una sola porina respecto a las 13 que expresaron dos, encontramos que las que expresaron una sola, presentaron indicios de una CMI media significativamente más elevada ($p=0,064$)

4.6.3. Influencia del tipo de porinas y el medio de cultivo sobre el valor de CMI

Los resultados de las pruebas estadísticas que establecen si existe variación de los valores de CMI de los aislados dependiendo del medio de cultivo, y, en su caso, si esta variación depende de la modificación en la expresión de porinas o sólo de las características del medio, se muestran en la tabla 48.

Tabla 48: Valores de media y desviación típica ajustados según el test estadístico

Antibiótico	Medio	Valores ajustados según el test estadístico	Grupo A (n=21)	Grupo B (n=29)	Total (A + B)
Amoxicilina-clavulánico	NB	Media	2,52	2,59	2,56
		Desviación típica	0,2151	0,1655	0,1863
	MH	Media	2,57	2,50	2,53
		Desviación típica	0,2168	0,1595	0,1836
	Total (A + B)	Media	2,55	2,54	2,54
		Desviación típica	0,2160	0,1625	0,1849
Piperacilina-tazobactam	NB	Media	0,88	1,30	1,12
		Desviación típica	0,3320	0,2736	0,2981
	MH	Media	0,50	0,82	0,68
		Desviación típica	0,3318	0,2734	0,2979
	Total (A + B)	Media	0,69	1,06	0,90
		Desviación típica	0,3319	0,2735	0,2980
Cefoxitina	NB	Media	1,58	1,57	1,58
		Desviación típica	0,2423	0,2037	0,2199
	MH	Media	2,07	2,06	2,06
		Desviación típica	0,2420	0,2037	0,2198
	Total (A + B)	Media	1,83	1,81	1,82
		Desviación típica	0,2421	0,2037	0,2199

Grupo A: Aislados con el mismo número de porinas en ambos medios (1 en NB y MH, 2 en NB y MH)
 Grupo B: Aislados con diferente número de porinas en ambos medios (2 en NB y 1 en MH)

Tabla 48 (continuación)

Antibiótico	Medio	Valores ajustados según el test estadístico	Grupo A (n=21)	Grupo B (n=29)	Total
Ceftazidima	NB	Media	1,55	0,19	0,76
		Desviación típica	0,4982	0,4810	0,4882
	MH	Media	1,55	0,59	0,99
		Desviación típica	0,4982	0,4814	0,4885
	Total (A + B)	Media	1,55	0,39	0,88
		Desviación típica	0,4982	0,4812	0,4884
Cefepima	NB	Media	2,07	2,14	2,11
		Desviación típica	0,4041	0,4507	0,4311
	MH	Media	1,98	2,18	2,09
		Desviación típica	0,4040	0,4504	0,4309
	Total (A + B)	Media	2,02	2,16	2,10
		Desviación típica	0,4040	0,4505	0,4310
Imipenem	NB	Media	-7,21	-6,95	-7,06
		Desviación típica	0,1646	0,1397	0,1502
	MH	Media	-3,49	-3,40	-3,44
		Desviación típica	0,1632	0,1399	0,1497
	Total (A + B)	Media	-5,35	-5,17	-5,25
		Desviación típica	0,1639	0,1398	0,1499
Meropenem	NB	Media	-6,26	-6,19	-6,22
		Desviación típica	0,2080	0,1773	0,1902
	MH	Media	-5,92	-6,26	-6,11
		Desviación típica	0,2074	0,1773	0,1900
	Total (A + B)	Media	-6,09	-6,22	-6,17
		Desviación típica	0,2077	0,1773	0,1901
Ertapenem	NB	Media	-4,88	-5,09	-5,00
		Desviación típica	0,2588	0,2202	0,2364
	MH	Media	-5,45	-5,26	-5,34
		Desviación típica	0,2583	0,2200	0,2361
	Total (A + B)	Media	-5,17	-5,17	-5,17
		Desviación típica	0,2586	0,2201	0,2363

Grupo A: Aislados con el mismo número de porinas en ambos medios (1 en NB y MH, 2 en NB y MH)

Grupo B: Aislados con diferente número de porinas en ambos medios (2 en NB y 1 en MH)

Tabla 48 (continuación)

Antibiótico	Medio	Valores ajustados según el test estadístico	Grupo A (n=21)	Grupo B (n=29)	Total
Amikacina	NB	Media	-2,21	-2,36	-2,30
		Desviación típica	0,1563	0,1333	0,1430
	MH	Media	0,03	0,05	0,05
		Desviación típica	0,1546	0,1316	0,1413
	Total (A + B)	Media	-1,09	-1,15	-1,13
		Desviación típica	0,1555	0,1325	0,1421
Tobramicina	NB	Media	-2,45	-3,23	-2,90
		Desviación típica	0,4324	0,3642	0,3928
	MH	Media	-0,26	-0,74	-0,54
		Desviación típica	0,4323	0,3641	0,3928
	Total (A + B)	Media	-1,36	-1,98	-1,72
		Desviación típica	0,4323	0,3642	0,3928
Ciprofloxacino	NB	Media	1,46	1,00	1,19
		Desviación típica	0,5665	0,3902	0,4643
	MH	Media	2,13	1,90	1,99
		Desviación típica	0,5667	0,3901	0,4643
	Total (A + B)	Media	1,79	1,45	1,59
		Desviación típica	0,5666	0,3902	0,4643
Levofloxacino	NB	Media	0,74	1,06	0,93
		Desviación típica	0,5324	0,3972	0,4540
	MH	Media	1,12	1,55	1,37
		Desviación típica	0,5325	0,3971	0,4540
	Total (A + B)	Media	0,93	1,31	1,15
		Desviación típica	0,5324	0,3972	0,4540

Grupo A: Aislados con el mismo número de porinas en ambos medios (1 en NB y MH, 2 en NB y MH)

Grupo B: Aislados con diferente número de porinas en ambos medios (2 en NB y 1 en MH)

Por tanto, llevado a cabo el análisis del diseño factorial se obtuvieron los siguientes resultados, analizados para cada antibiótico:

4.6.3.1. Amoxicilina-ácido clavulánico

Se encontró que la interacción no fue significativa ($p=0,372$), lo que indicó que los efectos del número de porinas y el medio no estaban asociados. Estudiados si los efectos individuales del número de porinas y del medio eran significativos, tampoco se encontró significación en ninguno de los casos ($p=0,727$). En definitiva, se puede decir que las medias de los valores de CMI de este antibiótico no se dejaron afectar ni por el número de porinas, ni por el medio de cultivo.

4.6.3.2. Piperacilina-tazobactam

Se encontró que la interacción no fue significativa ($p=0,634$), lo que indicó que los efectos del número de porinas y el medio no estaban asociados. Estudiados los efectos individuales del número de porinas y del medio, sólo se encontró significación en el medio ($p=0,013$), en el sentido de que la media de CMI en NB fue superior a la media de la CMI en MH. Se puede decir que las medias de los valores de CMI de este antibiótico se afectaron por el medio de cultivo, pero al no haberse obtenido interacción, podemos afirmar que el efecto del medio fue el mismo en los dos grupos (A y B)

4.6.3.3. Cefoxitina

Se encontró que la interacción no fue significativa ($p=0,988$), lo que indicó que los efectos del número de porinas y el medio no estaban asociados. Estudiados los efectos individuales del número de porinas y del medio, sólo se encontró significación en el medio ($p=0,0003$), en el sentido de que la media de CMI en NB fue inferior a la media de la CMI en MH. Se puede decir que las medias de los valores de CMI de este antibiótico se afectaron por el medio de cultivo, pero al no haberse obtenido interacción, podemos afirmar que el efecto del medio fue el mismo en los dos grupos (A y B)

4.6.3.4. Cefazidima

Se encontró que la interacción no fue significativa ($p=0,170$), lo que indicó que los efectos del número de porinas y el medio no estaban asociados. Estudiados si los efectos individuales del número de porinas y del medio eran significativos, tampoco se encontró significación en ninguno de los casos ($p=0,257$). En definitiva, se puede decir que las medias de los valores de CMI de este antibiótico no se afectaron ni por el número de porinas, ni por el medio de cultivo.

