

Caracterización de los
mecanismos de
resistencia a fosfomicina
y nitrofurantoína en
aislados clínicos de
Klebsiella pneumoniae y
Escherichia coli

Programa de Doctorado en
Medicina Clínica y Salud
Pública



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Isaac López Machado
Granada, 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Isaac López Machado

ISBN: 978-84-1306-946-3

URI: <http://hdl.handle.net/10481/69668>



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

*Caracterización de los mecanismos
de resistencia a fosfomicina y
nitrofurantoína en aislados clínicos
de *Klebsiella pneumoniae* y
*Escherichia coli**

Programa de Doctorado en Medicina Clínica
y Salud Pública

Isaac López Machado

Granada, 2021

AGRADECIMIENTOS



Quiero agradecer a mis directores, los profesores de la Universidad de Granada Antonio Sorlózano Puerto y José Gutierrez Fernández, por los conocimientos que me han trasladado y por su apoyo en las diferentes etapas de este proyecto. No puedo expresar con palabras todo lo que he aprendido de ellos y que, sin duda, me hará ser un mejor profesional en el futuro.

Agradezco también a todo el personal adscrito al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, especialmente a Pepi, Elena y José Manuel, por el apoyo diario y por la cálida acogida que me dieron desde el primer día. Doy las gracias a Pepi y a Elena, por todo lo que me han enseñado sobre procedimientos, trucos y manejo en el laboratorio.

Debo agradecer a mi compañera del programa de doctorado, María, todo el apoyo y la ayuda prestada. Este trabajo ha sido más fácil gracias a ti.

También debo reconocer al Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO), especialmente a Luis Javier Martínez y a toda la unidad de genómica, su aporte esencial en la secuenciación y el análisis bioinformático de las muestras.

Por último, quiero agradecer a Marina y a mi familia, en especial a mis padres, por su apoyo, y por darme la seguridad y la posibilidad de dedicarme por completo a este proyecto.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE



	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Bases genéticas de la resistencia a los antibióticos	7
1.1.1. Desarrollo de resistencias antibióticas por modificación genética	8
1.1.2. Desarrollo de resistencias antibióticas por transferencia horizontal de genes	9
1.2. Mecanismos moleculares de resistencia a los antibióticos	10
1.2.1. Modificación de la molécula del antibiótico	10
1.2.2. Disminución de la permeabilidad al antibiótico	12
1.2.3. Expulsión activa del antibiótico	12
1.2.4. Cambios en la diana de actuación del antibiótico	13
1.2.5. Adaptación celular global frente al antibiótico	14
1.3. Fosfomicina	15
1.3.1. Mecanismo de acción	17
1.3.2. Mecanismos de resistencia	20
<i>Modificación de la diana MurA</i>	20
<i>Reducción de la permeabilidad bacteriana a fosfomicina</i>	21
<i>Modificación enzimática del antibiótico</i>	22
1.3.3. Espectro de actividad	26
<i>Actividad de fosfomicina frente a bacterias Gram-positivas</i>	26
<i>Actividad de fosfomicina frente a bacterias Gram-negativas</i>	26
<i>Actividad de fosfomicina frente a bacterias productoras de biofilms</i>	28
1.3.4. Farmacocinética	28
1.3.5. Indicaciones clínicas	30
1.3.6. Efectos adversos e interacción con otros fármacos	31
1.4. Nitrofurantoína	32
1.4.1. Mecanismo de acción	33
1.4.2. Mecanismos de resistencia	34
1.4.3. Espectro de actividad	36
1.4.4. Farmacocinética	37
1.4.5. Indicaciones clínicas	38
1.4.6. Efectos adversos e interacción con otros fármacos	39

	Página
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	43
3. MATERIAL Y MÉTODO	47
3.1. Selección de los microorganismos	49
3.2. Prueba para la detección de la actividad glutatión-S-transferasa	50
3.3. Prueba de utilización de carbohidratos	50
3.4. Amplificación génica mediante PCR	51
3.5. Secuenciación	55
4. RESULTADOS	61
4.1. Sensibilidad de los aislados clínicos a otros antibióticos diferentes a fosfomicina y nitrofurantoína	63
4.2. Mecanismos de resistencia en <i>Escherichia coli</i>	67
4.2.1. Resistencia a fosfomicina	68
4.2.2. Resistencia a nitrofurantoína	76
4.3. Mecanismos de resistencia en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	80
4.3.1. Resistencia a fosfomicina	82
4.3.2. Resistencia a nitrofurantoína	88
5. DISCUSIÓN	93
5.1. Mecanismos de resistencia a fosfomicina	95
5.1.1. Resistencia por modificación de la diana	97
5.1.2. Resistencia por reducción de la permeabilidad	99
<i>Modificaciones en el transportador GlpT</i>	99
<i>Modificaciones en el transportador UhpT y la proteína reguladora UhpA</i>	102
<i>Modificaciones en las proteínas reguladoras PtsI y CyaA</i>	104
5.1.3. Resistencia por modificación enzimática del antibiótico	105
5.2. Mecanismos de resistencia a nitrofurantoína	113
6. CONCLUSIONES	123

	Página
7. BIBLIOGRAFÍA	127
8. PUBLICACIONES	151
Characterization of fosfomycin and nitrofurantoin resistance mechanisms in <i>Escherichia coli</i> isolated in clinical urine samples. <i>Antibiotics</i> . 2020; 9(9):534.	153
9. ANEXOS	173
Anexo I: Secuencia del gen <i>murA</i> y de la proteína MurA en <i>E. coli</i>	175
Anexo II: Secuencia del gen <i>glpT</i> y de la proteína GlpT en <i>E. coli</i>	179
Anexo III: Secuencia del gen <i>uhpT</i> y de la proteína UhpT en <i>E. coli</i>	183
Anexo IV: Secuencia del gen <i>uhpA</i> y de la proteína UhpA en <i>E. coli</i>	187
Anexo V: Secuencia del gen <i>ptsI</i> y de la proteína PtsI en <i>E. coli</i>	189
Anexo VI: Secuencia del gen <i>cyaA</i> y de la proteína CyaA en <i>E. coli</i>	193
Anexo VII: Secuencia del gen <i>murA</i> y de la proteína MurA en <i>K. pneumoniae</i>	199
Anexo VIII: Secuencia del gen <i>glpT</i> y de la proteína GlpT en <i>K. pneumoniae</i>	203
Anexo IX: Secuencia del gen <i>uhpT</i> y de la proteína UhpT en <i>K. pneumoniae</i>	205
Anexo X: Secuencia del gen <i>uhpA</i> y de la proteína UhpA en <i>K. pneumoniae</i>	211
Anexo XI: Secuencia del gen <i>ptsI</i> y de la proteína PtsI en <i>K. pneumoniae</i>	213
Anexo XII: Secuencia del gen <i>cyaA</i> y de la proteína CyaA en <i>K. pneumoniae</i>	217
Anexo XIII: Secuencia del gen <i>nfsA</i> y de la proteína NfsA en <i>E. coli</i>	223
Anexo XIV: Secuencia del gen <i>nfsB</i> y de la proteína NfsB en <i>E. coli</i>	225
Anexo XV: Secuencia del gen <i>ribE</i> y de la proteína RibE en <i>E. coli</i>	227
Anexo XVI: Secuencia del gen <i>nfsA</i> y de la proteína NfsA en <i>K. pneumoniae</i>	229
Anexo XVII: Secuencia del gen <i>nfsB</i> y de la proteína NfsB en <i>K. pneumoniae</i>	231
Anexo XVIII: Secuencia del gen <i>ribH</i> y de la proteína RibH en <i>K. pneumoniae</i>	233

	Página
Anexo XIX: Secuencia del gen <i>fosA3</i> y de la proteína FosA3	235
Anexo XX: Secuencia del gen <i>fosA4</i> y de la proteína FosA4	237
Anexo XXI: Secuencia del gen <i>fosA5</i> y de la proteína FosA5	239
Anexo XXII: Secuencia del gen <i>fosA6</i> y de la proteína FosA6	241
Anexo XXIII: Secuencia del gen <i>fosC2</i> y de la proteína FosC2	243
Anexo XXIV: Secuencia del gen <i>oqxA</i> y de la proteína OqxA	245
Anexo XXV: Secuencia del gen <i>oqxB</i> y de la proteína OqxB	247

RESUMEN



Fosfomicina y nitrofurantoína son dos de los antibióticos de elección para el tratamiento por vía oral de las infecciones del tracto urinario (ITU) no complicadas debido a que permanecen con tasas de actividad elevada frente a bacterias resistentes a otros antibióticos. Sin embargo, recientes estudios de vigilancia epidemiológica han detectado una reducción de la sensibilidad bacteriana a estos fármacos. El objetivo fundamental del presente trabajo fue determinar los mecanismos de resistencia a estos antibióticos en aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de ITUs.

Para ello, se seleccionaron 29 aislados clínicos de *E. coli* y 41 de *K. pneumoniae* resistentes a cualquiera de estos dos antibióticos y se realizaron pruebas fenotípicas para la detección de la actividad glutatión-S-transferasa, así como de la capacidad de crecimiento bacteriano en presencia de una sola fuente de carbono, G3P o G6P, como medida de la actividad transportadora de las proteínas GlpT y UhpT, respectivamente. Posteriormente, se amplificaron y secuenciaron, en todos los aislados, los genes cromosómicos relacionados con resistencia a fosfomicina (*murA*, *glpT*, *uhpT*, *uhpA*, *ptsI* y *cyaA*) y nitrofurantoína (*nfsA*, *nfsB*, *ribE* y *ribH*) buscando modificaciones que se pudiesen relacionar con la resistencia antibiótica expresada. También se comprobó la presencia de los genes plasmídicos *fosA^{KP}*, *fosA3*, *fosA4*, *fosA5*, *fosA6* y *fosC2* relacionados con resistencia a fosfomicina, y *oqxA* y *oqxB* relacionados con resistencia a nitrofurantoína.

De los 29 aislados de *E. coli*, 22 fueron resistentes a fosfomicina debido a la delección de los genes *uhpT* y/o *uhpA*, lo que altera la permeabilidad bacteriana al antibiótico como consecuencia de la ausencia de expresión del transportador UhpT. Además, en 2 de estos 22 aislados también se demostró la presencia del gen *fosA3*, responsable de la presencia de enzimas glutatión-S-transferasas que modifican e inactivan la molécula de fosfomicina. Por su parte, 15 de los 29 aislados clínicos de *E. coli* fueron resistentes a nitrofurantoína. Algunas modificaciones detectadas en secuencias de las proteínas NfsA (His11Tyr, Ser33Arg, Gln67Leu, Cys80Arg, Gly126Arg, Gly154Glu, Arg203Cys), NfsB (Gln44His, Phe84Ser, Arg107Cys, Gly192Ser, Arg207His) y RibE (Pro55His), así como la producción de proteínas truncadas NfsA (Gln67Stop y Gln147Stop) y NfsB (Glu54Stop), se asociaron a esta resistencia por la incapacidad que

tendrían estas enzimas, alteradas estructuralmente, de generar los principios activos derivados del metabolismo de nitrofurantoína.

En el caso de *K. pneumoniae*, de los 41 aislados clínicos estudiados, la resistencia a fosfomicina detectada en 24 de estos, se relacionó, fundamentalmente, con la presencia del gen *fosA*^{KP}, responsable de la expresión de una enzima con actividad glutatión-S-transferasa que modifica e inactiva la molécula del antibiótico. Aunque 31 de los aislados de esta especie fueron resistentes a nitrofurantoína, tan solo en 12 de ellos se pudieron detectar modificaciones en las secuencias de las proteínas NfsA (Ala112Val y Gly125Trp) y NfsB (Ser37Asn, His47Asp y Pro190Arg) que pudiesen asociarse a resistencia, por lo que, nuestros hallazgos en esta especie bacteriana, no fueron suficientes para explicar todas las situaciones de resistencia encontradas.

Finalmente, cabe señalar que la aparición y propagación de estos mecanismos de resistencia, especialmente la transferencia de resistencia a través de plásmidos, en aislados clínicos de estas especies bacterianas, podría comprometer la utilidad futura de fosfomicina y nitrofurantoína en el tratamiento de las ITUs.

1. INTRODUCCIÓN



El descubrimiento de los antibióticos, junto con su posterior comercialización y administración rutinaria, ha sido una de las intervenciones más importantes de la historia de la Medicina. Estos han modificado la manera de hacer frente a las infecciones, han mejorado el pronóstico de las enfermedades infecciosas que, en muchas ocasiones, resultaban mortales, y han posibilitado el desarrollo posterior de enfoques médicos complejos, como los procedimientos quirúrgicos, el trasplante de órganos o el manejo de pacientes con cáncer, entre otros (World Health Organization, 2014).

Desafortunadamente, el marcado incremento de las resistencias antibióticas entre los patógenos bacterianos está amenazando este gran logro terapéutico y poniendo en peligro los resultados exitosos en los pacientes críticamente enfermos. Especialmente preocupa que la tasa de aparición de estas resistencias supere la capacidad actual de desarrollar nuevas moléculas con actividad antibiótica (Falagas *et al.* 2016).

Este hecho ha generado el interés por viejos antimicrobianos, ya en desuso o incluso descatalogados en algunos países (Giske, 2015). Entre ellos se encuentran antibióticos como fosfomicina y nitrofurantoína, que en los últimos años han demostrado una excelente actividad frente a bacilos Gram-negativos como las enterobacterias y a cocos Gram-positivos como los enterococos y estafilococos, estando especialmente indicados ambos en el tratamiento de las infecciones del tracto urinario (ITUs). Sin embargo, como consecuencia del incremento de su uso clínico, se describe, paralelamente, un aumento de las resistencias frente a ellos, fundamentalmente en enterobacterias, lo que nos obliga a investigar los mecanismos implicados para abrir nuevas líneas de trabajo que prevengan la posibilidad de fracasos terapéuticos y preserven su actividad.

1.1. BASES GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Las bacterias presentan una gran plasticidad genética, que les permite adaptarse a una amplia variedad de amenazas ambientales, entre ellas la existencia de moléculas que puedan poner en peligro su supervivencia. Aquellas bacterias que comparten nicho ecológico con organismos capaces de producir sustancias con actividad antibiótica han desarrollado mecanismos evolutivos que les permite persistir

y desarrollar su actividad biológica en presencia de estas. Desde el punto de vista genético, las bacterias se sirven de dos estrategias para hacer frente a los efectos de los antibióticos: la aparición de modificaciones en los genes involucrados en el mecanismo de acción del antibiótico (a través de mutaciones, deleciones, inserciones, etc.) y la adquisición de ADN exógeno que codifica determinantes de resistencia (a través de un proceso de transferencia horizontal de genes) (Munita y Arias, 2016).

1.1.1. Desarrollo de resistencias antibióticas por modificación genética

En ocasiones, un subconjunto de células bacterianas de una población sensible a un antibiótico desarrolla modificaciones genéticas que le proporcionan resistencia frente al mismo y, con ello, una ventaja adaptativa. Una vez surge una línea de bacterias mutantes resistentes, el antibiótico eliminará al resto de la población sensible, quedando solo las que pueden sobrevivir en presencia del mismo, tras adquirir su condición de resistencia. Los cambios genéticos que dan lugar a la resistencia actúan a través de mecanismos que incluyen modificaciones en la diana de actuación del antibiótico, disminución de su capacidad de acceder a la bacteria, activación de un mecanismo de expulsión o alteraciones en las vías enzimáticas que lo metabolizan (Munita y Arias, 2016). La naturaleza de estas modificaciones genéticas puede ser muy diversa: mutaciones puntuales, deleciones, duplicaciones, inversiones e inserciones (Durão *et al.* 2018; Siguier *et al.* 2014).

Las mutaciones puntuales son aquellas en las que un nucleótido se sustituye por otro, lo que puede provocar distintos desenlaces. Si el codón en el que se produce el cambio sigue codificando para el mismo aminoácido, la mutación será silenciosa y no generará cambios en la secuencia de la proteína. Si el codón resultante codifica para un aminoácido diferente, se producirá una modificación de la secuencia de la proteína, aunque no necesariamente tiene que alterar la función de esta. Finalmente, si la sustitución implica la aparición de un codón de stop o parada, el resultado será la síntesis de una proteína truncada, lo que habitualmente se asocia a la pérdida de su función biológica.

Las deleciones conllevan la pérdida de material genético, desde un par de nucleótidos a fragmentos que puedan abarcar varios genes. Además de la pérdida de información, las deleciones pueden provocar un cambio en el marco de lectura, dando

lugar a una proteína con una secuencia alterada y no funcional. Por el contrario, las inserciones implican la adición de material genético, desde un par de bases a un fragmento de gran tamaño. Tras las inserciones se encuentran los denominados elementos de inserción (IS), segmentos de ADN cortos que tan solo codifican las enzimas necesarias para su transposición, y que juegan un papel fundamental en la movilidad de genes entre bacterias.

Las duplicaciones suponen la repetición de segmentos completos de una secuencia de ADN, pudiendo también alterar el marco de lectura y la futura secuencia de aminoácidos de la proteína afectada. Por último, las inversiones son un cambio de orientación de un segmento de ADN que, habitualmente, no suelen representar un inconveniente en la correcta expresión de los genes.

1.1.2. Desarrollo de resistencias antibióticas por transferencia horizontal de genes

A través de la transferencia horizontal de genes, las bacterias son capaces de adquirir material genético ajeno a su genoma e incorporarlo al mismo. Este mecanismo les dota de una capacidad de evolución y adaptación única que, con frecuencia, se encuentra detrás de la rápida acomodación de las bacterias a la presencia de sustancias antimicrobianas en su entorno, lo que se traduce en la aparición de resistencia. Muchos de los antibióticos que se utilizan actualmente derivan de productos naturales que se encuentran en el medio ambiente, por lo que la posibilidad de que las bacterias ya hayan tenido contacto con estas moléculas es bastante alta, aumentando las probabilidades de que alberguen algún tipo de determinante genético que las haga tolerantes y que pueda ser transferido (Munita y Arias, 2016).

Las bacterias son capaces de adquirir material genético exógeno gracias a tres mecanismos principales: transformación, transducción y conjugación. La transformación es la incorporación de fragmentos de material genético desde el medio circundante, en la transducción se incorpora material genético no viral de una célula a otra por medio de un virus (bacteriófago), y en la conjugación se produce la transferencia directa de material genético de una bacteria a otra en un proceso mediado por plásmidos. Mientras que la transformación es el tipo más simple de transferencia horizontal de genes en bacterias, y junto con la transducción suelen ser mecanismos con escaso éxito en el desarrollo de resistencias antibióticas (Thomas y

Nielsen, 2005), la conjugación es un método más eficaz (Munita y Arias, 2016). Esta utiliza elementos genéticos móviles como los plásmidos y transposones, que son los principales responsables del desarrollo y diseminación de resistencia a antibióticos, para compartir información genética valiosa entre bacterias (Manson *et al.* 2010; Thomas y Nielsen, 2005).

También se deben tener en cuenta a los integrones, sistemas de recombinación específicos de un sitio en el genoma que son capaces de capturar marcos de lectura abiertos y formar “cassettes” de genes móviles. Así, los integrones son capaces de proporcionar un mecanismo eficaz, y a la vez simple, con el que añadir nuevos genes al cromosoma bacteriano, y lo hacen con la maquinaria genética necesaria para que se expresen. Por estas razones, los integrones constituyen uno de los principales impulsores de la evolución bacteriana, con importantes repercusiones en el desarrollo de resistencias antibióticas (Thomas y Nielsen, 2005).

1.2. MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

A través de los mecanismos genéticos antes mencionados, las bacterias han sido capaces de desarrollar complejas resistencias a moléculas con actividad antimicrobiana a lo largo de toda su historia evolutiva, pero que se hace especialmente trascendente como consecuencia del desarrollo, mucho más reciente, de los antibióticos que usamos en terapia humana y animal. Aunque estas resistencias se manifiestan a través de diferentes rutas bioquímicas y metabólicas, en general, las distintas especies bacterianas suelen tener un mecanismo preferente para hacer frente a cada antibiótico concreto. Estos mecanismos se pueden clasificar y agrupar, en función de la ruta involucrada, en cuatro grandes estrategias: la modificación e inactivación de la molécula, la dificultad para que esta alcance su diana (bien por disminución de la permeabilidad o bien a través de su expulsión activa), los cambios en la diana de actuación y la adaptación celular global frente al antibiótico (Munita y Arias, 2016).

1.2.1. Modificación de la molécula de antibiótico

La modificación de la estructura bioquímica de los antibióticos es una de las mejores estrategias de las que disponen las bacterias para sobrevivir al efecto de

estos. Se realiza gracias a enzimas que, o bien alteran químicamente la molécula mediante la adición de restos químicos, o bien la destruyen completamente. En cualquiera de los casos, la inactivan (Munita y Arias, 2016).

La presencia de enzimas capaces de alterar químicamente a un antibiótico es un mecanismo bien conocido, tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas. Entre las reacciones más frecuentes de modificación de los antibióticos se encuentran la acetilación (que puede afectar, por ejemplo, a aminoglucósidos, cloranfenicol y estreptograminas), la fosforilación (en aminoglucósidos y cloranfenicol) o la adenilación (en aminoglucósidos y lincosamidas). Independientemente de la reacción química llevada a cabo por el enzima, el efecto suele relacionarse con una disminución de la afinidad del antibiótico por su diana de actuación (Wilson, 2014).

Uno de los ejemplos más importantes de mecanismo de resistencia basado en la destrucción del antibiótico, por su trascendencia terapéutica, es el llevado a cabo por las enzimas denominadas betalactamasas, que destruyen el enlace amídico del anillo betalactámico, inactivando el antibiótico. Estas enzimas se describieron por primera vez en la década de 1940, un año antes de que se introdujera la penicilina en el mercado; sin embargo, existen evidencias de su existencia durante millones de años (D'Costa *et al.* 2011). Tras la comercialización de la penicilina, las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a este antibiótico se volvieron clínicamente relevantes debido a la presencia de una penicilinasas codificada por un plásmido que se transmite fácilmente entre las cepas de *S. aureus*, lo que provocó la diseminación rápida de la resistencia (Bush, 2013). Aunque ante este problema se desarrollaron nuevos compuestos betalactámicos con un espectro de actividad más amplio y más resistentes a la acción de las penicilinasas, como ampicilina, no tardó en aparecer, entre las bacterias Gram-negativas, en la década de 1960, una nueva betalactamasa plasmídica capaz de hidrolizar este otro antibiótico (Paterson y Bonomo, 2005). Desde entonces, el desarrollo de nuevas generaciones de betalactámicos siempre se ha seguido de la rápida aparición de enzimas capaces de destruir los nuevos compuestos (betalactamasas de amplio espectro, betalactamasas de espectro extendido o BLEEs, carbapenemasas, etc.), en un proceso que es un excelente ejemplo de evolución bacteriana adaptativa impulsada por la selección natural derivada de la presión antibiótica (D'Costa *et al.* 2011).

1.2.2. Disminución de la permeabilidad al antibiótico

Un gran número de antibióticos tienen como dianas de actuación a moléculas bacterianas intracelulares o, en el caso de bacterias Gram-negativas, también a aquellas localizadas en la membrana citoplasmática. Por tanto, para ejercer su mecanismo de acción, el antibiótico tiene que atravesar la membrana exterior y/o la membrana citoplasmática. Frente a ello, las bacterias han desarrollado mecanismos que disminuyen la captación del antibiótico. Estos mecanismos, que limitan la entrada de sustancias procedentes del medio externo, son muy característicos de las bacterias Gram-negativas como consecuencia de modificaciones en sus porinas.

Las porinas son proteínas integrales de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, que funcionan como canales de transporte de diferentes moléculas hidrofílicas, con diferentes grados de selectividad y complejidad. Existen diferentes tipos, clasificadas en función de su estructura, de su especificidad o no de un sustrato y de la regulación de su expresión. Sus alteraciones inducen la aparición de resistencia por tres posibles mecanismos: por un cambio en el tipo de porinas que se expresan, por una disminución de la expresión o por una alteración en su función (Nikaido, 2003). Las moléculas hidrófilas, como algunos betalactámicos, se ven particularmente afectadas por los cambios en la permeabilidad de la membrana, ya que a menudo utilizan porinas para superar esta barrera (Pagès *et al.* 2008).

1.2.3. Expulsión activa del antibiótico

Algunas bacterias poseen complejas maquinarias transmembrana capaces de expulsar un compuesto tóxico fuera de la célula, lo que también puede ser utilizado como mecanismo de resistencia frente a los antibióticos. La descripción de uno de los primeros sistemas de eflujo, capaz de bombear tetraciclina fuera del citoplasma de *Escherichia coli*, se remonta a principios de la década de los 80 (McMurry *et al.* 2002). Desde ese momento, se han caracterizado diferentes tipos de bombas de eflujo en microorganismos patógenos, tanto Gram-negativos como Gram-positivos. Estos sistemas pueden ser específicos de sustrato, provocando la expulsión de un antibiótico particular, o poseer una baja especificidad, en cuyo caso se pueden afectar varias familias de antibióticos al mismo tiempo y generar multirresistencia (Poole, 2005). Los genes que codifican para la presencia de estas bombas de eflujo pueden ubicarse tanto

en el cromosoma como en elementos genéticos. Los sistemas de expulsión codificados cromosómicamente pueden explicar la resistencia intrínseca de algunas especies bacterianas a un antibiótico o familia de antibióticos concreta (Singh *et al.* 2002).

Existen cinco grandes familias de bombas de eflujo o expulsión activa que se diferencian entre sí por su estructura, fuente de energía utilizada para el transporte de las moléculas, tipo de sustrato que expulsan y especie bacteriana en la que se expresan (Piddock, 2006): MFS (*Mayor Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*), ABC (*ATP-Binding Cassette*) y MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*).

Un ejemplo de molécula que se puede ver afectada por este mecanismo de resistencia, como se ha comentado previamente, es tetraciclina. Este antibiótico puede ser expulsado del citoplasma bacteriano por acción de las bombas de eflujo Tet (pertenecientes a la familia MFS), que utilizan el intercambio de protones como fuente de energía. En la actualidad se describen más de 20 genes *tet* diferentes, muchos de ellos en elementos genéticos móviles. La mayoría de estos sistemas se encuentran en bacterias Gram-negativas, aunque también se han descrito en Gram-positivas, y algunos son selectivos, afectando a tetraciclina y a doxiciclina, pero sin disminuir la sensibilidad a minociclina o tigeciclina (Poole, 2005; Roberts, 2005). Sin embargo, además de estos sistemas de expulsión activa específicos de tetraciclina, este antibiótico también puede verse afectado por otros sistemas como AcrAB-TolC en *Enterobacteriaceae* y MexAB-OprM en *Pseudomonas aeruginosa*, ambas incluidas en la familia RND, y que son capaces de extruir tetraciclina como parte de su papel en la resistencia a múltiples antibióticos (Dean *et al.* 2003; Visalli *et al.* 2003).

1.2.4. Cambios en la diana de actuación del antibiótico

Otra estrategia común en el desarrollo de resistencia a los antibióticos es impedir la acción de estos. Para lograrlo, las bacterias han desarrollado diferentes tácticas, como la protección del objetivo, evitando que el antibiótico alcance su sitio de unión, o la modificación del mismo, provocando una menor afinidad de este por el antibiótico (Munita y Arias, 2016).

La protección de la diana se consigue a través de proteínas que median en su enmascaramiento. Algunos de los genes que codifican para la síntesis de estas proteínas se han encontrado en el cromosoma bacteriano, aunque la mayoría de los clínicamente relevantes son transportados por elementos genéticos móviles. Un ejemplo es la resistencia a fluoroquinolonas debido a la presencia de los genes plasmídicos *qnr*. Las proteínas Qnr actúan uniéndose a la topoisomerasa II (o ADN girasa) y a la topoisomerasa IV, entorpeciendo con ello la unión de las fluoroquinolonas a su diana de actuación en el centro activo de estas enzimas (Rodríguez-Martínez *et al.* 2011).

Las modificaciones en la diana pueden ocurrir de diversas formas: por mutaciones puntuales en los genes que la codifican, por alteraciones enzimáticas del sitio de unión, o por el reemplazo o desvío de la diana original. Independientemente del tipo de cambio, el efecto final es el mismo, una disminución de la afinidad del antibiótico por su objetivo (Campbell *et al.* 2001). Sin embargo, estas modificaciones pueden suponer una pérdida en la actividad de la enzima modificada, dando lugar a reacciones enzimáticas incompletas o con una menor cinética, lo que puede afectar a la supervivencia bacteriana (Sandegren *et al.* 2008).

Un ejemplo de resistencia debido a la modificación de la diana lo encontramos nuevamente en el caso de las fluoroquinolonas. Las mutaciones en los segmentos denominados QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*) de los genes cromosómicos que codifican a la ADN girasa y/o a la topoisomerasa IV, tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas, pueden dar lugar a la sustitución de aminoácidos en la zona de interacción entre el antibiótico y la enzima, provocando la pérdida de afinidad entre ambos y, por tanto, la aparición de la resistencia (Drlica y Malik, 2003; Sorlózano *et al.* 2007).

1.2.5. Adaptación celular global frente al antibiótico

Las bacterias, a lo largo de millones de años de selección natural y evolución, han desarrollado complejos mecanismos para poder hacer frente a los múltiples factores de estrés ambiental a los que se ven sometidas, lo que se hace especialmente importante en los entornos más hostiles, como es el cuerpo humano. Se encuentran en una constante competencia por los limitados nutrientes de su medio, a lo que se

suma la necesidad de evitar el ataque de moléculas que producen otros organismos rivales (Pogliano *et al.* 2012).

Cuando las bacterias colonizan o infectan un hospedador en particular se ven atacadas constantemente por su sistema inmunológico. Esto les obliga a adaptarse a esta situación estresante si quieren establecer un nicho biológico concreto. De esta manera, los microorganismos patógenos han desarrollado mecanismos con los que pueden evitar la interrupción de procesos celulares fundamentales, como la síntesis de la pared celular o la homeostasis de la membrana citoplasmática. Estos mecanismos también suponen una ventaja de las bacterias frente a los antibióticos, como ocurre en la formación de biofilms.

Un biofilm es una comunidad estructurada de bacterias aisladas en una matriz de producción propia, que se adhiere a superficies inertes o vivas, como tejidos, implantes, dispositivos médicos protésicos, catéteres, materiales dentales, válvulas cardíacas, dispositivos anticonceptivos intrauterinos o lentes de contacto, entre otros (Jolivet-Gougeon y Bonnaure-Mallet, 2014). Se originan a partir de bacterias que actúan como colonizadoras, adhiriéndose a las superficies y excretando una sustancia denominada exopolisacárido, que puede estar compuesta por diferentes polisacáridos (celulosa, alginatos, poli-N-acetilglucosamina), proteínas, lípidos y ARN o ADN extracelular, y que acaba formando una red densa que dificulta el paso de los antibióticos y, por tanto, el acceso de estos a las bacterias (Sun *et al.* 2013).

1.3. FOSFOMICINA

Fosfomicina o ácido 1,2-epoxipropilfosfónico, también denominado fosfomicina durante los primeros años tras su descubrimiento, es un antibiótico de origen natural aislado en 1969 de una cepa de *Streptomyces fradiae* obtenida de una muestra de tierra de la provincia de Alicante (Hendlin *et al.* 1969). Su estructura química es sencilla, no está relacionada con la de otras familias de antibióticos y posee un peso molecular de 138,1 g/mol, el más bajo para un antibiótico hasta la aparición de cicloserina en 1982. Está compuesto por un anillo epóxido, al que se debe su actividad antibiótica, y tres átomos de carbono con un enlace carbono-fosfórico sin puente de oxígeno intermedio (figura 1). En los años posteriores a su descubrimiento, fosfomicina se pudo aislar de otras especies del género *Streptomyces*, como *S.*

wedmorensis o *S. viridochromogenes*, de *Pseudomonas* como *P. viridiflava* o *P. syringae* y de algunas especies de *Penicillium*, si bien hoy día es un antibiótico de producción sintética (Gobernado, 2003; Shi *et al.* 2001).

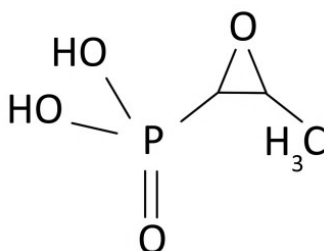


Figura 1: Estructura química de fosfomicina.

En la actualidad, este antibiótico tiene como indicación principal el tratamiento de las ITUs (Wagenlehner *et al.* 2011). En España, para su administración intravenosa en caso de pielonefritis e ITUs complicadas, se utiliza la sal disódica de fosfomicina, mientras que para su administración oral en cistitis e ITUs no complicadas se combina con sal cálcica o con la base orgánica tris-hidroxi metil-aminoetano (trometamol o trometamina). Esta última combinación, fosfomicina-trometamina, se administra al paciente en una única dosis, suficiente para alcanzar concentraciones en orina efectivas frente a la mayoría de los patógenos urinarios (Schito, 2003).

Fosfomicina ha demostrado una gran actividad bactericida frente a cocos Gram-positivos, como *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* o *Streptococcus pneumoniae*, así como frente a bacilos Gram-negativos entéricos, por lo que se trata de una buena opción en el tratamiento de infecciones ocasionadas por estas bacterias, incluidas las multirresistentes. Sin embargo, cabe señalar que la sensibilidad de algunas de estas, como *E. coli* o *Klebsiella pneumoniae*, se está viendo especialmente afectada como consecuencia del incremento de su prescripción en el tratamiento de las ITUs (Falagas *et al.* 2010a).

1.3.1. Mecanismo de acción

Fosfomicina es un análogo estructural del fosfoenolpiruvato (PEP) (figura 2).

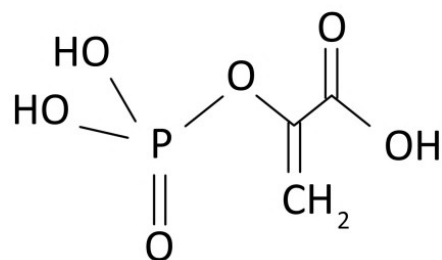


Figura 2: Estructura química del fosfoenolpiruvato.

Su mecanismo de acción se basa en la competencia por el centro activo de la enzima UDP-N-acetilglucosamina-enolpiruvil-transferasa (MurA), a la que se une mediante enlace covalente. MurA cataliza la transferencia del PEP al carbono 3' de algunas moléculas de N-acetilglucosamina uridin-difosfato (NAG-UDP) para formar N-acetilmurámico uridin-difosfato (NAM-UDP), paso necesario en la síntesis de la pared celular bacteriana (figura 3). Concretamente, este antibiótico se une de manera covalente al grupo tiol (-SH) del aminoácido cisteína situado en la posición 115 (Cys115) del centro activo de MurA (tomando como referencia la secuencia de aminoácidos de esta enzima en *E. coli*). De esta forma, se impide la unión del PEP y, como consecuencia, se inhibe la formación del peptidoglucano y de la pared celular en un estadio más temprano al que actúan otros antibióticos como bacitracina, betalactámicos o glucopéptidos (Eschenburg *et al.* 2005; Falagas *et al.* 2016).