4.6.3.5. *Cefepima*

Se encontró que la interacción no fue significativa ($p=0,441$), lo que indicó que los efectos del número de porinas y el medio no estaban asociados. Estudiados si los efectos individuales del número de porinas y del medio eran significativos, tampoco se encontró significación en ninguno de los casos ($p=0,897$). En definitiva, se puede decir que las medias de los valores de CMI de este antibiótico no se afectaron ni por el número de porinas, ni por el medio de cultivo.

4.6.3.6. *Imipenem*

Se encontró que la interacción no fue significativa ($p=0,574$), lo que indicó que los efectos del número de porinas y el medio no estaban asociados. Estudiados los efectos individuales del número de porinas y del medio, sólo se encontró significación en el medio ($p<0,0001$), en el sentido de que la media de CMI en NB fue inferior a la media de la CMI en MH. Se puede decir que las medias de los valores de CMI de este antibiótico se afectaron por el medio de cultivo, pero al no haberse obtenido interacción, podemos afirmar que el efecto del medio fue el mismo en los dos grupos (A y B)

4.6.3.7. Meropenem

Se encontró que la interacción no fue significativa ($p=0,175$), lo que indicaba que los efectos del número de porinas y el medio no estaban asociados. Estudiados si los efectos individuales del número de porinas y del medio eran significativos, tampoco se encontró significación en ninguno de los casos ($p=0,485$). En definitiva, se puede decir que las medias de los valores de CMI de este antibiótico no se afectaron ni por el número de porinas, ni por el medio de cultivo.

4.6.3.8. Ertapenem

Se encontró que la interacción no fue significativa ($p=0,302$), lo que indicó que los efectos del número de porinas y el medio no estaban asociados. Estudiados si los efectos individuales del número de porinas y del medio eran significativos, tampoco se encontró significación en ninguno de los casos ($p=0,076$). En definitiva, se puede decir que las medias de los valores de CMI de este antibiótico no se afectaron ni por el número de porinas, ni por el medio de cultivo.

4.6.3.9. Amikacina

Se encontró que la interacción no fue significativa ($p=0,563$), lo que indicó que los efectos del número de porinas y el medio no estaban asociados. Estudiados los efectos individuales del número de porinas y del medio, sólo se encontró significación en el medio ($p<0,0001$), en el sentido de que la media de CMI en NB fue inferior a la media de la CMI en MH. Se puede decir que las medias de los valores de CMI de este antibiótico se afectaron por el medio de cultivo, pero al no haberse obtenido interacción, podemos afirmar que el efecto del medio fue el mismo en los dos grupos (A y B)

4.6.3.10. Tobramicina

Se encontró que la interacción no fue significativa ($p=0,535$), lo que indicó que los efectos del número de porinas y el medio no estaban asociados. Estudiados los efectos individuales del número de porinas y del medio, sólo se encontró significación en el medio ($p<0,0001$), en el sentido de que la media de CMI en NB fue inferior a la media de la CMI en MH. Se puede decir que las medias de los valores de CMI de este antibiótico se afectaron por el medio de cultivo, pero al no haberse obtenido interacción, podemos afirmar que el efecto del medio fue el mismo en los dos grupos (A y B)

4.6.3.11. *Ciprofloxacino*

Se encontró que la interacción fue significativa ($p=0,036$), lo que indicó que los efectos del número de porinas y el medio estaban asociados. A consecuencia de esto, se llevó a cabo la comparación entre medios para cada grupo. Se obtuvieron significaciones en ambos grupos entre NB y MH ($p=0,024$ para el grupo A, $p=0,0004$ para el grupo B), y, en ambos casos, en el sentido de que la media de CMI en NB fue inferior a la media de la CMI en MH, pero como la interacción fue significativa, hubo más diferencia entre medias en el grupo B.

4.6.3.12. *Levofloxacino*

Se encontró que la interacción no fue significativa ($p=1,000$), lo que indicó que los efectos del número de porinas y el medio no estaban asociados. Estudiados los efectos individuales del número de porinas y del medio, sólo se encontró significación en el medio ($p=0,013$), en el sentido de que la media de CMI en NB fue inferior a la media de la CMI en MH. Se puede decir que las medias de los valores de CMI de este antibiótico se afectaron por el medio de cultivo, pero al no haberse obtenido interacción, podemos afirmar que el efecto del medio fue el mismo en los dos grupos (A y B)

5. DISCUSIÓN

5.1. ACTIVIDAD *IN VITRO* DE DIVERSOS ANTIBIÓTICOS FRENTE A *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORES DE BLEEs

En la tabla 49 se muestran los resultados de sensibilidad obtenidos en el presente estudio, comparados con los obtenidos en otros trabajos recientes, para los diferentes antibióticos ensayados por microdilución en caldo Mueller-Hinton.

Tabla 49: Porcentaje de aislados sensibles a diversos antibióticos, en estudios recientes, sobre aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs

	Nuestro estudio	Casellas <i>et al.</i> , 2003	Sader <i>et al.</i> , 2005	Hoban <i>et al.</i> , 2005	Mulvey <i>et al.</i> , 2004
Amoxicilina-clavulánico	81,7	-	-	12,5	81
Piperacilina-tazobactam	95,7	75,6	86,2	79,2	89
Cefoxitina	91,3	-	29,8	-	-
Ceftazidima	67,8	7,4	60,6	20,8	93
Cefepima	80	24,3	93,8	50	-
Imipenem	100	100	100	100	100
Meropenem	100	-	-	-	-
Ertapenem	100	-	-	-	-
Amikacina	100	86,4	97,2	95,8	92
Tobramicina	87	-	-	-	56
Ciprofloxacino	27,8	-	68,7	-	49
Levofloxacino	27	37,8	-	12,5	50

- Antibiótico no ensayado

5.1.1. Actividad de amoxicilina-clavulánico

En este estudio amoxicilina-clavulánico presentó una actividad aceptable frente a *E. coli* productor de BLEEs, no existiendo diferencias de sensibilidad entre los dos tipos estudiados (CTX-M9 vs. SHV). Esta actividad frente a aislados productores de BLEEs se debe a la presencia de ácido clavulánico, que protege a amoxicilina de la hidrólisis mediada por betalactamasas, incluidas las de origen plasmídico.

Es muy importante determinar cual es la CMI de este antibiótico en este tipo de microorganismos, pues, por ejemplo, en el tratamiento de una ITU no complicada, en un paciente extrahospitalario, por un microorganismo portador de una BLEE, amoxicilina-clavulánico podría ser una buena opción terapéutica, siempre y cuando se muestre con CMIs bajas y en el rango de sensibilidad (Spanu *et al.*, 2002; Oliver y Cantón, 2004).

En cualquier caso, el comportamiento de esta combinación de antibióticos ante la presencia de una BLEE es variable, pudiéndose mostrar activo o no, según el caso. Como apreciamos en la tabla 49, en otros estudios los resultados de sensibilidad para amoxicilina-clavulánico son similares a los obtenidos por nosotros (Mulvey *et al.*, 2004), aunque esto no ocurre en todos los casos (Hoban *et al.*, 2005).

La coexistencia en el mismo microorganismo productor de BLEE de una enzima AmpC (*E. coli*) o SHV-1 (*K. pneumoniae*), o, en menor

medida, las alteraciones de la permeabilidad o la hiperproducción de la propia BLEE, pueden hacer que la combinación amoxicilina-clavulánico se muestre poco activa (Navarro *et al.*, 2002).

5.1.2. Actividad de piperacilina-tazobactam

Piperacilina-tazobactam se mostró muy activo frente a los aislados productores de BLEEs, con un porcentaje de aislados sensibles similar al estudio de Mulvey *et al.* (2004), y ligeramente superior al de los estudios de Casellas *et al.* (2003), Sader *et al.* (2005) o Hoban *et al.* (2005) (tabla 49), y sin diferencias significativas entre ambos grupos de aislados (productores de CTX-M9 y de SHV).

Según algunos autores, piperacilina-tazobactam es una buena opción terapéutica, a nivel hospitalario, para pacientes con infecciones sistémicas por microorganismos productores de BLEEs, siempre y cuando presente CMIs dentro del rango de sensibilidad (Spanu *et al.*, 2002); otros, sin embargo, no aconsejan su uso por haberse producido fracasos terapéuticos (Johnson *et al.*, 2002).