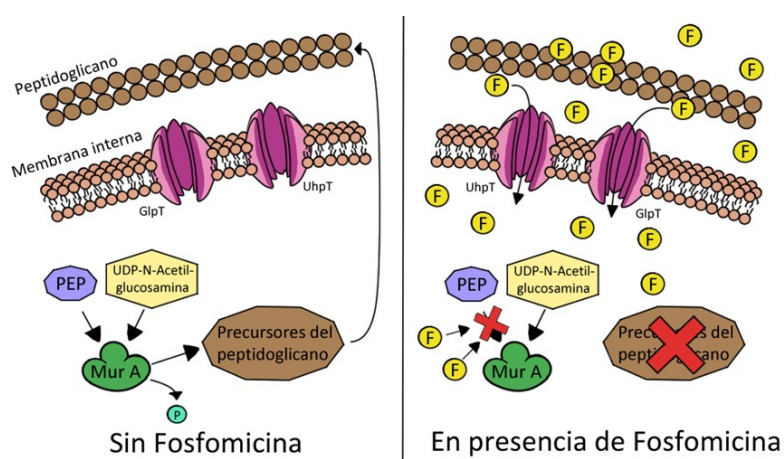


Figura 3: Mecanismo de acción de fosfomicina (adaptado de Castañeda-García *et al.* 2013). El antibiótico (F) alcanza el citoplasma bacteriano a través de los transportadores (GlpT y/o UhpT). Posteriormente se une a la enzima MurA, impidiendo que esta se una a su sustrato natural, el fosfoenolpiruvato (PEP), bloqueando así la síntesis del peptidoglucano.

Para ejercer este mecanismo de acción es necesario que, previamente, fosfomicina acceda al citoplasma bacteriano. Para ello, puede utilizar las mismas vías que el glicerol-3-fosfato (G3P) y la glucosa-6-fosfato (G6P), dos moléculas que presentan una gran similitud estructural con este antibiótico, y que utilizan los transportadores GlpT y UhpT, respectivamente, para acceder al interior de la bacteria (figura 4). Ambos transportadores pertenecen a la familia de proteínas OPA (*Organophosphate-Phosphate Antiporter*), que está presente en un gran número de especies bacterianas con un elevado grado de conservación (Lemieux *et al.* 2004a).

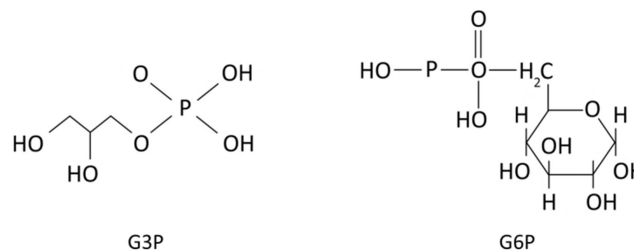


Figura 4: Estructura química del glicerol-3-fosfato (G3P) y de la glucosa-6-fosfato (G6P).

En *E. coli*, GlpT presenta una estructura de 12 segmentos α -hélice (H1-H12), altamente conservadas en otras bacterias, ya que es un componente integral de la membrana citoplasmática. Estos segmentos forman dos dominios de seis hélices conectados a través de un largo bucle central. El poro, encargado de la translocación del sustrato, se sitúa entre ambos dominios y se abre al citoplasma. GlpT es un sistema transportador antiporte, a través del cual una molécula de fosfato inorgánico pasa hacia el exterior de la bacteria a favor de gradiente y una molécula de G3P accede al citoplasma celular en contra de gradiente (Huang *et al.* 2003; Lemieux *et al.* 2004b).

De igual modo, UhpT presenta cierta analogía en su secuencia de aminoácidos con GlpT, así como una estructura monomérica similar, con 12 segmentos α -hélice transmembrana. La proteína de transporte UhpT intercambia, también por un mecanismo antiporte, una molécula de fosfato citoplasmático por una hexosa-fosfato extracelular, siendo responsable de la entrada de G6P, manosa 6-fosfato o fructosa 6-fosfato, entre otras, hacia el interior bacteriano (Castañeda-García *et al.* 2013).

La actividad de estos dos transportadores se induce ante la presencia de sus sustratos en el medio extracelular (G3P y G6P, respectivamente) y está regulada por un sistema proteico en el que el AMP cíclico (cAMP) y la proteína receptora de cAMP

(CRP, *cAMP Receptor Protein*) juegan un papel fundamental (Castañeda-García *et al.* 2013; Falagas *et al.* 2016). La síntesis de cAMP es dependiente de la enzima adenilato ciclasa (CyaA), cuya concentración citoplasmática se regula, a su vez, por la enzima fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (PtsI) del sistema PTS (*Phosphotransferase Transport System*) (Sakamoto *et al.* 2003). La proteína CRP es uno de los siete principales reguladores de la expresión génica presente en *E. coli*. En su estructura presenta un dominio N-terminal de unión a cAMP y un dominio C-terminal de unión al ADN, que se conectan a través de una región bisagra de pequeño tamaño (Geng y Jiang, 2015). Cuando cAMP se une a CRP, el complejo cAMP-CRP se une a regiones promotoras de la transcripción génica y con ello se inicia la síntesis de las proteínas correspondientes (Grainger *et al.* 2005)

La transcripción del gen *glpT* está regulada por la proteína GlpR y el complejo cAMP-CRP (figura 5). GlpR, al unirse a los operadores adyacentes al promotor de *glpT*, bloquea la expresión del gen. Sin embargo, cuando GlpR se une a G3P, reduce su afinidad por el operador, lo que permite que se unan a este el complejo cAMP-CRP, que activa la transcripción de *glpT* e incrementa la expresión del transportador GlpT (Saier *et al.* 2017). Una modificación de GlpR que condujese a su inactivación tendría como resultado una expresión constitutiva de *glpT* (Castañeda-García *et al.* 2013).

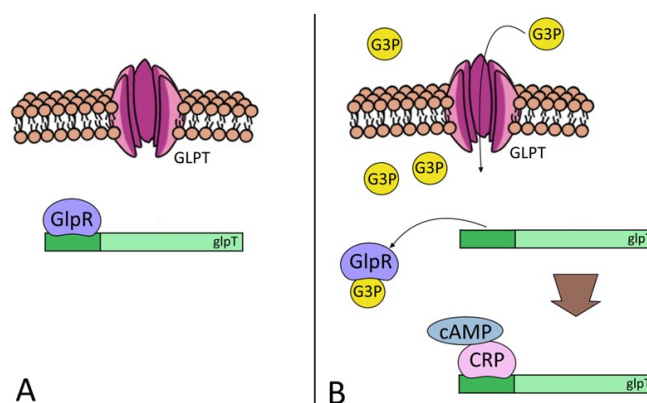


Figura 5: Mecanismo de regulación de GlpT (adaptado de Castañeda-García *et al.* 2013). A: cuando en el medio externo no hay G3P, el represor GlpR se une a la zona promotora del gen *glpT* y reduce la expresión del transportador GlpT a niveles mínimos. B: cuando en el medio externo hay G3P, su presencia estimula la producción del transportador transmembrana GlpT mediante la reducción de la afinidad del represor GlpR por el promotor de *glpT*.

La expresión de UhpT está regulada por varios genes (*uhpA*, *uhpB* y *uhpC*) cuyos productos son esenciales para alcanzar unos niveles elevados del transportador UhpT (figura 6). El complejo proteico UhpC-UhpB es una estructura que se encuentra

integrada en la membrana citoplasmática. UhpC detecta la presencia de G6P en el medio extracelular, activando a UhpB, que fosforila a UhpA, una proteína reguladora que se une al complejo cAMP-CRP activando la transcripción de *uhpT* (Kurabayashi *et al.* 2017; Oleknovich y Kadner, 2002).

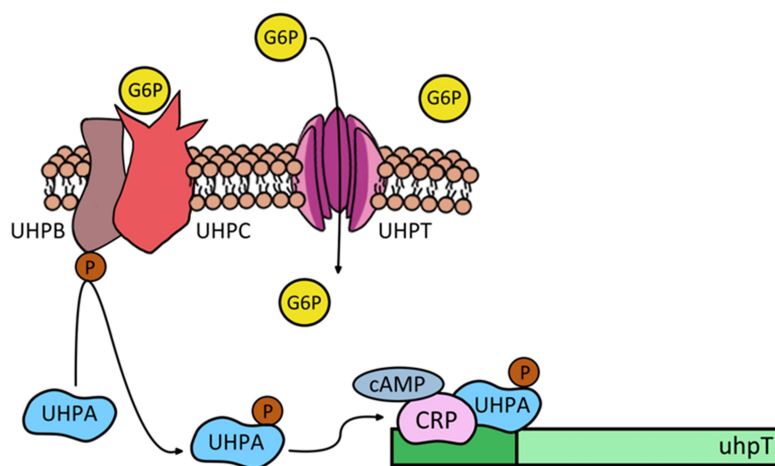


Figura 6: Mecanismo de regulación de UhpT (adaptado de Castañeda-García *et al.* 2013). En la regulación de la expresión de *uhpT* intervienen las proteínas reguladoras UhpA, UhpB y UhpC. UhpC y UhpB forman un complejo que detecta la presencia de G6P en el medio extracelular. Cuando hay G6P, UhpB fosforila a UhpA, que forma un complejo junto a CRP y cAMP que se une al promotor de *uhpT* y activa su transcripción.

1.3.2. Mecanismos de resistencia

Los tres mecanismos principales a través de los cuales se ha descrito resistencia a fosfomicina, especialmente en *E. coli*, la bacteria más estudiada, son la modificación de la diana, las alteraciones de la permeabilidad y la modificación del antibiótico.

Modificación de la diana MurA

Como se ha señalado con anterioridad, la enzima MurA es la diana de actuación de fosfomicina, por lo que modificaciones en el sitio de unión entre el antibiótico y la enzima, especialmente en la cisteína en posición 115 (Cys115), se han relacionado con resistencia en *E. coli* (Castañeda-García *et al.* 2013).

Al tratarse de una enzima esencial en el metabolismo bacteriano, su modificación puede tener consecuencias graves para la supervivencia celular (Nilsson *et al.* 2003). En este sentido, se ha demostrado que una sustitución en Cys115 por Glu115 (Cys115Glu) no sólo se relaciona con la pérdida de actividad enzimática de MurA sino que compromete enormemente la síntesis de la pared bacteriana y, por

tanto, la viabilidad celular (Eschenburg *et al.* 2005; Nilsson *et al.* 2003). Sin embargo, si la sustitución del aminoácido es a Asp115 (Cys115Asp), MurA permanece totalmente funcional, por lo que estos mutantes no verían comprometida su supervivencia, aunque expresarían resistencia a fosfomicina por la incapacidad del antibiótico de unirse a su centro activo (Eschenburg *et al.* 2005). Cabe destacar que la presencia de ácido aspártico en la posición 115 de MurA (Asp115) es constitutiva en algunas especies bacterianas que son intrínsecamente resistentes a fosfomicina, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* o *Borrelia burgdorferi* (Jiang *et al.* 2011; McCoy *et al.* 2003; Xu *et al.* 2014). De la misma manera, si estas bacterias sufren una sustitución del tipo Asp115Cys pierden su resistencia natural, haciéndose sensibles al antibiótico (Eschenburg *et al.* 2005; Jiang *et al.* 2011).

Como consecuencia del problema de supervivencia que pueden generar a la bacteria las modificaciones en el centro activo de MurA, estas no son habituales en aislados de origen clínico. Sin embargo, sí son frecuentes las modificaciones en otros aminoácidos diferentes. Más en concreto, en aislados clínicos de *E. coli* se han descrito las sustituciones Asp369Asn o Leu370Ile. Ambas parecen contribuir a la aparición de resistencia a fosfomicina debido a que los aminoácidos en estas posiciones están muy conservados, lo que indica que podrían ser importantes para la unión del PEP con el sitio activo del enzima (Takahata *et al.* 2010).

Por último, una sobreexpresión de MurA, sin efecto adverso sobre la supervivencia de la bacteria, también es un mecanismo capaz de conferir resistencia a fosfomicina, aunque no ha sido descrito en aislados clínicos (Couce *et al.* 2012). Se ha observado que esta sobreexpresión puede surgir, bien como consecuencia de una mayor afinidad de la ARN polimerasa por el promotor de la transcripción del gen *murA* (Depardieu *et al.* 2005; McAleese y Foster, 2003), o bien por la adquisición de un elemento de inserción con actividad promotora sobre el gen (Corvec *et al.* 2003).

Reducción de la permeabilidad bacteriana a fosfomicina

Se trata del mecanismo de resistencia más frecuente a fosfomicina. Diferentes estudios realizados en aislados clínicos de *E. coli* y, en menor medida de *K. pneumoniae*, han indicado que las modificaciones de las proteínas de transporte GlpT o UhpT, o en los sistemas que regulan su expresión, pueden conducir a la reducción de

la entrada de fosfomicina hacia el interior bacteriano y provocar la aparición de resistencia al antibiótico (Castañeda-García *et al.* 2013). El déficit de GltT impedirá a un aislado bacteriano crecer en presencia de G3P como única fuente de carbono, mientras que el déficit de UhpT generará el mismo efecto cuando la única molécula biológicamente activa presente en el medio sea G6P. La ausencia de ambos sistemas de transporte imposibilitará que una bacteria sobreviva en un medio que sólo contenga estas fuentes para la obtención de carbono y energía.

Además, la ausencia de las proteínas UhpA, UhpB o UhpC, así como la alteración de las proteínas CyaA y PtsI, o de los genes que codifican a cualquiera de ellas, afectará también la entrada de G3P o G6P, ya que se verá afectada la expresión de los transportadores GltT y/o UhpT, propiciando con ello también la aparición de resistencia a fosfomicina por la reducción de su permeabilidad (Sakamoto *et al.* 2003).

En otras bacterias, como *P. aeruginosa*, fosfomicina solo puede alcanzar el citoplasma bacteriano a través del transportador GltT, ya que carece de UhpT. De esta forma, un déficit en la actividad de GltT provoca la aparición de resistencia a fosfomicina en esta bacteria, lo cual es un hecho bastante común (Castañeda-García *et al.* 2009).

Un caso especial es el de *Listeria monocytogenes*. Esta bacteria muestra *in vitro* niveles elevados de resistencia a fosfomicina, porque es incapaz de incorporar el antibiótico por la carencia de una vía de entrada. Sin embargo, *in vivo*, en el transcurso de una infección, es capaz de transformarse en una bacteria sensible al antibiótico. Esto ocurre porque la proteína reguladora PrfA (uno de sus factores de virulencia más importantes) induce la expresión del transportador Hpt (una permeasa para la G6P), abriendo la posibilidad de entrada de fosfomicina en el interior de la bacteria (Chico-Calero *et al.* 2002; Scotti *et al.* 2006).

Modificación enzimática del antibiótico

Existen varias enzimas capaces de modificar e inactivar la molécula de fosfomicina, especialmente FosA, FosC2, FosB y FosX. Estas proteínas pertenecen a una superfamilia de metaloenzimas dependientes de iones metálicos divalentes, que están relacionadas evolutivamente con otras metaloenzimas como la glioxalasa I, la metilmalonil-CoA epimerasa o la extradiol-oxigenasa. Todas ellas comparten un

plegamiento estructural que les otorga una gran versatilidad, que se traduce en su capacidad para mediar en un gran número de reacciones catalíticas. Concretamente, FosA, FosC2, FosB y FosX catalizan la apertura del anillo epóxido de fosfomicina, inhibiendo su función antibiótica, si bien cada enzima realiza esta modificación mediante un mecanismo químico diferente (Armstrong, 2000; Rigsby *et al.* 2005).

FosA fue la primera enzima identificada con capacidad de inactivar a fosfomicina. El gen *fosA* (o *fosA1*) se detectó por primera vez en un hospital de Asturias (España) en plásmidos conjugativos presentes en muestras clínicas de *Serratia marcescens* (Mendoza *et al.* 1980). Más concretamente, este gen forma parte del transposón Tn2921, por lo que también se le ha denominado *fosA*^{Tn2921}. Su secuencia muestra un elevado grado de similitud con determinados segmentos genómicos presentes en el cromosoma bacteriano de *Enterobacter cancerogenus*, donde se considera que tiene su origen (Seoane *et al.* 2010). El gen *fosA2* se ha descrito en el cromosoma de *Enterobacter cloacae* (Xu *et al.* 2011), pero no está documentada su diseminación a través de plásmidos (Yang *et al.* 2019). Los genes plasmídicos *fosA5* y *fosA6* se han hallado fundamentalmente en *E. coli*, pero probablemente originados en el cromosoma de *K. pneumoniae* (gen *fosA*^{KP}), con el que poseen más del 95% de similitud (Ito *et al.* 2017; Ma *et al.* 2015). Los genes *fosA4* y *fosA3* presentan una elevada similitud entre sí, por lo que se considera que tienen un mismo origen, en el cromosoma de *Klebsiella georgiana* (Ito *et al.* 2018). El gen plasmídico *fosA3* es, entre el conjunto de genes *fos*, el que se observa, sin duda, con mayor frecuencia, distribuido sobre todo en *E. coli*, aunque también se ha descrito en otras enterobacterias (Yang *et al.* 2019). Por último, hasta el momento, la presencia de *fosA7* solo se ha informado como cromosómica en aislados de *Salmonella enterica* serovar *Heidelberg* de origen animal (Rehman *et al.* 2017). En general, los datos sugieren que los genes *fos* mediados por plásmidos se han originado en cromosomas bacterianos, donde son capturados por secuencias de inserción u otros elementos móviles (Yang *et al.* 2019).

FosC2 es una enzima relacionada con la anterior. El gen *fosC2* comparte un 56% de su secuencia con *fosA* y un 72% con *fosG*, un gen cromosómico presente en *Achromobacter denitrificans* (Yang *et al.* 2019). La primera descripción de este gen se produjo en un plásmido presente en un aislado clínico de *E. coli* (Wachino *et al.* 2010).

Es necesario aclarar que la enzima FosC2 no pertenece a la misma familia que la enzima FosC (ver más adelante). El gen *fosC2* fue denominado así por su similitud con la secuencia del gen *fosC* de *A. denitrificans*, que años más tarde se renombró como *fosG*.

Ambas proteínas, FosA y FosC2 poseen actividad glutatión S-transferasa dependiente de Mn^{2+} y K^+ (figura 7), que inactiva a fosfomicina mediante la rotura del anillo epóxido a consecuencia de la adición de glutatión reducido (GSH), lo que imposibilita su unión al centro activo de MurA (Beharry y Palzkill, 2005; Wachino *et al.* 2010; Wang *et al.* 2015).

FosB es una tiol-S-transferasa relacionada con FosA, descrita por primera vez en un plásmido responsable de la resistencia a fosfomicina en *Staphylococcus epidermidis* (Fu *et al.* 2016). Posteriormente, el gen *fosB* se ha detectado en gran número de bacterias, todas ellas Gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecium* y *S. aureus* (Castañeda-García *et al.* 2013). En *B. subtilis*, una especie bacteriana con resistencia intrínseca a fosfomicina, el gen *fosB* (nombrado como *yndN*) es de naturaleza cromosómica. En esta especie, la expresión de *fosB* requiere de la presencia del factor sigma extracitoplasmático SigW (Cao *et al.* 2001), un regulador crucial en la inducción de resistencia a diversos antibióticos en esta bacteria (Butcher y Helmann, 2006). Por tanto, las cepas de *B. subtilis* que presentan mutaciones en *fosB* o *sigW* expresan una elevada sensibilidad a fosfomicina (Cao *et al.* 2001).

En un principio, FosB fue categorizada como una L-cisteína tiol-transferasa dependiente de Mn^{2+} y Mg^{2+} , capaz de catalizar la adición de un grupo tiol, que rompe el anillo epóxido, usando L-cisteína como donante (Cao *et al.* 2001). Más tarde se demostró que el bacilitiol, un glucósido α -anomérico de L-cisteinil-D-glucosamina con ácido L-málico, es el donante del grupo tiol que usa FosB *in vivo* (Gaballa *et al.* 2010; Roberts *et al.* 2013) (figura 7). Esto último explica que aquellas cepas de *B. subtilis*, *B. anthracis* y *S. aureus* que carecen de bacilitiol sean sensibles a fosfomicina de forma muy similar a aquellas bacterias que han perdido por completo el gen *fosB* (Gaballa *et al.* 2010; Parsonage *et al.* 2010; Roberts *et al.* 2013).

Por último, FosX es una hidrolasa perteneciente a una subfamilia de enzimas relacionadas con FosA y FosB. El gen *fosX*, que comparte entre un 30% y un 35% de su

secuencia con *fosA* y *fosB*, se ha detectado en el cromosoma de ciertas especies bacterianas como *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Brucella melitensis* (Fillgrove *et al.* 2003). FosX es una epoxi-hidrolasa dependiente de Mn^{2+} capaz de catalizar la adición de agua al carbono en posición 1 de la molécula de fosfomicina, rompiendo el anillo epóxido y produciendo un diol (figura 7), con la consecuente pérdida de la actividad antibiótica de la molécula (Fillgrove *et al.* 2003; Fillgrove *et al.* 2007).

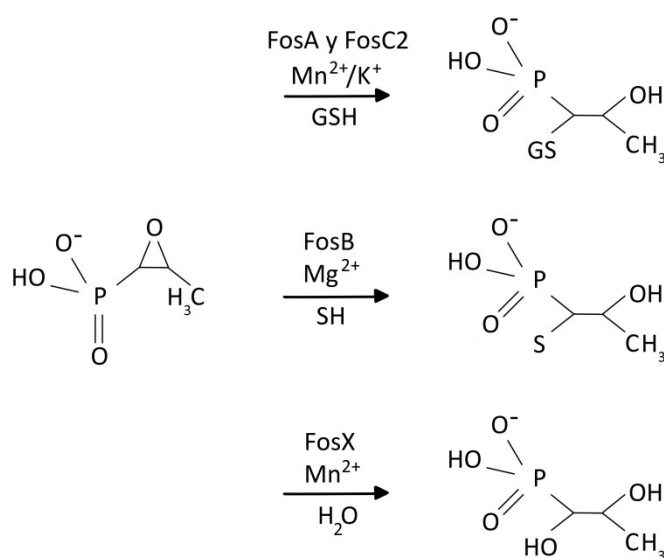


Figura 7: Mecanismos de acción de FosA, FosC2, FosB y FosX.

Otro posible mecanismo modificador de la molécula de fosfomicina se basa en la presencia de quinasas. Las bacterias que sintetizan antibióticos naturales presentan genes cromosómicos que les confieren una resistencia constitutiva que protegen a la célula de los efectos dañinos del antibiótico producido. Por ese motivo, aquellas especies bacterianas capaces de sintetizar fosfomicina, como algunas de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*, presentan quinasas (sin relación con las metaloenzimas Fos descritas anteriormente), capaces de detoxificar al antibiótico en el citoplasma bacteriano. En el género *Streptomyces*, existen dos fosfomicin-quinatas de codificación cromosómica que modifican a fosfomicina de manera secuencial en presencia de ATP y Mg^{2+} , imposibilitando la unión al centro activo de MurA. La primera de estas enzimas, FomA, cataliza la transformación de fosfomicina a fosfomicina-monofosfato, mientras que FomB añade otro grupo fosfato para formar fosfomicina-difosfato (Kobayashi *et al.*

2000). En *Pseudomonas syringae* este proceso de modificación de fosfomicina lo realiza la enzima de origen cromosómico FosC, un ortólogo de FomA (Castañeda-García *et al.* 2013).

1.3.3. Espectro de actividad

Fosfomicina es un antibiótico de amplio espectro que ha demostrado, en diferentes estudios, su excelente capacidad bactericida frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, incluso en aquellos aislados que muestran resistencia a los antibióticos más comúnmente usados en clínica humana.

Actividad de fosfomicina frente a bacterias Gram-positivas

Fosfomicina es habitualmente activo frente a *S. aureus*, tanto frente a aislados sensibles como resistentes a meticilina (*S. aureus* meticilín resistentes, SAMR). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de este antibiótico en *S. aureus* suele estar en torno a 1 µg/ml (Falagas *et al.* 2010b) si bien, entre los aislados SAMR podemos encontrar, con muy baja frecuencia, algunos con elevada resistencia a este antibiótico (Lu *et al.* 2011). También es activo frente a la mayoría de aislados de estafilococos coagulasa negativa, aunque la probabilidad de encontrar aislados resistentes es mayor que en *S. aureus* (Falagas *et al.* 2010b).

In vitro, la mayoría de los aislados clínicos de *E. faecalis* permanecen sensibles a fosfomicina, incluso aquellos que son resistentes a vancomicina (VRE, *Vancomycin-Resistant Enterococci*), con valores de CMI entre 32 y 64 µg/ml. La aparición de aislados con un elevado grado de resistencia a este antibiótico es muy poco frecuente (Hirsch *et al.* 2015; Neuner *et al.* 2012; Pogue *et al.* 2013).

La sensibilidad a fosfomicina en *S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* es variable, según diversos estudios publicados (Falagas *et al.* 2010b; Hirsch *et al.* 2015; Lu *et al.* 2011).

Actividad de fosfomicina frente a bacterias Gram-negativas

Fosfomicina muestra una excelente actividad, especialmente frente a *E. coli*, principal agente patógeno implicado en las ITUs, así como frente a *K. pneumoniae*. La sensibilidad de la primera alcanza el 97-100% de los aislados clínicos, mientras que

para la segunda las tasas de sensibilidad oscilan entre el 70% y el 85%, según los datos recogidos en numerosos estudios, en diferentes áreas geográficas (Biondo *et al.* 2011; Demir y Buyukguclu, 2013; Gobernado *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2013; Karlowsky *et al.* 2014; Maraki *et al.* 2009; Naber *et al.* 2008; Sorlózano *et al.* 2014). Otras bacterias Gram-negativas como *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *S. marcescens* y *S. enterica* son, por norma general, sensibles a fosfomicina, aunque las tasas de resistencia son ligeramente superiores a las anteriores (Demir y Buyukguclu, 2013; Falagas *et al.* 2010c).

Un hecho importante, que favorece su prescripción clínica, es que mantiene una excelente actividad frente a aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEEs, e incluso carbapenemasas, por encima de la que muestran otros antibióticos con indicaciones parecidas como nitrofurantoína, ciprofloxacino o trimetoprim-sulfametoxazol (Araj y Jaber, 2012; Demir y Buyukguclu, 2013; Hutley *et al.* 2010; Keating, 2013; Liu *et al.* 2011; Maraki *et al.* 2009, Saltoglu *et al.* 2015). Una revisión realizada por Falagas *et al.* (2009), que incluyó 17 estudios y que evaluó la actividad de fosfomicina sobre bacterias multirresistentes de la familia *Enterobacteriaceae*, entre las que se incluían cepas BLEE, demostró que la sensibilidad al antibiótico superaba el 90% de estos aislados. En otro estudio realizado en Estados Unidos, entre el 86% y el 93% de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo KPC fueron sensibles a fosfomicina, a pesar de que se mostraron resistentes a otros antibióticos como tigeciclina o colistina (Endimiani *et al.* 2010). Sin embargo, en un estudio similar realizado en Reino Unido, tan solo el 67% de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas fueron sensibles a fosfomicina (Livermore *et al.* 2011). En estos casos, se recomienda la combinación de fosfomicina con meropenem, cuya combinación sinérgica ha demostrado su eficacia en infecciones producidas por cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC (Souli *et al.* 2011).

A pesar de los buenos datos anteriores en relación a las altas tasas de sensibilidad a fosfomicina, cabe ser precavidos, ya que como muestran diversos estudios realizados en nuestro país, la tasa de resistencia en aislados clínicos de *E. coli*, sobre todo productores de BLEEs, se ha visto incrementada en los últimos años, por lo que es de esperar que continúe haciéndolo de forma paralela al incremento de su utilización terapéutica (Oteo *et al.* 2010; Sorlózano *et al.* 2014).

En *P. aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia* los valores de CMI suelen ser cercanos a 64 µg/ml, por lo que su caracterización como aislados sensibles o resistentes va a depender de los criterios elegidos para definir el punto de corte de categoría clínica (Hirsch *et al.* 2015; Lu *et al.* 2011; Perdigao-Neto *et al.* 2014). *Acinetobacter baumannii* y *Morganella morganii* poseen resistencia natural a fosfomicina, por lo que frente a estas bacterias solo se plantea su uso en combinación con otros antibióticos (Demir y Buyukguclu, 2013; Hirsch *et al.* 2015; Lu *et al.* 2011).

Actividad de fosfomicina frente a bacterias productoras de biofilms

Fosfomicina tiene capacidad de penetrar en los biofilms. Diversos estudios experimentales han mostrado que este antibiótico, tanto en administración única, como en combinación con otros, es capaz, no solo de reducir o eliminar significativamente la cantidad de bacterias del biofilm, sino también de llegar a modificar la estructura de este (Anderson *et al.* 2013; Cai *et al.* 2009; Corvec *et al.* 2013; Mihailescu *et al.* 2014; Oliva *et al.* 2014). Estudios realizados en biomodelos de biofilms de SAMR, *P. aeruginosa* o *E. coli* han mostrado que la combinación de fosfomicina con vancomicina, prulifloxacino o N-acetilcisteína, respectivamente, hace desaparecer la estructura del biofilm (Marchese *et al.* 2003a; Mikuniya *et al.* 2007; Shi *et al.* 2014), aunque este efecto no se ha demostrado en el caso de los biofilms producidos por *S. epidermidis* cuando se ha usado fosfomicina en combinación con azitromicina (Hadju *et al.* 2009; Presterl *et al.* 2009).

1.3.4. Farmacocinética

Fosfomicina se encuentra disponible en forma de dos sales para su administración oral, fosfomicina-trometamina y fosfomicina cálcica. Ambas son absorbidas rápidamente tras su administración, si bien la primera presenta una biodisponibilidad significativamente mayor (40%) que la segunda (12%), debido a que fosfomicina cálcica se hidroliza por acción del ácido gástrico. Para la administración intravenosa se utiliza fosfomicina disódica. Esta administración se debe realizar con una toma de sodio elevada, lo que la convierte en una práctica desaconsejada en pacientes con fallo cardíaco o que se encuentren en hemodiálisis (Michalopoulos *et al.* 2010).

Es un antibiótico que presenta nula capacidad de unión a proteínas (Roussos *et al.* 2009), por lo que se elimina del organismo exclusivamente mediante filtración glomerular (Frimodt-Møller, 2018).

Tras una sola dosis de 3 gramos de fosfomicina (unos 5,63 gramos de fosfomicina-trometamol, la dosis utilizada habitualmente en el tratamiento de ITUs bajas no complicadas), se alcanza una concentración máxima en suero (C_{máx}) entre 22 y 32 µg/ml a las dos horas tras su administración, con una vida media de entre 2,4 y 7,3 horas, por lo que alcanza una tasa concentración/tiempo de entre 145 y 228 µg/ml por hora (Sastry y Doi, 2016). En orina se pueden alcanzar unas concentraciones de fosfomicina muy elevadas después de 3 horas tras su administración (1000-4000 µg/ml) y que se mantienen por encima de 100 µg/ml después de transcurridas 30-48 horas. Estos son motivos fundamentales para la administración de fosfomicina en dosis única para el tratamiento de las ITUs (Mazzei *et al.* 2006).

Cuando se administra una dosis de 4 gramos de fosfomicina disódica por vía intravenosa, la C_{máx} se sitúa entre 200 y 250 µg/ml una hora después, y si la dosis administrada es de 8 gramos alcanza entre 260 y 450 µg/ml a los 20-30 minutos posteriores a la administración (Roussos *et al.* 2009). En pacientes críticos se ha observado que el volumen de distribución puede aumentar un 50% debido al incremento de la permeabilidad capilar, provocando que se alcancen concentraciones de fosfomicina en plasma significativamente menores (Lipman *et al.* 2011; Parker *et al.* 2013; Parker *et al.* 2015). Por ese motivo, en estos pacientes se debe incrementar la dosis de fosfomicina en las primeras 24-48 horas, monitorizando la función renal (Parker *et al.* 2013; Parker *et al.* 2015).

A consecuencia de su bajo peso molecular, su larga vida media y su escasa unión a proteínas plasmáticas, fosfomicina también presenta una gran capacidad de penetración en una gran variedad de tejidos, como válvulas cardiacas (Miró *et al.* 2012), tejido pulmonar (Matzi *et al.* 2010), próstata (Gardiner *et al.* 2014), líquido intersticial del músculo y tejidos blandos (Frossard *et al.* 2000; Joukhadar *et al.* 2003), líquido cefalorraquídeo (Pfausler *et al.* 2004) y vejiga urinaria (Abbott *et al.* 2018). Sin embargo, la capacidad de penetración en los abscesos es muy variable, pudiendo ser necesarias múltiples dosis para alcanzar niveles que sean efectivos en estos casos (Sauermann *et al.* 2005).

Por último, debido a su filtrado glomerular, la insuficiencia renal disminuye enormemente la excreción de fosfomicina. Por tanto, cuando el aclaramiento de creatinina es inferior 50 ml/min la dosis de fosfomicina debe reducirse. En el caso de los pacientes hemodializados, fosfomicina es eliminada en el procedimiento, por lo que se recomienda administrar una pequeña dosis de 2 gramos tras cada sesión para mantener de esa forma las concentraciones terapéuticas (Frimodt-Møller, 2018).

1.3.5. Indicaciones clínicas

Como se ha comentado en varias ocasiones, la principal indicación de fosfomicina oral es el tratamiento de ITUs no complicadas causadas por bacterias Gram-negativas, fundamentalmente *E. coli* (Michalopoulos *et al.* 2011). Un gran número de ensayos clínicos demuestran que la eficacia del tratamiento con dosis única de fosfomicina es muy similar a la que se obtiene con tratamientos de una sola dosis o una dosis cada 3 ó 7 días de otros antibióticos como fluoroquinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol, nitrofurantoína, amoxicilina-clavulánico o cefalosporinas orales (Falagas *et al.* 2010c). Estudios realizados entre 2009 y 2013 en Estados Unidos revelaron que entre el 74,8% y el 89,9% de las ITUs curaron con la administración de una dosis única de fosfomicina oral, con tan solo un 4,3% de recurrencias (Sastry *et al.* 2015). En otro trabajo, las tasas de eficacia clínica tras la administración de una sola dosis en casos de cistitis, ITUs recurrentes e ITUs complicadas fueron de un 95%, 77% y 63%, respectivamente, con tasas de sensibilidad bacteriana al antibiótico en torno al 98%, 94% y 84%, respectivamente, lo que demuestra que la administración en dosis única, tal y como indica la farmacocinética del antibiótico, es más eficaz que la pauta de una dosis de 3 gramos de fosfomicina cada dos o tres días (Frimodt-Møller, 2018). Otro estudio español puso de manifiesto una tasa de curación del 93% en cistitis producidas por *E. coli* productores de BLEEs, mostrándose sensibles la totalidad de los aislados de esta bacteria (Rodríguez-Baño *et al.* 2008).