5.1.3. Actividad de cefoxitina

Cefoxitina, *in vitro*, es un antibiótico que se muestra activo frente a las BLEEs, salvo que coexistan en el mismo aislado la presencia de estas enzimas con alteraciones de la permeabilidad, cefamicinasas o

betalactamasas AmpC hiperproducidas, en cuyo caso, existirá resistencia a cefoxitina por estos mecanismos (Navarro *et al.*, 2002).

La sensibilidad de los aislados productores de BLEEs a cefoxitina es variable dependiendo de los estudios (Sader *et al.*, 2005) (tabla 49). En nuestro caso, la actividad demostrada fue superior al estudio de Sader, y no se apreciaron diferencias significativas en su actividad entre ambos grupos de aislados.

Sin embargo, y considerando que su uso clínico no es aconsejable frente a este tipo de microorganismos, debido a la selección de mutantes resistentes de permeabilidad (Martínez-Martínez *et al.*, 1996), siempre debe ser informado como resistente. Sólo es una posibilidad cuando no existe ninguna otra alternativa.

5.1.4. Actividad de cefepima

La sensibilidad de los aislados productores de BLEEs a cefepima es variable dependiendo de los estudios (Casellas *et al.*, 2003; Sader *et al.*, 2005; Hoban *et al.*, 2005) (tabla 49). Sin embargo, su uso clínico no es aconsejable, por haberse descrito fracasos terapéuticos (Paterson *et al.*, 2001b).

Los aislados productores de CTX-M9 presentaron, de forma significativa, valores más elevados de CMI para cefepime, ya que estas

enzimas hidrolizan este antibiótico con mayor eficacia que las SHV (Yu *et al.*, 2002).

5.1.5. Actividad de ceftazidima

Como es propio de la menor capacidad hidrolítica de las enzimas CTX-M9 sobre ceftazidima (Bradford, 2001), las CMIs obtenidas en este grupo son significativamente inferiores, y en el rango de sensibilidad, respecto a las obtenidas entre los aislados productores de SHV. Casellas *et al.*, (2003) y Hoban *et al.*, (2005) (tabla 49) encontraron un porcentaje de sensibilidad muy inferior al nuestro, mientras que en el estudio de Sader *et al.* (2005) el resultado fue muy similar, y para Mulvey *et al.* (2004) la sensibilidad a ceftazidima fue muy alta.

5.1.6. Actividad de los antibióticos carbapenémicos

Imipenem, meropenem y ertapenem fueron los únicos antibióticos betalactámicos que se mostraron activos en el 100% de los aislados, y sin diferencias significativas entre ambos tipos de enzimas, siendo meropenem el antibiótico que presentó las CMIs más bajas para cada aislado, convirtiéndose así en la mejor opción, *in vitro*, de entre todos los antibióticos ensayados.

De la misma forma, en el estudio de DeRyke *et al.*, (2007) también el antibiótico carbapenémico más activo, *in vitro*, frente a

aislados de *E. coli* productores de BLEEs fue meropenem, con una CMI media de 0,125 µg/ml (rango 0,03-32 µg/ml), mientras que para ertapenem fue de 0,5 µg/ml (rango 0,012-128 µg/ml). En el trabajo de Colodner *et al.*, (2007), en el que se estudió la sensibilidad de 1011 aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs frente a diferentes antibióticos, se observó que los únicos antibióticos que mantenían su actividad intacta fueron los carbapenémicos y de estos, también meropenem presentó los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ más bajos (0,06 y 0,19, respectivamente).

5.1.7. Actividad de los aminoglucósidos

Amikacina se mostró activa en el 100% de los aislados productores de BLEEs, sin diferencias significativas entre ambos grupos de enzimas. En otros estudios (tabla 49) se comprueba, en general, la excelente actividad de este antibiótico en este tipo de microorganismos.

Tobramicina también se mostró muy activa entre estos aislados, mostrándose significativamente más activa entre los aislados productores de CTX-M9.

5.1.8. Actividad de fluorquinolonas

Las quinolonas se mostraron poco activas, sin diferencias significativas entre los grupos de aislados productores de CTX-M9 y SHV.

La asociación entre la producción de BLEEs y la resistencia a estos antibióticos es bien conocida (Valverde *et al.*, 2004), aunque no se produce en todos los casos (Sader *et al.*, 2005) (tabla 49).

En el trabajo de Lautenbach *et al.* (2001b) el 55,8% de los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs fueron resistentes a fluorquinolonas. En otros estudios, como el realizado en Turquía por Tolun *et al.* (2004) encontraron más asociación de resistencias entre BLEEs y ciprofloxacino en la especie *E. coli* ($p=0,015$) que en la especie *K. pneumoniae* ($p=0,276$).

La frecuencia de resistencia a fluorquinolonas ha alcanzado ya niveles preocupantes, especialmente en *E. coli*. Hay una tendencia en España al aumento del consumo de fluorquinolonas, principalmente fuera del hospital, que ha hecho que la resistencia a éstos en *E. coli* adquiridos en la comunidad haya aumentado significativamente en los últimos años (Lázaro *et al.*, 2004). En general, se observa una asociación significativa entre la producción de BLEEs y la resistencia a estos antibióticos, especialmente en aislados de *E. coli* causantes de infección del tracto urinario en la comunidad. Puesto que la resistencia a fluorquinolonas en

enterobacterias depende casi exclusivamente de mutaciones en genes cromosómicos, la asociación de estas resistencias podría deberse a la transferencia conjunta de ambos mecanismos de resistencia a través de plásmidos [Martínez-Martínez *et al* (1998) ya demostraron la transferencia de resistencia a fluorquinolonas a través de plásmidos] y también, probablemente, a la selección de aislados con ambos mecanismos de resistencia por el frecuente uso de betalactámicos y fluorquinolonas en un mismo contexto terapéutico, como es el tratamiento de las infecciones del tracto urinario.

Desde 1997 a 2002 se ha producido un incremento constante del consumo extrahospitalario de fluorquinolonas del 20%, mientras que el consumo total extrahospitalario de antibióticos ha descendido un 9% en el mismo periodo (Oteo y Campos, 2004). Además a nivel intrahospitalario, Neuhauser *et al.* (2003) señalan que el descenso de la sensibilidad a ciprofloxacino de un 86% en 1994 a un 76% en el año 2000 en aislados procedentes de UCI está significativamente asociado al incremento en el uso de fluorquinolonas.

Recientemente, nuestro grupo ha publicado un estudio (Sorlózano *et al.*, 2007) sobre la presencia de mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* en treinta aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) y resistentes a

fluorquinolonas (30 de los 115 aislados del presente estudio). No se observaron cambios en el gen *gyrB* en ninguno de los aislados. Las mutaciones en el gen *gyrA*, Ser83Leu y Asp87Asn, estuvieron presentes en todos los aislados. En la región QRDR del gen *parC* se detectaron seis mutaciones distintas: Ser80Ile (76.7% de los aislados), Ser80Arg (6.7%), Glu84Lys (3.3%), Ser80Ile y Glu84Gly (3.3%), Ser80Ile y Glu84Val (3.3%), Ser80Ile y Ala108Val (6.7%). Por último, en diez (33.3%) de los treinta aislados se detectó, además, una mutación en el gen *parE* (Ser458Ala) que se relacionó, estadísticamente, con el incremento de CMI de fluorquinolonas.

5.1.9. Actividad de tigeciclina

Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ en diferentes estudios (tabla 50) oscilan entre 0,12 a 1 µg/ml y 0,25 a 1 µg/ml, respectivamente (0,125 y 0,38 µg/mL en nuestro estudio). Como podemos comprobar, por tanto, nuestros resultados son similares a los aportados por otros autores.

Dada la importancia de estos microorganismos en las infecciones intraabdominales, y las indicaciones iniciales para el uso de tigeciclina, los resultados presentados demuestran que tigeciclina posee una excelente actividad frente a este patógeno. Además, dicha actividad se mantiene, en nuestra serie, independientemente del tipo de BLEE.

Tabla 50: Actividad de tigeiciclina frente aislados de *E. coli* (productores y no productores de BLEEs) en diferentes estudios

Referencia	Microorganismo	Rango (µg/ml)	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)
Gales y Jones, 2000	<i>E. coli</i> (no BLEE)	0,12-0,25	0,25	0,25
Biedenbach <i>et al.</i> , 2001	<i>E. coli</i> (BLEE)	0,06-0,5	0,12	0,5
Betriú <i>et al.</i> , 2002	<i>E. coli</i> (no BLEE)	0,5-2	1	1
Milatovic <i>et al.</i> , 2003	<i>E. coli</i> (no BLEE)	0,06-1	0,25	0,5
Zhang <i>et al.</i> , 2004	<i>E. coli</i> (no BLEE)	0,125-1	0,25	0,5
Reynolds <i>et al.</i> , 2004	<i>E. coli</i> (BLEE y no BLEE)	0,125-2	0,5	1
Fritsche <i>et al.</i> , 2005a	<i>E. coli</i> (no BLEE)	0,06-2	0,12	0,5
Fritsche <i>et al.</i> , 2005b	<i>E. coli</i> (BLEE)	0,06-2	0,25	0,5
Sader <i>et al.</i> , 2005	<i>E. coli</i> (no BLEE)	0,03-1	0,25	0,25
Hoban <i>et al.</i> , 2005	<i>E. coli</i> (BLEE)	-	0,25	0,5
Hoban <i>et al.</i> , 2005	<i>E. coli</i> (no BLEE)	-	0,12	0,25

5.2. REPERCUSIÓN DE OmpC Y OmpF EN LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS

Con la finalidad de dar respuesta a los objetivos planteados, en el presente estudio se evaluó la actividad de diversos antibióticos (betalactámicos, aminoglucósidos y fluorquinolonas) en aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEEs en dos medios de cultivo con diferente osmolaridad, y, por tanto, en teoría, con diferente expresión de porinas.

Para ello, en primer lugar, se demostró que la expresión de porinas en ambos medios era distinta: en MH, un medio de alta osmolaridad, hubo una pérdida significativa de la porina OmpF, respecto de NB, un medio de baja osmolaridad, como está descrito previamente (Giuliodori *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2006).

Por otro lado, al analizar la actividad de cada antibiótico en cada uno de los medios de cultivo, de forma independiente, se comprobó que la pérdida de porinas está relacionada con la disminución de la actividad de algunos antibióticos. Así, en medio NB, se observó que los aislados que expresaron una sola porina poseían valores de CMI media de cefoxitina, cefepima, ertapenem, tobramicina, ciprofloxacino y levofloxacino superiores a la de los aislados que expresaron las dos porinas; mientras que, en MH, este hecho sólo ocurrió para cefoxitina.

Otros autores también han determinado esta relación entre el déficit de expresión de porinas de la membrana externa y la disminución

de la actividad de diversos antibióticos (Ananthan y Subha, 2005; Hernández-Allés *et al.*, 2000; Mitsuyama *et al.*, 1992).

Son diversos los estudios que evalúan, en especies bacterianas como *E. coli* o *K. pneumoniae*, la actividad de distintos antibióticos en relación con la pérdida de porinas (Hancock *et al.*, 1991, Hernández-Allés *et al.*, 2000). Sin embargo, lo hacen considerando un único medio de cultivo, habitualmente, Mueller-Hinton, por ser éste el medio de cultivo que mejor reproduce las concentraciones fisiológicas de los diferentes iones y por ser el medio estandarizado para los estudios de actividad antibiótica. Sin embargo, faltan estudios que evalúen el efecto que el propio medio puede tener sobre la actividad de los antibióticos, independientemente de la alteración en la expresión de porinas, ya que está descrito que los medios de alta osmolaridad, no sólo reducen la expresión de porinas, sino que pueden, por ejemplo, incrementar la expresión de bombas de expulsión activa, lo cual también contribuye a disminuir la actividad de algunos antibióticos (Giuliodori *et al.*, 2007). Siguiendo este planteamiento, en el presente estudio, se pudo comprobar que, en MH, el incremento de la osmolaridad, respecto de NB, se relacionó, de forma significativa, con una disminución de la actividad de piperacilina-tazobactam, cefoxitina, imipenem, amikacina, tobramicina y levofloxacino, independientemente del perfil de expresión de porinas, tal vez debido a otros mecanismos, como se ha comentado. Sin embargo,

para amoxicilina-clavulánico, ceftazidima, cefepime, meropenem y ertapenem no hubo modificación de la actividad frente a los aislados de *E. coli*, ni en relación con la modificación de porinas ni en relación con la osmolaridad del medio de cultivo.

Sólo ciprofloxacino presentó menor actividad en MH como consecuencia de la menor expresión de porinas en este medio.

5.2.1. Antibióticos betalactámicos

Cefoxitina fue el único antibiótico, de entre los ensayados, cuya actividad disminuyó, de forma significativa, como consecuencia de la pérdida de porinas, tanto en NB como en MH. Además, independientemente de la pérdida o no de porinas, también su actividad se vio directamente influida por la osmolaridad del medio, presentando menor actividad en el medio de mayor osmolaridad, MH.

Diversos autores también han encontrado esta relación directa entre la actividad de cefoxitina y la pérdida de porinas, tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae* (Ananthan y Subha, 2005; Martínez-Martínez *et al.*, 1996). En este sentido, Clarke *et al* (2003) demostraron que, en cepas de *E. coli* con sensibilidad intermedia a cefoxitina se podría inducir resistencia dando pases sucesivos en medios con cefoxitina, explicándose este fenómeno por mutaciones que desencadenan hiperproducción de AmpC y pérdida en la expresión de OmpF y OmpC. Mortimer y Piddok

(1993) también observaron que la ausencia de la porina OmpF reducía drásticamente la acumulación intracelular de cefoxitina, demostrando que esta porina es la ruta de entrada preferida para este antibiótico.

La sensibilidad de nuestros aislados frente a piperacilina-tazobactam no se relacionó con el déficit de porinas. Este hecho podría explicarse por el gran volumen y carga iónica de piperacilina, que dificultan el paso a través de la luz de la porina, jugando por lo tanto un papel secundario en la resistencia a este antibiótico (Danelon *et al.*, 2006). Sin embargo, su actividad sí se vio afectada por la osmolaridad del medio.

En el caso de cefepima está descrita la importancia de OmpF en la penetración bacteriana (Jacoby y Carreras, 1990). Además, se sabe, por estudios que emplearon cefepima marcada radiactivamente, que, mutaciones puntuales que conducen a la modificación de la polaridad de la luz de OmpF, alteran significativamente la difusión de cefepima al interior celular (Simonet *et al.*, 2000).

En nuestro trabajo, todas las cepas de *E. coli* estudiadas fueron sensibles a los antibióticos carbapenémicos. Ertapenem fue el único antibiótico de este grupo en el que la pérdida de la porina OmpF se relacionó, de forma significativa, con un incremento de la CMI, sin alcanzar niveles de resistencia clínica, lo cual puede estar relacionado con el hecho de que se trata del carbapenémico más voluminoso de los

tres. Diversos estudios han determinado que el déficit de porinas, por sí solo, no se relaciona con resistencia de alto nivel a estos antibióticos (Hancock, 1997), sin embargo, su asociación con diferentes betalactamasas como CMY-2 (Poirel *et al.*, 2004), hiperproducción de AmpC (Low *et al.*, 2001; Nordmann y Poirel., 2002; Odeh *et al.*, 2002) o la producción de una carbapenemasa como KPC-3 (Hong *et al.*, 2005), sí se asocian a alto grado de resistencia. Más recientemente se ha relacionado la resistencia a ertapenem con el déficit de porinas en un aislado clínico productor de una BLEE tipo CTX-M2 en una paciente pretratada con imipenem durante 10 días (Lartigue *et al.*, 2007).

Por otro lado, para cada uno de los tres patrones de expresión de porinas, los valores de CMI de los antibióticos betalactámicos evaluados presentaron un alto grado de variabilidad en ambos medios de cultivo, especialmente para ceftazidima y cefepima. Este hecho puede explicarse por la hidrólisis debida a la presencia de los enzimas BLEEs: los aislados que poseían una enzima tipo CTX-M9 presentaron resistencia de alto nivel a cefepima, prácticamente sin incrementar las CMIs de ceftazidima, mientras que los aislados que presentaron una enzima SHV fueron más resistentes a ceftazidima (Sorlózano *et al.*, 2006a). Ello sugiere que el papel de las porinas en la resistencia de *E. coli* productores de BLEEs a los antibióticos betalactámicos es secundario, siendo más importante la acción de la propia betalactamasa.