Con la dosis oral estándar de 3 gramos, fosfomicina también alcanza unas concentraciones adecuadas en la próstata, mejores incluso que las fluoroquinolonas, por lo que se recomienda su prescripción en el tratamiento de las prostatitis ocasionadas por microorganismos multirresistentes (Grayson *et al.* 2015) o en la

profilaxis de infección tras la intervención quirúrgica de esta glándula (Ongun *et al.* 2012; Rhodes *et al.* 2015).

Las ITUs son comunes durante el embarazo debido a los cambios hormonales y anatomo-fisiológicos que sufre el organismo, lo que favorece el crecimiento y la diseminación de bacterias en el tracto urinario materno (Fiadjoe *et al.* 2010; Gardiner *et al.* 2014). Aunque fosfomicina es capaz de atravesar la barrera placentaria, su uso durante el embarazo es seguro para el feto y para la madre (Krcmery *et al.* 2001). Por ese motivo, en el tratamiento de ITUs no complicadas en mujeres embarazadas se recomienda la prescripción de fosfomicina-trometamina en dosis única, que ha demostrado ser tan eficaz y segura como cefuroxima o amoxicilina-clavulánico (Bayrak *et al.* 2007; Usta *et al.* 2011).

En infecciones sistémicas (bacteriemia, endocarditis, infección post-quirúrgica, infecciones de piel y tejidos blandos, meningitis, encefalitis, enteritis, infección respiratoria, infección ocular e infecciones ginecológicas, entre otras), fosfomicina se administra en dosis de entre 2 y 24 gramos al día, dividido en 3 ó 4 dosis, normalmente en combinación con otros antibióticos (Falagas *et al.* 2008; Legat *et al.* 2003; Roussos *et al.* 2009). Su administración intravenosa en el tratamiento de infecciones ocasionadas por SAMR, VRE y bacterias Gram-negativas multirresistentes se ha visto incrementada en los últimos años gracias a su exclusivo mecanismo de acción y a la ventaja que ofrece frente a la nefrotoxicidad que presentan otros antibióticos como aminoglucósidos o colistina (Michalopoulos *et al.* 2010).

1.3.6. Efectos adversos e interacción con otros fármacos

Por lo general, fosfomicina es un antibiótico seguro, siendo el efecto adverso más frecuente la aparición ocasional de diarrea. Según diversos trabajos, la tasa de estos eventos diarreicos relacionados con la ingesta de fosfomicina oral varían entre un 2% y un 6%, siendo las tasas más elevadas en aquellos pacientes en los que se administró más de una dosis oral de fosfomicina (Florent *et al.* 2011; Roussos *et al.* 2009; Sastry *et al.* 2015).

Los efectos sobre la microbiota intestinal tras la toma de una sola dosis de 3 gramos de fosfomicina no se han descrito; sin embargo, todo parece indicar que puede llegar a alterarla, ya que en tratamientos intensos de fosfomicina intravenosa (5

gramos dos veces al día durante 5 días) se describe una reducción significativa de las enterobacterias intestinales (Sastry y Doi, 2016).

También se ha descrito la aparición de hipocaliemia leve en casos de administración intravenosa, por lo que se deben monitorizar los niveles plasmáticos de potasio en estos casos (Florent *et al.* 2011).

Finalmente, los datos sobre interacciones entre fosfomicina y otros fármacos son escasos. Uno de los más significativos es la interacción con metoclopramida, un medicamento que favorece la motilidad gastrointestinal, y que se asocia a la reducción de las concentraciones séricas, así como de la excreción urinaria de fosfomicina, aunque este efecto es poco relevante porque las concentraciones urinarias permanecen en rangos adecuados para controlar la infección (Frimodt-Møller, 2018). Además, fosfomicina es capaz de reducir la nefrotoxicidad de aminoglucósidos, glucopéptidos y anfotericina B en modelos animales, aunque no está claro que esto sea suficiente para que pueda traducirse en un beneficio clínico para el paciente (Sastry y Doi, 2016).

1.4. NITROFURANTOÍNA

Nitrofurantoína es el antibiótico del grupo de los nitrofuranos (compuestos que contienen en su estructura uno o más grupos nitro en un esqueleto nitroaromático o nitroheterocíclico) de mayor importancia en el ámbito clínico. Se trata de un derivado sintético de imidazolidina [(E)-1-[(5-nitro-furan-2-il)metilidenamino]imidazolidin-2,4-diona], con un peso molecular de 238,16 g/mol (figura 8). Se ha utilizado durante más de 50 años, administrándose exclusivamente por vía oral y alcanzando concentraciones elevadas en orina, razón por la cual está indicada en el tratamiento y prevención de las ITUs (Giske, 2015; Hooper, 2005).

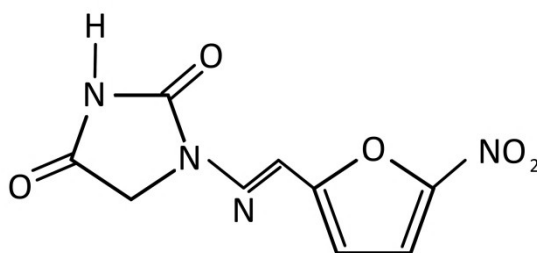


Figura 8: Estructura química de nitrofurantoína.

A pesar de haberse usado este antibiótico durante tantos años, la aparición de aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a nitrofurantoína es poco frecuente en nuestro entorno, salvo en aquellos productores de BLEEs, que pueden presentar tasas de resistencia cercanas al 30% según algunos estudios (Puerto *et al.* 2006; Sorlózano *et al.* 2014). En Estados Unidos y Canadá estas cifras se han mantenido en torno al 1,1% (Zhan *et al.* 2006), si bien son muy variables en diferentes países, como Italia (20%) o la región de Sudamérica (13%) (Fadda *et al.* 2005; Gales *et al.* 2000).

1.4.1. Mecanismo de acción

Aunque su mecanismo de acción no se conoce en profundidad, todo parece indicar que nitrofurantoína no actúa por sí misma, sino que requiere la acción de nitrato-reductasas bacterianas que modifiquen la molécula, activando su centro activo, el grupo nitro acoplado al anillo heterocíclico de furano (Hooper, 2005; Koulaouzidis *et al.* 2007). En *E. coli*, la bacteria en la que más se ha estudiado el mecanismo de acción de nitrofurantoína, existen dos tipos diferentes de actividad nitrato-reductasa, una insensible al oxígeno (nitrato-reductasas tipo I) y otra que es inhibida por la presencia de oxígeno (nitrato-reductasas tipo II). Los análisis químicos parecen apuntar que son las enzimas de tipo I, NsfA y NfsB, las que estarían detrás de actuar sobre el grupo nitro de la molécula de nitrofurantoína, reduciéndolo en una secuencia en la que aparecen distintos metabolitos intermedios, de los que posiblemente debe depender la acción bactericida de nitrofurantoína, ya que el producto final de este proceso de nitrorreducción es biológicamente inactivo (Sandegren *et al.* 2008).

En el proceso de reducción, NfsA y NfsB usan como cofactor al mononucleótido de flavina (FMN), que actúa como puente que permite el paso de los electrones desde las moléculas donantes (NADH o NADPH) hasta la molécula de nitrofurantoína. Por tanto, en el mecanismo de acción de este antibiótico también juega un papel importante la proteína RibE de *E. coli* (o RibH en *K. pneumoniae*), una lumazina sintetasa que interviene en la síntesis de riboflavina, que a su vez es esencial para la posterior producción de los FMNs (Giske, 2015; Vervoort *et al.* 2014).

Una vez modificado, el antibiótico sería capaz de dañar a la bacteria a través de procesos como la inhibición de la síntesis proteica o la inhibición de enzimas

relacionadas con la síntesis de ADN y ARN, fundamentalmente. Además, sería capaz de inhibir enzimas relacionadas con otros procesos metabólicos, como el metabolismo de los carbohidratos en el ciclo de Krebs o la síntesis de la pared celular (Huttner y Stewardson, 2018; Vervoort *et al.* 2014) (figura 9). Sin embargo, se ha demostrado que su actividad microbicida se mantiene en condiciones en las que las nitrato-reductasas bacterianas se encuentran inhibidas, por lo que nitrofurantoína debe mantener algún tipo de citotoxicidad a pesar de no estar reducida (Hooper, 2005).

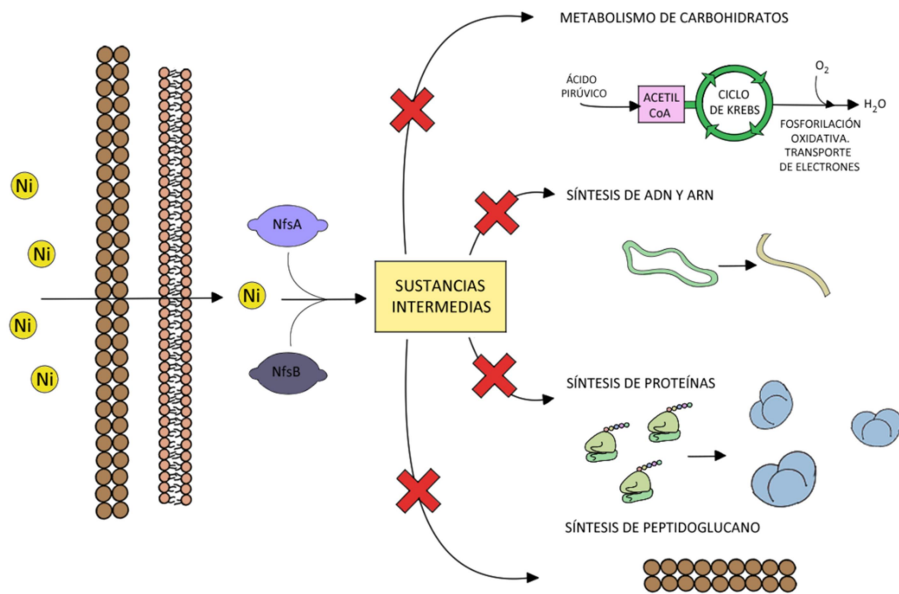


Figura 9: Mecanismo de acción de nitrofurantoína. El antibiótico es reducido por la acción de las nitrato-reductasas NfsA y NfsB, generando compuestos intermedios que dañan a la bacteria mediante la alteración de los procesos de síntesis proteica, de ADN y ARN, así como de otros procesos metabólicos importantes.

1.4.2. Mecanismos de resistencia

Existen pocos estudios que hayan tratado de dilucidar los mecanismos de resistencia que pueden desarrollar las bacterias frente a este antibiótico. En general, en *E. coli*, la bacteria más estudiada, la aparición de aislados clínicos resistentes a nitrofurantoína se ha asociado con tres posibilidades: la inhibición de la actividad nitrato-reductasa de NfsA y NfsB, que conlleva un descenso de la concentración de los derivados activos del antibiótico; la modificación del gen *ribE*, y la presencia del plásmido *oqxAB* que contiene genes que codifican mecanismos de expulsión activa para distintos antibióticos, entre ellos nitrofurantoína (Ho *et al.* 2015; Sandegren *et al.* 2008).

Los estudios realizados en bacterias con modificaciones en su nitrato-reductasas tipo I han puesto de manifiesto que la resistencia a nitrofurantoína se asocia, sobre todo, a cambios secuenciales de estas enzimas (Huttner y Stedwarson, 2018). Los datos apuntan a que debe producirse una modificación en el gen *nfsA* seguida de otra en *nfsB*, ya que si bien un cambio que inactive NfsA puede reducir ligeramente la actividad nitrato-reductasa bacteriana, uno que solo inactive NfsB no tendría ningún efecto. Por tanto, es necesaria una inactivación conjunta y secuencial de ambas nitrato-reductasas (Ho *et al.* 2015).

Entre las modificaciones de los genes *nfsA* y *nfsB*, las inserciones son las causas más frecuentes de resistencia a nitrofurantoína según los datos publicados (García *et al.* 2017; Ho *et al.* 2015). Aunque en *E. coli* se han descrito un número amplio de secuencias de inserción, son elementos muy concretos los que interrumpen las secuencias de estos genes (Partridge *et al.* 2018). Así, el elemento de inserción IS5 interrumpe la secuencia de *nfsB* en multitud de aislados clínicos de *E. coli* resistentes a nitrofurantoína, mientras que los fragmentos IS186 e IS30 son los más frecuentes en el gen *nfsA* (Humayun *et al.* 2017; Whiteway *et al.* 1998).

En el caso del gen *ribE*, la resistencia a nitrofurantoína se ha relacionado con una deleción de 12 nucleótidos, que se traduce en 4 aminoácidos (TKAG) en las posiciones 131-134 de la secuencia de la proteína, y que afecta a su sitio activo. Esta región está muy conservada en las lumazinas sintetasas de una gran variedad de especies bacterianas, como *B. subtilis*, *Photobacterium leiognathi* y *Haemophilus influenzae*, lo que indica que la deleción descrita compromete gravemente el correcto funcionamiento de la enzima (Vervoort *et al.* 2014).

Los mecanismos de resistencia comentados hasta ahora han implicado alteraciones de genes cromosómicos que juegan un papel importante en el mecanismo de acción de nitrofurantoína. Sin embargo, la resistencia también puede estar mediada por la presencia de plásmidos, mecanismo conocido desde hace décadas y que, debido a su escasa presencia en aislados clínicos, no ha sido estudiado en profundidad (Giske, 2015; Sandegren *et al.* 2008). En aislados de *E. coli* y *Salmonella enterica* multirresistentes y con resistencia de alto nivel a nitrofurantoína, se ha descrito la presencia del sistema de expulsión de antibióticos OqxAB, codificado por los genes de naturaleza plasmídica *oqxAB*, que aparecen en el plásmido conjugativo pOLA52, dentro

del transposón Tn6010 y flanqueados por IS26 (Guillard *et al.* 2015; Li *et al.* 2013; Sorensen *et al.* 2003). En *K. pneumoniae*, estos mismos genes también han sido descritos en el cromosoma, sin asociación al transposón, o formando parte del plásmido conjugativo (Guillard *et al.* 2015; Rodríguez-Martínez *et al.* 2013). Esta bomba de eflujo se relaciona fundamentalmente con resistencia de alto nivel a quinolonas como ácido nalidíxico o ciprofloxacino, tetraciclinas, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol y desinfectantes como la clorhexidina, el triclosán y los derivados del amonio cuaternario (Hansen *et al.* 2007). Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto que la presencia del plásmido *oqxAB* no es suficiente para producir resistencia a nitrofurantoína, sino que es necesaria una modificación concomitante de nNSA, independiente de la afectación secuencial de la nitrato-reductasa NfsB (Ho *et al.* 2015).

1.4.3. Espectro de actividad

Nitrofurantoína es activa frente a la mayoría de los bacilos Gram negativos causantes de ITUs. En gran medida, los aislados clínicos de *E. coli*, incluidos los multirresistentes, son sensibles a este antibiótico. Otras bacterias como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. o *Klebsiella* spp. muestran tasas de sensibilidad más variables. *Proteus* spp. y *Providencia* spp. son moderadamente resistentes, mientras que *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp. o *P. aeruginosa* son resistentes (De Backer *et al.* 2008; Farrell *et al.* 2003; Gales *et al.* 2002; Kashanian *et al.* 2008; Nys *et al.* 2008; Samonis *et al.* 2009; Sánchez *et al.* 2012; Sánchez *et al.* 2014; Sorlózano *et al.* 2014). Entre las bacterias productoras de BLEEs, la sensibilidad a nitrofurantoína alcanza sólo el 71% en países como Estados Unidos y Canadá, con cifras inferiores en otros como Italia o España (Fadda *et al.* 2005; Puerto *et al.* 2006). Sin embargo, en otras áreas geográficas, como Hong Kong, más del 90% de aislados productores de BLEE con fenotipo CTX-M son sensibles a este antibiótico (Ho *et al.* 2007).

En el caso de las bacterias Gram-positivas, nitrofurantoína es activa frente a cocos causantes de ITUs como *E. faecalis*, *E. faecium* (incluso aislados VRE), *S. aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* o *S. agalactiae* (Farrell *et al.* 2003; Huttner y Stewardson, 2018; Zhanel *et al.* 2001). Aunque otras bacterias como *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* o *Corynebacterium diphtheriae* también se muestran sensibles, estos

microorganismos no se relacionan con las ITUs, por lo que su sensibilidad a nitrofurantoína tiene poca relevancia clínica. Otras especies de *Corynebacterium*, *Rhodococcus equi* y *L. monocytogenes* se muestran resistentes a este antibiótico (Huttner y Stewardson, 2018).

1.4.4. Farmacocinética

Actualmente nitrofurantoína se encuentra disponible en una forma macrocristalina contenida en cápsulas para liberación lenta y en suspensión. La absorción oral se sitúa entre el 40% y el 50% de la dosis administrada, aunque aumenta cuando se ingiere con comida, ya que esta prolonga el tiempo de permanencia en el tracto gastrointestinal, favoreciendo que los macrocristales se disuelvan en el ácido gástrico antes de alcanzar el duodeno, donde es absorbida (Wijma *et al.* 2018). Formulaciones anteriores, basadas en microcristales de nitrofurantoína, aunque han demostrado una absorción más rápida, se han asociado a una mayor tasa de efectos secundarios no deseados (Alhalaweh *et al.* 2012; Teoh *et al.* 2020).

A pesar de la buena absorción que presentan los macrocristales, las concentraciones que alcanza nitrofurantoína en suero son muy bajas y su vida media, en personas con una función renal normal, es de tan sólo 20 minutos. Este es uno de los motivos por los que este antibiótico no se aconseja en el tratamiento de infecciones sistémicas (Huttner y Stewardson, 2018).

Sin embargo, nitrofurantoína se excreta de forma rápida a través de la orina, pudiendo alcanzar concentraciones en torno a un tercio de la dosis administrada por vía oral, siempre y cuando la función renal sea normal (Garau, 2008). Debe evitarse su uso en pacientes con una insuficiencia renal severa, aunque puede ajustarse la dosis y realizarse un seguimiento estrecho en pacientes con insuficiencia renal moderada (Singh *et al.* 2015).

En formulaciones de liberación lenta, la excreción total, así como las tasas de excreción pasadas 24 horas tras la administración del fármaco, son mayores en comparación con las formulaciones de liberación normal. Por lo tanto, prolongar el tiempo que pasa el medicamento en el tracto gastrointestinal no solo favorece una

mayor absorción, sino también la presencia de concentraciones más elevadas en orina (Wijma *et al.* 2018).

1.4.5. Indicaciones clínicas

De manera convencional, la dosis de nitrofurantoína para el tratamiento de una ITU es de 50 a 100 mg, cuatro veces al día, siempre con las comidas. Inicialmente, su indicación principal fue el tratamiento de las ITUs agudas no complicadas, tanto en hombres como en mujeres, pero su uso se amplió posteriormente a la prevención y tratamiento de las ITUs recurrentes en mujeres. Actualmente también está indicado en el tratamiento de la bacteriuria asociada a cateterismo y como profilaxis cuando se procede a la instrumentación del tracto urinario (Cunha *et al.* 2012; Delzell y Lefevre, 2000). Aunque puede emplearse en el tratamiento de la bacteriuria gestacional, presente en un 10% de las mujeres embarazadas, sólo debe prescribirse si es claramente necesario, estando totalmente contraindicado en el embarazo a término (38 a 42 semanas) y durante el parto. Tampoco está indicada en pacientes con pielonefritis o en hombres con ITU recurrente, ya que estas infecciones pueden estar relacionadas con una prostatitis y el antibiótico no penetra en este tejido (Muñoz-Dávila, 2014).

La duración del tratamiento es controvertida. Aunque diversos estudios sostienen que podría disminuirse de los 7 días tradicionales a un solo día, ya que el antibiótico mantiene su eficacia (Lumbiganon *et al.* 2009), otros indican que la posibilidad de fracaso terapéutico aumenta en los tratamientos de corta duración, lo que hace más recomendable los tratamientos largos tradicionales (Guinto *et al.* 2010). La reducción de la dosis de 4 a 3 veces al día también ha demostrado mantener una eficacia elevada (Amábile-Cuevas y Arredondo-García, 2011).

Aunque nitrofurantoína es más efectiva que trimetoprim-sulfametoxazol en la prevención de ITUs sintomáticas en niños, sin embargo, se asocia a un gran número de efectos secundarios, especialmente en menores de un año y prematuros, en los que el antibiótico puede alcanzar niveles séricos tóxicos. Por lo tanto, no se considera una alternativa terapéutica aceptable en edades infantiles (Williams y Craig, 2011).

En los últimos años, con el aumento de las tasas de resistencia a los antibióticos utilizados de manera tradicional, nitrofurantoína ha experimentado, al igual que se ha

comentado para fosfomicina, un renacer de nuevas aplicaciones más allá del tratamiento habitual de ITUs no complicadas, como es el tratamiento de las ITUs causadas por aislados multirresistentes (Muñoz-Dávila, 2014). Así, la prescripción de nitrofurantoína ha resultado útil en el tratamiento frente a VRE (Cunha, 2006) y enterobacterias productoras de BLEEs (Zhanet *et al.* 2006). Además, por el momento, la selección de resistencia a nitrofurantoína es mínima, como ha quedado demostrado al observar bajos niveles de enterobacterias resistentes en la orina de pacientes tratados (Vervoort *et al.* 2014).

1.4.6. Efectos adversos e interacción con otros fármacos

Por normal general, nitrofurantoína se considera un antibiótico seguro. Tras décadas de un uso intensivo en el tratamiento de ITUs, los efectos secundarios presentan una incidencia muy baja, inferior al 0,001% (Poulsen *et al.* 2013; Větrovský y Baldrian, 2013; Vieira *et al.* 2013). Las reacciones adversas más frecuentes, como alteraciones gastrointestinales, erupciones cutáneas, trastornos hematológicos, defectos neurológicos, hepatotoxicidad, complicaciones pulmonares y otros trastornos diversos, se relacionan principalmente con su uso a largo plazo.

Las alteraciones gastrointestinales como anorexia, náuseas y vómitos son el efecto secundario más común, habitualmente tras una semana de tratamiento (Muñoz-Dávila, 2014). Existen estudios que han demostrado que el impacto que produce nitrofurantoína en la microbiota intestinal es mínimo, mostrando tan solo un aumento transitorio del género *Bifidobacterium* (Vervoort *et al.* 2015).

Las reacciones de hipersensibilidad son relativamente poco frecuentes, aunque en algunos estudios han representado alrededor del 40% de todas las reacciones adversas descritas a nitrofurantoína (Huttner y Stewardson, 2018; Muller *et al.* 2017). Las manifestaciones más comunes son las erupciones cutáneas, la eosinofilia y la fiebre medicamentosa, que desaparecen rápidamente cuando se deja de administrar el antibiótico. Se ha observado asma por sensibilización al fármaco, anafilaxia, edema angioneurótico y artropatía. Entre las complicaciones más graves se ha documentado el desarrollo del síndrome de Stevens-Johnson y la necrólisis epidérmica tóxica, caracterizadas por erupción, descamación de la piel y ampollas en las membranas mucosas, y que son potencialmente mortales (Huttner y Stewardson, 2018).

Puede producir síndrome hemolítico agudo en pacientes con déficit de G6P-deshidrogenasa (van de Mheen *et al.* 2014). Por tanto, debe usarse con precaución en pacientes de origen africano, mediterráneo y del sudeste asiático, y evitarse a toda costa en bebés menores de 1 mes, cuyos eritrocitos poseen sistemas enzimáticos inmaduros. También se asocia a anemia hemolítica en pacientes con otras deficiencias enzimáticas, como el déficit de enolasa (Huttner y Stewardson, 2018; Muller *et al.* 2017).

Se ha descrito sintomatología de tipo neurológico, en general dosis-dependiente, como dolor de cabeza, mareos, depresión, confusión, somnolencia, dificultad para hablar y alteración de la visión (Huttner y Stewardson, 2018; Tan *et al.* 2012). La polineuropatía motora y sensorial ascendente es uno de los efectos secundarios más graves del tratamiento con nitrofurantoína, generalmente en pacientes con insuficiencia renal, en los que se alcanzan niveles séricos tóxicos del antibiótico, o en ancianos, si se utilizan tratamientos prolongados (Kammire y Donofrio, 2007; Tan *et al.* 2012).

Por su parte, la aparición de hepatotoxicidad inducida por nitrofurantoína es poco frecuente y se puede solucionar rápidamente. Las afecciones pulmonares son también bastante comunes. El síndrome pulmonar agudo clásico se presenta con fiebre repentina, escalofríos, tos, mialgia y disnea, pudiéndose desarrollar de horas a semanas tras la ingesta del antibiótico. Las reacciones pulmonares subagudas suelen aparecer después de un mes de la ingestión del antibiótico y se caracterizan por tos persistente y progresiva, disnea, ortopnea y fiebre. La reacción pulmonar crónica a nitrofurantoína se asocia con el desarrollo de tos no productiva y disnea (Marshall y Dempsey, 2013).

La cristaluria es también un efecto secundario poco común. Se han descrito algunos casos en pacientes ancianos portadores de catéteres vesicales que recibían profilaxis de ITU con nitrofurantoína (Huttner y Stewardson, 2018).

Aunque la literatura médica establece, de forma general, que nitrofurantoína es un antibiótico seguro durante el primer trimestre del embarazo, existe la preocupación por su posible asociación con la aparición de malformaciones congénitas como enoftalmia, malformaciones cardiovasculares, malformaciones en la cavidad oral o anomalías craneales (Crider *et al.* 2009). Sin embargo, muchos estudios sugieren

justo lo contrario, que no se relaciona con un mayor riesgo teratogénico y, por tanto, apoyan su uso durante el primer trimestre del embarazo (Czeizel *et al.* 2001; Goldberg *et al.* 2013; Lee *et al.* 2008). Por este motivo, dada esta controversia, se prefieren los antibióticos betalactámicos en el tratamiento de las ITUs en mujeres embarazadas (Muñoz-Dávila, 2014). Como se ha comentado anteriormente, solo debe usarse durante el embarazo si es absolutamente necesario y nunca cerca del momento del parto, debido a la posibilidad de anemia hemolítica fetal.

Finalmente, en relación a las interacciones medicamentosas, nitrofurantoína reduce la actividad bacteriostática del ácido nalidíxico, por lo que se desaconseja esta combinación de antibióticos para el tratamiento de las ITUs (Huttner y Stewardson, 2018).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



Las ITUs son uno de los procesos clínicos más comunes, llegando a representar un porcentaje destacable del gasto sanitario anual. El aumento de edad de la población, la presencia de alergias e intolerancias a ciertos medicamentos, el creciente número de pacientes inmunodeprimidos o, muy especialmente, la aparición y diseminación de agentes patógenos multirresistentes son algunos de los factores que más dificultan una prescripción adecuada desde el primer momento en que se diagnostica la infección (Sorlózano *et al.* 2014).

Tanto fosfomicina como nitrofurantoína presentan varias características que les hacen especialmente eficaces para el tratamiento de las ITUs: tienen una rápida absorción por vía oral, poseen pocos efectos adversos y son bien toleradas, alcanzan una concentración elevada en orina y, según algunos estudios recientes en nuestra área sanitaria, conservan su actividad frente a uropatógenos habituales como *E. coli* o *K. pneumoniae*, especialmente en aquellos casos en los que existe producción de betalactamasas como las BLEEs, o incluso las carbapenemasas (Sorlózano-Puerto *et al.* 2017). Estas características favorecen que estos antibióticos sean considerados como opciones terapéuticas de primera línea en el tratamiento de ITUs no complicadas, como las cistitis, especialmente en mujeres.

Sin embargo, desde el punto de vista médico se debe tener en cuenta que, aunque sea de manera lenta y progresiva, también el uso de estos antibióticos se relaciona con el desarrollo de resistencia bacteriana. Por eso, este proceso debe ser monitorizado a través de estudios epidemiológicos que detecten el incremento de la resistencia, así como de estudios moleculares que demuestren los mecanismos implicados en la misma. Recientes estudios realizados en el ámbito hospitalario de Granada revelan que, aunque fosfomicina y nitrofurantoína muestran tasas de actividad superiores al 80% en el tratamiento de las ITUs de origen bacteriano, se observa un incremento gradual de la resistencia que puede llevar a que, en los próximos años, más del 20% de los aislados clínicos de enterobacterias sean resistentes, lo que conduciría inevitablemente a una limitación en la prescripción clínica de estos dos antibióticos en los años venideros (Sorlózano *et al.* 2014).

En definitiva, es necesario desarrollar herramientas que permitan detectar los mecanismos moleculares que están implicados en la aparición de resistencia a estos antibióticos y conocer su epidemiología. De esta manera se podrá preservar el uso de

fosfomicina y nitrofurantoína, con la finalidad última de garantizar que puedan seguir siendo una herramienta terapéutica de primera fila, especialmente en las ITUs.

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue detectar y caracterizar los mecanismos de resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* aislados en muestras clínicas de orina, desarrollando los siguientes objetivos específicos:

1. Detectar, en aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, los determinantes genéticos implicados en los mecanismos de acción y resistencia a fosfomicina.
2. Detectar, en aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*, los genes que codifican a las proteínas implicadas en los mecanismos de acción y resistencia a nitrofurantoína.
3. Caracterizar todos y cada uno de estos genes para determinar el mecanismo por el que se produce la expresión de resistencia a fosfomicina y/o nitrofurantoína en cada aislado clínico.

3. MATERIAL Y MÉTODO



3.1. SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Para la realización del presente estudio se seleccionaron 29 aislados clínicos de *E. coli* y 41 de *K. pneumoniae* resistentes a fosfomicina, nitrofurantoína o a ambos antibióticos al mismo tiempo. Todos los aislados procedieron del cultivo de 70 muestras de orina diferentes analizadas en el laboratorio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España) en el curso de su actividad clínica asistencial, para el diagnóstico microbiológico de ITUs, y en las que se obtuvo un recuento bacteriano significativo. Los estudios de identificación y sensibilidad previa de todas las bacterias se realizaron mediante los sistemas MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, EEUU) y MicroScan (Siemens Healthcare Diagnostics, Madrid, España), respectivamente, siguiendo procedimientos previamente descritos (Sorlózano *et al.* 2014).

En todos los aislados se confirmó la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína mediante un procedimiento fenotípico de difusión en agar Mueller-Hinton con discos de fosfomicina (200 µg suplementados con 50 µg de G6P) o nitrofurantoína (300 µg), respectivamente. En la tabla 1 se indican los diámetros del halo de inhibición del crecimiento bacteriano que definen las categorías clínicas de sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) de estas especies bacterianas (pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*) respecto de cada antibiótico, según los criterios definidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017) para aislados clínicos de *E. coli* de origen urinario.

Tabla 1: Diámetro (en mm) del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de antibiótico para la categorización de su uso clínico en enterobacterias (CLSI, 2017).

Categoría clínica	Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	
	Fosfomicina	Nitrofurantoína
Sensible	≥ 16	≥ 17
Intermedio	13-15	15-16
Resistente	≤ 12	≤ 14

Para el control del procedimiento se usaron las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 13883 (American Type Culture Collection, Manassas, EEUU) (CLSI, 2017).

3.2. PRUEBA PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA

Con el objetivo de identificar en los aislados seleccionados la posible resistencia a fosfomicina debido a la presencia de enzimas glutatión-S-transferasas (FosA o FosC2), se realizó una prueba basada en la inhibición de éstas con fosfonoformato de sodio (PPF). Para ello, sobre un segundo disco de fosfomicina, separado una distancia mínima de 30-35 mm del primero, se depositaron 20 µl de PPF (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 50 mg/ml. Tras la incubación correspondiente durante 24 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ se compararon los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de ambos discos (figura 10). Se consideró que un incremento ≥ 5 mm del diámetro de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco que contenía PPF, respecto al que no, confirmaba la presencia de actividad glutatión-S-transferasa (Nakamura *et al.* 2014). Todos los ensayos se realizaron en duplicado.

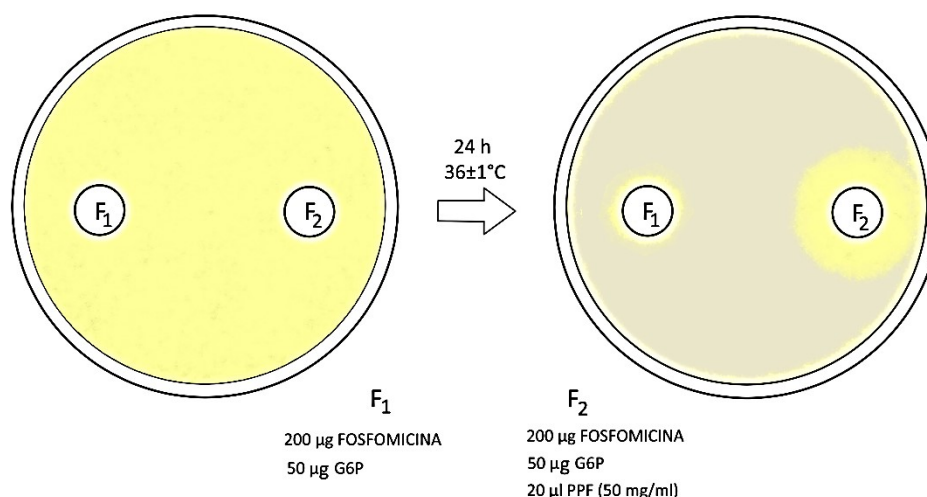


Figura 10: Prueba del fosfonoformato de sodio para la detección de la actividad glutatión-S-transferasa.

3.3. PRUEBA DE UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Con el objetivo de evaluar la capacidad de transporte de las proteínas GlpT y UhpT en todos los aislados, se evaluó la capacidad de crecimiento bacteriano en presencia de una sola fuente de carbono, G3P o G6P, respectivamente, según un procedimiento previamente descrito (Takahata *et al.* 2010).