5.2.2. Aminoglucósidos

En lo que respecta a los aminoglucósidos, tanto amikacina como tobramicina incrementaron su CMI en relación a la mayor osmolaridad en medio MH, independientemente de la expresión de porinas.

En cualquier caso, el principal mecanismo de resistencia a estos antibióticos es la presencia de enzimas modificantes (Shaw *et al.*, 1993), que no han sido valoradas en el presente estudio.

5.2.3. Fluorquinolonas

En relación a las fluorquinolonas, además de penetrar por difusión pasiva a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, pueden penetrar en la bacteria a través de porinas de membrana externa (Gootz *et al.*, 1996; Hooper, 2001; Nikaido y Thanassi, 1993). Es conocido que la reducción en la expresión de OmpF en la membrana externa de *E. coli* se asocia a un incremento en la resistencia frente a fluorquinolonas en estas bacterias (Mitsuyama *et al.*, 1992).

Además, como se comentó antes, con ciprofloxacino se observó, en MH, menor actividad, consecuencia de la menor expresión de porinas en este medio. Algunos autores consideran que, quizás, la presencia de concentraciones suprainhedorias de fluorquinolonas también pueden disminuir la expresión de OmpF (Giuliodori *et al.*, 2007).

La variabilidad de la CMI de las fluorquinolonas también se puede explicar por la presencia, en algunos aislados y no en otros, de mutaciones en *gyrA*, *parC* y *parE*, que ya fueron descritas en un estudio previo sobre estos mismos aislados productores de BLEEs (Sorlózano *et al.*, 2007).

Por último, hay que aclarar que la separación de las porinas de *E. coli* por electroforesis no siempre resulta sencilla, ya que los pesos moleculares de OmpC y OmpF (38,284 kDa y 37,061 kDa, respectivamente) son muy similares, dificultando su resolución. Por eso, para facilitar la identificación diferencial de ambas porinas se empleó urea en el gel de poliacrilamida: en geles con urea, OmpC migra más lentamente que OmpF debido a su mayor peso molecular (Hernández-Allés *et al.*, 1999). Aún así, en 8 de los aislados no se pudo identificar correctamente la porina expresada.

6. CONCLUSIONES

1. Amoxicilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefoxitina, cefepima, imipenem, ertapenem, meropenem, amikacina, tobramicina y tigeciclina mostraron una excelente actividad frente a los aislados de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido. Por el contrario, dicha actividad fue reducida para ceftazidima, ciprofloxacino y levofloxacino.
2. Piperacilina-tazobactam fue la combinación con inhibidores de betalactamasas que presentó mayor actividad. Meropenem fue el antibiótico carbapenémico más activo, e imipenem el que menos. No hubo diferencias clínicamente relevantes en la actividad entre los dos aminoglucósidos ensayados. La actividad de tigeciclina ocupó una posición intermedia entre aminoglucósidos y carbapenémicos.
3. Al comparar la actividad de los antibióticos frente a los aislados productores de CTX-M9 y SHV, no hubo diferencias significativas, frente a ambos tipos de enzimas, en la actividad de amoxicilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefoxitina, carbapenémicos, amikacina, fluorquinolonas y tigeciclina, y sí las hubo para ceftazidima, cefepima y tobramicina.

4. Cefepima fue más activo frente a los aislados productores de SHV, mientras que ceftazidima y tobramicina lo fueron frente a los aislados productores de CTX-M9.

5. Considerando los puntos de corte establecidos para tigeciclina en *Enterobacteriaceae* en el año 2005 para definir las categorías clínicas, todos los aislados de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido se mostraron sensibles a tigeciclina, e inhibidos por concentraciones muy bajas del antibiótico. Cuando se relacionaron los valores de CMI mediante E-test con los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento mediante disco-placa, se encontró una excelente relación entre ambos parámetros de laboratorio. Tigeciclina es, por tanto, una buena alternativa para el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos, y su actividad se puede determinar fácilmente mediante un procedimiento de disco-placa.

6. Los patrones de expresión de porinas de los aislados en dos medios de cultivo con diferente osmolaridad fueron distintos: en Mueller-Hinton, un medio de alta osmolaridad, hubo una pérdida significativa de la porina OmpF, respecto de Nutrient-Broth, un medio de baja osmolaridad.

7. Al analizar la actividad de cada antibiótico en cada uno de los medios de cultivo, de forma independiente, se comprobó que la pérdida de porinas está relacionada con la disminución de la actividad de algunos antibióticos. Así, en medio Nutrient-Broth, se observó que los aislados que expresaron una sola porina poseían valores de CMI media de cefoxitina, cefepima, ertapenem, tobramicina y fluorquinolonas superiores a la de los aislados que expresaron las dos porinas; mientras que, en Mueller-Hinton, este hecho sólo ocurrió para cefoxitina.

8. En Mueller-Hinton, el incremento de la osmolaridad, respecto de Nutrient-Broth, se relacionó, de forma significativa, con una disminución de la actividad de piperacilina-tazobactam, cefoxitina, imipenem, aminoglucósidos y levofloxacin, independientemente del perfil de expresión de porinas. Sin embargo, para amoxicilina-clavulánico, ceftazidima, cefepima, meropenem y ertapenem no hubo modificación de la actividad, ni en relación con la modificación de porinas, ni en relación con la osmolaridad del medio de cultivo. Sólo ciprofloxacino presentó menor actividad en Mueller-Hinton como consecuencia de la menor expresión de porinas en este medio.

9. Cefoxitina fue el único antibiótico cuya actividad disminuyó, de forma significativa, como consecuencia de la pérdida de porinas, tanto en Nutrient-Broth como en Mueller-Hinton. Además, independientemente de la pérdida de porinas, también su actividad se vio directamente influida por la osmolaridad del medio, presentando menor actividad en el medio de mayor osmolaridad.

10. Según lo anterior, se pone en evidencia la importancia de la naturaleza química del medio al realizar estudios de sensibilidad *in vitro*, en unos casos, porque se modifica la expresión de porinas, y, en otros, por la interacción química dependiente de la propia composición del medio.

11. Con la metodología empleada, no se pudo demostrar que la pérdida de porinas sea responsable de cambios clínicamente relevantes en la CMI de aislados de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido. Ello sugiere que el papel de las porinas en la resistencia de estos microorganismos a los antibióticos betalactámicos es secundario, siendo más importante la acción de la propia betalactamasa, sin descartar la coexistencia de otros mecanismos que incrementen los valores de CMI de otros antibióticos ensayados.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham EP y Chain E. *An enzyme from bacteria able to destroy penicillin*. Nature 1940; 146:837.
- Aleskun MN y Levy SB. *The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals*. Trends Microbiol 1999; 7: 410-413.
- Almirante B. *Revisiones y actualizaciones: Enfermedades infecciosas. Infecciones por enterobacterias*. Medicine 2002; 64: 3385-3397.
- Ambler RP. *The structure of betalactamase*. Philos Trans R Soc London B Biol Sci 1980; 289: 321-331.
- Ananthan S y Subha A. *Cefoxitin resistance mediated by loss of a porin in clinical strains of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli*. Indian J Med Microbiol 2005; 23: 20-23.
- Atlas RM. *Microbiología. Fundamentos y aplicaciones*. CECSA, México. 1990; 870 pp.
- Baker CN, Stocker SA, Culver DH, et al. *Comparison of the E-test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria*. J Clin Microbiol 1991; 29: 533-538.
- Barthélémy M, Peduzzi J y Labia R. *Distinction entre les structures primaires des β -lactamases TEM-1 et TEM-2*. Ann Inst Pasteur Microbiol 1985; 136: 311-321.
- Betriu C, Rodriguez-Avial I, Sanchez BA, et al. *In vitro activities of tigecycline (GAR-936) against recently isolated clinical bacteria in Spain*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 892-895.
- Bettelheim KA. *Biochemical characteristics of Escherichia coli*. In: Gyles CL (ed) *Escherichia coli in domestic animals and humans*. CAB International, Wallingford, Reino Unido. 1994; 3-30.
- Biedenbach DJ, Beach ML y Jones RN. *In vitro antimicrobial activity of GAR-936 tested against antibiotic-resistant gram-positive blood stream infection isolates and strains producing extended-spectrum β -lactamases*. Diagn Microbiol Infect Dis 2001; 40: 173-177.