Para ello, inicialmente cada bacteria se sembró en caldo Mueller-Hinton e incubó durante 24 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ en agitación para obtener crecimiento bacteriano. Transcurrido este tiempo, tras centrifugar el cultivo, las bacterias se resuspendieron en

solución salina (0,9% NaCl) y se sometieron a cinco ciclos de lavado y centrifugado para eliminar cualquier resto de medio de cultivo o desecho metabólico que pudiese ser utilizado como fuente de carbono. Posteriormente, las bacterias se sembraron en masa en placas de agar M9 (Sigma-Aldrich) suplementado al 0,2% con glucosa (medio que actuaría como control positivo del crecimiento bacteriano), G3P (para evaluar la actividad del transportador GlpT) o G6P (para evaluar la actividad del transportador UhpT). Tras la incubación de todas las placas durante 48 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, se evaluó la capacidad de crecimiento de todas las bacterias en medio M9 suplementado con las diferentes fuentes de carbono (figura 11). Se consideró que la ausencia de crecimiento bacteriano o un crecimiento deficiente, sin formación de colonias en el medio suplementado con G3P o G6P, indicaba la deficiencia en la función de GlpT o UhpT, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

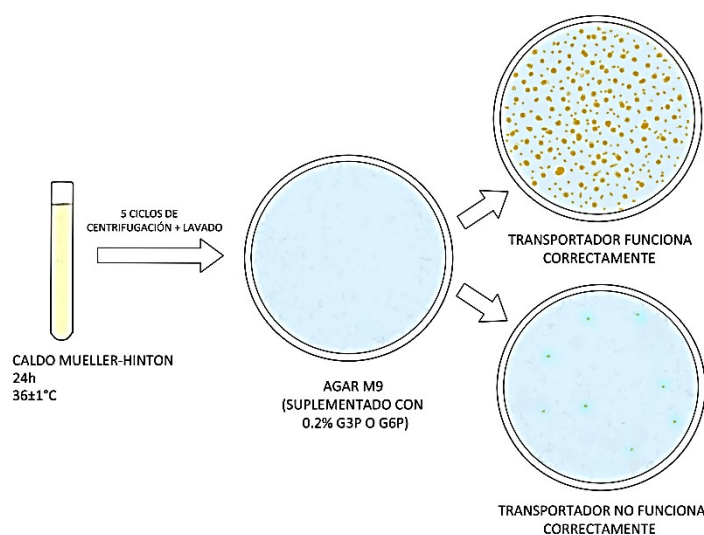


Figura 11: Prueba de utilización de G3P y G6P en la evaluación de la actividad de GlpT y UhpT, respectivamente.

3.4. AMPLIFICACIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR

Para la detección de los genes implicados en los mecanismos de acción de fosfomicina y nitrofurantoína, y cuyas alteraciones pueden provocar resistencia a estos antibióticos, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se amplificaron los genes cromosómicos *murA*, *glpT*, *uhpT*, *uhpA*, *ptsI*, *cyaA*, *nfsA*, *nfsB* y *ribE/ribH* tanto de *E. coli* como de *K. pneumoniae*. Dado el gran tamaño del gen *cyaA*, su detección se realizó mediante la amplificación, por separado, de dos fragmentos solapados, *cyaA1* y *cyaA2*. Las secuencias de los cebadores utilizados se recogen en las tablas 2 y 3.

Tabla 2: Cebadores utilizados en la amplificación de genes involucrados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en *Escherichia coli*.

Gen		Cebadores	Tamaño del amplificado	Referencia	
<i>murA</i>	Forward	5'-AAACAGCAGACGGTCTATGG-3'	1542 pb	Takahata <i>et al.</i> 2010	
	Reverse	5'-CCATGAGTTTATCGACAGAACG-3'			
<i>glpT</i>	Forward	5'-GCGAGTCGCGAGTTTTTCATTG-3'	1785 pb		
	Reverse	5'-GGCAAATATCCACTGGCACC-3'			
<i>uhpT</i>	Forward	5'-TTTTTGAACGCCAGACACC-3'	1667 pb		
	Reverse	5'-AGTCAGGGGCTATTTGATGG-3'			
<i>uhpA</i>	Forward	5'-GATCGCGGTGTTTTTCAG-3'	771 pb		
	Reverse	5'-GATACTCCACAGGCAAACC-3'			
<i>ptsI</i>	Forward	5'-GAAAGCGGTTGAACATCTGG-3'	1908 pb		
	Reverse	5'-TCCTTCTGTCTCGGAAAC-3'			
<i>cyaA1</i>	Forward	5'-AACCAGGCGGAAAAGTGG-3'	1559 pb		Takahata <i>et al.</i> 2010 Este estudio
	Reverse	5'-TGATGGCTGATGATCGACTC-3'			
<i>cyaA2</i>	Forward	5'-AAAGCTCAGCCGTGAACGC-3'	1648 pb		
	Reverse	5'-ACCTTCTGGGATTTGCTGG-3'			
<i>nfsA</i>	Forward	5'-ATTTTCTCGCCAGAAGTGC-3'	1036 pb	Sandegren <i>et al.</i> 2008	
	Reverse	5'-AGAATTTCAACCAGGTGACC-3'			
<i>nfsB</i>	Forward	5'-CTTCGCGATCTGATCAACG-3'	923 pb		
	Reverse	5'-CAACAGCAGCCTATGATGAC-3'			
<i>ribE</i>	Forward	5'-AAGGGAAGCAGCGCACGAA-3'	634 pb		Este estudio
	Reverse	5'-GGACAACCTGCCAGGAGTAGA-3'			

Tabla 3: Cebadores utilizados en la amplificación de genes involucrados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en *Klebsiella pneumoniae*.

Gen		Cebadores	Tamaño del amplificado	Referencia	
<i>murA</i>	Forward	5'-GCGAGACCGCAAACCTCAATG-3'	1439 pb	Lu <i>et al.</i> 2016	
	Reverse	5'-CGACAGAACGCAGATGATGC-3'			
<i>glpT</i>	Forward	5'-ATTCGCGCGTTATTTGAGCG-3'	1642 pb		
	Reverse	5'-ATTTTATCAGCCGCTGTCGC-3'			
<i>uhpT</i>	Forward	5'-GCGCTGGTTTTTACAATGCC-3'	1541 pb		
	Reverse	5'-GCTGTCGACTGTCGGACCT-3'			
<i>uhpA</i>	Forward	5'-TCGCTAAGGTAAGCGCCTTT-3'	746 pb		
	Reverse	5'-ATGACCGACAGCAATCGTGA-3'			
<i>ptsI</i>	Forward	5'-TCTCCGCTGAAGGCGAAGAT-3'	1875 pb		
	Reverse	5'-TAAGCAGTAATTTGGGCCGC-3'			
<i>cyaA1</i>	Forward	5'-GACGACGAATGGTGACGGT-3'	1515 pb		Este estudio
	Reverse	5'-TGATCGATTCCATGTCCGGC-3'			
<i>cyaA2</i>	Forward	5'-ACCGCGCCAACTGGAAAATC-3'	1603 pb		
	Reverse	5'-CGGTGAGACGGTGAAGTTC-3'			
<i>nfsA</i>	Forward	5'-CGGGATCGTGCTGATGATC-3'	924 pb		
	Reverse	5'-GGCCTCAGCTATCGAACAC-3'			
<i>nfsB</i>	Forward	5'-CAGGTGGTGAACAAGCTGAG-3'	896 pb		
	Reverse	5'-GAGTGGGTGAAGAAAGTCCC-3'			
<i>ribH</i>	Forward	5'-CCGGATGTCTGCCTGCATT-3'	679 pb		
	Reverse	5'-GGACAACCTGCCAGGAGTAG-3'			

En aquellos aislados de *E. coli* en los que no se pudieron detectar los genes *uhpT* o *uhpA* con los cebadores recogidos en la tabla 2, se diseñaron nuevos primers (*uhpT*-F2: 5'-GATGTTAATCGGTATGGCGGC-3'; *uhpT*-R2: 5'-CAGTCGCTGGCGGAACAAAT-3'; *uhpA*-F2: 5'-CGTAATTCTGGAGCTCACCG-3'; *uhpA*-R2: 5'-CGCCTGCGTTAGCCAGTAA-3'), que se unían en posiciones más externas. En estos casos, además de la amplificación con estos cebadores externos, se realizaron amplificaciones usando las distintas combinaciones posibles de cebadores externos e internos con el objetivo de aumentar la especificidad de la detección de estos dos genes.

También se amplificaron los genes relacionados con resistencia a fosfomicina a través de la actividad glutatión-S-transferasa de las enzimas FosA (genes plasmídicos *fosA3*, *fosA4*, *fosA5* y *fosA6*) y FosC2 (gen plasmídico *fosC2*) así como los genes *oqxA* y *oqxB* relacionados con resistencia a nitrofurantoína. Las secuencias de los cebadores utilizados se recogen en la tabla 4.

Tabla 4: Cebadores utilizados en la amplificación de genes plasmídicos involucrados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína.

Gen	Cebadores	Tamaño del amplificado	Referencia
<i>fosA3</i>	Forward 5'-GCGTCAAGCCTGGCATT-3'	282 pb	Hou <i>et al.</i> 2012
	Reverse 5'-GCCGTCAGGGTTCGAGAAA-3'		
<i>fosA4</i>	Forward 5'-CTGGCGTTTTATCAGCGTT-3'	241 pb	Benzerara <i>et al.</i> 2017
	Reverse 5'-CTTCGCTGCGGTTGTCTTT-3'		
<i>fosA5</i>	Forward 5'-TATTAGCGAAGCCGATTTTGCT-3'	187 pb	
	Reverse 5'-CCCCTTATACGGCTGCTCG-3'		
<i>fosA6</i>	Forward 5'-GCTACGGTTCAGCTTCCAGA-3'	242 pb	Este estudio
	Reverse 5'-CGAGCGTGGCGTTTTATCAG-3'		
<i>fosC2</i>	Forward 5'-CGTTCGGTGGAGTTCTATAC-3'	334 pb	Nakamura <i>et al.</i> 2014
	Reverse 5'-CTTGATAGGGTTAGACTTC-3'		
<i>oqxA</i>	Forward 5'-GACAGCGTCGCACAGAATG-3'	339 pb	Chen <i>et al.</i> 2012
	Reverse 5'-GGAGACGAGGTTGGTATGGA-3'		
<i>oqxB</i>	Forward 5'-CGAAGAAAGACCTCCCTACCC-3'	240 pb	
	Reverse 5'-CGCCGCAATGAGATACA-3'		

Para la detección del gen cromosómico *fosA^{KP}* de *K. pneumoniae* se utilizaron los mismos cebadores que para la amplificación del gen *fosA5* (amplificado de 187 pb), ya que se considera que *fosA5* y *fosA6*, ubicados en plásmidos de *E. coli*, se originaron a partir de *fosA^{KP}* de *K. pneumoniae* (Ito *et al.* 2017; Singkham-in *et al.* 2020).

El ADN de los aislados clínicos y de las cepas control utilizadas (*E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 13883) se extrajo utilizando el kit de extracción y

purificación PureLink Microbiome DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU). Para la realización de la PCR se añadió 1 µl de ADN purificado a un “master mix” con tampón para PCR (1x), MgCl₂ (2 mM), dNTPs (0,4 mM), primers (0,4 M) y Taq polimerasa (1,25 U). Las condiciones de temperatura de cada PCR se muestran en las tablas 5 y 6.

Tabla 5: Ciclos de temperatura en la detección de los genes cromosómicos implicados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Genes	Ciclos de PCR
<i>murA, glpT, uhpT, cyaA1, cyaA2, nfsA, nfsB, ribE/ribH</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturalización inicial: 2' a 94°C. • 35 ciclos de: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Desnaturalización 30'' a 94°C ✓ Anillamiento 30'' a 55°C ✓ Extensión 2' a 72°C (1' en <i>nfsA, nfsB, ribE</i>) • Extensión final: 5' a 72°C
<i>uhpA, ptsI</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturalización inicial: 2' a 94°C. • 35 ciclos de: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Desnaturalización 30'' a 94°C ✓ Anillamiento 30'' a 57°C ✓ Extensión 1' a 72°C • Extensión final: 5' a 72°C

Tabla 6: Ciclos de temperatura en la detección de los genes plasmídicos implicados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Genes	Ciclos de PCR
<i>fosA5</i> (y <i>fosA^{KP}</i>) <i>fosC2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturalización inicial: 2' a 94°C. • 30 ciclos de: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Desnaturalización 30'' a 94°C ✓ Anillamiento 30'' a 55°C ✓ Extensión 1' a 72°C • Extensión final: 5' a 72°C
<i>fosA3</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturalización inicial: 2' a 94°C. • 30 ciclos de: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Desnaturalización 30'' a 94°C ✓ Anillamiento 30'' a 57°C ✓ Extensión 1' a 72°C • Extensión final: 5' a 72°C
<i>fosA4</i> <i>fosA6</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturalización inicial: 2' a 94°C. • 30 ciclos de: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Desnaturalización 30'' a 94°C ✓ Anillamiento 30'' a 60°C ✓ Extensión 1' a 72°C • Extensión final: 5' a 72°C
<i>oqxA</i> <i>oqxB</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturalización inicial: 2' a 94°C. • 30 ciclos de: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Desnaturalización 30'' a 94°C ✓ Anillamiento 30'' a 62°C ✓ Extensión 1' a 72°C • Extensión final: 5' a 72°C

Para detectar los productos resultantes de la PCR, los amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en un tampón de Tris-Borato-EDTA 0,5x (Tris 0,1 M; ácido bórico 0,08 M; EDTA 0,1 mM). El gel fue suplementado con bromuro de etidio para la visualización de los productos de PCR bajo luz ultravioleta.

3.5. SECUENCIACIÓN

La secuenciación de todos los genes implicados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína, así como su análisis bioinformático, se realizó con la colaboración del centro GENYO (Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica).

Cada amplificado se purificó usando 30 μ l del sistema de esferas paramagnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, L'Hospitalet de Llobregat, España) y se resuspendió en 50 μ l de agua estéril desionizada. Tras realizar una cuantificación usando el fluorómetro Qubit[®]3.0 (Thermo Fisher Scientific), se establecieron grupos o pools de 8 a 10 amplificados, normalizados equimolarmente.

Como paso previo a la secuenciación, los amplificados se fragmentaron y etiquetaron usando el kit de preparación de muestras de ADN Nextera[®]XT (Illumina Inc., San Diego, EEUU), para generar librerías de secuenciación. Mediante este sistema, el ADN de los amplificados fue fragmentado de forma aleatoria a través de enzimas denominadas transposasas y, posteriormente, fue marcado o etiquetado mediante la adición de pequeñas secuencias en sus extremos. Estas secuencias de etiquetado, denominadas adaptadores, son diferentes para los extremos 5' y 3' de los fragmentos de ADN y constan de dos pequeñas secuencias que hibridarán con secuencias complementarias dispuestas en el fondo del soporte en el que se realiza la secuenciación. De esta forma se obtuvo una librería de fragmentos con extremos universales, que serían amplificados posteriormente con un solo juego de primers complementarios a los adaptadores (figura 12).

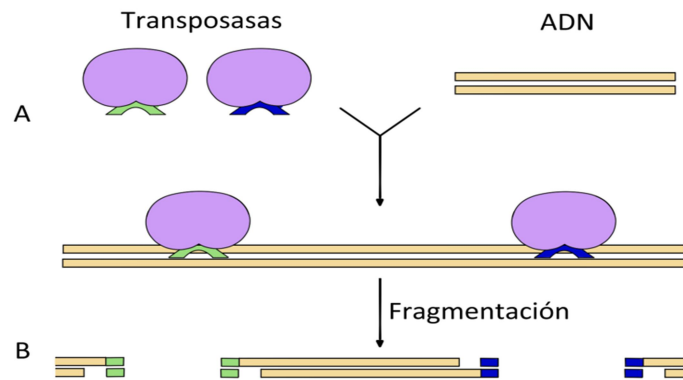


Figura 12: El kit de preparación de muestras de Nextera XT fragmenta y marca ("etiqueta") el ADN de forma simultánea, agregando secuencias adaptadoras únicas en el proceso, lo que permitirá la amplificación mediante PCR en pasos posteriores. A: las transposasas y los adaptadores se combinan con el ADN molde. B: Se produce la fragmentación y el etiquetado del ADN.

Para la secuenciación de estas librerías se utilizó la plataforma de NGS (*Next Generation Sequencing*) NextSeq 550 (Illumina). En primer lugar, la plataforma realizó una amplificación de cada uno de los fragmentos mediante un número limitado de ciclos de PCR. Esta amplificación tiene como finalidad incrementar el número de copias de cada fragmento de la librería, quedando los fragmentos iguales agrupados en clusters. Para ello, la plataforma utiliza como soporte una celda de flujo, un dispositivo en cuya superficie hay tallados alrededor de 10^7 pocillos de $1 \mu\text{m}$ de diámetro, y en cuyo fondo se encuentran los dos tipos diferentes de secuencias de nucleótidos complementarias a las dos secuencias de los adaptadores (figura 13). Solo uno de los extremos del fragmento de ADN (el extremo 5' o el 3') accede a cada pocillo, hibridando con la secuencia complementaria que tapiza el fondo. El otro extremo, en principio, queda libre (figura 14A).

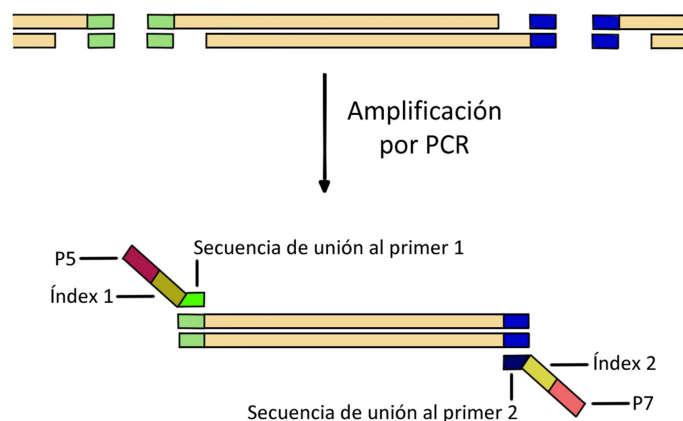


Figura 13: Hibridación de los adaptadores con las secuencias de nucleótidos complementarias (índice 1 e índice 2) presentes en las celdas de flujo.

Cada ciclo de PCR comienza con una fase de hibridación, en la que el adaptador del extremo que ha quedado libre se une con el primer más próximo, formando un “puente” sobre la superficie del pocillo (figura 14A). A continuación, tiene lugar la fase de extensión, en la que una polimerasa sintetiza una nueva cadena complementaria mediante la adición de los correspondientes nucleótidos. Para finalizar el ciclo, en la fase de desnaturalización, las cadenas complementarias se separan, permaneciendo unidas por uno de sus extremos a la superficie del pocillo y libres por el otro, quedando los fragmentos iguales muy próximos entre sí (figura 14B). Tras el último ciclo de PCR, los fragmentos 3'-5' (reverse) son eliminados del pocillo, quedando solo unidos al fondo de este millones de copias del fragmento 5'-3' (forward). El resultado final es la generación de clusters de cada uno de los fragmentos de la librería, cada uno de ellos con miles de copias idénticas del fragmento (figura 14B).

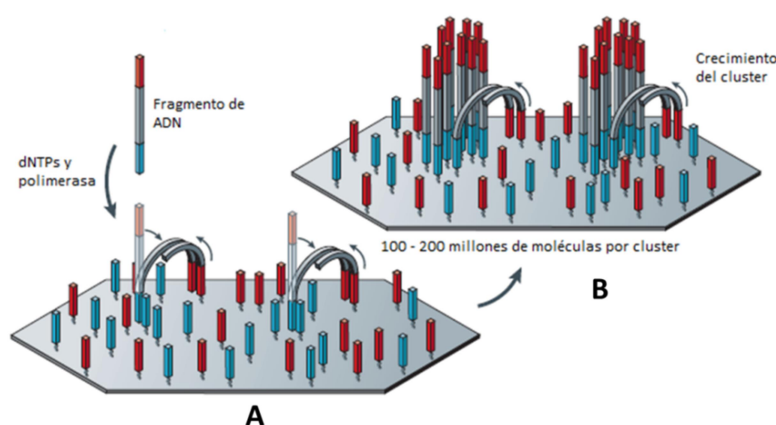


Figura 14: Amplificación de cada fragmento mediante un número limitado de ciclos de PCR (tomada de Metzker, 2010). **A:** Unión del fragmento de ADN a las secuencias de nucleótidos complementarias a los adaptadores (índice 1 e índice 2) y formación del puente. **B:** Amplificación de los fragmentos y formación del cluster.

Tras la amplificación, el sistema procede a realizar la secuenciación propiamente dicha. Para ello, se utilizan dNTPs marcados con un fluoróforo diferente para cada uno de los 4 dNTPs y bloqueados, aunque de forma reversible, para impedir que puedan unirse a otros nucleótidos, por lo que actúan como terminadores de cadena.

La reacción se inicia con la unión de los primers a los adaptadores que han quedado libres por su extremo 3'. Tras esta hibridación, una ADN polimerasa se une al primer e incorpora el primer nucleótido marcado. Tras un lavado que elimina los nucleótidos no incorporados, se excita la muestra con un láser y se registra la señal

fluorescente emitida en cada uno de los pocillos. La lectura de esta señal genera una matriz de puntos de cuatro colores diferentes, dependiendo del nucleótido, y común para cada uno de los clusters. Una vez realizada la lectura, se elimina el fluoróforo y el agente bloqueante, para que pueda incorporarse un nuevo nucleótido y se genere una nueva matriz de puntos. La lectura de la fluorescencia de las sucesivas matrices permite descifrar la secuencia de cada uno de los fragmentos de ADN (figura 15).

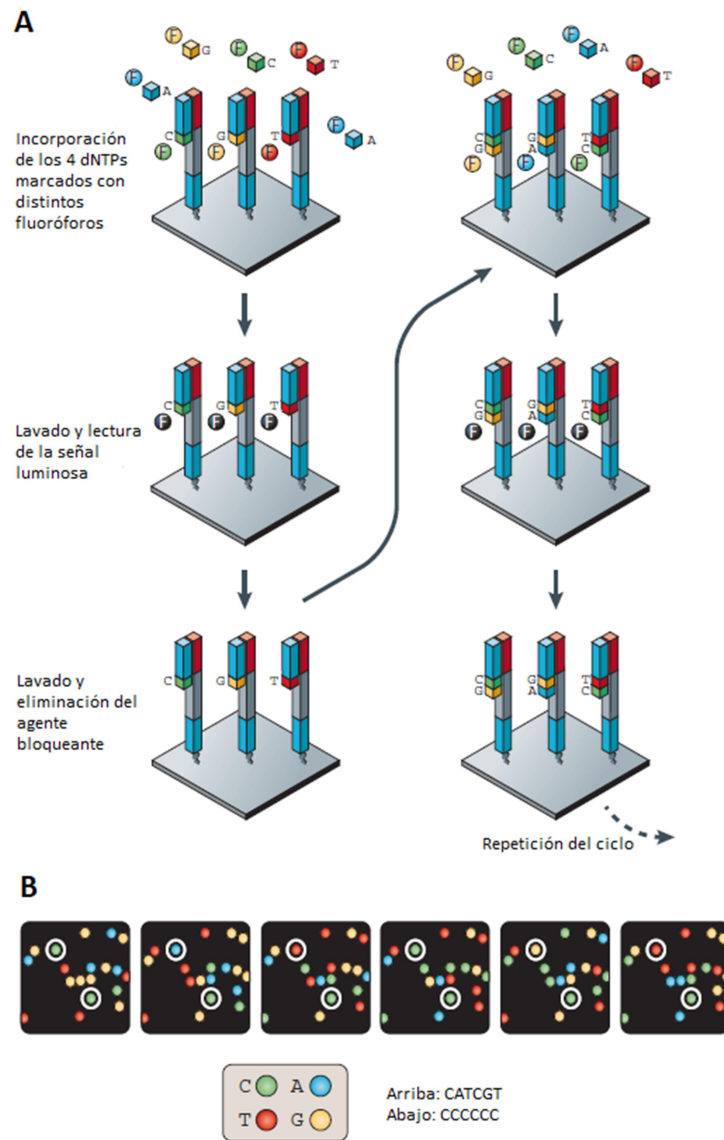


Figura 15: Proceso de secuenciación (tomada de Metzker, 2010). **A:** En un primer paso, los dNTPs marcados con los distintos fluoróforos, y bloqueados, son incorporados por la polimerasa en el lugar correspondiente para sintetizar una copia complementaria al fragmento de ADN. Tras la adición del primer nucleótido se procede a un lavado que elimina el resto de dNTPs no unidos. La excitación con una luz láser del nucleótido incorporado genera una señal luminosa (verde, azul, roja o amarilla) dependiendo del tipo de nucleótido. Finalmente, se eliminan el fluoróforo y el agente bloqueante y se añaden de nuevo dNTPs marcados para iniciar un nuevo ciclo de síntesis y lectura. **B:** Representación de la matriz de señales luminosas que se generan durante la lectura. Cada punto luminoso correspondería con un cluster diferente.

Tras la secuenciación y lectura de los fragmentos “forward”, se vuelve a realizar un proceso de amplificación mediante ciclos limitados de PCR. En esta segunda fase de amplificación, sin embargo, al contrario de la anterior, los fragmentos 5'-3' (forward) son eliminados del pocillo, quedando solo unidos al fondo de este las copias del fragmento 3'-5' (reverse), que serán secuenciadas por el mismo procedimiento.

Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de referencia de *E. coli* (cepa K-12, subcepa MG1655, secuencia de referencia NCBI: NC_000913.3) y *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae* ATCC 13883, secuencia de referencia NCBI: KN046818.1) mediante el software IGV (*Integrative Genomics Viewer*) (James *et al.* 2017). Las secuencias de los genes, cromosómicos y plasmídicos, implicados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en estas dos especies bacterianas, así como de sus respectivas proteínas, se muestran con detalle en los anexos I a XXV.

Para predecir el impacto que sobre la estructura y función biológica de las proteínas tenían las sustituciones de aminoácidos identificadas en las mismas, se utilizó la plataforma en línea PROVEAN (*Protein Variation Effect Analyzer*) (<http://provean.jcvi.org/index.php>) (Choi y Chan, 2015). Este software permite realizar predicciones para cualquier tipo de variación (sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos únicos o múltiples) en la secuencia de una proteína concreta, obteniéndose una puntuación basada en la alineación de la secuencia problema con versiones de referencia de estas secuencias y sus distintas variantes, recopiladas de la base de datos de proteínas NCBI a través de BLAST. Tal y como establece esta herramienta, si la puntuación obtenida por PROVEAN (o “P-score”) era igual o inferior a -2.5 (cutoff), se consideró que esa variación tenía un efecto perjudicial sobre la función de la proteína, como consecuencia de una pérdida de la estructura proteica. Si el valor “P-score” estaba por encima de -2.5, se consideró que esa variación era neutral y sin ningún efecto sobre la estructura y la función de la proteína.

4. RESULTADOS



4.1. SENSIBILIDAD DE LOS AISLADOS CLÍNICOS A OTROS ANTIBIÓTICOS DIFERENTES A FOSFOMICINA Y NITROFURANTOÍNA

La distribución de los datos de sensibilidad a diferentes antibióticos, obtenidos en los procedimientos utilizados en el laboratorio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves (sistema MicroScan) en los 70 aislados clínicos seleccionados en el presente trabajo, así como su categorización en sensibles, intermedios (o SDD, sensibles dosis dependiente para el caso de cefepime) o resistentes según los criterios del CLSI, se muestra en las tablas 7 y 8.

Tabla 7: Sensibilidad de los aislados clínicos a diversos antibióticos betalactámicos en términos de CMI (en µg/ml), categoría de uso clínico de cada antibiótico basada en el dato de CMI y predicción del fenotipo de resistencia según el sistema MicroScan y la lectura interpretada del antibiograma.

Aislado	Bacteria	AMP		AMC		CFX		CTX		FEP		IMP		Fenotipo
		CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	
6	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinas
11	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
17	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
19	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	AmpC
26	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
28	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
66	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
81	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
100	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
115	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
118	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
121	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
128	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
140	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
259	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	>16	R	>8	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
261	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>8	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
302	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	8	R	≤1	S	≤1	S	AmpC
319	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
334	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	4	R	16	R	≤1	S	BLEE
342	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	32	R	8	SDD	≤1	S	BLEE
360	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
381	<i>E. coli</i>	≤8	S	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Wild type
387	<i>E. coli</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	>16	R	≤1	S	BLEE
414	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
430	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	>32	R	≥16	R	8	R	Carbapen.
460	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
462	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinas
477	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinas
495	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
499	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinas
511	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinas
522	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
534	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	4	R	8	SDD	≤1	S	BLEE

Tabla 7: Continuación.

Aislado	Bacteria	AMP		AMC		CFX		CTX		FEP		IMP		Fenotipo
		CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC	
552	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
553	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
557	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
560	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
586	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
591	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
593	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
623	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
632	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	>16	R	>32	R	8	SDD	≤1	S	BLEE
653	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	>32	R	≥16	R	≤1	S	BLEE
654	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
669	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
674	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	16	R	16	R	≤1	S	BLEE
680	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
718	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	>16/8	R	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penic. hiper.
719	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
723	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	>16	R	≤1	S	BLEE
738	<i>K. pneumoniae</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
751	<i>E. coli</i>	≤8	S	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Wild type
752	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
757	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	8	I	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penic. hiper.
776	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
789	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	32	R	≤1	S	≤1	S	AmpC
792	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
795	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
797	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	16	I	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penic. hiper.
799	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penicilinasa
802	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	>32	R	≤1	S	≤1	S	AmpC
809	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	>16	R	8	R	≤1	S	≤1	S	AmpC
853	<i>E. coli</i>	≤8	S	≤8/4	S	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Wild type
854	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penic. hiper.
860	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	>16	R	16	R	≤1	S	≤1	S	BLEE
871	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	>16	R	>32	R	>16	R	≤1	S	BLEE
872	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	>16	R	>32	R	>16	R	≤1	S	BLEE
883	<i>E. coli</i>	>16	R	16/8	I	>16	R	>32	R	>16	R	≤1	S	BLEE
891	<i>E. coli</i>	>16	R	>16/8	R	≤4	S	≤1	S	≤1	S	≤1	S	Penic. hiper.
892	<i>E. coli</i>	>16	R	≤8/4	S	>16	R	>32	R	16	R	≤1	S	BLEE

AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-clavulánico, CFX: cefuroxima, CTX: cefotaxima, FEP: cefepime, IMP: Imipenem
BLEE: betalactamasa de espectro extendido, Penic. hiper.: hiperproducción de penicilinasa, Carbapen.: carbapenemasa

Tres aislados de *E. coli* fueron sensibles a todos los betalactámicos, lo que indicó la ausencia de cualquier mecanismo de resistencia a esta familia de antibióticos (wild type). Entre los aislados resistentes, 25 presentaron un fenotipo compatible con la presencia de una penicilinasa, de los cuales, en 5 casos, posiblemente estuviese hiperproducida, ya que se afectó la sensibilidad a la combinación de amoxicilina con ácido clavulánico e incluso a cefuroxima (cefalosporina de segunda generación). El

fenotipo de 5 aislados fue compatible con la presencia de una betalactamasa tipo AmpC y en otros 36 se sospechó la presencia de una enzima tipo BLEE (12 *E. coli* y 24 *K. pneumoniae*). Tan solo un aislado de *K. pneumoniae* mostró resistencia a carbapenémicos, compatible con la presencia de una carbapenemasa.

Como se puede observar en la tabla 8, hubo 28 aislados clínicos resistentes a gentamicina, 50 a ciprofloxacino y 44 a cotrimoxazol.

Tabla 8: Sensibilidad de los aislados clínicos, en términos de CMI (en µg/ml), a otros antibióticos habitualmente usados en el tratamiento de ITUs y categoría de uso clínico de cada uno de estos.

Aislado	Bacteria	Gentamicina		Ciprofloxacino		Cotrimoxazol	
		CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC
6	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
11	<i>E. coli</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
17	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	≥4/76	R
19	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
26	<i>E. coli</i>	>8	R	≤1	S	≤2/38	S
28	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
66	<i>E. coli</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
81	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	>2	R	≤2/38	S
100	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
115	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
118	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	>2	R	≥4/76	R
121	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
128	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
140	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
259	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	>2	R	≤2/38	S
261	<i>K. pneumoniae</i>	4	S	>2	R	≥4/76	R
302	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	≥4/76	R
319	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
334	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	≥4/76	R
342	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	≥4/76	R
360	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	>2	R	≥4/76	R
381	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	≤2/38	S
387	<i>E. coli</i>	>8	R	>2	R	≤2/38	S
414	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R
430	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	>2	R	>4/76	R
460	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R
462	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	≤2/38	S
477	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
495	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R
499	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
511	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
522	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R
534	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
552	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
553	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
557	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R
560	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	>4/76	R
586	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R

Tabla 8: Continuación.

Aislado	Bacteria	Gentamicina		Ciprofloxacino		Cotrimoxazol	
		CMI	CC	CMI	CC	CMI	CC
591	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
593	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R
623	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
632	<i>E. coli</i>	≤2	S	>32	R	>4/76	R
653	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R
654	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
669	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	>2	R	≤2/38	S
674	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	>2	R	>4/76	R
680	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
718	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
719	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
723	<i>K. pneumoniae</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R
738	<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	≤0,5	S	>4/76	R
751	<i>E. coli</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
752	<i>E. coli</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R
757	<i>E. coli</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
776	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	4/76	R
789	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	>4/76	R
792	<i>E. coli</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R
795	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	>4/76	R
797	<i>E. coli</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
799	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	4/76	R
802	<i>E. coli</i>	>8	R	>2	R	≤2/38	S
809	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	>4/76	R
853	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	>4/76	R
854	<i>E. coli</i>	≤2	S	≤0,5	S	≤2/38	S
860	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	≤2/38	S
871	<i>E. coli</i>	>8	R	>2	R	>4/76	R
872	<i>E. coli</i>	≤2	S	≤0,5	S	>4/76	R
883	<i>E. coli</i>	>8	R	>2	R	≤2/38	S
891	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	>4/76	R
892	<i>E. coli</i>	≤2	S	>2	R	>4/76	R

Como se observa, sólo uno de los aislados clínicos (aislado 751) se mostró sensible a todos estos antibióticos. Dieciséis aislados fueron resistentes a una sola familia (15 a betalactámicos y 1 a quinolonas), 10 a dos, 19 a tres y 24 fueron resistentes a todas las familias de antibióticos. Por tanto, el 75,7% de los aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* mostraron resistencia a dos o más familias de antibióticos diferentes, sin tener aún en consideración la sensibilidad mostrada por estos aislados a fosfomicina y nitrofurantoína.

Es necesario precisar que, en el presente trabajo, no se caracterizaron genéticamente los mecanismos de resistencia a aquellos antibióticos diferentes a fosfomicina y nitrofurantoína.

4.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *Escherichia coli*

En la tabla 9 se muestran, para cada uno de los 29 aislados clínicos de *E. coli* seleccionados en el presente trabajo, los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos de 200 µg de fosfomicina y 300 µg de nitrofurantoína, la interpretación de la categoría de uso clínico según los criterios definidos por el CLSI para cada uno de estos antibióticos, el diámetro del halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco de 200 µg de fosfomicina suplementado con PPF y el resultado de las pruebas de utilización de carbohidratos (G3P y G6P).

Tabla 9: Caracterización fenotípica de la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína de los 29 aislados clínicos de *E. coli*.

Identificación del aislado	Disco de fosfomicina ¹	Categoría clínica según CLSI ²	Disco de fosfomicina con PPF ³	Crecimiento en M9 con G3P	Crecimiento en M9 con G6P	Disco de nitrofurantoína ¹	Categoría clínica según CLSI ²
11	6	R	6	+	-	11	R
17	6	R	6	+	-	27	S
26	12	R	12	+	-	24	S
66	6	R	13	+	-	14	R
302	29	S	30	+	+	14	R
334	31	S	32	+	+	15	I
381	6	R	6	+	-	25	S
387	6	R	6	+	-	21	S
462	12	R	13	+	-	14	R
632	6	R	6	+	-	20	S
751	30	S	32	+	+	14	R
752	11	R	11	+	-	22	S
757	6	R	6	+	-	16	I
776	12	R	12	+	-	19	S
789	6	R	6	+	-	24	S
792	6	R	6	+	-	25	S
795	6	R	6	+	-	16	I
797	20	S	21	+	+	12	R
799	6	R	7	+	-	13	R
802	30	S	30	+	+	12	R
809	6	R	6	+	-	28	S
853	6	R	8	+	-	20	S
854	6	R	6	+	-	16	I
860	6	R	7	+	-	20	S
871	6	R	14	+	-	24	S
872	35	S	35	+	+	15	I
883	11	R	12	+	-	13	R
891	11	R	11	+	-	23	S
892	21	S	21	+	+	10	R

¹Diámetro (en mm) del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de antibiótico. ²Categoría de uso clínico del antibiótico según los criterios del CLSI. ³Diámetro (en mm) del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de fosfomicina suplementado con PPF. +: Crecimiento bacteriano en medio M9 suplementado con G3P o G6P. -: Ausencia de crecimiento bacteriano en medio M9 suplementado con G3P o G6P.

De los 29 aislados de *E. coli*, 8 presentaron algún nivel de resistencia (categoría clínica R o I) a fosfomicina y nitrofurantoína al mismo tiempo, 14 fueron resistentes a fosfomicina y sensibles a nitrofurantoína y 7 fueron sensibles a fosfomicina y resistentes (R o I) a nitrofurantoína. En definitiva, 22 aislados fueron resistentes a fosfomicina y 15 lo fueron a nitrofurantoína.

4.2.1. Resistencia a fosfomicina

En dos de los aislados clínicos resistentes a fosfomicina (aislados 66 y 871) se detectó un incremento superior a 5 mm del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de fosfomicina suplementado con PPF en comparación con el obtenido en torno al disco que solo contenía fosfomicina (figura 16). Fenotípicamente, este resultado sugería que la resistencia al antibiótico podría ser consecuencia de la presencia de enzimas con actividad glutatión-S-transferasa.



Figura 16: Incremento del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de fosfomicina suplementado con PPF, respecto al que solo contiene fosfomicina, en los aislados clínicos 66 (A) y 871 (B) de *E. coli*.

Los 29 aislados de *E. coli* crecieron en medio M9 suplementado con G3P, independientemente de su sensibilidad o resistencia a fosfomicina, lo que, desde un punto de vista fenotípico, sugería que la función del transportador GlpT se encontraba conservada en todos ellos (figura 17). Sin embargo, ninguno de los 22 aislados clínicos resistentes a fosfomicina creció en medio M9 suplementado con G6P (figura 18), lo que, fenotípicamente, sugería una alteración de la función del transportador UhpT, que no se observó en los aislados sensibles al antibiótico.

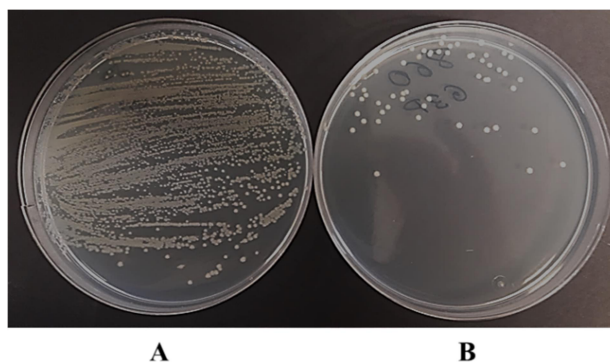


Figura 17: Prueba de utilización de G3P en un aislado clínico de *E. coli* resistente a fosfomicina (aislado 860). Se observa crecimiento bacteriano en medio M9 suplementado al 0,2% con glucosa (A) y también en medio M9 suplementado con G3P (B).

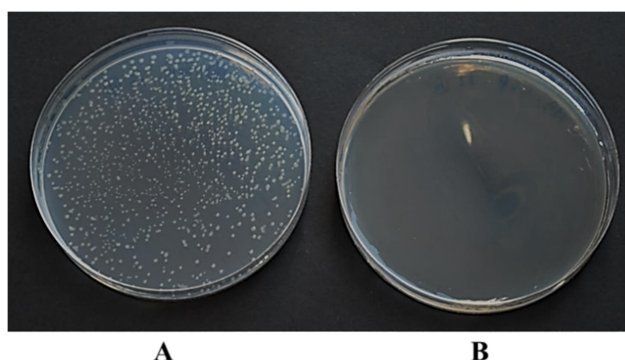


Figura 18: Prueba de utilización de G6P en un aislado clínico de *E. coli* resistente a fosfomicina (aislado 11). Se observa crecimiento bacteriano en medio M9 suplementado al 0,2% con glucosa (A) y ausencia de crecimiento bacteriano en medio M9 suplementado con G6P (B).

En la figura 19 se muestra el gel de agarosa con los productos de la amplificación, mediante PCR, de los genes cromosómicos implicados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoina en la cepa control *E. coli* ATCC 25922.

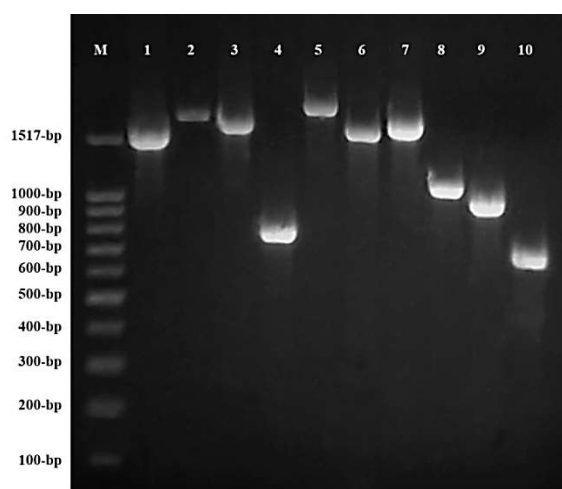


Figura 19: Detección, en *E. coli* ATCC 25922, de los genes cromosómicos implicados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoina. M: marcador de peso molecular. Líneas 1 a 10: *murA* (1542 pb), *glpT* (1785 pb), *uhpT* (1667 pb), *uhpA* (771 pb), *ptsI* (1908 pb), *cyaA1* (1559 pb), *cyaA2* (1648 pb), *nfsA* (1036 pb), *nfsB* (923 pb) y *ribE* (634 pb), respectivamente.

Los genes cromosómicos *murA*, *glpT*, *ptsI*, *cyaA*, *nfsA*, *nfsB* y *ribE* se detectaron en la totalidad de los aislados de *E. coli*. Sin embargo, el gen *uhpT* no se detectó en 2 aislados (ambos resistentes a fosfomicina) y el gen *uhpA* no se pudo detectar en 21 aislados (todos ellos resistentes a fosfomicina). La detección o no, mediante PCR, de cada uno de estos genes en los 29 aislados clínicos de *E. coli* se resume en la tabla 10.

Tabla 10: Detección, mediante PCR, en los 29 aislados clínicos de *E. coli*, de los genes cromosómicos implicados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína.

Identificación del aislado	<i>murA</i>	<i>glpT</i>	<i>uhpT</i>	<i>uhpA</i>	<i>ptsI</i>	<i>cyaA</i>	<i>nfsA</i>	<i>nfsB</i>	<i>ribE</i>
11	+	+	-	-	+	+	+	+	+
17	+	+	+	-	+	+	+	+	+
26	+	+	-	+	+	+	+	+	+
66	+	+	+	-	+	+	+	+	+
302	+	+	+	+	+	+	+	+	+
334	+	+	+	+	+	+	+	+	+
381	+	+	+	-	+	+	+	+	+
387	+	+	+	-	+	+	+	+	+
462	+	+	+	-	+	+	+	+	+
632	+	+	+	-	+	+	+	+	+
751	+	+	+	+	+	+	+	+	+
752	+	+	+	-	+	+	+	+	+
757	+	+	+	-	+	+	+	+	+
776	+	+	+	-	+	+	+	+	+
789	+	+	+	-	+	+	+	+	+
792	+	+	+	-	+	+	+	+	+
795	+	+	+	-	+	+	+	+	+
797	+	+	+	+	+	+	+	+	+
799	+	+	+	-	+	+	+	+	+
802	+	+	+	+	+	+	+	+	+
809	+	+	+	-	+	+	+	+	+
853	+	+	+	-	+	+	+	+	+
854	+	+	+	-	+	+	+	+	+
860	+	+	+	-	+	+	+	+	+
871	+	+	+	-	+	+	+	+	+
872	+	+	+	+	+	+	+	+	+
883	+	+	+	-	+	+	+	+	+
891	+	+	+	-	+	+	+	+	+
892	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: Gen detectado mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa.

-: Gen no detectado mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa

Tras secuenciar los productos de amplificación de la PCR, las sustituciones detectadas en las secuencias de aminoácidos de las proteínas MurA, GlpT, UhpT, UhpA, PtsI y CyaA en los 29 aislados clínicos de *E. coli* se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Sustituciones detectadas en la secuencia de aminoácidos de los genes cromosómicos implicados en la resistencia a fosfomicina en *E. coli*.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI	MurA (419 aa)	GlpT (452 aa)	UhpT (463 aa)	UhpA (196 aa)	PtsI (575 aa)	CyaA (848 aa)
11	R	Ninguna	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Gen no detectado	Gen no detectado	Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser352Thr Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp
17	R	Ninguna	Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Val25Ile Arg367Lys	Asn142Ser Asp837Glu Thr840Ala
26	R	Ninguna	Gly84Asp Glu448Lys	Gen no detectado	Ninguna	Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp Ala363Ser Asp837Glu Thr840Ala
66	R	Ninguna	Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Val25Ile Arg367Lys	Asn142Ser Asp837Glu Thr840Ala
302	S	Ninguna	Glu448Lys	Ninguna	Ninguna	Arg367Lys	Asn142Ser Gly222Ser
334	S	Ninguna	Glu448Lys	Ninguna	Ninguna	Arg367Lys	Asn142Ser
381	R	Ninguna	Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Val25Ile Arg367Lys	Asn142Ser Asp837Glu Thr840Ala
387	R	Ninguna	Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Val25Ile Arg367Lys	Asn142Ser Asp837Glu Thr840Ala
462	R	Ninguna	Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Val25Ile Arg367Lys	Asn142Ser Asp837Glu Thr840Ala
632	R	Ninguna	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser352Thr Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp Ala363Gly
751	S	Ninguna	Ala16Thr Glu448Lys	Ninguna	Arg46Cys	Ala306Thr Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp Asp837Glu Thr840Ala
752	R	Ninguna	Pro212Leu Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Val25Ile Arg367Lys	Asn142Ser Asp837Glu Thr840Ala

Tabla 11: Continuación.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI	MurA (419 aa)	GlpT (452 aa)	UhpT (463 aa)	UhpA (196 aa)	PtsI (575 aa)	CyaA (848 aa)
757	R	Ninguna	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Ninguna	Gen no detectado	Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser352Thr Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp
776	R	Ninguna	Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Val25Ile Arg367Lys	Asn142Ser Asp837Glu Thr840Ala
789	R	Leu370Ile	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser352Thr Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp
792	R	Ninguna	Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Val25Ile Arg367Lys	Asn142Ser Asp837Glu Thr840Ala
795	R	Ninguna	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser352Thr Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp
797	S	Ninguna	Ala16Thr Leu373Arg Glu448Lys	Ninguna	Arg46Cys	Ala306Thr Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp Asp837Glu Thr840Ala
799	R	Ninguna	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Ninguna	Gen no detectado	Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser352Thr Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp
802	S	Ninguna	Phe133Cys Gly135Trp Ala197Val Glu448Lys	Ninguna	Ninguna	Arg367Lys	Asn142Ser
809	R	Leu370Ile	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser352Thr Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp
853	R	Leu370Ile	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser352Thr Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp

Tabla 11: Continuación.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI	MurA (419 aa)	GlpT (452 aa)	UhpT (463 aa)	UhpA (196 aa)	PtsI (575 aa)	CyaA (848 aa)
854	R	Ninguna	Glu448Lys	Ninguna	Gen no detectado	Arg367Lys	Asn142Ser
860	R	Ninguna	Met52Leu Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Ninguna	Gen no detectado	Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser352Thr Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp
871	R	Ninguna	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Arg367Lys	Asn142Ser Ala349Glu Ser352Thr Ser356Leu Gly359Glu Glu362Asp Ala363Gly
872	S	Ninguna	Glu448Lys	Ninguna	Ninguna	Arg367Lys	Asn142Ser Asp837Glu Thr840Ala
883	R	Ninguna	Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Val25Ile Arg367Lys	Asn142Ser Asp837Glu Thr840Ala
891	R	Ninguna	Glu448Lys	Glu350Gln	Gen no detectado	Val25Ile Arg367Lys	Asn142Ser Asp837Glu Thr840Ala
892	S	Ninguna	Glu448Lys	Ninguna	Ninguna	Arg367Lys	Asn142Ser

La predicción del impacto o efecto que sobre la estructura y función biológica de cada una de las proteínas tendrían estas sustituciones, según el análisis realizado a través de la plataforma online PROVEAN, se resume en la tabla 12.

Tabla 12: Predicción del impacto de las sustituciones en la secuencia de aminoácidos sobre la estructura y función biológica de cada una de las proteínas implicadas en la resistencia a fosfomicina.

Proteína	Sustitución en aminoácido	P-score	Predicción del impacto (cutoff = -2.5)
MurA	Leu370Ile	-1.995	Efecto neutro
GlpT	Ala16Thr	-0.713	Efecto neutro
	Met52Leu	-1.261	Efecto neutro
	Gly84Asp	-6.056	Efecto perjudicial
	Phe133Cys	-5.549	Efecto perjudicial
	Gly135Trp	-7.756	Efecto perjudicial
	Ala197Val	-3.472	Efecto perjudicial
	Pro212Leu	-9.698	Efecto perjudicial
	Leu297Phe	-2.375	Efecto neutro
	Leu373Arg	-5.328	Efecto perjudicial
	Glu443Gln	0.014	Efecto neutro
	Gln444Glu	-0.106	Efecto neutro
	Glu448Lys	0.486	Efecto neutro

Tabla 12: Continuación.

Proteína	Sustitución en aminoácido	P-score	Predicción del impacto (cutoff = -2.5)
UhpT	Glu350Gln	-0.016	Efecto neutro
UhpA	Arg46Cys	-0.268	Efecto neutro
PtsI	Val25Ile	-0.606	Efecto neutro
	Ala306Thr	0.030	Efecto neutro
	Arg367Lys	0.842	Efecto neutro
CyaA	Asn142Ser	0.016	Efecto neutro
	Gly222Ser	-3.447	Efecto perjudicial
	Ala349Glu	2.261	Efecto neutro
	Ser352Thr	-0.645	Efecto neutro
	Ser356Leu	-2.624	Efecto perjudicial
	Gly359Glu	-3.077	Efecto perjudicial
	Glu362Asp	-0.286	Efecto neutro
	Ala363Gly	-0.251	Efecto neutro
	Ala363Ser	0.900	Efecto neutro
	Asp837Glu	0.123	Efecto neutro
	Thr840Ala	-0.314	Efecto neutro

En la secuencia de aminoácidos de MurA se detectó una única sustitución (Leu370Ile) en tres de los aislados clínicos de *E. coli* resistentes a fosfomicina (aislados 789, 809 y 853). Sin embargo, el análisis de la plataforma PROVEAN, consideró dicha sustitución de efecto neutro, es decir, que no altera la estructura y función de la proteína.

En GlpT se detectaron hasta 12 sustituciones diferentes en su secuencia de aminoácidos. Glu448Lys (de efecto neutro) fue constante en todos los aislados, tanto resistentes como sensibles a fosfomicina. Ala16Thr (de efecto neutro), Phe133Cys, Gly135Trp, Ala197Val y Leu373Arg (categorizadas como de posible efecto perjudicial sobre la estructura y función de la proteína) se detectaron exclusivamente en aislados sensibles al antibiótico. Met52Leu, Leu297Phe, Glu443Gln, Gln444Glu (todas ellas de efecto neutro), Gly84Asp y Pro212Leu (ambas consideradas de efecto perjudicial), se detectaron solo en aislados resistentes.

En 16 de los 22 aislados clínicos resistentes a fosfomicina, y en ninguno de los sensibles, se detectó la misma sustitución en la secuencia de aminoácidos de UhpT (Glu350Gln), categorizada por la plataforma PROVEAN sin efecto sobre la estructura o función proteica. Además, la ausencia del gen *uhpT* fue un hallazgo destacado en los aislados 11 y 26, ambos resistentes a fosfomicina.

El gen *uhpA* se detectó en todos los aislados sensibles a fosfomicina y en solo uno de los resistentes (aislado 26). En dos de estos aislados sensibles se detectó la sustitución Arg46Cys en la secuencia de su proteína (categorizada con efecto neutro). Este gen no se detectó en 21 de los 22 aislados resistentes a fosfomicina.

En la proteína PtsI se detectaron 3 sustituciones diferentes en su secuencia de aminoácidos: Arg367Lys, presente en todos los aislados, tanto resistentes como sensibles a fosfomicina; Ala306Thr, exclusivamente en 2 aislados sensibles; y Val25Ile en 10 aislados resistentes. Todas ellas fueron categorizadas con efecto neutro según la plataforma PROVEAN.

Finalmente, en CyaA se detectaron 11 sustituciones: Asn142Ser (de efecto neutro) estuvo presente en la totalidad de los aislados; Gly222Ser (de efecto perjudicial) se observó exclusivamente en 1 de los 7 aislados sensibles; Ala349Glu, Glu362Asp, Asp837Glu, Thr840Ala (de efecto neutro), Ser356Leu y Gly359Glu (ambas de efecto perjudicial), se detectaron en algunos aislados, tanto sensibles como resistentes; y Ala363Ser, Ala363Gly y Ser352Thr (de efecto neutro), solo se describieron en aislados resistentes a fosfomicina.

La comparación de los resultados obtenidos a partir del análisis de las secuencias proteicas con el estudio fenotípico en el que se evaluó la capacidad de crecimiento bacteriano en presencia de G3P o G6P (sustratos de las proteínas transportadores GlpT y UhpT), permitió determinar el efecto real que, sobre la función de estos dos transportadores, tuvieron las sustituciones en la secuencia de sus aminoácidos. Como se ha comentado previamente, todos los aislados clínicos de *E. coli* crecieron en medio M9 con G3P, lo que indicó que no hubo pérdida significativa de la función de GlpT, independientemente de las sustituciones detectadas en la secuencia de aminoácidos de este transportador. Sin embargo, ninguno de los aislados clínicos resistentes a fosfomicina pudo crecer en medio M9 con G6P, indicando que la ausencia de los genes *uhpT* y / o *uhpA* fue la causa directa de la pérdida de función de UhpT.

Mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa, también se procedió a detectar la presencia de los genes plasmídicos *fosA3*, *fosA4*, *fosA5*, *fosA6* y *fosC2*, relacionados con resistencia a fosfomicina como consecuencia de la expresión de enzimas glutatión-S-transferasas. Como se observa en la figura 20, de entre estos, solo se detectó la presencia del gen *fosA3* en los aislados 66 y 871, confirmando la

presencia de estas enzimas, tal y como había puesto de manifiesto, inicialmente, el estudio fenotípico mediante el empleo de PPF (ver figura 16).

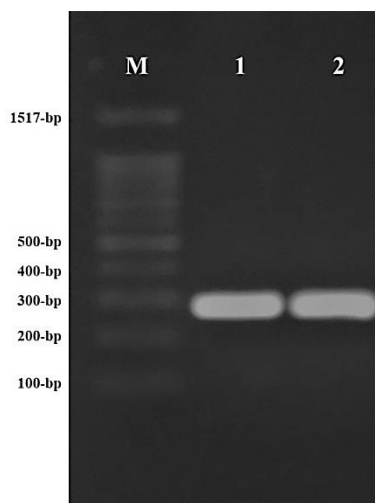


Figura 20: Detección del gen *fos A3* (282 pb) en los aislados clínicos 66 (1) y 871 (2) de *E. coli*. M: marcador de peso molecular.

4.2.2. Resistencia a nitrofurantoína

Las sustituciones detectadas en las secuencias de aminoácidos de las proteínas NfsA, NfsB y RibE en los 29 aislados clínicos de *E. coli* se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Sustituciones detectadas en la secuencia de aminoácidos de los genes cromosómicos implicados en la resistencia a nitrofurantoína en *E. coli*.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI	NfsA (240 aa)	NfsB (217 aa)	RibE (156 aa)
11	R	Ile117Thr Gly126Arg Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Glu54Stop	Ninguna
17	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Ninguna
26	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Ninguna
66	R	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu Arg207His	Ninguna
302	R	Ninguna	Gly66Asp Met75Ile Val93Ala Ala174Glu Arg207His	Ninguna

Tabla 13: Continuación.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI	NfsA (240 aa)	NfsB (217 aa)	RibE (156 aa)
334	I	Gln67Leu	Gly66Asp Met75Ile Val93Ala Arg107Cys	Pro55His
381	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Ninguna
387	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Ninguna
462	R	Cys80Arg Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu Gly192Ser	Ninguna
632	S	Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	Ninguna
751	R	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp Arg203Cys	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Val51Ile
752	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Ninguna
757	I	Glu58Asp Gln67Stop	Val93Ala Lys122Arg	Ninguna
776	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Ninguna
789	S	Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	Ninguna
792	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Ninguna
795	I	His11Tyr Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	Ninguna
797	R	Ile117Thr Lys141Glu Gly154Glu Gly187Asp	Leu22Ile Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Val51Ile

Tabla 13: Continuación.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI	NfsA (240 aa)	NfsB (217 aa)	RibE (156 aa)
799	R	Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	Ninguna
802	R	Gln147Stop	Met75Ile Val93Ala	Ninguna
809	S	Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	Ninguna
853	S	Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	Ninguna
854	I	Ninguna	Gly66Asp Met75Ile Val93Ala	Ninguna
860	S	Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	Ninguna
871	S	Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	Ninguna
872	I	Asp19Asn Ser33Arg Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gln44His Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Ninguna
883	R	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Phe84Ser Val93Ala Ala174Glu	Ninguna
891	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Ninguna
892	R	Ninguna	Gly66Asp Met75Ile Val93Ala	Ninguna

La predicción del efecto que sobre la estructura y función biológica de cada una de las proteínas tendrían estas sustituciones, según el análisis realizado a través de la plataforma online PROVEAN se resume en la tabla 14.

Tabla 14: Predicción del impacto de las sustituciones en la secuencia de aminoácidos sobre la estructura y función biológica de cada una de las proteínas implicadas en la resistencia a nitrofurantoína.

Proteína	Sustitución en aminoácido	P-score	Predicción del impacto (cutoff = -2.5)
NfsA	His11Tyr	-5.746	Efecto perjudicial
	Asp19Asn	-2.091	Efecto neutro
	Ser33Arg	-2.526	Efecto perjudicial
	Glu58Asp	-1.866	Efecto neutro
	Gln67Leu	-5.860	Efecto perjudicial
	Cys80Arg	-11.148	Efecto perjudicial
	Ile117Thr	-0.634	Efecto neutro
	Gly126Arg	-7.544	Efecto perjudicial
	Lys141Glu	1.207	Efecto neutro
	Gln147Arg	-1.170	Efecto neutro
	Gly154Glu	-7.608	Efecto perjudicial
	Ser180Asn	0.071	Efecto neutro
	Gly187Asp	1.554	Efecto neutro
	Arg203Cys	-7.090	Efecto perjudicial
NfsB	Leu22Ile	0.334	Efecto neutro
	Gln44His	-4.800	Efecto perjudicial
	Gly66Asp	-1.775	Efecto neutro
	Met75Ile	2.094	Efecto neutro
	Phe84Ser	-5.862	Efecto perjudicial
	Val93Ala	2.155	Efecto neutro
	Arg107Cys	-7.863	Efecto perjudicial
	Lys122Arg	-0.179	Efecto neutro
	Ala174Glu	1.621	Efecto neutro
	Gly192Ser	-5.961	Efecto perjudicial
	Arg207His	-4.966	Efecto perjudicial
RibE	Val51Ile	-0.363	Efecto neutro
	Pro55His	-8.840	Efecto perjudicial

En la secuencia de aminoácidos de la proteína NfsA se detectaron hasta 14 sustituciones diferentes. Glu58Asp, Ile117Thr, Lys141Glu, Gln147Arg y Gly187Asp (de efecto neutro) se observaron solo en aislados sensibles a nitrofurantoína. Asp19Asn, Ser180Asn (ambas de efecto neutro), His11Tyr, Ser33Arg, Gln67Leu, Cys80Arg, Gly126Arg, Gly154Glu, y Arg203Cys (todas estas de efecto perjudicial) solo se detectaron en aislados con algún nivel de resistencia (R o I) a nitrofurantoína. Además, en los aislados 757 y 802, la mutación de un solo nucleótido en el gen *nfsA* generó un codón de stop. Estas mutaciones dieron como resultado la producción de proteínas NfsA truncadas de 66 y 146 aminoácidos (el codón CAA mutó a TAA, Gln67Stop en el aislado 757; el codón CAG mutó a TAG, Gln147Stop en el aislado 802), en lugar de una proteína con 240 aminoácidos.

En la proteína NfsB se detectaron 11 sustituciones en la secuencia de aminoácidos: Gly66Asp, Val93Ala y Ala174Glu (de efecto neutro) en aislados sensibles;

Leu22Ile, Met75Ile, Lys122Arg (de efecto neutro), Gln44His, Phe84Ser, Arg107Cys, Gly192Ser y Arg207His (de efecto perjudicial) solo en aislados con algún nivel de resistencia (R o I) a nitrofurantoína. Además, en el aislado 11, la mutación de un solo nucleótido en el gen *nfsB* generó un codón de stop que dio como resultado la producción de una proteína NfsB truncada (el codón GAA mutó a TAA, Glu54Stop), con 53 aminoácidos en lugar de una proteína completa con 217.

Finalmente, en RibE se detectaron 2 sustituciones en la secuencia de aminoácidos de 3 aislados clínicos con algún nivel de resistencia (R o I) a nitrofurantoína: Val51Ile (de efecto neutro) y Pro55His (de efecto perjudicial).

Mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa, también se procedió a detectar la presencia de los genes *oqxAB*, plasmídicos en *E. coli*, relacionados con la resistencia a nitrofurantoína, sin embargo, estos fueron negativos en todos los aislados clínicos de esta especie.

4.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *Klebsiella pneumoniae*

En la tabla 15 se muestran, para cada uno de los 41 aislados clínicos de *K. pneumoniae* seleccionados en el presente trabajo, los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos de 200 µg de fosfomicina y 300 µg de nitrofurantoína, la interpretación de la categoría de uso clínico según los criterios definidos por el CLSI para cada uno de estos antibióticos, el diámetro del halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco de 200 µg de fosfomicina suplementado con PPF y el resultado de las pruebas de utilización de carbohidratos (G3P y G6P).

De estos 41 aislados, 14 presentaron algún nivel de resistencia (categoría clínica R o I) a fosfomicina y nitrofurantoína al mismo tiempo, 10 fueron resistentes (R o I) a fosfomicina y sensibles a nitrofurantoína y 17 fueron resistentes (R o I) a nitrofurantoína y sensibles a fosfomicina. En definitiva, 24 aislados fueron resistentes a fosfomicina y 31 lo fueron a nitrofurantoína.

Tabla 15: Caracterización fenotípica de la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína de los 41 aislados clínicos de *K. pneumoniae*.

Identificación del aislado	Disco de fosfomicina ¹	Categoría clínica según CLSI ²	Disco de fosfomicina con PPF ³	Crecimiento en M9 con G3P	Crecimiento en M9 con G6P	Disco de nitrofurantoína ¹	Categoría clínica según CLSI ²
6	6	R	13	-	+	18	S
19	23	S	25	+	+	14	R
28	17	S	18	+	+	14	R
81	6	R	16	+	+	15	I
100	19	S	20	+	+	15	I
115	6	R	17	-	+	18	S
118	20	S	21	+	+	16	I
121	18	S	19	+	+	16	I
128	6	R	13	+	+	15	I
140	6	R	12	+	+	9	R
259	19	S	20	+	+	11	R
261	6	R	13	+	+	7	R
319	18	S	21	+	+	12	R
342	6	R	14	+	+	8	R
360	15	I	20	+	+	12	R
414	20	S	23	+	+	10	R
430	6	R	13	+	+	7	R
460	20	S	22	+	+	12	R
477	6	R	16	+	+	18	S
495	24	S	25	+	+	16	I
499	22	S	23	+	+	11	R
511	6	R	16	+	+	18	S
522	6	R	12	+	+	13	R
534	17	S	19	+	+	8	R
552	18	S	20	+	+	16	I
553	6	R	21	+	+	22	S
557	22	S	23	+	+	14	R
560	6	R	14	+	+	20	S
586	14	I	19	+	+	14	R
591	23	S	25	+	+	11	R
593	6	R	19	+	+	10	R
623	20	S	21	+	+	12	R
653	14	I	19	+	+	10	R
654	6	R	17	+	+	18	S
669	10	R	15	+	+	17	S
674	6	R	18	+	+	9	R
680	10	R	16	+	+	14	R
718	6	R	14	+	+	11	R
719	6	R	17	+	+	23	S
723	15	I	21	-	+	21	S
738	21	S	23	+	+	10	R

¹Diámetro (en mm) del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de antibiótico. ²Categoría de uso clínico del antibiótico según los criterios del CLSI. ³Diámetro (en mm) del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de fosfomicina suplementado con PPF. +: Crecimiento bacteriano en medio M9 suplementado con G3P o G6P. -: Ausencia de crecimiento bacteriano en medio M9 suplementado con G3P o G6P.

4.3.1. Resistencia a fosfomicina

En los 24 aislados clínicos resistentes a fosfomicina se detectó un incremento igual o superior a 5 mm del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de fosfomicina suplementado con PPF, en comparación con el obtenido en torno al disco que solo contenía fosfomicina (figura 21). Fenotípicamente, este resultado sugería que la resistencia al antibiótico podría ser consecuencia de la presencia de enzimas con actividad glutatión-S-transferasa.

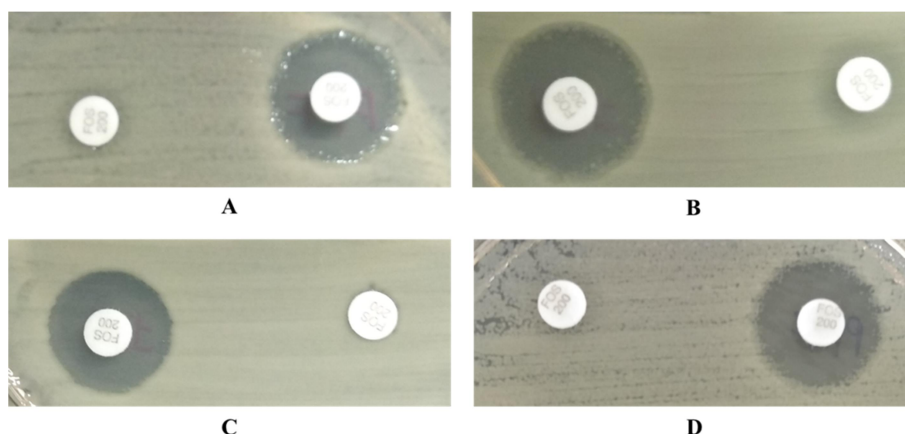


Figura 21: Incremento del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de fosfomicina suplementado con PPF, respecto al que solo contiene fosfomicina, en los aislados clínicos 81 (A), 115 (B), 477 (C) y 511 (D) de *K. pneumoniae*.

Aunque el resto de aislados clínicos de *K. pneumoniae* se caracterizaron por su sensibilidad a fosfomicina, según los criterios del CLSI, en dos de estos (aislados 319 y 460) se observó la ausencia de colonias dentro del halo alrededor del disco suplementado con PPF que, sin embargo, sí aparecían dentro de la zona de inhibición del crecimiento en presencia exclusivamente de fosfomicina (figura 22).

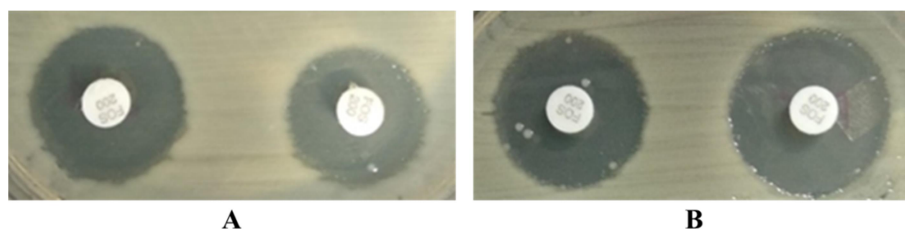


Figura 22: Ausencia de colonias dentro de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de fosfomicina suplementado con PPF en los aislados clínicos 319 (A) y 460 (B) de *K. pneumoniae*.

Treinta y ocho aislados clínicos de *K. pneumoniae* crecieron en medio M9 suplementado con G3P, independientemente de su sensibilidad o resistencia a fosfomicina, lo que, desde un punto de vista fenotípico, indicaría que la función del transportador GlpT se encontraba conservada en todos ellos. Sin embargo, los aislados 6, 115 y 723 no crecieron en presencia de G3P como única fuente de carbono, lo que sugería una alteración de GlpT (figura 23). Por otro lado, todos los aislados crecieron en medio M9 suplementado con G6P, independientemente de su sensibilidad o resistencia, sugiriendo que se conservaba la función del transportador UhpT.

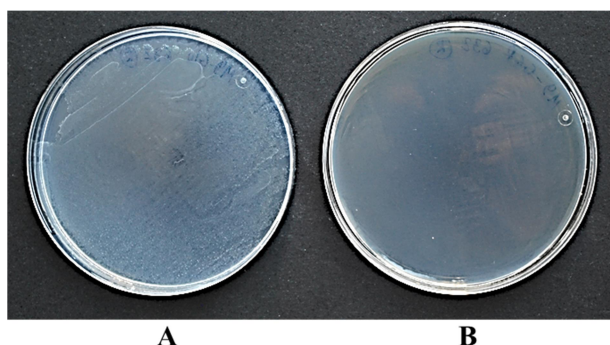


Figura 23: Prueba de utilización de G3P en un aislado clínico de *K. pneumoniae* resistente a fosfomicina (aislado 115). Se observa crecimiento bacteriano en medio M9 suplementado al 0,2% con glucosa (A) y ausencia de crecimiento bacteriano en medio M9 suplementado con G3P (B).