- Blanco J, Alonso MP, Blanco M, *et al.* *Mecanismos de patogénesis de los Escherichia coli causantes de infecciones extraintestinales.* *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991a; 9: 640-651.
- Blanco J, Blanco JE, Alonso MP, *et al.* *Factores de virulencia de los Escherichia coli causantes de peritonitis, apendicitis y otras infecciones extraintestinales.* *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10: 393-398.
- Blanco J, Blanco M y González EA. *Mecanismos de patogénesis de los Escherichia coli enteropatógenicos, enterotoxigénicos, enteroinvasivos y enterohemorrágicos.* *Rev Esp Microbiol Clin* 1991b; 6: 163-176
- Bordow R, Ries A y Morris T. *Neumología.* Editorial Marbán, Univ de California, San Diego, EEUU, 2003.
- Bornet C, Davin-Regli A, Bosi C, *et al.* *Imipenem resistance of Enterobacter aerogenes mediated by outer membrane impermeability.* *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1048-1052.
- Bradford PA. *Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat.* *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-951.
- Brumfitt W. *Progress in understanding urinary infections.* *J Antimicrob Chemother* 1991; 27: 9-22.
- Bush K. *Characterization of β -lactamases.* *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 259-263.
- Bush K, Jacoby GA y Medeiros AA. *A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure.* *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
- Casellas JM, Tome G, Bantar C, *et al.* *Argentinean collaborative multicenter study on the in vitro comparative activity of piperacillin-tazobactam against selected bacterial isolates recovered from hospitalized patients.* *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 527-537.
- Chevalier J, Mallea M y Pagès JM. *Comparative aspects of the diffusion of norfloxacin, cefepime and spermine through the F porin channel of Enterobacter cloacae.* *Biochem J* 2000; 348: 223-227.

- Clarke B, Hiltz M, Musgrave H, *et al.* *Cephamicin resistance in clinical isolates and laboratory-derived strains of Escherichia coli, Nova Scotia, Canada.* Emerg Infect Dis 2003; 9: 1254-1259.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.* Sixth edition. Approved standard. CLSI publication M7-A6. Wayne, Pa., EEUU, 2005.
- Colodner R, Samra Z, Keller N, *et al.* *First national surveillance of susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella spp. to antimicrobials in Israel.* Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57: 201-205.
- Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, *et al.* *Genes encoding TEM-4, SHV-2 and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple Klebsiella pneumoniae clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000).* Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 500-510.
- Danelon C, Nestorovich EM, Winterhalter M, *et al.* *Interaction of zwitterionic penicillins with the OmpF channel facilitates their translocation.* Biophys J 2006; 90: 1617-1627.
- Datta N y Kontomichalon P. *Penicillinase synthesis controlled by infections R factors in Enterobacteriaceae.* Nature 1965; 208: 239-244.
- Davies JE. *Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants.* In: Chadwick DJ y Goode J (eds) *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread.* Wiley, New Jersey, EEUU, 1997.
- Daza R, Gutierrez J y Piedrola G. *Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections.* Int J Antimicrob Agents 2001;18: 211-215.
- De Champs C, Sirot D, Chanal C, *et al.* *A 1998 survey of extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae in France.* Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3177-3179.
- De la Vega AL y Delcour AH. *Polyamines decrease Escherichia coli outer membrane permeability.* J Bacteriol 1996; 178: 3715-3721.

- Delihás N y Frost S. *MicF: an antisense RNA gene involved in response of Escherichia coli to global stress factors*. J Mol Biol 2001; 313: 1-12.
- DeRyke CA, Banevicius MA, Fan HW, et al. *Bactericidal activities of meropenem and ertapenem against extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a neutropenic mouse thigh model*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 1481-1486.
- Domenech-Sánchez A y Benedí VJ. *Enterobacterial outer membrana proteins and porins: Isolation and polyacrylamide gel electrophoretic análisis*. En: *Antimicrobial resistance a laboratory approach*. Ed: bioMérieux España S.A. 2000; 17-33.
- Domenech-Sanchez A, Hernandez-Alles S, Martinez-Martinez L, et al. *Identification and characterization of a new porin gene of Klebsiella pneumoniae: its role in β -lactam antibiotic resistance*. J Bacteriol 1999; 181: 2726-2732.
- Du Bois SK, Marriott MS y Amyes SGB. *TEM and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function*. J Antimicrob Chemother 1995; 35: 7-22.
- Eisenstein BI y Zaleznik DF. *Enterobacteriaceae*. En: Mandell GL, Bennett JE y Dolin R (eds) *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, EEUU 2000; 2294-2310.
- Ericson CD. *Travelers' diarrhea: epidemiology, prevention, and self-treatment*. Infect Dis Clin North Am 1998; 12: 285-303.
- Fernández-Rodríguez A, Reguera JA, Pérez-Díaz JC, et al. *Primera epidemia española de resistencia plasmídica a cefalosporinas de tercera generación: implicación de SHV-2*. Enferm Infecc Microbiol Clin 1992; 10: 426-461.
- Ferrández O, Grau S, Luque S, et al. *Tratamiento de las infecciones por microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido: un nuevo reto terapéutico*. Farm Hosp 2005; 29: 351-353.

- Foulds J y Chai TJ. *New major outer membrane protein found in an Escherichia coli tolF mutant resistant to bacteriophage T4*. J Bacteriol 1978; 133: 1478-1483.
- Fritsche TR, Sader HS, Stilwell MG, *et al.* *Potency and spectrum of tigecycline tested against an international collection of bacterial pathogens associated with skin and soft tissue infections (2000-2004)*. Diagn Microbiol Infect Dis 2005a; 52: 195-201.
- Fritsche TR, Strabla PA, Sader HS, *et al.* *Activity of tigecycline tested against a global collection of Enterobacteriaceae, including tetracycline-resistant isolates*. Diagn Microbiol Infect Dis 2005b; 52: 209-213.
- Gales AC y Jones RN. *Antimicrobial activity and spectrum of the new glycylicycline, GAR-936 tested against 1,203 recent clinical bacterial isolates*. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 36: 19-36.
- Giuliodori AM, Gualerzi CO, Soto S, *et al.* *Review on bacterial stress topics*. Ann N Y Acad Sci 2007; (en prensa)
- Gootz T, Brighty K, Blondeau J, *et al.* *Fluoroquinolone antibacterials: SAR mechanism of action, resistance, and clinical aspects* Med Res Rev 1996; 16: 433-486.
- Gransden WR, Eykyn SJ, Phillips I, *et al.* *Bacteremia due to Escherichia coli: A study of 861 episodes*. Rev Infect Dis 1990; 12: 1008-1018.
- Hammel J, Bhavnani S, Jones R, *et al.* *Comparison of censored regression and standard regression analyses for modeling relationships between antimicrobial susceptibility and patient- and institution-specific variables*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 62-67.
- Hancock RE. *Role of porins in outer membrane permeability*. J Bacteriol 1987; 169: 929-933.
- Hancock RE. *The bacterial outer membrane as a drug barrier*. Trends Microbiol 1997; 5: 37-42.
- Hancock RE, Farmer SW, Li ZS, *et al.* *Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and*

OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1309-1314.

Hancock RE, Raffle VJ y Nicas TI. *Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19: 777-785.

Harder KJ, Nikaido H y Matsushashi M. *Mutants of Escherichia coli that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the ompF porin*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 20: 549-552.

Hawkey PM. *The origins and molecular basis of antibiotic resistance*. *BMJ* 1998; 317: 657-660.

Hernández JR, Pascual A, Cantón R, *et al*. *Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000)*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 77-82.

Hernández-Allés S, Alberti S, Álvarez D, *et al*. *Porin expression in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* 1999; 145: 673-679.

Hernández-Allés S, Conejo MC, Pascual A, *et al*. *Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 273-277.

Hoban DJ, Bouchillon SK, Johnson BM, *et al*. *In vitro activity of tigecycline against 6792 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the global Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program, 2004)*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 215-227.

Hong T, Moland ES, Abdalhamid B, *et al*. *Escherichia coli: development of carbapenem resistance during therapy*. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 84-86.

Hooper DC. *Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance*. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 337-341.