En la figura 24 se muestra el gel de agarosa con los productos de la amplificación, mediante PCR, de los genes cromosómicos implicados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoina en la cepa control *K. pneumoniae* ATCC 13883.

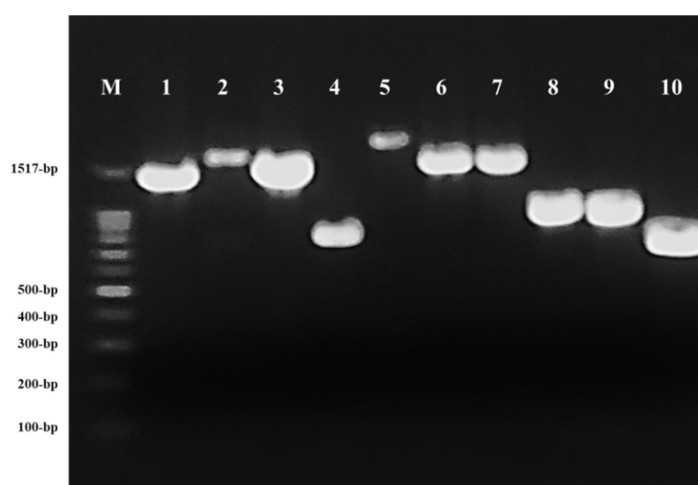


Figura 24: Detección, en *K. pneumoniae* ATCC 13883, de los genes cromosómicos implicados en la resistencia a fosfomicina y nitrofurantoina. M: marcador de peso molecular. Líneas 1 a 10: *murA* (1439 pb), *glpT* (1642 pb), *uhpT* (1541 pb), *uhpA* (746 pb), *ptsI* (1875 pb), *cyaA1* (1515 pb), *cyaA2* (1603 pb), *nfsA* (924 pb), *nfsB* (896 pb) y *ribH* (679 pb), respectivamente.

Los genes *murA*, *glpT*, *uhpT*, *uhpA*, *ptsI* y *cyaA* se detectaron en la totalidad de los aislados clínicos de *K. pneumoniae*. Tras secuenciar los productos de amplificación de la PCR, las sustituciones detectadas en las secuencias de aminoácidos de las respectivas proteínas, en los 41 aislados, se muestran en la tabla 16.

Tabla 16: Sustituciones detectadas en la secuencia de aminoácidos de los genes cromosómicos implicados en la resistencia a fosfomicina en *K. pneumoniae*.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI	MurA (419 aa)	GlpT (448 aa)	UhpT (463 aa)	UhpA (197 aa)	PtsI (575 aa)	CyaA (850 aa)
6	R	Ninguna	Ser79Stop	Ninguna	Thr75Ile	Ninguna	Ninguna
19	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
28	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Thr75Ile	Ninguna	Ninguna
81	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
100	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Glu64Asp	Ninguna	Ninguna
115	R	Ninguna	Ser79Stop	Ninguna	Thr75Ile	Ninguna	Ninguna
118	S	Ninguna	Ala294Thr	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
121	S	Ninguna	Ala294Thr	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
128	R	Ninguna	Ser276Pro	Ninguna	Thr75Ile	Ninguna	Ninguna
140	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
259	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
261	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
319	S	Arg212His	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
342	R	Ninguna	Asp274Gly	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
360	I	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
414	S	Arg212His	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
430	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
460	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
477	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
495	S	Val6Ile	Ninguna	Ninguna	Thr75Ile	Ninguna	Ninguna
499	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
511	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
522	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Lys174Asn	Ninguna
534	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ser247Arg
552	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
553	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
557	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Thr75Ile	Ninguna	Ninguna
560	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Lys174Asn	Ninguna
586	I	Ninguna	Val158Ala Ala294Thr	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
591	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Lys174Asn	Ninguna
593	R	Ninguna	Val158Ala Ala294Thr	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
623	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Lys174Asn	Ninguna
653	I	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
654	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
669	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna

Tabla 16: Continuación.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI	MurA (419 aa)	GlpT (448 aa)	UhpT (463 aa)	UhpA (197 aa)	PtsI (575 aa)	CyaA (850 aa)
674	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
680	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
718	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
719	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
723	I	Ninguna	Gln58Stop	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
738	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna

La predicción del impacto o efecto que sobre la estructura y función biológica de cada una de las proteínas tendrían estas sustituciones, según el análisis realizado a través de la plataforma online PROVEAN, se resume en la tabla 17.

Tabla 17: Predicción del impacto de las sustituciones en la secuencia de aminoácidos sobre la estructura y función biológica de cada una de las proteínas implicadas en la resistencia a fosfomicina.

Proteína	Sustitución en aminoácido	P-score	Predicción del impacto (cutoff = -2.5)
MurA	Val6Ile	0.544	Efecto neutro
	Arg212His	-1.477	Efecto neutro
GlpT	Val158Ala	-2.043	Efecto neutro
	Asp274Gly	-5.425	Efecto perjudicial
	Ser276Pro	-2.162	Efecto neutro
	Ala294Thr	-2.921	Efecto perjudicial
UhpA	Glu64Asp	-0.559	Efecto neutro
	Thr75Ile	0.987	Efecto neutro
PtsI	Lys174Asn	0.022	Efecto neutro
CyaA	Ser247Arg	-3.885	Efecto perjudicial

En la secuencia de aminoácidos de MurA se detectaron dos sustituciones, Val6Ile y Arg212His, ambas categorizadas con efecto neutro sobre la estructura y función biológica de la proteína y presentes en tres de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* sensibles a nitrofurantoína (aislados 319, 414 y 495).

En GlpT se detectaron 4 sustituciones diferentes en su secuencia de aminoácidos. Val158Ala y Ser276Pro (de efecto neutro) y Asp274Gly (categorizada como de posible efecto perjudicial) se detectaron en aislados con algún nivel de resistencia (R o I) a fosfomicina. Ala294Thr (de efecto perjudicial) estuvo presente tanto en aislados sensibles como resistentes al antibiótico. Además, en los aislados 6, 115 y 723, con resistencia al antibiótico y ausencia de crecimiento en presencia de G3P como única fuente de carbono, la mutación de un solo nucleótido en el gen *glpT*

generó un codón de stop. Estas mutaciones dieron como resultado la producción de proteínas GlpT truncadas de 78 y 57 aminoácidos (el codón TCG mutó a TAG, Ser79Stop en los aislados 6 y 115; el codón CAG mutó a TAG, Gln58Stop en el aislado 723), en lugar de una proteína con 448 aminoácidos.

No se detectaron modificaciones en la proteína UhpT. En la secuencia de UhpA se obtuvieron dos sustituciones (Glu64Asp y Thr75Ile), ambas categorizadas como de efecto neutro y presentes tanto en aislados sensibles, como resistentes a fosfomicina.

Finalmente, en las secuencias de aminoácidos de las proteínas PtsI y CyaA se detectó una única sustitución, Lys174Asn (de efecto neutro) y Ser247Arg (de efecto perjudicial), respectivamente. Ambas sustituciones estuvieron presentes en aislados sensibles y resistentes al antibiótico.

La comparación de los resultados obtenidos a partir del análisis de las secuencias proteicas con el estudio fenotípico en el que se evaluó la capacidad de crecimiento bacteriano en presencia de G3P o G6P (sustratos de las proteínas transportadoras GlpT y UhpT), nos permitió determinar el efecto real que, sobre la función de estos dos transportadores, tuvieron las sustituciones en la secuencia de sus aminoácidos. Como se ha comentado previamente, 3 de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* no crecieron en medio M9 con G3P, lo que indicó la existencia de pérdida significativa de la función de GlpT. Estos aislados correspondieron con aquellos en los que se detectó la presencia de una GlpT truncada, lo que indicó que esta era la causa directa de la pérdida de función de este transportador.

Mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa, también se procedió a detectar la presencia del gen cromosómico *fosA^{KP}* y los genes plasmídicos *fosA3*, *fosA4* y *fosC2*, relacionados con resistencia a fosfomicina como consecuencia de la expresión de enzimas glutatión-S-transferasas. El gen *fosA^{KP}* se detectó en los 24 aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a fosfomicina, en los 2 aislados en los que se observó ausencia de colonias dentro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de PPF y, también, en 11 de los restantes 15 aislados sensibles a fosfomicina (figura 25). El gen *fosA3* se detectó, adicionalmente, en el aislado 140 (figura 26). No se detectaron *fosA4* ni *fosC2*. En la tabla 18 se resumen estos hallazgos.

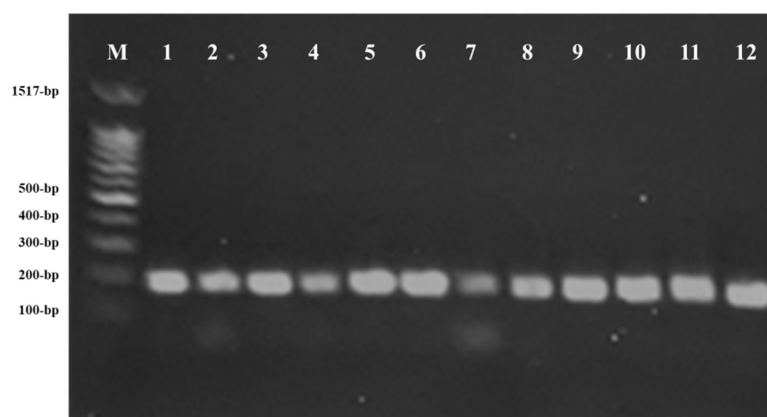


Figura 25: Detección del gen *fosA^{KP}* (187 pb) en los aislados clínicos 6 (1), 19 (2), 28 (3), 81 (4), 100 (5), 115 (6), 118 (7), 121 (8), 128 (9), 140 (10), 259 (11) y 261 (12) de *K. pneumoniae*. M: marcador de peso molecular.

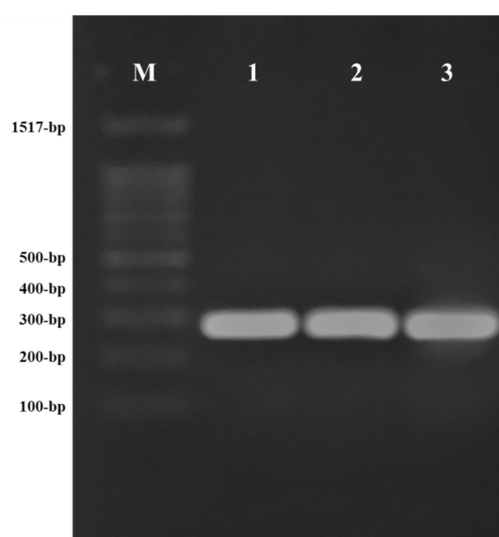


Figura 26: Detección del gen *fosA3* (282 pb) en los aislados clínicos 66 (1) y 871 (2) de *E. coli* y 140 (3) de *K. pneumoniae*. M: marcador de peso molecular.

Tabla 18: Detección, mediante PCR, en los 41 aislados clínicos de *K. pneumoniae*, de los genes *fos* implicados en la resistencia a fosfomicina.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI (fosfomicina)	<i>fosA^{KP}</i>	<i>fosA3</i>	<i>fosA4</i>	<i>fosC2</i>
6	R	+	-	-	-
19	S	+	-	-	-
28	S	+	-	-	-
81	R	+	-	-	-
100	S	+	-	-	-
115	R	+	-	-	-
118	S	+	-	-	-
121	S	+	-	-	-
128	R	+	-	-	-
140	R	+	+	-	-

Tabla 18: Continuación.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI (fosfomicina)	<i>fosA</i> ^{KP}	<i>fosA3</i>	<i>fosA4</i>	<i>fosC2</i>
259	S	+	-	-	-
261	R	+	-	-	-
319	S	+	-	-	-
342	R	+	-	-	-
360	I	+	-	-	-
414	S	+	-	-	-
430	R	+	-	-	-
460	S	+	-	-	-
477	R	+	-	-	-
495	S	-	-	-	-
499	S	-	-	-	-
511	R	+	-	-	-
522	R	+	-	-	-
534	S	+	-	-	-
552	S	+	-	-	-
553	R	+	-	-	-
557	S	+	-	-	-
560	R	+	-	-	-
586	I	+	-	-	-
591	S	-	-	-	-
593	R	+	-	-	-
623	S	-	-	-	-
653	I	+	-	-	-
654	R	+	-	-	-
669	R	+	-	-	-
674	R	+	-	-	-
680	R	+	-	-	-
718	R	+	-	-	-
719	R	+	-	-	-
723	I	+	-	-	-
738	S	+	-	-	-

4.3.2. Resistencia a nitrofurantoína

Las sustituciones detectadas en las secuencias de aminoácidos de las proteínas NfsA, NfsB y RibH en los 41 aislados clínicos de *K. pneumoniae* se muestran en la tabla 19.

Tabla 19: Sustituciones detectadas en la secuencia de aminoácidos de los genes cromosómicos implicados en la resistencia a nitrofurantoína en *K. pneumoniae*.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI	NfsA (240 aa)	NfsB (217 aa)	RibH (156 aa)
6	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna
19	R	Ninguna	Pro190Arg	Ninguna
28	R	Ninguna	His47Asp Ile49Leu	Ninguna

Tabla 19: Continuación.

Identificación del aislado	Categoría clínica según CLSI	NfsA (240 aa)	NfsB (217 aa)	RibH (156 aa)
81	I	Glu29Ala	Pro190Arg	Ninguna
100	I	Glu29Ala	Ninguna	Ninguna
115	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna
118	I	Glu29Ala Gly125Trp	Ninguna	Ninguna
121	I	Ninguna	Ninguna	Ninguna
128	I	Ninguna	Ninguna	Ninguna
140	R	Glu29Ala Gly125Trp Gly204Ser	Ninguna	Ninguna
259	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna
261	R	Ala112Val	Ninguna	Ninguna
319	R	Glu29Ala	Ninguna	Ninguna
342	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna
360	R	Ala112Val	Ninguna	Ninguna
414	R	Glu29Ala	Ninguna	Ninguna
430	R	Glu29Ala	Pro190Arg	Ninguna
460	R	Gln195Leu	Ninguna	Ninguna
477	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna
495	I	Ninguna	Ninguna	Ninguna
499	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna
511	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna
522	R	Ala190Gly	Ninguna	Ninguna
534	R	Glu29Ala Gly125Trp Gly204Ser	Ninguna	Ninguna
552	I	Glu29Ala Gly204Ser	Ninguna	Ninguna
553	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna
557	R	Ninguna	Ser37Asn	Ninguna
560	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna
586	R	Ala190Gly	Ninguna	Ninguna
591	R	Asp162Val	Ninguna	Ninguna
593	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna
623	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna
653	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna
654	S	Ala55Thr	Ninguna	Ninguna
669	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna
674	R	Glu29Ala	Pro190Arg	Ninguna
680	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna
718	R	Ninguna	Ninguna	Ninguna
719	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna
723	S	Ninguna	Ninguna	Ninguna
738	R	Glu29Ala Gly125Trp Gly204Ser	Ninguna	Ninguna

La predicción del efecto que sobre la estructura y función biológica de cada una de las proteínas tendrían estas sustituciones, según el análisis realizado a través de la plataforma online PROVEAN se resume en la tabla 20.

Tabla 20: Predicción del impacto de las sustituciones en la secuencia de aminoácidos sobre la estructura y función biológica de cada una de las proteínas implicadas en la resistencia a nitrofurantoína.

Proteína	Sustitución en aminoácido	P-score	Predicción del impacto (cutoff = -2.5)
NfsA	Glu29Ala	1.526	Efecto neutro
	Ala55Thr	-0.686	Efecto neutro
	Ala112Val	-3.556	Efecto perjudicial
	Gly125Trp	-7.630	Efecto perjudicial
	Asp162Val	-1.666	Efecto neutro
	Ala190Gly	-2.207	Efecto neutro
	Gln195Leu	-2.255	Efecto neutro
	Gly204Ser	1.406	Efecto neutro
NfsB	Ser37Asn	-2.709	Efecto perjudicial
	His47Asp	-8.374	Efecto perjudicial
	Ile49Leu	-1.453	Efecto neutro
	Pro190Arg	-2.687	Efecto perjudicial

En la secuencia de aminoácidos de la proteína NfsA se detectaron hasta 8 sustituciones diferentes. Glu29Ala, Asp162Val, Ala190Gly, Gln195Leu, Gly204Ser (de efecto neutro) se observaron solo en aislados resistentes a nitrofurantoína. Ala55Thr (de efecto neutro) se detectó solo en un aislado sensible al antibiótico. Ala112Val y Gly125Trp (ambas de efecto perjudicial) solo se detectaron en aislados con algún nivel de resistencia (R o I).

En la proteína NfsB se detectaron 4 sustituciones en la secuencia de aminoácidos: Ile49Leu (de efecto neutro), Ser37Asn, His47Asp y Pro190Arg (de efecto perjudicial), todas ellas en aislados con algún nivel de resistencia (R o I) a nitrofurantoína. Por último, no se detectaron modificaciones de la secuencia de RibH en ninguno de los aislados clínicos de *K. pneumoniae*.

Mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa, se detectó la presencia de los genes *oqxAB* en 40 de los 41 aislados clínicos de *K. pneumoniae* (figura 27). La excepción fue el aislado 719.

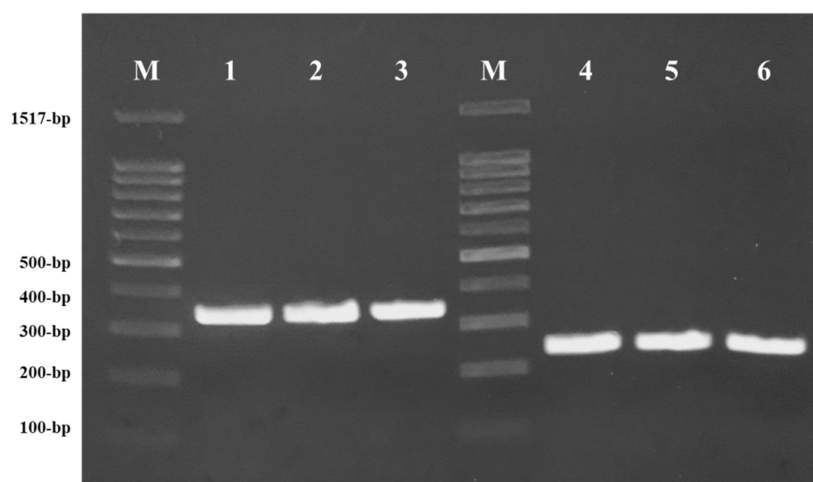


Figura 27: Detección de los genes *oqxA* (339 pb) y *oqxB* (240 pb) en los aislados clínicos 6 (muestras 1 y 4), 19 (muestras 2 y 5) y 28 (muestras 3 y 6) de *K. pneumoniae*. M: marcador de peso molecular.

5. DISCUSIÓN



5.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA A FOSFOMICINA

En *E. coli* y *K. pneumoniae* se han descrito básicamente tres mecanismos de resistencia a fosfomicina. En primer lugar, la modificación de la molécula diana MurA. También la reducción de la permeabilidad, como consecuencia de modificaciones en la estructura y función de los transportadores GlpT y/o UhpT, de alteraciones de las proteínas que regulan su expresión (especialmente UhpA) o del descenso de los niveles intracelulares de cAMP (dependientes de PtsI y CyaA). Por último, también se ha descrito la modificación irreversible del antibiótico a través de las diferentes variantes enzimáticas de FosA o FosC2, que catalizan la apertura del anillo central de fosfomicina. Los dos primeros mecanismos son de origen cromosómico, mientras que los genes que codifican las enzimas modificantes del antibiótico pueden ser cromosómicos en *K. pneumoniae* o estar codificados en plásmidos en cualquiera de las dos bacterias (Castañeda-García *et al.* 2013).

La resistencia a fosfomicina no es frecuente, como demuestran diversos trabajos en todo el mundo, especialmente entre aislados clínicos productores de ITU (Vardakas *et al.* 2016). En gran medida se considera que este hecho es consecuencia de que fosfomicina ha sido un antibiótico escasamente empleado, por lo que las bacterias no han desarrollado resistencia frente a él. Sin embargo, hay también que destacar que algunos de los mecanismos de resistencia comentados anteriormente suponen un elevado coste biológico para la bacteria, pues afectan a procesos biológicos imprescindibles para su supervivencia, como la síntesis de la pared celular (dependiente de MurA) o el transporte y metabolismo de los carbohidratos (dependientes de GlpT, UhpT, UhpA, PtsI y CyaA). Eso explica que, como consecuencia de las alteraciones de estos sistemas, las bacterias resistentes a fosfomicina reducen su capacidad de crecimiento y de adhesión a los epitelios, dificultando la colonización e infección de tejidos como la vejiga urinaria. En consecuencia, serían eliminadas por la orina antes de poder establecerse, lo que explicaría la escasa frecuencia de aislados clínicos resistentes al antibiótico detectados *in vivo* (Nilsson *et al.* 2003). En las tablas 21 y 22 se resumen algunos de los hallazgos al respecto en varios de los trabajos más significativos realizados en aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente.

Tabla 21: Modificaciones en las proteínas MurA, GlpT, UhpT, UhpA, PtsI y CyaA de *E. coli* relacionadas con resistencia a fosfomicina y observadas en diversos estudios.

MurA	GlpT	UhpT	UhpA	PtsI	CyaA	Referencia
Cys115Asp						Kim <i>et al.</i> 1996
	14-bp duplicación 5-bp duplicación 227-bp delección	96-bp delección Ausencia del gen*	Gln144Stop Ausencia del gen*			Wachino <i>et al.</i> 2010
Asp369Asn Leu370Ile*	Gly33Arg Gln213Stop Pro218Stop Trp256Stop Leu297Phe* Gly302Asp Glu443Gln* Gln444Glu* Glu448Lys*	Glu350Gln* Ausencia del gen*	Gly97Asp Ausencia del gen*	Val25Ile*	Ser352Thr*	Takahata <i>et al.</i> 2010
Asn67Ile Val146Ala Phe151Ser His159Tyr Trp164Ser	Arg50Cys Gly142Cys Val149Met Ala156Val Leu174Val Phe176Ser Arg209His	Val18Leu Ser26Arg Trp44Cys His50Pro Arg83Cys Val85Leu Cys109Trp Ser122Ile Lys132Glu Gly134Asp Val143Met Ile149Met Trp151Cys Tyr165His Phe187Tyr	Gln32His Pro160Leu Ala167Val	Ala39Val Ala104Thr Thr215Ala Gly227Arg		Tseng <i>et al.</i> 2015 ¹
Gln59Lys Glu139Lys Val389Ile Asp390Ala	Ile4Val Gly84Asp* Thr144Pro Pro173Ser Ala206Stop Gly437Cys	Ausencia del gen*				Li <i>et al.</i> 2015
		Ausencia del gen*	Ausencia del gen*			Lucas <i>et al.</i> 2017
	Ile171Thr Phe176Leu 3-bp delección	Ausencia del gen*	Met1Ile Thr3Ala 25-bp delección Ausencia del gen*	Lys145Asn Val399Leu Lys410Arg Ala443Thr Gly452Asp	Asn142Ser* His716Leu Ausencia del gen	Ohkoshi <i>et al.</i> 2017
	Pro97Leu Pro139Gln Cys141Tyr Gln213Stop Tyr223Cys	Gln7Stop Tyr60Phe Gln66Stop 9-bp delección 1291-bp delección Ausencia del gen*	Gln28Stop Ser104Stop Ala110Ser 9-bp delección 12-bp delección	Arg400His	Leu125Phe	Cattoir <i>et al.</i> 2020

*Modificaciones detectadas también en el presente trabajo

¹La secuencia de aminoácidos se comparó con la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922, sensible a fosfomicina

Tabla 22: Modificaciones en las proteínas MurA, GlpT, UhpT, UhpA, PtsI y CyaA de *K. pneumoniae* relacionadas con resistencia a fosfomicina y observadas en diversos estudios.

MurA	GlpT	UhpT	UhpA	PtsI	CyaA	Referencia
Gly118Asp Glu130Lys Thr214Ile Asp259Asn Asp260Tyr Arg267Leu Leu282Phe Thr287Asn Thr307Lys	Arg177Lys Phe183Leu Phe184Ile Ser205Thr Thr208Ser Asp214Glu Cys221Arg Ile226Thr Phe236Pro Glu241Lys Ala255Glu Pro257Arg Ile266Ser Asn278Lys Ser283Cys Ile293Phe Gly300Arg Pro305Ala Arg317His Ala318Thr Pro327Thr Leu338Trp Arg344Gly	Arg165Gly Arg171Val Leu178Phe Gly196Glu Ala252Pro Ser266Pro Ile283Leu Lys286Arg Ala301Gly Arg312Pro Glu317Lys Gln320Lys Arg323Lys				Lu <i>et al.</i> 2016 ¹
1-bp inserción 1-bp delección 219-bp sustituciones	Inserción de un gran fragmento Ausencia del gen			1-bp delección		Liu <i>et al.</i> 2020 ²
Thr287Asn	Pro97Arg Phe112Ser His147Gln Pro212Leu Gly386Ser Gly386Ile Ausencia del gen	Leu132Val Arg171Gly Ala176Pro				Singkhram-In <i>et al.</i> 2020 ¹

¹La secuencia de aminoácidos se comparó con la cepa de referencia *K. pneumoniae* K68

²La secuencia de aminoácidos se comparó con una cepa *K. pneumoniae* sensible a fosfomicina perteneciente al mismo estudio

5.1.1. Resistencia por modificación de la diana

MurA es una enzima esencial, imprescindible en la síntesis del peptidoglucano, por lo que, la reducción de la afinidad a fosfomicina como consecuencia de variaciones en su secuencia, también puede afectar al proceso de síntesis de la pared, con la consiguiente reducción de la viabilidad y supervivencia de la bacteria (Herring y Blattner, 2004). Como se ha comentado previamente, esta circunstancia explica que la descripción de modificaciones en la secuencia de MurA asociadas a resistencia a

fosfomicina sea poco frecuente entre aislados clínicos (Castañeda-García *et al.* 2013; Takahata *et al.* 2010).

No todas las variaciones en MurA afectan de igual modo a la bacteria. Algunas modificaciones en residuos específicos podrían generar la pérdida de afinidad por fosfomicina manteniéndose la actividad del enzima y la viabilidad bacteriana. Así, en estudios realizados en *E. coli* se ha demostrado que si la sustitución se produce en la posición Cys115 del centro activo, como por ejemplo Cys115Asp, se mantiene la función biológica de MurA, aunque es incapaz de unirse a fosfomicina, expresando, por tanto, resistencia al antibiótico (Kim *et al.* 1996). Algunos autores también apuntan a que modificaciones en los residuos Lys22, Arg120 y Arg397, con los que la molécula de fosfomicina establece uniones electrostáticas estrechas tras unirse a Cys115, y que están ampliamente conservados en la estructura de la proteína en diversas especies bacterianas, podrían tener este mismo efecto (Skarzynski *et al.* 1996).

Otras modificaciones descritas en esta proteína (ver tablas 21 y 22) también podrían ser importantes en este mecanismo de resistencia, aunque su papel no está completamente esclarecido. En los ensayos de transferencia a cepas de *E. coli* sensibles a fosfomicina de los genes *murA* mutados detectados por Takahata *et al.* (2010) y Tseng *et al.* (2015) en *E. coli* y Lu *et al.* (2016) en *K. pneumoniae*, se observó un incremento de hasta 16 veces de los valores de CMI a fosfomicina. Estos resultados indicaban que las modificaciones halladas en MurA eran responsables de la resistencia al antibiótico. Sin embargo, estudios de cristalización han puesto de manifiesto que ni el ácido aspártico en posición 369 ni leucina en posición 370 de MurA intervienen en la unión a fosfomicina, y que las sustituciones de estos aminoácidos no alteran la estructura ni la función biológica de la proteína (Skarzynski *et al.* 1996), lo que parece indicar que no están asociadas a resistencia al antibiótico. Algunos autores mantienen que Leu370 es un residuo altamente conservado en diferentes especies bacterianas, lo que sugiere que debe desempeñar un papel relevante en la unión del PEP y, por tanto, de fosfomicina, al sitio activo del enzima (Takahata *et al.* 2010).

En el presente trabajo se detectaron las sustituciones Leu370Ile en 3 aislados clínicos de *E. coli* resistentes a fosfomicina y Arg212His y Val6Ile en 3 aislados sensibles de *K. pneumoniae*. La ausencia de impacto de estas sustituciones en la estructura y

función biológica de la proteína, además de su detección, en el caso de Arg212His y Val6Ile, exclusivamente en bacterias sensibles, indican que no existen datos concluyentes que nos permitan afirmar que las modificaciones detectadas en la secuencia de MurA estén directamente relacionados con resistencia a fosfomicina. Sin embargo, son necesarios más estudios, especialmente en el caso de Leu370Ile, para poder llegar a una conclusión definitiva al respecto.

Aunque se ha descrito que la sobreexpresión de MurA también es un fenómeno compatible con el incremento de la resistencia a fosfomicina, este mecanismo conlleva un alto coste biológico y no ha sido descrito entre aislados clínicos (Couce *et al.* 2012; Takahata *et al.* 2010), motivo por el cual no se consideró su estudio en el presente trabajo.

5.1.2. Resistencia por reducción de la permeabilidad

GlpT y UhpT son dos transportadores que aparecen en multitud de especies bacterianas con un elevado grado de conservación. En *E. coli* y *K. pneumoniae*, la ausencia o inactivación de cualquiera de ellos, como consecuencia de mutaciones o deleciones completas de los genes cromosómicos que los codifican o de aquellos que regulan su expresión (fundamentalmente *uhpA*, *ptsI* y *cyaA*, pero no solo estos), se han descrito como los mecanismos más determinantes de la presencia de altos niveles de resistencia a fosfomicina (Liu *et al.* 2020; Singkham-In *et al.* 2020; Takahata *et al.* 2010, Wachino *et al.* 2010). Sin embargo, al igual que ocurre con las modificaciones en MurA, estos fenómenos conllevan un alto coste en la viabilidad y supervivencia bacteriana, ya que se dificulta el acceso al citoplasma de sustratos como G3P y diferentes hexosas-fosfato, entre ellas G6P, que actúan como fuente para la obtención de carbono y energía. Especialmente cuando la afectación ocurre en ambos transportadores al mismo tiempo, las bacterias son incapaces de crecer en una amplia variedad de carbohidratos (Castañeda-García *et al.* 2013; Nilsson *et al.* 2003).

Modificaciones en el transportador GlpT

En el presente trabajo, todos los aislados clínicos de *E. coli* crecieron en presencia de G3P como única fuente de carbono, lo que indicaría que la función de

GlpT se encontraba conservada en la totalidad de ellos. Sin embargo, también en todos los aislados se detectaron sustituciones en la secuencia de aminoácidos de este transportador, algunas de ellas previamente descritas por otros autores (ver tabla 21). Las sustituciones Ala16Thr, Phe133Cys, Gly135Trp, Ala197Val, Leu373Arg y Glu448Lys se detectaron en aislados sensibles a fosfomicina, por lo que no se puede considerar que estén implicadas en modificaciones funcionales de GlpT, ni, por tanto, en la resistencia al antibiótico. Otras, aunque halladas exclusivamente en aislados resistentes (Met52Leu, Leu297Phe, Glu443Gln, Gln444Glu) fueron categorizadas como de efecto neutro, lo que indicaría la ausencia de impacto en la estructura y función biológica de la proteína, como se pudo demostrar por la capacidad de crecimiento de las bacterias en presencia de G3P, como se ha comentado. Es de destacar que las sustituciones Leu297Phe, Glu443Gln y Gln444Glu también fueron detectadas en un aislado de *E. coli* en el trabajo de Takahata *et al.* (2010), el mismo en el que se detectó la sustitución Leu370Ile en MurA, y que creció en presencia de G3P, por lo que los autores concluyeron que la resistencia a fosfomicina en este aislado era consecuencia de la modificación en MurA y no de los hallazgos en GlpT. Por último, sólo las sustituciones Gly84Asp y Pro212Leu se podrían relacionar con la alteración de la funcionalidad de GlpT según el análisis de su impacto biológico. Sin embargo, los aislados que presentaron estas sustituciones (aislados 26 y 752, respectivamente), al igual que ocurrió con el resto de los de esta especie bacteriana, tal y como se ha comentado, crecieron en presencia de G3P como única fuente de carbono, lo que indicaría que la función de GlpT no se encontraba alterada.

En 9 de los 41 aislados de *K. pneumoniae* se detectaron modificaciones en la secuencia de GlpT. La sustitución Ala294Thr se observó tanto en aislados sensibles como resistentes, por lo que no se pudo relacionar con resistencia al antibiótico. Aunque Val158Ala y Ser276Pro se hallaron exclusivamente en aislados resistentes, se descartó el impacto en la estructura y función biológica de la proteína. Solo la sustitución Asp274Gly se observó en un aislado resistente (aislado 342), considerándose que podría tener algún efecto perjudicial sobre la estructura y función de GlpT. Sin embargo, este aislado clínico creció en presencia de G3P, lo que indicaría

que se conservaba la función del transportador a pesar de la modificación de su secuencia de aminoácidos.

Todos los aislados de *K. pneumoniae* crecieron en medio M9 suplementado con G3P, a excepción de 3 de ellos, todos resistentes a fosfomicina (aislados 6, 115 y 723), lo que indicaba, en estos, la existencia de una alteración funcional de GlpT. El análisis de estos aislados demostró la presencia de proteínas GlpT truncadas, de 78 y 57 aminoácidos, en contraposición a la proteína natural, de 448 aminoácidos. En este sentido, por tanto, la utilización de pruebas de crecimiento bacteriano en presencia de G3P como única fuente de carbono fue un excelente método para detectar las disfuncionalidades de este transportador como consecuencia de la pérdida de su estructura.

La presencia de una GlpT truncada en estos tres aislados clínicos podría explicar una disminución de la entrada de fosfomicina a través de este transportador y, por tanto, la resistencia que presentaban al antibiótico. Sin embargo, la suplementación de los discos de fosfomicina con G6P, y, en general, la adición de G6P al medio en los procedimientos para el estudio de la sensibilidad a fosfomicina, como recomiendan los comités internacionales, tiene como finalidad aumentar la expresión del transportador UhpT, facilitando la entrada de fosfomicina a su través. Esto indica que la sola alteración, o incluso ausencia, de GlpT, no es suficiente para determinar resistencia al antibiótico en bacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae*, que compensan el déficit de GlpT con el incremento de expresión de UhpT al adicionar G6P al medio. Solo en *P. aeruginosa*, que expresa exclusivamente GlpT, y no UhpT, la pérdida del único transportador se puede relacionar con resistencia a fosfomicina, ya que esta bacteria no posee un mecanismo compensador para la entrada del antibiótico (Castañeda-García *et al.* 2009).