- Huletsky A, Couture F y Levesque RC. *Nucleotide sequence and phylogeny of SHV-2 β -lactamase*. Antimicrob Agents Chemother 1990, 34: 1725-1732.
- Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, *et al.* *β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3045-3049.
- Jacoby G y Carreras I. *Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 858-862.
- Jacoby GA y Sutton L. *Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 164-169.
- Jerse AE, Yu J, Tall BD, *et al.* *A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells*. Proc Natl Acad Sci 1990; 87: 7839-7843.
- Johnson JR. *Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection*. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 80-128.
- Johnson DM, Biedenbach DJ y Jones RN. *Potency and antimicrobial spectrum update for piperacillin-tazobactam 2000: Emphasis on its activity against resistant organisms populations and generally untested species causing community-acquired respiratory tract infections*. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 43: 49-60.
- Joly-Guillou ML y Bergogne-Berezin E. *Enzymatic resistance to betalactams and aminoglycosides in *Acinetobacter calcoaceticus**. J Antimicrob Chemother 1987; 773-776.
- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, *et al.* *Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins*. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28: 302-307.
- Knothe H, Shah P, Krcméry V, *et al.* *Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens**. Infection 1983, 11: 315-317.

- Lartigue MF, Poirel L, Poyart C, *et al.* *Ertapenem resistance of Escherichia coli.* Emerg Infect Dis 2007; 13: 315-317.
- Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, *et al.* *Extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes.* Clin Infect Dis 2001a; 32: 1162-1171.
- Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, *et al.* *Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum β -lactamase producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae.* Clin Infect Dis 2001b; 33: 1288-1294.
- Lázaro E, Oteo J, Baquero G, *et al.* *Evolución del consumo y de la resistencia a quinolonas en la comunidad en España.* XI Congreso de la SEIMC. Comunicación 236. Bilbao. 2004
- Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD, *et al.* *Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of Enterobacter cloacae with high level resistance to imipenem.* Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1093-1098.
- Legrand P, Fournier G, Bure A, *et al.* *Detection of extended broad-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in four French hospitals.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8: 527-529.
- Levin BR. *Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of Escherichia coli populations.* Genetics 1981; 99: 1-23.
- Livermore DM. *β -lactamases in laboratory and clinical resistance.* Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557-584.
- Logan NA. *Bacterial systematics.* Blackwell scientific publications, Oxford, Reino Unido, 1994; 263 pp.
- Long JS. *Regression models for categorical and limited dependent variables.* Thousands Oaks, CA: Sage. 1997.
- Long JS y Freese J. *Regression models for categorical and limited dependent variables using stata.* Segunda edición. College Station, TX: Stata Press. 2006.

- Low AS, MacKenzie FM, Gould IM, *et al.* *Protected environments allow parallel evolution of a bacterial pathogen in a patient subjected to long-term antibiotic therapy.* Mol Microbiol 2001; 42: 619-630.
- MacDougall C y Polk RE. *Antimicrobial stewardship programs in health care systems.* Clin Microbiol Rev 2005; 18: 638-656
- Madigan MT, Martinko JM y Parker J. *Brock biology of microorganisms.* Novena edición. Prentice Hall, EEUU; 2000; 991pp.
- Mallea M, Chevalier J, Bornet C, *et al.* *Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by Enterobacter aerogenes.* Microbiology 1998; 144: 3003-3009.
- Margall N, Domínguez A, Prats G, *et al.* *Escherichia coli enterohemorrágica.* Rev Esp Salud Pública 1997; 71: 437-443.
- Martínez-Martínez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, *et al.* *In vivo selection of porin deficient mutants of Klebsiella pneumoniae with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins.* Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 342-348.
- Martínez-Martínez L, Pascual A y Jacoby GA. *Quinolone resistance from a transferable plasmid.* Lancet 1998; 351: 797-799.
- Medeiros A, Mayer KH y Opal SM. *Plasmid-mediated β -lactamases.* Antimicrob Nexsl 1988; 5: 61-65.
- Merino S. *Aplicación de técnicas de fluorescencia y microscopia de fuerza atómica al estudio de la interacción lipido-proteína en modelos de membrana.* Tesis doctoral. Departamento de Fisicoquímica, Universidad de Barcelona, 2005.
- Meyers KS, Urban C, Eagan JA, *et al.* *Nosocomial outbreak of Klebsiella pneumoniae resistant to late-generation cephalosporins.* Annals Intern Med 1993; 119: 353-358.
- Milatovic D, Schmitz FJ, Verhoef J, *et al.* *Activities of the glycylicline tigecycline (GAR-936) against 1,924 recent european clinical bacterial isolates.* Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 400-404.

- Mitsuyama J, Itoh Y, Takahata M, *et al.* *In vitro* antibacterial activities of tosylfloxacin against and uptake of tosylfloxacin by outer membrane mutants of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2030-2036.
- Mortimer P y Piddok L. *The accumulation of five antibacterial agents in porin-deficient mutants of Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 195-213.
- Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, *et al.* *Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella spp. in Canadian hospitals*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1204-1214.
- Nataro JP y Kaper JB. *Diarrheagenic Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142-201.
- Navarro F, Miró E y Mirelis B. *Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2002; 20: 225-234.
- Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, *et al.* *Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use*. *JAMA* 2003 ; 289: 885-888.
- Nicas T y Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa outer membrane permeability: isolation of a porin protein F-deficient mutant*. *J Bacteriol* 1983; 153: 281-285.
- Nikaido H. *Role of permeability barriers in resistance to betalactam antibiotics*. *Pharmacol Ther* 1985; 27: 197-231.
- Nikaido H. *Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1831-1836.
- Nikaido H. *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 593-656.
- Nikaido H y Normark S. *Sensitivity of Escherichia coli to various β -lactams is determined by the interplay of outer membrane permeability and degradation by periplasmic β -lactamases: a quantitative predictive treatment*. *Mol Microbiol* 1987; 1: 29-36.

- Nikaido H y Rosenberg EY. *Porin channels in Escherichia coli: studies with liposomes reconstituted from purified proteins*. J Bacteriol 1983; 153: 241-252.
- Nikaido H y Thanassi D. *Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples*. Antimicrobi Agents Chemother 1993; 37: 1393-1399.
- Nordmann P y Poirel L. *Emerging carbapenemas in gramnegative aerobes*. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 321-331.
- Novelli A, Mazzei T, Cassetta MI, et al. *Outer membrane permeability of gram-negative rods to cephalosporins*. Program and Abstract of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, EEUU, 1995; resumen: C106.
- Nurminem M. *A mild procedure to isolate the 34K, 35K and 36K porins of the outer membrane of Salmonella typhimurium*. FEMS Microbiol Lett 1978; 3: 331-334.
- Obara M y Nakae T. *Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in Acinetobacter calcoaceticus*. J Antimicrob Chemother 1991; 28: 791-800.
- Odeh R, Kelkar S, Hujer AM, et al. *Broad resistance due to plasmid-mediated AmpC β -lactamases in clinical isolates of Escherichia coli*. Clin Infect Dis 2002; 35: 140-145.
- Oliver A y Cantón R. *Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido*. En: Control de Calidad de la SEIMC. 2004. Disponible en: (<http://www.seimc.org>). Última consulta 11 de junio de 2007.
- Oteo J y Campos J. *Uso de quinolonas y resistencia*. Enferm Infec Microbiol Clin 2004; 22: 201-203.
- Pagés JM. *Porines bacteriennes et sensibilité aux antibiotiques*. Médecine sciences 2004; 20: 346-351.
- Pangon B, Bizet C, Bure A, et al. *In vivo selection of a cephamycin-resistant porin-deficient mutant of Klebsiella pneumoniae producing a TEM-3 β -lactamase*. J Infect Dis 1989; 159: 1005-1006.