Por tanto, aunque para diversos autores la presencia de sustituciones en la secuencia de GlpT o la presencia de una proteína GlpT truncada se asocian de forma clara a resistencia a fosfomicina (Li *et al.* 2015; Lu *et al.* 2016; Takahata *et al.* 2010; Tseng *et al.* 2015), nuestros resultados no nos permitieron asegurar que las modificaciones halladas en la secuencia de GlpT de los aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* del presente trabajo fuesen, por sí solas, responsables de esta resistencia.

Modificaciones en el transportador UhpT y la proteína reguladora UhpA

En los 7 aislados clínicos de *E. coli* sensibles a fosfomicina no se observaron alteraciones en el transportador UhpT. Sin embargo, entre los 22 aislados resistentes, en 4 no se detectaron sustituciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína, en 16 se detectó la sustitución Glu350Gln, categorizada como sin efecto sobre la estructura y función biológica del transportador, y 2 aislados fueron deficientes en UhpT debido a la ausencia completa del gen (aislados 11 y 26).

En todos los aislados de *E. coli* sensibles a fosfomicina se detectó el gen *uhpA*. En 2 de estos, se observó la sustitución Arg46Cys, sin efecto sobre la estructura y función biológica de la proteína reguladora, por lo que no se pudo considerar implicada en la resistencia al antibiótico. Sin embargo, hay que destacar que, entre los aislados resistentes, el gen *uhpA* solo se detectó en el aislado 26 (uno de los 2 aislados con ausencia del gen *uhpT*), estando ausente en todos los demás.

La incapacidad de los 22 aislados clínicos de *E. coli* resistentes a fosfomicina de crecer en presencia de G6P como única fuente de carbono (hecho que no se observó entre los aislados sensibles al antibiótico), junto con los hallazgos genéticos observados, demuestran que la resistencia a fosfomicina en todos ellos estuvo en relación con defectos en la expresión del transportador UhpT, por delección de los genes *uhpT* y/o *uhpA*. De igual modo, otros trabajos han observado que la resistencia a fosfomicina en *E. coli* surge, en muchos casos, por el bloqueo de la vía de entrada del antibiótico al interior bacteriano, principalmente por modificaciones o ausencia del transportador UhpT o de las proteínas reguladoras de su expresión, fundamentalmente UhpA (Li *et al.* 2015; Lucas *et al.* 2017; Nilsson *et al.* 2003; Ohkoshi *et al.* 2017; Takahata *et al.* 2010; Tseng *et al.* 2015; Wachino *et al.* 2010). Es evidente, por tanto, que la utilización de pruebas de crecimiento bacteriano, en este caso en presencia de G6P como única fuente de carbono, es un buen método para detectar la alteración de la función de UhpT.

Frente a estos hallazgos en el transportador UhpT y su sistema regulador UhpA observados en *E. coli*, el comportamiento de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* fue completamente diferente. En esta bacteria no se hallaron modificaciones en la proteína UhpT y solo se detectaron 2 sustituciones en la secuencia de UhpA, Glu64Asp

y Thr75Ile, sin efecto en la funcionalidad del transportador, ya que todas las bacterias, sensibles y resistentes, crecieron en presencia de G6P como única fuente de carbono. Nuestros resultados en *K. pneumoniae* difieren de los obtenidos por Lu *et al.* (2016) y Singkham-In *et al.* (2020), que detectaron modificaciones de UhpT relacionadas con resistencia a fosfomicina, pero son similares a los obtenidos por Liu *et al.* (2020), que no encontraron alteraciones en la función de este transportador.

Según nuestros resultados, la alteración de la expresión del transportador UhpT es el mecanismo de resistencia más frecuente y más relevante en los aislados clínicos de *E. coli*, pero no así entre los de *K. pneumoniae*. Este hallazgo ha sido bastante común y generalizado en multitud de trabajos, indicando la importancia de este transportador en la resistencia a fosfomicina, especialmente, como se ha comentado previamente, debido al hecho de que los procedimientos para el estudio de sensibilidad bacteriana a este antibiótico recomiendan la adición de G6P para aumentar la expresión del transportador UhpT. La incapacidad de las bacterias deficientes en esta proteína para aumentar la expresión de la misma cuando se realiza un antibiograma en presencia de G6P es el factor que determina la disminución de la entrada de fosfomicina al interior de la célula y, en consecuencia, su resistencia, ya que, puesto que el medio no se suplementa con G3P, no se produce un incremento de GlpT que pueda compensar el déficit de UhpT. Es evidente que este sesgo estará siempre presente a la hora de interpretar los resultados de sensibilidad a este antibiótico, ya que la adición de G6P es obligatoria si se siguen los protocolos estandarizados de las técnicas de sensibilidad.

Por último, aunque habitualmente se ha considerado que la pérdida de expresión del gen *uhpT* sólo era consecuencia de alteraciones del gen *uhpA*, y no de otros genes reguladores (Island y Kadner, 1993), hallazgos recientes han demostrado que alteraciones en los genes *uhpB* y *uhpC* también se pueden asociar a déficit de expresión de la proteína UhpT y, en consecuencia, a resistencia a fosfomicina (Cattoir *et al.* 2020).

Modificaciones en las proteínas reguladoras PtsI y CyaA

Las modificaciones en PtsI y CyaA reducen la concentración intracelular de cAMP, lo que disminuye la expresión de los transportadores GlpT y UhpT. Las variaciones de estas proteínas no solo afectan el transporte de G3P y G6P, sino que alteran profundamente el metabolismo de los carbohidratos y disminuyen la expresión de fimbrias, reduciendo la capacidad de adhesión de las bacterias a los epitelios. Por ello, como se ha comentado en otros casos, estos cambios suponen un elevado coste biológico para la célula bacteriana, ya que no podrá colonizar los epitelios del hospedador ni establecerse en ellos, de ahí que su descripción también sea poco frecuente entre aislados clínicos (Castañeda-García *et al.* 2013; Nilsson *et al.* 2003).

En el presente trabajo, todos los aislados de *E. coli* presentaron sustituciones en la secuencia de las proteínas PtsI y CyaA. Algunas de estas modificaciones se observaron en aislados sensibles a fosfomicina (Ala306Thr y Arg367Lys en PtsI; Asn142Ser, Gly222Ser, Ala349Glu, Ser356Leu, Gly359Glu, Glu362Asp, Asp837Glu y Thr840Ala en CyaA), por lo que no se puede considerar que estén implicadas en modificaciones estructurales y funcionales de estas proteínas, ni, por tanto, en la resistencia al antibiótico. Y aunque otras sustituciones sólo se detectaron en aislados clínicos resistentes (Val25Ile en PtsI; Ser352Thr, Ala363Ser y Ala363Gly en CyaA), algunas de las cuales también se han hallado en otros trabajos previos (ver tabla 21), ninguna de estas posee un efecto perjudicial sobre la estructura y función biológica de las respectivas proteínas. Por otro lado, puesto que todos los aislados de *E. coli* crecieron en presencia de G3P, podemos afirmar que las sustituciones descritas en PtsI y CyaA no afectaron a la expresión del transportador GlpT ni se relacionaron con resistencia antibiótica.

Solo en 5 aislados de *K. pneumoniae* se detectaron sustituciones de las secuencias de las proteínas PtsI (Lys174Asn) y CyaA (Ser247Arg), pero considerando que las mismas se observaron tanto en aislados sensibles como resistentes y que no afectaron a la expresión de UhpT (puesto que todos los aislados clínicos de esta especie crecieron en presencia de G6P), no se puede afirmar que estas modificaciones contribuyeran a la resistencia a fosfomicina.

En relación a estas dos proteínas, resultados similares se han descrito en otros trabajos, en los que el papel desempeñado por modificaciones en los genes *ptsI* y *cyaA* no se han podido relacionar de forma directa con resistencia al antibiótico (Liu *et al.* 2020; Ohkoshi *et al.* 2017; Takahata *et al.* 2010).

5.1.3. Resistencia por modificación enzimática del antibiótico

Como se ha comentado previamente, la resistencia a fosfomicina por acción de enzimas modificantes del antibiótico puede ser consecuencia de dos mecanismos: la apertura del anillo epóxido que llevan a cabo las enzimas FosA, FosC2, FosB y FosX, o la fosforilación del mismo a través de las enzimas FomA, FomB y FosC. En la tabla 23 se exponen las localizaciones más frecuentes, cromosómicas o plasmídicas, que, en diferentes especies bacterianas, presentan los genes responsables de la codificación de cada una de estas enzimas.

Los genes *fosA* y *fosC2* codifican a enzimas con actividad glutatión-S-transferasa, *fosB* a una L-cisteína tiol transferasa y *fosX* una epóxido hidrolasa, que inactivan a fosfomicina a través de la adición de glutatión reducido, L-cisteína y H₂O, respectivamente, al carbono C1 del anillo oxirano del antibiótico (Beharry y Palzkill, 2005; Fillgrove *et al.* 2003; Fillgrove *et al.* 2007; Fu *et al.* 2016; Wang *et al.* 2015). Como se observa en la tabla 23, las enzimas FosA y FosC2 aparecen en bacterias Gram-negativas, frecuentemente en enterobacterias, y muy especialmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*, FosB se ha hallado exclusivamente en bacterias Gram-positivas y FosX se ha detectado en el cromosoma de *L. monocytogenes*, *C. botulinum* y *B. melitensis* (Castañeda-García *et al.* 2013; Falagas *et al.* 2016; Yang *et al.* 2019).

Las enzimas FomA (identificada en el cromosoma de *Streptomyces* spp.) y FosC (identificada en el cromosoma de *P. syringae*) catalizan la fosforilación de fosfomicina a monofosfato de fosfomicina, mientras que FomB (también observada en *Streptomyces* spp.) cataliza la fosforilación de este último producto a difosfato de fosfomicina (Castañeda-García *et al.* 2013; Karageorgopoulos *et al.* 2012; Kobayashi *et al.* 2000). No se han detectado genes cromosómicos ni plasmídicos codificantes de estas enzimas en otras bacterias, más allá de las señaladas.

Tabla 23: Genes responsables de la resistencia a fosfomicina por modificación de la molécula de antibiótico (Castañeda-García *et al.* 2013; Falagas *et al.* 2016; Yang *et al.* 2019).

Gen	Cromosómico en:	Plasmídico en:
<i>fosA (fosA1)</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>fosA2</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
<i>fosA^{KG}</i> <i>fosA3 / fosA4</i>	<i>Klebsiella georgiana</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella enterica</i>
<i>fosA^{KP}</i> <i>fosA5 / fosA6</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>fosA7</i>	<i>S. enterica</i> serovar <i>Heidelberg</i>	-
<i>fosG</i> <i>fosC2</i>	<i>Achromobacter denitrificans</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i>
<i>fosB</i>	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>fosX</i>	<i>Brucella melitensis</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Listeria monocitogenes</i>	-
<i>fomA/fomB</i>	<i>Streptomyces</i> spp.	-
<i>fosC</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	-

De todas estas enzimas, los hallazgos de FosA3, FosA5, FosA6 y FosC2 son los que se han descrito más ampliamente en numerosos trabajos. El gen *fosA3* tiene su origen en el cromosoma de *K. georgiana* (Ito *et al.* 2018) aunque su presencia se ha detectado fundamentalmente en plásmidos de enterobacterias asociado a elementos móviles como IS26, muy especialmente en *E. coli* y con mucha menor frecuencia en *K. pneumoniae*. Su distribución es mundial, sin embargo, son muy numerosos los hallazgos en aislados de origen humano o animal en países del este asiático como China, Corea del Sur, Taiwán o Japón (Ho *et al.* 2013a; Ho *et al.* 2013b; Hou *et al.* 2012; Hou *et al.* 2013; Jiang *et al.* 2015; Lee *et al.* 2012; Li *et al.* 2015; Liu *et al.* 2020; Sato *et al.* 2013, Sun *et al.* 2012; Tseng *et al.* 2015; Tseng *et al.* 2017; Wachino *et al.* 2010; Xiang *et al.* 2015; Xie *et al.* 2016; Yang *et al.* 2014; Yao *et al.* 2016), siendo infrecuente su detección en países de nuestro entorno más cercano como Francia, Portugal o Alemania (Benzerara *et al.* 2017; Mendes *et al.* 2016; Villa *et al.* 2015). Por su elevada

frecuencia se considera el gen plasmídico dominante en la expresión de resistencia a fosfomicina (Yang *et al.* 2019).

Los genes *fosA5* y *fosA6* son genes plasmídicos también detectados ampliamente en *E. coli* (Guo *et al.* 2016; Ho *et al.* 2013a; Klontz *et al.* 2017; Li *et al.* 2015; Ma *et al.* 2015), pero originados en un gen *fosA* cromosómico de *K. pneumoniae* (*fosA^{KP}*), con el que comparten más del 95% de similitud (Elliot *et al.* 2019, Ito *et al.* 2017). Se considera que estos genes se pueden movilizar a plásmidos de *E. coli* a través de elementos móviles de inserción, fundamentalmente IS10 (Yang *et al.* 2019).

El gen *fosC2*, posiblemente originado en el gen cromosómico *fosG* de *A. denitrificans*, se ha descrito sobre todo en plásmidos de *E. coli*, y también se ha relacionado con mecanismos de multirresistencia (Wachino *et al.* 2010; Wang *et al.* 2015).

Entre los aislados clínicos de *E. coli* del presente trabajo se observó actividad glutatión-S-transferasa en 2 aislados clínicos resistentes a fosfomicina. En ambos se confirmó la presencia del gen plasmídico *fosA3* mediante PCR (aislados 66 y 871) y no se detectó ninguno de los demás genes plasmídicos estudiados (*fosA4*, *fosA5*, *fosA6*, *fosC2*). En ambos aislados también se había observado bloqueo de la entrada del antibiótico al interior bacteriano como consecuencia de la delección completa del gen *uhpA*, como se ha comentado previamente, por lo que, en ellos concurren, al mismo tiempo, dos mecanismos independientes de resistencia a fosfomicina.

Hay que destacar que, de los 22 aislados clínicos de *E. coli* resistentes a fosfomicina, estos dos aislados que contenían el gen *fosA3*, junto con otro (aislado 11), expresaron un fenotipo de resistencia, al mismo tiempo, a betalactámicos (mediante la producción de una BLEE), a gentamicina, a ciprofloxacino y a trimetoprim-sulfametoxazol. Adicionalmente, los aislados 11 y 66 también fueron resistentes a nitrofurantoína.

En relación a este hallazgo, diversos trabajos han demostrado que es frecuente que el gen *fosA3* se asocie con la presencia, en el mismo plásmido, de otros determinantes de resistencia, como enzimas BLEE (frecuentemente de tipo CTX-M), carbapenemasas (sobre todo tipo KPC o NDM), metilasas (gen *rmtB*) o la expresión de mecanismos de expulsión activa de antibióticos (gen *floR*), entre otros. Como

resultado, estas bacterias suelen presentar un fenotipo de multirresistencia, afectándose la sensibilidad a fosfomicina, cefalosporinas (más frecuentemente a cefotaxima), carbapenémicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, cotrimoxazol u otros antibióticos, de forma conjunta (Chen *et al.* 2019; Falagas *et al.* 2016; Hou *et al.* 2012; Hou *et al.* 2013; Jiang *et al.* 2015; Lee *et al.* 2012; Li *et al.* 2015; Sato *et al.* 2013; Villa *et al.* 2015; Xiang *et al.* 2015; Yang *et al.* 2014). Por tanto, al igual que señalan estos trabajos, la presencia del gen *fosA3* en dos de los aislados clínicos del presente trabajo refuerza la posibilidad de la transmisión de algunos de estos otros mecanismos de resistencia a través del mismo plásmido. Son necesarios nuevos estudios para confirmar los mecanismos moleculares implicados en las co-resistencias detectadas en estos aislados clínicos, así como la posibilidad de la transferencia plasmídica conjunta.

La actividad glutatión-S-transferasa también se observó en la totalidad de aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a fosfomicina. Adicionalmente, en dos aislados sensibles (aislados 319 y 460), aunque no hubo modificación significativa (≥ 5 mm) del halo de inhibición del crecimiento, se observó que colonias que aparecían dentro de la zona de inhibición alrededor del disco de fosfomicina, desaparecían en presencia de PPF (fenómeno que no se observó entre los aislados de *E. coli*). Este hecho se ha relacionado recientemente con la presencia de enzimas FosA (Singkham-In *et al.* 2020).

El estudio genético de los aislados de *K. pneumoniae* demostró la presencia del gen cromosómico *fosA^{KP}* en todos los aislados clínicos resistentes a fosfomicina, en los dos aislados en los que se observó el fenómeno de pérdida de colonias internas en presencia de PPF e, incluso, en aislados sensibles a fosfomicina (a excepción de 4 de estos). Además, en el aislado 140, resistente al mismo tiempo, al igual que otros 14, a fosfomicina, a betalactámicos (como consecuencia de la presencia de una BLEE), a gentamicina, a ciprofloxacino, a cotrimoxazol y a nitrofurantoína, también se detectó el gen plasmídico *fosA3*, indicando la posibilidad de transmisión conjunta de algunos de estos mecanismos a través del mismo plásmido, si bien, como se ha indicado previamente, son necesarios nuevos estudios para confirmarlo.

En trabajos previos en los que se ha descrito la presencia de genes codificantes de las enzimas FosA en *K. pneumoniae*, fuesen cromosómicos (*fosA^{KP}*) o plasmídicos

(*fosA3*, *fosA4*), lo habitual era que estos hallazgos se realizaran exclusivamente entre aislados resistentes a fosfomicina (Jiang *et al.* 2015; Tseng *et al.* 2017). Sin embargo, al igual que ha ocurrido en el presente trabajo, recientemente se ha descrito la presencia del gen *fosA^{KP}* en aislados de *K. pneumoniae* sensibles a fosfomicina (Elliot *et al.* 2019; Singkham-In *et al.* 2020). Aunque aún no se ha confirmado el motivo por el que, a pesar de la presencia de genes *fosA*, algunos aislados de esta especie pueden no expresar resistencia a fosfomicina, se ha indicado que, en células bacterianas deficientes en la biosíntesis de glutatión, que es imprescindible para que se pueda producir la modificación enzimática de fosfomicina, la presencia de FosA (o FosC2), por sí sola, no sería suficiente para proporcionar resistencia intrínseca al antibiótico (Bernat *et al.* 1997; Ito *et al.* 2017). También se ha especulado con el hecho de que el gen cromosómico *fosA^{KP}* podría no expresarse suficientemente en algunas bacterias, lo que impediría el efecto modificante de la molécula de fosfomicina (Singkham-In *et al.* 2020). Aunque otros autores consideran la posibilidad de que el gen *fosA^{KP}* no juegue un papel relevante en la resistencia al antibiótico, estudios de transferencia del gen a *E. coli* a través de plásmidos demuestran un incremento considerable de la CMI de fosfomicina (Klontz *et al.* 2017). Son necesarios, por tanto, nuevos estudios para confirmar cualquiera de estas posibilidades, u otras, entre nuestros aislados clínicos.

En los aislados clínicos de *E. coli* la prueba de inhibición de la actividad glutatión-S-transferasa mediante el empleo de discos de fosfomicina suplementados con PPF demostró ser un buen método para detectar la presencia de las enzimas FosA. Puesto que en esta especie bacteriana la actividad de estas enzimas no es intrínseca, sino consecuencia de su codificación en genes plasmídicos, es fácil diferenciar su presencia mediante el empleo de esta técnica. Sin embargo, en los aislados de *K. pneumoniae*, la prueba de PPF no se relacionó directamente con la presencia del gen cromosómico *fosA^{KP}*, aunque sí con la expresión de la actividad glutatión-S-transferasa, como es su propósito. Según nuestros resultados, en todos los aislados resistentes de esta especie bacteriana y en aquellos que, aun considerados sensibles, poseían colonias en el interior de la zona de inhibición, se produjo un incremento del halo o la desaparición de las colonias internas en presencia de PPF, fenómenos que podían explicarse por la inhibición de la actividad del enzima. Sin embargo, en algunos

aislados que contenían el gen *fosA^{KP}*, no se observaron estos cambios, posiblemente porque el gen no se expresase a causa de alguno de los motivos ya comentados.

El procedimiento recomendado por los comités internacionales como CLSI y EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) para el estudio de la sensibilidad bacteriana a fosfomicina es el de dilución en agar suplementado con 25 µg/ml de G6P, que mimetiza la situación fisiológica en la que se encuentran las bacterias en el lugar de la infección, por lo que los valores de CMI se acercarían a los teóricamente reales (Díez-Aguilar y Cantón, 2019). Sin embargo, la complejidad técnica de este método hace que muchos laboratorios de microbiología clínica los sustituyan por otras técnicas de más fácil manejo, como la difusión con discos de 200 µg de fosfomicina suplementados con 50 µg de G6P, que también está recomendado por estos comités, aunque exclusivamente para *E. coli* y *E. faecalis* obtenidos de muestras urinarias. No se recomienda la utilización de estos procedimientos de difusión en aislados clínicos de bacterias diferentes a estas puesto que los resultados obtenidos no son equiparables al método de referencia (Kaase *et al.* 2014). Sin embargo, su uso también es habitual para determinar la sensibilidad en otras enterobacterias aisladas a partir de muestras del tracto urinario, como *K. pneumoniae*.

En este tipo de procedimientos en los que el antibiótico difunde en el agar, como la técnica de disco-placa o Kirby-Bauer, empleada para la categorización clínica de los aislados clínicos del presente trabajo, la presencia de colonias en el interior de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano es un fenómeno que supone un problema de difícil interpretación clínica. En *E. coli*, el mecanismo que se ha descrito como responsable de la presencia de estas colonias es la pérdida de la función del transportador UhpT en las bacterias que las forman. Esto es así puesto que, como se ha comentado previamente, la adición de G6P al medio, obligatoria si se siguen los protocolos estandarizados de las técnicas de sensibilidad que establecen los comités científicos, induce la expresión de este transportador. Por tanto, sólo cuando existen cepas mutantes con ausencia del mismo se observará la presencia de colonias internas resistentes a fosfomicina. La ausencia de GlpT, sin embargo, se ve compensada por el incremento de la expresión de UhpT, por lo que no generaría la aparición de este tipo de colonias.

Puesto que, como ya se ha señalado, la alteración de estos transportadores supone un elevado coste para la supervivencia *in vivo* de la bacteria, estos aislados se ven superados en el lugar de la infección por aquellos que son sensibles al antibiótico. Por este motivo, algunos autores proponen ignorar la presencia de estas colonias mutantes en la interpretación del antibiograma por disco-placa y categorizar a la bacteria como sensible si el tamaño del halo es lo suficientemente grande según los puntos de corte establecidos por los comités, ya que su presencia no supone un problema para el tratamiento de las ITUs con fosfomicina (Lucas *et al.* 2017). Además, la consideración como resistentes de aquellos aislados que presentasen estas colonias mutantes en las técnicas de difusión con disco sobredimensionaría la resistencia a fosfomicina respecto a la técnica de referencia, la dilución en agar, en las que este tipo de cepas mutantes no se pueden detectar (Elliot *et al.* 2019; Hirsch *et al.* 2015; Kaase *et al.* 2014). Por esos motivos, las recomendaciones actuales de EUCAST van en este sentido y sugiere ignorar la presencia de estas colonias en la interpretación de los puntos de corte a fosfomicina en *E. coli* (figura 28) con el fin de obtener resultados más reproducibles (EUCAST, 2021).

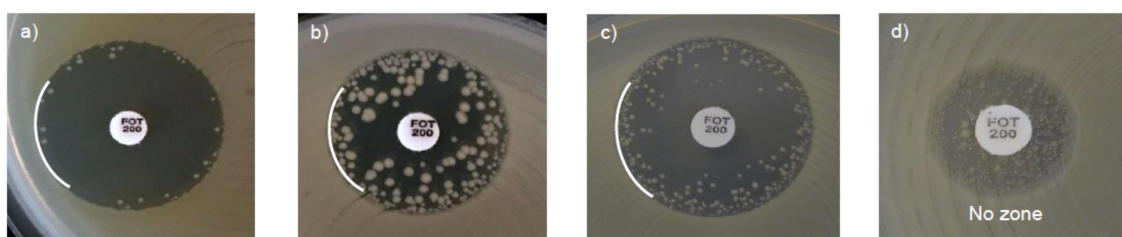


Figura 28: Ejemplos de la presencia de colonias internas alrededor del disco de fosfomicina para la correcta medición de los halos de inhibición del crecimiento en *E. coli* según EUCAST (tomado de EUCAST, 2021). A, B y C: se recomienda ignorar todas las colonias y leer el borde de la zona exterior. D: se debe considerar que no existe zona de inhibición y, por tanto, hay que categorizar al aislado como resistente.

Sin embargo, en contraposición a EUCAST, CLSI recomienda que en la interpretación de los puntos de corte a fosfomicina en *E. coli* se tengan en cuenta esas colonias dispersas dentro de la zona de inhibición del crecimiento (CLSI, 2020). Esta decisión viene determinada porque la frecuencia con la que aparecen este tipo de mutantes es relativamente baja y su categorización como aislados resistentes no

incrementaría de forma significativa las tasas de resistencia a fosfomicina en aislados clínicos de *E. coli* (Lucas *et al.* 2017; Marchese *et al.* 2003b).

Como se ha comprobado en el presente trabajo, así como en otros previos, en otras especies bacterianas, como *K. pneumoniae*, la presencia de estas colonias internas se relaciona con la presencia de genes *fosA* cromosómicos y no con alteraciones en los transportadores, motivo por el cual el uso de PPF permite su detección en esta bacteria y no en *E. coli*. Puesto que la presencia de enzimas FosA no altera la viabilidad de la bacteria y, por tanto, estas cepas sí juegan un papel importante en la infección *in vivo* del tracto urinario, se considera que no es recomendable ignorar su presencia en bacterias diferentes a *E. coli*, sino, muy al contrario, tenerlas en cuenta. En estas bacterias la adición de PPF en la técnica de difusión, que hace que las colonias mutantes desaparezcan, mejora la concordancia entre esta técnica y la de referencia, la dilución con agar (Elliot *et al.* 2019). En nuestro caso, los dos aislados de *K. pneumoniae* en los que se detectó la presencia de este tipo de colonias fueron considerados inicialmente sensibles a fosfomicina, atendiendo exclusivamente al tamaño del diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor del disco de fosfomicina. Nuestros resultados indican, sin embargo, la importancia de considerarlos resistentes debido a la presencia de actividad FosA, que puede inactivar el antibiótico. De haber aplicado este criterio desde el primer momento, estos aislados clínicos hubiesen sido categorizados como resistentes, como es recomendable hacer en función de lo expuesto anteriormente. Se puede decir que es imprudente ignorar estas colonias, ya que pueden ser el reflejo de la presencia de estos genes cromosómicos.

Por último, en relación a este conjunto de hallazgos, podemos afirmar que la contribución de las enzimas modificantes codificadas por plásmidos, especialmente *fosA3*, a la resistencia a fosfomicina en aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* de nuestro entorno es aún baja. Sin embargo, no debemos olvidar la posibilidad de que este mecanismo acabe favoreciendo la diseminación rápida de multirresistencias antibióticas entre estas y otras bacterias Gram-negativas por un fenómeno de transferencia plasmídica (Yang *et al.* 2019). Esto es especialmente importante porque diversos estudios consideran que fosfomicina es una buena alternativa en el

tratamiento, no solo de las ITUs, sino también de infecciones sistémicas por microorganismos resistentes a betalactámicos u otros antibióticos, ya que actualmente mantiene unas tasas elevadas de sensibilidad entre diferentes especies de enterobacterias (de Cueto *et al.* 2006; Pontikis *et al.* 2014; Sorlózano *et al.* 2014).

En *K. pneumoniae*, la presencia de genes cromosómicos *fosA* es el principal mecanismo relacionado con resistencia a fosfomicina en nuestro entorno. Sin embargo, además, también es posible su presencia en aislados sensibles. Esta posibilidad debe tenerse en cuenta especialmente en el caso de aislados clínicos en los que aparezcan colonias en el interior de las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano en los procedimientos de estudio de la sensibilidad a fosfomicina por técnicas de difusión en agar (disco-placa o E-test). Es evidente que la presencia de la proteína FosA en el cromosoma de *K. pneumoniae* representa un riesgo importante para el uso terapéutico de fosfomicina, porque confiere a esta bacteria sensibilidad reducida al antibiótico de forma intrínseca, además de convertirla en un reservorio para la movilización de genes plasmídicos *fosA5* y *fosA6*, lo que puede ser un fenómeno preocupante en un plazo relativamente corto de tiempo, dada la presión selectiva ejercida por el uso creciente de fosfomicina (Guo *et al.* 2016; Klontz *et al.* 2017; Ma *et al.* 2015).

5.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA A NITROFURANTOÍNA

Los escasos estudios realizados sobre la resistencia a nitrofurantoína en *E. coli* y *K. pneumoniae* establecen la existencia de tres mecanismos básicos. El más frecuente es la inhibición de la actividad nitrato-reductasa de las enzimas NfsA y NfsB, que genera una disminución de los metabolitos activos derivados del antibiótico. En segundo lugar, la modificación del gen que codifica la lumazina sintetasa, *ribE* en *E. coli* y su equivalente *ribH* en *K. pneumoniae*. Y, por último, la presencia de los genes *oqxA/oqxB* que codifican la expresión de una bomba de eflujo con actividad sobre distintos antibióticos. En las tablas 24 y 25 se resumen algunos de los hallazgos al respecto en varios de los trabajos más significativos realizados en aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente.

Tabla 24: Hallazgos relacionados con resistencia a nitrofurantoína en estudios realizados sobre aislados de *E. coli*.

NfsA		NfsB		RibE	oqxAB	Referencia
His11Leu* Arg15Cys Gln67Pro* Ile89Asn Varias deleciones e inserciones		Leu33Pro Leu34Arg Ser37Arg Ser39Cys Ser40Cys Gln44Pro* Pro45Gln Val83Asp	Asp105Tyr Gly148Ser Tyr183Asp Val187Glu Arg207His* Varias deleciones e inserciones			Whiteway <i>et al.</i> 1998
Arg15Cys Ser33Arg* Trp77Stop Tyr128Stop Gly131Asp Gln147Stop Tyr181Stop Gln182Stop	Gln195Stop Arg203Cys* Arg203Leu* Trp212Stop Varias deleciones e inserciones	Lys9Stop Gln44Leu* Val93Gly Trp94Stop Gln101Stop Arg107His* Trp138Cys	Glu165Ala Gly166Asp Tyr183Stop Gly192Asp* Gly192Ala* Varias deleciones e inserciones			Sandegren <i>et al.</i> 2008
Arg15Leu Arg15Cys Glu20Stop Gln72Lys Gln100Stop Ile117Thr*	Ala138Gly Gln147Stop Leu157Phe Gly187Asp* Varias deleciones e inserciones	Lys57Stop Gly66Asp* Met75Ile* Arg121Cys Trp138Stop Varias deleciones e inserciones		12-bp deleción		Vervoort <i>et al.</i> 2014
Gln44Stop Arg133Ser Lys141Stop Arg203Cys* His233Stop Varias deleciones e inserciones			Glu137Stop IS5-inserción			Ho <i>et al.</i> 2015
Arg15Cys Glu20Lys Gly24Asp Arg27Cys Ala36Val Gln72Stop Gln94Stop Ile117Thr* Lys141Glu*	Cys156Tyr Leu157Phe Gly158Cys Trp159Stop Gly187Asp* Gln195Stop Glu198Gln Thr211Stop Trp212Stop		Gln26Stop Met75Ile* Val93Ala* Lys122Arg*		Detectado	Zhang <i>et al.</i> 2018
His11Tyr* Ser33Asn* Ser38Tyr Glu58Asp* Gln72Lys Ile117Thr* Lys141Glu* Gln147Arg*	Ala172Ser Gly187Asp* Ala188Val Ala188Glu Trp212Arg 1-bp deleción 10-bp deleción	Pro45Ser Gly66Asp* Phe84Ser* Val93Ala* Trp94Stop Lys130Arg Ile171Phe Ala174Glu Glu197Stop Gln210His Ausencia del gen		Gly85Cys		Mottaghizadeh <i>et al.</i> 2020

*Residuos en los que también se detectaron sustituciones en el presente trabajo

Tabla 25: Hallazgos relacionados con resistencia a nitrofurantoína en estudios realizados sobre aislados de *K. pneumoniae*.

NfsA		NfsB	Referencia
Ala20Val	Gln147Lys		Wand <i>et al.</i> 2019
Glu29Ala*	Asp162Val*		
Ala55Thr*	Arg180His		
Arg59Gln	Ala190Gly*	Met1Arg	
Gln68Arg	Glu191Asp	Ala24Gly	
Val78Ala	Glu194Asp	Gly25Ser	
Gln94Glu	Gln195Lys*	Gln181Lys	
Ala112Val*	Gln195Leu*	Pro190Arg*	
Thr117Ile	Arg203Cys	Ala196Val	
Leu132Val	Asn222Lys	No detectado	
Glu144Ala	Inserción de un nucleótido y terminación prematura de la proteína		

*Residuos en los que también se detectaron sustituciones en el presente trabajo

Al igual que se ha descrito para fosfomicina, la pérdida de la actividad nitrato-reductasa de NfsA y NfsB, así como determinadas deleciones que afectan a la secuencia de aminoácidos del centro activo de *ribE/ribH*, se han relacionado con una reducción de la viabilidad y supervivencia de las bacterias *in vivo*, lo que explica la escasa frecuencia con la que se detectan este tipo de aislados clínicos (Sandegren *et al.* 2008; Vervoort *et al.* 2014). Algunos de estos trabajos sugieren que la reducción en la tasa de crecimiento bacteriano causada por estas alteraciones podría impedir que se estableciese una infección por mutantes resistentes a nitrofurantoína, por lo que el uso clínico de este antibiótico a dosis terapéuticas estaría recomendado aún incluso cuando en el estudio microbiológico de una ITU se observasen este tipo de bacterias (Sandegren *et al.* 2008).

En el presente trabajo se detectaron diversas sustituciones en la secuencia de aminoácidos de NfsA y/o NfsB en todos los aislados clínicos de *E. coli*. Algunas de ellas también se han descrito en otros trabajos previos (ver tabla 24). Varias de estas modificaciones se hallaron en aislados sensibles a nitrofurantoína (Glu58Asp, Ile117Thr, Lys141Glu, Gln147Arg y Gly187Asp en NfsA; Gly66Asp, Val93Ala y Ala174Glu en NfsB), lo que, junto al hecho de que todas fueron categorizadas como de efecto neutro, y, por tanto, sin impacto en la estructura y función biológica de la proteína, indicaría que ninguna de ellas estuvo implicada en la resistencia al antibiótico. Otros autores han expuesto resultados similares a los nuestros en relación con estas mismas

sustituciones (Mottaghizadeh *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2018), aunque algunas han sido asociadas a resistencia en otros trabajos (Vervoort *et al.* 2014).