- Parveen S, Portier KM, Robinson K, *et al.* *Discriminant analysis of ribotype profiles of Escherichia coli for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution.* *App Environ Microbiol* 1999; 65: 3142-3147.
- Paterson DL y Yu VL. *Extended-spectrum β -lactamases: A call for improved detection and control.* *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1419-1422.
- Paterson DL, Ko WC, Gottberg A, *et al.* *Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory.* *J Clin Microbiol* 2001a; 39: 2206-2212.
- Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, *et al.* *Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in Klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia.* *Clin Infect Dis* 2000; 30: 473-478.
- Paterson DL, Singh N, Rihs JD, *et al.* *Control of an extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli in a liver transplantation unit.* *Clin Infect Dis* 2001b; 33: 126-128.
- Paterson DL, Wen-Chien K, Von Gottberg A, *et al.* *Antibiotic therapy for Klebsiella pneumoniae bacteremia: implications of production of extended-spectrum β -lactamases.* *CID* 2004; 39: 31-37.
- Peña C, Pujol M, Ricart A, *et al.* *Risk factors for faecal carriage of Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit.* *J Hosp Infect* 2001; 35: 9-16.
- Philippon A, Labia R y Jacoby G. *Extended-spectrum β -lactamases.* *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1131-1136.
- Picazo JJ. *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica, recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2000. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/> (Última consulta: 16/01/2007).

- Poirel L, Héritier C, Spicq C, *et al.* *In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in Escherichia coli.* J Clin Microbiol 2004; 42: 3831-3833.
- Pratt LA, Hsing W, Gibson KE, *et al.* *From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of OmpF and OmpC porins in Escherichia coli.* Mol Microbiol 1996; 20: 911-917.
- Primarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, *et al.* *Emergence of an inhibitor resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant.* Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 838-840.
- Reguera JA, Baquero F, Pérez-Díaz JC, *et al.* *Factors determining resistance to beta-lactam combined with beta-lactamase inhibitors in Escherichia coli.* J Antimicrob Chemother 1991; 27: 569-575.
- Reynolds R, Potz N, Colman M, *et al.* *Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001-2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme.* J Antimicrob Chemother 2004; 53: 1018-1032.
- Rupp ME y Fey PD. *Extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment.* Drugs 2003; 63: 353-365.
- Sabaté M, Tarragó R, Navarro F, *et al.* *Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from Escherichia coli in Spain.* Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1970-1973.
- Sader HS, Fritsche TR y Jones RN. *Potency and spectrum trends for cefepime tested against 65746 clinical bacterial isolates collected in North American medical centers: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2003).* Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 52: 265-273.
- Samaha-Kfoury JN y Araj GF. *Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases.* BMJ 2003; 1209-1213.
- Samartzidou H y Delcour AH. *Excretion of endogenous cadaverine leads to a decrease in porin-mediated outer membrane permeability.* J Bacteriol 1999; 181: 791-798.

- Sanders CC. *Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer betalactam antibiotics*. Am Rev Microbiol 1987; 41: 573-593.
- Sarff ID, McCracken GH, Schiffer MS, et al. *Epidemiology of Escherichia coli K1 in healthy and diseased newborns*. Lancet 1975; 1: 1099-1104.
- Sato K y Nakae T. *Outer membrane permeability of Acinetobacter calcoaceticus and its implication in antibiotic resistance*. J Antimicrob Chemother 1991; 28: 35-45.
- Schulz G. *Bacterial porins: structure and function*. Curr Opin Cell Biol 1993; 5: 701-707.
- Selander RK, Caugant DA y Whittam TS. *Genetic structure and variation in natural populations of Escherichia coli*. En: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, et al. (eds.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., EEUU.1987;1625-1648.
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, et al. *Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes*. Microbiol Rev 1993; 57: 138-163.
- Simonet V, Malléa M y Pagès JM. *Substitutions in the eyelet region disrupt cefepime diffusion through the Escherichia coli OmpF channel*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 311-315.
- Sorlózano A. *Betalactamasas de espectro extendido en nuestro medio: Aportaciones científicas*. Tesis doctoral. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Granada; 2004.
- Sorlózano A, Gutiérrez J, Fernández F, et al. *A preliminary study on the presence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in clinical isolates of Escherichia coli in Granada (Spain)*. Ann Microbiol 2004b; 54: 227-232.
- Sorlózano A, Gutiérrez J, Jiménez A, et al. *Contribution of a new mutation in parE to quinolone resistance in extended-spectrum {beta}-lactamase-producing Escherichia coli isolates*. J Clin Microbiol 2007; 45:2740-2742.

- Sorlózano A, Gutiérrez J, Luna JD, *et al.* *High presence of extended-spectrum β -lactamases and resistance to quinolones in clinical isolates of Escherichia coli.* Microbiol Res 2006a Mar 23; [Epub ahead of print].
- Sorlózano A, Gutiérrez J, Palanca M, *et al.* *High incidence of extended-spectrum beta-lactamases among outpatient clinical isolates of Escherichia coli: a phenotypic assessment of NCCLS guidelines and a commercial method.* Diagn Microbiol Infect Dis 2004a; 50: 131-134.
- Sorlozano A, Gutiérrez J, Salmeron A, *et al.* *Activity of tigecycline against clinical isolates of Staphylococcus aureus and extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in Granada, Spain.* Int J Antimicrob Agents 2006b, 28: 532-536.
- Sougakoff W, Goussard S y Courvalin P. *The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicilinase by two amino acid substitutions.* FEMS Microbiol Lett 1988; 56: 343-348.
- Souza V, Rocha M, Valera A, *et al.* *Genetic structure of natural populations of Escherichia coli in wild hosts on different continents.* App Environm Microbiol 1999; 65: 3373-3385.
- Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, *et al.* *Occurrence to extended-espectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: Implications for resistance to β -lactams and other antimicrobial drugs.* Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 196-202.
- Stapleton PD, Shannon KP y French GL. *Carbapenem resistance in Escherichia coli associated with plasmid-determined CMY-4 beta-lactamase production and loss of an outer membrane protein.* Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1206-1210.
- Stürenburg E y Mack D. *Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control.* J Infect 2003; 47: 273-295.
- Tolun V, Kucukbasmaci O, Torumkuney-Akbulut D, *et al.* *Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae strains.* Clin Microbiol Infec 2004; 10: 72-75.

- Trias J y Nikaido H. *Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 52–57.
- Tzouvelekis LS y Bonomo RA. *SHV type β -lactamase*. Curr Pharm Des 1999; 5: 847-864.
- Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, *et al*. *CTX-M-type β -lactamases an emerging group of extended-spectrum enzymes*. Int J Antimicrob Agents 2000; 14: 137-143.
- Tzouvelekis LS, Gazouli M, Markogiannakis A, *et al*. *Emergence of resistance to third-generation cephalosporins amongst Salmonella typhimurium isolates in Greece: report of the first three cases*. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 273-275.
- Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, *et al*. *Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain*. J Clin Microbiol 2004; 42: 4769-4775.
- Van der Ley P, Burm P, Agterberg M, *et al*. *Analysis of structure-function relationships in Escherichia coli K12 outer membrane porins with the aid of ompC-phoE and phoE-ompC hybrid genes*. Mol Gen Genet 1987; 209: 585-591.
- Vidal S, Bredin J, Pages JM, *et al*. *Beta-lactam screening by specific residues of the OmpF eyelet*. J Med Chem 2005; 48: 1395-1400.
- Weill FX, Demartin M, Tandé D, *et al*. *SHV-12-like extended-spectrum β -lactamase producing strains of Salmonella enterica serotypes babelsberg and enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali*. J Clin Microbiol 2004; 42: 2432-2437.
- Wiener J, Quinn JP, Bradford PA, *et al*. *Multiple antibiotic-resistant Klebsiella and Escherichia coli in nurseries homes*. JAMA 1999; 281: 517-523.
- Winokur PL, Cantón R, Casellas JM, *et al*. *Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region*. Clin Infect Dis 2001; 32: 94-103.

7. Bibliografía

Wyeth Pharmaceuticals, Tygacil product insert, Wyeth Pharmaceuticals, Philadelphia, PA (2005) Disponible en: <http://www.tygacil.com> [acceso 10 de diciembre de 2006].

Yoshida T, Qin L, Egger LA, *et al.* *Transcription regulation of ompF and ompC by a single transcription factor, OmpR.* J Biol Chem 2006; 281: 17114-17123.

Yu WL, Pfaller MA, Winokur PL, *et al.* *Cefepime MIC as a predictor of the extended-spectrum beta-lactamase type in Klebsiella pneumoniae, Taiwan.* Emerg Infect Dis 2002; 8: 522-524.

Zhang YY, Zhou L, Zhu DM, *et al.* *In vitro activities of tigecycline against clinical isolates from Shanghai, China.* Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 50: 267-81.