Otras modificaciones se detectaron exclusivamente en aislados con sensibilidad reducida a nitrofurantoína (categoría clínica R o I). En la proteína NfsA se hallaron las sustituciones His11Tyr, Asp19Asn, Ser33Arg, Gln67Leu, Cys80Arg, Gly126Arg, Gly154Glu, Ser180Asn, Arg203Cys, así como la presencia de proteínas truncadas de 66 y 146 aminoácidos, en contraposición a la proteína natural, de 240 aminoácidos. En NfsB se detectaron las sustituciones Leu22Ile, Gln44His, Met75Ile, Phe84Ser, Arg107Cys, Lys122Arg, Gly192Ser, Arg207His, y también una proteína truncada de 53 aminoácidos en lugar de una proteína completa con 217 aminoácidos. En RibE solo se observaron las sustituciones Val51Ile y Pro55His. Algunas de estas sustituciones también han sido previamente descritas por otros autores y se han relacionado con resistencia a nitrofurantoína (residuos His11, Ser33, Gln67, Gln147 y Arg203 en NfsA; Gln44, Met75, Phe84, Arg107, Lys122, Gly192 y Arg207 en NfsB) (Mottaghizadeh *et al.* 2020; Sandegren *et al.* 2008; Vervoort *et al.* 2014; Whiteway *et al.* 1998). Sin embargo, nuestros hallazgos indicarían que solo His11Tyr, Ser33Arg, Gln67Leu, Cys80Arg, Gly126Arg, Gly154Glu y Arg203Cys en NfsA; Gln44His, Phe84Ser, Arg107Cys, Gly192Ser y Arg207His en NfsB y Pro55His en RibE, todas ellas con impacto en la estructura y función biológica de las proteínas, así como la presencia de proteínas NfsA y NfsB truncadas, podrían explicar la resistencia al antibiótico en los aislados clínicos afectados, por la incapacidad que tendrían estas enzimas alteradas estructuralmente de metabolizar el antibiótico.

Algunas publicaciones corroboran parte de estos hallazgos expuestos. Se ha demostrado, por ejemplo, que los residuos His11 y Gln67 de NfsA están ampliamente conservados en otras enzimas con actividad oxido-reductasa que usan FMN como cofactor. Es el caso de las enzimas NADH oxido-reductasas de *Vibrio harveyi* (Frp) y de *Thermus thermophilus* (Nox), lo que indicaría que, al menos estos dos aminoácidos, deben jugar un papel importante en la actividad de esta enzima. De igual modo, la secuencia de 14 aminoácidos que va de Ser37 a Val50 en NfsB, así como Arg207, también están muy conservados en oxido-reductasas de bacterias como *E. coli*, *S. enterica* serotipo Typhimurium, *E. cloacae*, *Vibrio fischeri*, *Helicobacter pylori*, *B.*

subtilis y *T. thermophilus* (Whiteway *et al.* 1998). La región que ocupan los residuos 131 a 134 de RibE también se encuentra altamente conservada en diversas bacterias como *B. subtilis*, *P. leiognathi* y *H. influenzae* (Vervoort *et al.* 2014), aunque, en este caso, no se ha detectado ninguna alteración en esta zona entre los aislados de *E. coli* del presente trabajo.

Por tanto, en 12 de los 15 aislados clínicos de *E. coli* resistentes a nitrofurantoína se encontraron modificaciones en NfsA, NfsB y RibE que podrían explicar la resistencia detectada. En 5 de estos 12 aislados se observó alguna de las modificaciones en NfsA que se han considerado compatibles con resistencia (aislados 751, 757, 795, 797 y 802). En otros 3 se detectaron sustituciones en NfsB posiblemente asociadas a resistencia (aislados 66, 302 y 883). En 3 aislados más aparecieron modificaciones en NfsA y NfsB a la vez (aislados 11, 462 y 872). Y, finalmente, en un solo aislado se observaron modificaciones en NfsA, NfsB y RibE al mismo tiempo (aislado 334). Sin embargo, hubo tres aislados resistentes a nitrofurantoína (aislados 799, 854 y 892) en los que las sustituciones detectadas no se pudieron relacionar con la reducción de sensibilidad al antibiótico, pues también aparecieron en aislados sensibles y/o se categorizaron como de efecto neutro.

En el caso de *K. pneumoniae*, de los 10 aislados clínicos sensibles a nitrofurantoína, solo en 1 (aislado 654) se detectó una sustitución en NfsA (Ala55Thr), sin efecto sobre la estructura y función de la proteína, por lo que no se pudo relacionar con resistencia al antibiótico. No se encontró ninguna otra modificación en NfsA, NfsB o RibH en los otros 9 aislados sensibles. Entre los 31 aislados con sensibilidad reducida a nitrofurantoína, en 11 no se detectó ninguna modificación en ninguna de estas tres proteínas. Entre los otros 20 aislados resistentes, 14 solo presentaron sustituciones en NfsA, 3 sólo en NfsB y otros 3 en ambas proteínas al mismo tiempo. Por tanto, a excepción de la sustitución Ala55Thr en NfsA, todas las demás variaciones de la secuencia de esta proteína se observaron en aislados resistentes, si bien, la mayoría no se pudieron asociar a resistencia, puesto que su efecto fue categorizado como neutro sobre la estructura y función de la proteína (Glu29Ala, Asp162Val, Ala190Gly, Gln195Leu y Gly204Ser en NfsA; Ile49Leu en NfsB). Por tanto, solo las sustituciones Ala112Val y Gly125Trp en NfsA y Ser37Asn, His47Asp y Pro190Arg en NfsB fueron

categorizadas como de efecto perjudicial y con repercusiones en la expresión fenotípica de la resistencia al antibiótico. Estos datos indicaron que solo en 12 de los 31 aislados clínicos resistentes al antibiótico habría una sustitución en NfsA o NfsB compatible con resistencia a nitrofurantoína (aislados 118, 140, 261, 360, 534 y 738 con una NfsA alterada; aislados 19, 28, 81, 430, 557 y 674 con una modificación de NfsB). Es importante señalar que, entre estos aislados, no se observaron variaciones, al mismo tiempo, en ambas proteínas. Además, en ningún aislado de *K. pneumoniae*, ni sensible ni resistente, se hallaron alteraciones de la secuencia de *ribH*.

Los trabajos que han analizado, en estas dos especies bacterianas, el mecanismo de resistencia a nitrofurantoína por alteración de las nitrato-reductasas tipo I coinciden en que se trata de un proceso secuencial, en dos pasos. En primer lugar es necesaria la inactivación de NfsA, seguida posteriormente de la inactivación de NfsB (Sandegren *et al.* 2008; Whiteway *et al.* 1998). Cada proceso que disminuya la actividad nitrato-reductasa en el interior de la bacteria incrementa la resistencia a nitrofurantoína. Sin embargo, mientras que la sola inactivación de NfsA se asocia a una disminución de la sensibilidad, la inactivación de NfsB en presencia de una NfsA no modificada (wild type) no altera la sensibilidad al antibiótico. Esto se debe a que la mayor parte de la actividad nitrato-reductasa aeróbica es atribuible a NfsA, por lo que la simple pérdida de la actividad NfsB es insuficiente para reducir esta actividad (Whiteway *et al.* 1998).

Nuestros resultados difieren, en cierta medida, de las conclusiones expuestas por estos autores, ya que, como se ha indicado previamente, en 3 aislados de *E. coli* (aislados 66, 302 y 883) y 6 de *K. pneumoniae* (aislados 19, 28, 81, 430, 557 y 674) con sensibilidad reducida a nitrofurantoína, se observaron sustituciones en las secuencias de NfsB que no se acompañaron de variaciones significativas en la función biológica de NfsA. Según nuestros hallazgos, sería posible que, determinadas modificaciones en NfsB, sin necesidad de alteraciones previas en NfsA, fuesen responsables de la alteración funcional de esta nitrato-reductasa bacteriana, pudiendo afectar al metabolismo del antibiótico. Son necesarios nuevos estudios para confirmar o descartar los mecanismos moleculares implicados en la resistencia por modificación exclusiva de NfsB detectada en estos 9 aislados clínicos, ya que un hallazgo como este

no ha sido descrito previamente en ningún otro trabajo. Vervoort *et al.* (2014) documentaron una situación similar, pero la afectación de la actividad de NfsB fue consecuencia de la presencia de una proteína truncada en el aminoácido 142, lo que explicaría claramente la pérdida de la funcionalidad es esta nitrato-reductasa.

El papel que desempeña la lumazina sintetasa (RibE/RibH) en este proceso es discutible. Entre todos los aislados clínicos de ambas especies del presente trabajo, solo la sustitución Pro55His en RibE, detectada en un aislado de *E. coli* (aislado 334), podría asociarse, *a priori*, con sensibilidad reducida a nitrofurantoína. Al igual que ocurrió en el trabajo de Mottaghizadeh *et al.* (2020), este aislado fue el único que, además, también tenía sustituciones relacionadas con resistencia tanto en NfsA como en NfsB, lo que podría explicar la pérdida de sensibilidad al antibiótico independientemente del hallazgo en RibE. Hasta la fecha, solo determinadas deleciones en la secuencia de esta proteína se han asociado con resistencia y en la mayoría de los aislados clínicos estudiados en otros trabajos no se observan modificaciones en la misma, por lo que se cuestiona actualmente su relevancia (Mottaghizadeh *et al.* 2020; Vervoort *et al.* 2014; Xu *et al.* 2019).

Por último, como ya se ha señalado en relación a los mecanismos de resistencia por modificaciones de las nitrato-reductasas tipo I y/o de la lumazina sintetasa, en 22 de los 46 aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* que expresaron sensibilidad reducida a nitrofurantoína, no se detectó ninguna modificación en la secuencia de NfsA, NfsB o RibE (RibH) compatible con dicho fenotipo.

La presencia de la bomba de expulsión activa OqxAB, que confiere sensibilidad reducida a quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, cotrimoxazol y diversos desinfectantes, también potencia la resistencia a nitrofurantoína. Los genes *oqxA* y *oqxB* que la codifican se han detectado principalmente en el plásmido pOLA52 de *E. coli* y *S. enterica*, en el que aparecen flanqueados por los elementos de inserción IS26 (Sorensen *et al.* 2003), pero también en el cromosoma de otras enterobacterias como *K. pneumoniae* (Li *et al.* 2019) (figura 29). De hecho, se propone que *K. pneumoniae* es un reservorio para *oqxAB* y que el plásmido pOLA52 puede haber surgido como consecuencia de la captura de los genes desde el cromosoma de esta bacteria a través de IS26 (Guillard *et al.* 2015). La presencia de estos genes, tanto en aislados de origen

humano como animal, se ha observado fundamentalmente en China (Chen *et al.* 2012; Ho *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2018). Aunque menos habitual, su presencia en Europa y España también se ha descrito (Campos *et al.* 2016; Dotto *et al.* 2014; Rodríguez-Martínez *et al.* 2013). Sin embargo, se considera que posiblemente el papel de esta bomba de expulsión activa en la resistencia a nitrofurantoína podría ser secundario, ya que su sola presencia en la bacteria no se ha podido relacionar con niveles de resistencia a este antibiótico, sino que son necesarias modificaciones previas de las nitrato-reductasas (Ho *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2018).

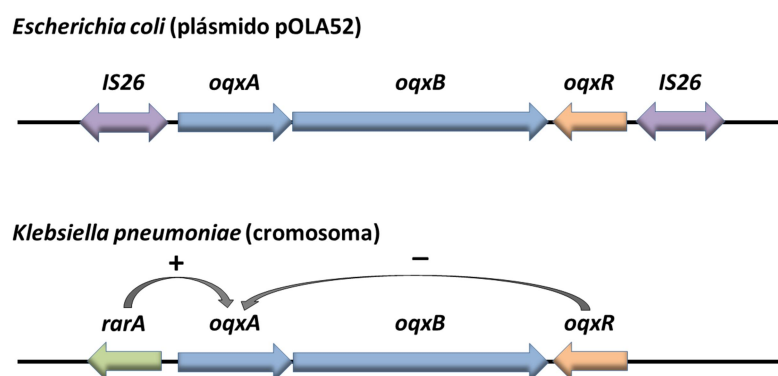


Figura 29: Organización genómica del plásmido de pOLA52 y el transposón IS26 en *Escherichia coli* y del locus *rarA-oqxABR* en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae* (tomado de Li *et al.* 2019).

En el presente trabajo, los genes *oqxAB* estuvieron ausentes en todos los aislados clínicos de *E. coli*, de forma similar a hallazgos obtenidos en otras publicaciones (Guillard *et al.* 2015; Mottaghizadeh *et al.* 2020). Por tanto, en aquellos 3 aislados en los que la resistencia observada a nitrofurantoína no pudo ser explicada por alteraciones en NfsA, NfsB o RibE, tampoco se pudo afirmar que estuviese producida por la presencia de la bomba de expulsión activa OqxAB. En cualquier caso, en esta bacteria, algunos estudios coinciden en que la mera expresión de OqxAB no es suficiente para causar una resistencia de alto nivel a nitrofurantoína, sino que sería necesaria una modificación concomitante de las nitrato-reductasas (Ho *et al.* 2015).

En contraposición a los datos obtenidos en *E. coli*, en *K. pneumoniae* los genes *oqxAB* se detectaron en casi la totalidad de los aislados (40 de 41). Sin embargo, este hallazgo fue independiente de la sensibilidad a nitrofurantoína, e incluso de la mostrada a ciprofloxacino y/o cotrimoxazol. Diversos trabajos han establecido que, en

K. pneumoniae, la aparición de resistencia al antibiótico se asocia a la sobreexpresión de la bomba de eflujo, dependiente, a su vez, entre otros, de los genes cromosómicos *rarA* y *oqxR*, que regulan la transcripción de *oqxAB* (figura 29). La delección de *rarA* se traduce en una disminución de la transcripción de *oqxAB* y un incremento de la sensibilidad bacteriana al antibiótico, mientras que, al contrario, la sobreexpresión de *rarA* incrementa la transcripción de *oqxAB*, contribuyendo al fenotipo resistente. Mutaciones en la secuencia de *oqxR* se han asociado a un aumento de la expresión de *rarA* y *oqxAB* (Bialek-Davenet *et al.* 2015). Además, es posible que otros sistemas reguladores de la transcripción génica, como *soxRS*, *marRA* y especialmente *ramRA*, que se considera como el regulador transcripcional asociado a sensibilidad a los antibióticos más eficaz en *K. pneumoniae*, también jueguen un papel importante en la expresión de OqxAB. En conjunto, la bomba OqxAB está sujeta a la regulación tanto de RarA como de RamA (activadores transcripcionales) y de OqxR (represor transcripcional) (Li *et al.* 2019). Incluso se sospecha que otros sistemas de expulsión activa ampliamente distribuidos entre enterobacterias y sobre los que todos estos genes ejercen capacidad de regulación, como AcrAB, también medien la resistencia a nitrofurantoína, incluso en aislados sin alteraciones en NfsA, NfsB ni RibE (Xu *et al.* 2019). Todavía es necesario un número más amplio de trabajos que esclarezcan el papel que desempeñan todos estos mecanismos reguladores de la transcripción génica en la resistencia a nitrofurantoína mediada por sistemas de expulsión activa de los antibióticos.

En definitiva, de los resultados obtenidos en el presente trabajo, cabe destacar que las alteraciones de las nitrato-reductasas tipo I, de la lumazina sintetasa o la presencia de los genes *oqxAB*, no fueron suficientes para explicar todas las situaciones de resistencia a nitrofurantoína en los aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* del presente trabajo, como tampoco lo fueron en otros estudios previos. Existe consenso en considerar que deben existir otros determinantes, aún no aclarados, que estén implicados en la resistencia a nitrofurantoína. Podrían ser genes indirectamente relacionadas con la biosíntesis de FMN como *araB*, que codifica una ribuloquinasa, o *rbsR*, un gen represor del transporte de ribosa, o *soxRS* y *marRA*, genes reguladores que intervienen en la respuesta coordinada de NfsA, NfsB y otras enzimas al estrés

oxidativo. De igual modo, la presencia de otras nitrato-reductasas diferentes a NfsA y NfsB, que actúen en su ausencia, o la presencia de algún otro elemento que interaccione y module la actividad de estas nitrato-reductasas, o incluso algún mecanismo que module el transporte de la molécula de nitrofurantoína a través de OqxAB, como las alteraciones en el sistema *ramRA* regulador de la expresión de las bombas de eflujo en enterobacterias como *K. pneumoniae*, son otros mecanismos que están aún por explorar (Sandegren *et al.* 2008; Vervoort *et al.* 2014; Wand *et al.* 2019; Xu *et al.* 2019). Algunos estudios apuntan claramente a que la resistencia a nitrofurantoína es un proceso multifactorial, en el que las alteraciones de las nitrato-reductasas seguramente sean el principal, pero no único mecanismo implicado, ya que, al igual que en el presente trabajo, han encontrado aislados resistentes sin alteraciones en ninguno de estos procesos, lo que indica la necesidad de seguir buscando nuevos mecanismos que expliquen la resistencia a nitrofurantoína en estas bacterias (Ho *et al.* 2015; Wand *et al.* 2019).

6. CONCLUSIONES



1. En nuestro entorno, la resistencia a fosfomicina en aislados clínicos de *E. coli* se relacionó, fundamentalmente, con la alteración de la permeabilidad bacteriana al antibiótico debido a la ausencia de expresión del transportador UhpT como consecuencia de la delección completa del gen *uhpT* y/o del gen regulador *uhpA*.
2. La resistencia a fosfomicina en los aislados clínicos de *K. pneumoniae* se relacionó con el gen cromosómico *fosA^{KP}*, responsable de la expresión de una enzima con actividad glutatión-S-transferasa que modifica e inactiva la molécula del antibiótico.
3. Tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*, el gen plasmídico *fosA3* contribuyó, junto con los hallazgos anteriores, a la resistencia a fosfomicina por la inactivación del antibiótico a través de la actividad glutatión-S-transferasa. Aunque se trata de una situación poco frecuente, tiene una gran importancia epidemiológica por la posibilidad de diseminación de esta resistencia, así como de otras localizadas en el mismo plásmido, lo que facilitaría el incremento de la presencia de aislados multirresistentes en un futuro próximo.
4. En nuestro ámbito clínico, la aparición de colonias resistentes a fosfomicina dentro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano, que se puede observar, en ocasiones, cuando se estudia la sensibilidad a enterobacterias por la técnica de difusión por disco, puede ser consecuencia de alteraciones en UhpT o de la presencia de genes *fosA*. Debido a la diferente repercusión que sobre la viabilidad bacteriana tiene cada uno de estos mecanismos de resistencia, en la práctica clínica sería conveniente utilizar técnicas que permitan diferenciarlos antes de clasificar a una bacteria como sensible o resistente a fosfomicina en función de los criterios establecidos por los diferentes comités científicos.
5. Aunque la resistencia a nitrofurantoína pudo ser explicada, al menos en una parte de los aislados clínicos, por la presencia de modificaciones concretas en las proteínas NfsA y/o NfsB, las alteraciones de estas nitrato-reductasas, de la lumazina sintetasa o la presencia de los genes *oqxAB*, no fueron suficientes para explicar todas las situaciones de resistencia a nitrofurantoína. Aún son necesarias nuevas investigaciones, que incluyan la detección de otros genes, para esclarecer con exactitud los mecanismos que expliquen la resistencia a nitrofurantoína, tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*.

6. La presencia de los genes *oqxAB* no representa actualmente un mecanismo de resistencia relevante entre los aislados de *E. coli* en nuestro medio. Sin embargo, debido a su naturaleza plasmídica, su vigilancia epidemiológica tiene una gran importancia ante la posibilidad de diseminación en aislados clínicos de esta bacteria.

7. BIBLIOGRAFÍA



- Abbott IJ**, Meletiadis J, Belghanch I, Wijma RA, Kanioura L, Roberts JA, Peleg AY, Mouton JW. (2018). Fosfomicin efficacy and emergence of resistance among *Enterobacteriaceae* in an in vitro dynamic bladder infection model. *J Antimicrob Chemother.* 73(3):709-719.
- Alhalaweh A**, George S, Basavoju S, Childs SL, Rizvi SAA, Velaga SP. (2012). Pharmaceutical cocrystals of nitrofurantoin: screening, characterization and crystal structure analysis. *CrystEngComm.* 14(15):5078-5088.
- Amábile-Cuevas CF, Arredondo-García JL.** (2011). Antimicrobial activity data in support of nitrofurantoin three times per day. *J Antimicrob Chemother.* 66(7):1652-1653.
- Anderson GG**, Kenney TF, Macleod DL, Henig NR, O'Toole GA. (2013). Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cultured airway cells by a fosfomicin/tobramycin antibiotic combination. *Pathog Dis.* 67(1):39-45.
- Araj GF, Jaber FA.** (2012). In vitro activity of fosfomicin and other antimicrobials against uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a tertiary care center in Lebanon. *J Med Liban.* 60(3):142-147.
- Armstrong RN.** (2000). Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry.* 39(45):13625-13632.
- Bayrak O**, Cimentepe E, Inegöl I, Atmaca AF, Duvan CI, Koç A, Turhan NO. (2007). Is single-dose fosfomicin trometamol a good alternative for asymptomatic bacteriuria in the second trimester of pregnancy? *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 18(5):525-529.
- Beharry Z, Palzkill T.** (2005). Functional analysis of active site residues of the fosfomicin resistance enzyme FosA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 280(18):17786-17791.
- Benzerara Y**, Gallah S, Hommeril B, Genel N, Decré D, Rottman M, Arlet G. (2017). Emergence of plasmid-mediated fosfomicin-resistance genes among *Escherichia coli* isolates, France. *Emerg Infect Dis.* 23(9):1564-1567.
- Bernat BA**, Laughlin LT, Armstrong RN. (1997). Fosfomicin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochemistry.* 36(11):3050-3055.
- Bialek-Davenet S**, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S, Leflon-Guibout V, Nicolas-Chanoine MH. (2015). Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 70(1):81-88.
- Biondo CM**, Rocha JL, Tuon FF. (2011). Fosfomicin in vitro resistance of *Escherichia coli* from the community. *Braz J Infect Dis.* 15(1):96.

- Bush K.** (2013). Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann N Y Acad Sci.* 1277:84-90.
- Butcher BG, Helmann JD.** (2006). Identification of *Bacillus subtilis* sigma-dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by Bacilli. *Mol Microbiol.* 60(3):765-782.
- Cai Y, Fan Y, Wang R, An MM, Liang BB.** (2009). Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomicin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and biofilm infections in a rat model. *J Antimicrob Chemother.* 64(3):563-566.
- Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA.** (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell.* 104(6):901-912.
- Campos J, Mourão J, Marçal S, Machado J, Novais C, Peixe L, Antunes P.** (2016). Clinical *Salmonella* Typhimurium ST34 with metal tolerance genes and an IncHI2 plasmid carrying *oqxAB-aac(6')-Ib-cr* from Europe. *J Antimicrob Chemother.* 71(3):843-845.
- Cao M, Bernat BA, Wang Z, Armstrong RN, Helmann JD.** (2001). FosB, a cysteine-dependent fosfomicin resistance protein under the control of sigma(W), an extracytoplasmic-function sigma factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 183(7):2380-2383.
- Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A.** (2013). Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomicin resistance. *Antibiotics (Basel).* 2(2):217-236.
- Castañeda-García A, Rodríguez-Rojas A, Guelfo JR, Blázquez J.** (2009). The glycerol-3-phosphate permease GlpT is the only fosfomicin transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 191(22):6968-6974.
- Cattoir V, Pourbaix A, Magnan M, Chau F, de Lastours V, Felden B, Fantin B, Guérin F.** (2020). Novel chromosomal mutations responsible for fosfomicin resistance in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 11:575031.
- Chen J, Wang D, Ding Y, Zhang L, Li X.** (2019). Molecular epidemiology of plasmid-mediated fosfomicin resistance gene determinants in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Microb Drug Resist.* 25(2):251-257.
- Chen X, Zhang W, Pan W, Yin J, Pan Z, Gao S, Jiao X.** (2012). Prevalence of *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(6):3423-3427.
- Chico-Calero I, Suarez M, Gonzalez-Zorn B, Scotti M, Slaghuis J, Goebel W, Vazquez-Boland JA, European Listeria Genome Consortium.** (2002). Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(1):431-436.

- Choi Y, Chan AP.** (2015). PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*. 31(16):2745-2747.
- CLSI.** (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100, 27^a ed., Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, Estados Unidos.
- CLSI.** (2020). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100, 30^a ed., Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, Estados Unidos.
- Corvec S, Furustrand T, Tafin U, Betrisey B, Borens O, Trampuz A.** (2013). Activities of fosfomicin, tigecycline, colistin, and gentamicin against extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 57(3):1421-1427.
- Couce A, Briales A, Rodriguez-Rojas A, Costas C, Pascual A, Blázquez J.** (2012). Genomewide overexpression screen for fosfomicin resistance in *Escherichia coli*: MurA confers clinical resistance at low fitness cost. *Antimicrob Agents Chemother*. 56(5):2767-2769.
- Crider KS, Cleves MA, Reefhuis J, Berry RJ, Hobbs CA, Hu DJ.** (2009). Antibacterial medication use during pregnancy and risk of birth defects: National Birth Defects Prevention Study. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 163(11):978-985.
- Cunha BA, Schoch P, Hage JE.** (2012). Oral therapy of catheter-associated bacteriuria (CAB) in the era of antibiotic resistance: nitrofurantoin revisited. *J Chemother*. 24(2):122-124.
- Cunha BA.** (2006). New uses for older antibiotics: nitrofurantoin, amikacin, colistin, polymyxin B, doxycycline, and minocycline revisited. *Med Clin North Am*. 90(6):1089-1107.
- Czeizel AE, Rockenbauer M, Sørensen HT, Olsen J.** (2001). Nitrofurantoin and congenital abnormalities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 95(1):119-126.
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD.** (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 477(7365):457-461.
- De Backer D, Christiaens T, Heytens S, De Sutter A, Stobberingh EE, Verschraegen G.** (2008). Evolution of bacterial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in uncomplicated urinary tract infections in a country with high antibiotic consumption: a comparison of two surveys with a 10 year interval. *J Antimicrob Chemother*. 62(2):364-368.
- de Cueto M, López L, Hernández JR, Morillo C, Pascual A.** (2006). In vitro activity of fosfomicin against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*

and *Klebsiella pneumoniae*: comparison of susceptibility testing procedures. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(1):368-370.

Dean CR, Visalli MA, Projan SJ, Sum PE, Bradford PA. (2003). Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(3):972-978.

Delzell JE Jr, Lefevre ML. (2000). Urinary tract infections during pregnancy. *Am Fam Physician.* 61(3):713-721.

Demir T, Buyukguclu T. (2013). Evaluation of the in vitro activity of fosfomicin tromethamine against Gram-negative bacterial strains recovered from community- and hospital-acquired urinary tract infections in Turkey. *Int J Infect Dis.* 17(11):966-970.

Depardieu F, Courvalin P, Kolb A. (2005). Binding sites of VanRB and sigma70 RNA polymerase in the *vanB* vancomycin resistance operon of *Enterococcus faecium* BM4524. *Mol Microbiol.* 57(2):550-564.

Díez-Aguilar M, Cantón R. (2019). New microbiological aspects of fosfomicin. *Rev Esp Quimioter.* 32(Suppl 1):8-18.

Dotto G, Giacomelli M, Grilli G, Ferrazzi V, Carattoli A, Fortini D, Piccirillo A. (2014). High prevalence of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from domestic and wild lagomorphs in Italy. *Microb Drug Resist.* 20(2):118-123.

Drlica K, Malik M. (2003). Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr Top Med Chem.* 3(3):249-282.

Durão P, Balbontín R, Gordo I. (2018). Evolutionary mechanisms shaping the maintenance of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* 26(8):677-691.

Elliott ZS, Barry KE, Cox HL, Stoesser N, Carroll J, Vegesana K, Kotay S, Sheppard AE, Wailan A, Crook DW, Parikh H, Mathers AJ. (2019). The role of *fosA* in challenges with fosfomicin susceptibility testing of multispecies *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 57(10):e00634-19.

Endimiani A, Patel G, Hujer KM, Swaminathan M, Perez F, Rice LB, Jacobs MR, Bonomo RA. (2010). In vitro activity of fosfomicin against *blaKPC*-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(1):526-529.

Eschenburg S, Priestman M, Schonbrunn E. (2005). Evidence that the fosfomicin target Cys115 in UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) is essential for product release. *J Biol Chem.* 280:3757-3763.

EUCAST. (2021). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, versión 11.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disponible en: <https://www.eucast.org/> (Última consulta: 21 de enero de 2021).

- Fadda G**, Nicoletti G, Schito GC, Tempera G. (2005). Antimicrobial susceptibility patterns of contemporary pathogens from uncomplicated urinary tract infections isolated in a multicenter Italian survey: possible impact on guidelines. *J Chemother.* 17(3):251-257.
- Falagas ME**, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. (2008). Fosfomycin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clin Infect Dis.* 46(7):1069-1077.
- Falagas ME**, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. (2010a). Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum beta-lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 10(1):43-50.
- Falagas ME**, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI. (2009). Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. *Int J Antimicrob Agents.* 34(2):111-120.
- Falagas ME**, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Kapaskelis A, Samonis G. (2010b). Antimicrobial susceptibility of Gram-positive non-urinary isolates to fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents.* 35(5):497-499.
- Falagas ME**, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. (2016). Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev.* 29(2):321-347.
- Falagas ME**, Vouloumanou EK, Toghias AG, Karadima M, Kapaskelis AM, Rafailidis PI, Athanasiou S. (2010c). Fosfomycin versus other antibiotics for the treatment of cystitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother.* 65(9):1862-1877.
- Farrell DJ**, Morrissey I, De Rubeis D, Robbins M, Felmingham D. (2003). A UK multicentre study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infections. *J Infect.* 46(2):94-100.
- Fiadjoe P**, Kannan K, Rane A. (2010). Maternal urological problems in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 152(1):13-17.
- Fillgrove KL**, Pakhomova S, Newcomer ME, Armstrong RN. (2003). Mechanistic diversity of fosfomycin resistance in pathogenic microorganisms. *J Am Chem Soc.* 125(51):15730-15731.
- Fillgrove KL**, Pakhomova S, Schaab MR, Newcomer ME, Armstrong RN. (2007). Structure and mechanism of the genomically encoded fosfomycin resistance protein, FosX, from *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry.* 46(27):8110-8120.
- Florent A**, Chichmanian RM, Cua E, Pulcini C. (2011). Adverse events associated with intravenous fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents.* 37(1):82-83.

- Frimodt-Møller N.** (2018). Fosfomicin. En: Grayson ML, Cosgrove SE, Crowe SM, Hope W, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Norrby SR, Paterson DL (Eds.). Kucer's the use of antibiotics (7ª edición). Hodder Arnold/ASM Press, pp. 1392-1406. Londres, Reino Unido.
- Frossard M,** Joukhadar C, Erovic BM, Dittrich P, Mrass PE, Van Houte M, Burgmann H, Georgopoulos A, Müller M. (2000). Distribution and antimicrobial activity of fosfomicin in the interstitial fluid of human soft tissues. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(10):2728-2732.
- Fu Z,** Liu Y, Chen C, Guo Y, Ma Y, Yang Y, Hu F, Xu, Wang M. (2016). Characterization of fosfomicin resistance gene, *fosB*, in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS One.* 11(5):e0154829.
- Gaballa A,** Newton GL, Antelmann H, Parsonage D, Upton H, Rawat M, Claiborne A, Fahey RC, Helmann JD. (2010). Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(14):6482-6486.
- Gales AC,** Sader HS, Jones RN, SENTRY Participants Group (Latin America). (2002). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 44(3):289-299.
- Gales AC,** Sader HS, Jones RN, SENTRY Participants Group (Latin America). (2000). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 44(3):289-299.
- Garau J.** (2008). Other antimicrobials of interest in the era of extended-spectrum beta-lactamases: fosfomicin, nitrofurantoin and tigecycline. *Clin Microbiol Infect.* 14(Suppl 1):198-202.
- García V,** Montero I, Bances M, Rodicio R, Rodicio MR. (2017). Incidence and genetic bases of nitrofurantoin resistance in clinical isolates of two successful multidrug-resistant clones of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*: pandemic "DT 104" and pUO-StVR2. *Microb Drug Resist.* 23(4):405-412.
- Gardiner BJ,** Mahony AA, Ellis AG, Lawrentschuk N, Bolton DM, Zeglinski PT, Frauman AG, Grayson ML. (2014). Is fosfomicin a potential treatment alternative for multidrug-resistant gram-negative prostatitis? *Clin Infect Dis.* 58(4):101-105.
- Geng H, Jiang R.** (2015). cAMP receptor protein (CRP)-mediated resistance/tolerance in bacteria: mechanism and utilization in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(11):4533-4543.
- Giske CG.** (2015). Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomicin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clin Microbiol Infect.* 21(10):899-905.

- Gobernado M**, Valdés L, Alós JI, García-Rey C, Dal-Ré R, García-de-Lomas J, Spanish Surveillance Group for Urinary Pathogens. (2007). Antimicrobial susceptibility of clinical *Escherichia coli* isolates from uncomplicated cystitis in women over a 1-year period in Spain. *Rev Esp Quimioter*. 20(1):68-76.
- Gobernado M**. (2003). Fosfomicina. *Rev Esp Quimioterap*. 16(1):15-40.
- Goldberg O**, Koren G, Landau D, Lunenfeld E, Matok I, Levy A. (2013). Exposure to nitrofurantoin during the first trimester of pregnancy and the risk for major malformations. *J Clin Pharmacol*. 53(9):991-995.
- Grainger DC**, Hurd D, Harrison M, Holdstock J, Busby SJW. (2005). Studies of the distribution of *Escherichia coli* cAMP-receptor protein and RNA polymerase along the *E. coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(49):17693-17698.
- Grayson ML**, Macesic N, Trevillyan J, Ellis AG, Zeglinski PT, Hewitt NH, Gardiner BJ, Frauman AG. (2015). Fosfomicin for treatment of prostatitis: new tricks for old dogs. *Clin Infect Dis*. 61(7):1141-1143.
- Guillard T**, Lebreil AL, Hansen LH, Kisserli A, Berger S, Lozniewski A, Alauzet C, de Champs C. (2015). Discrimination between native and Tn6010-associated oqxAB in *Klebsiella* spp., *Raoultella* spp. and other *Enterobacteriaceae* by using a two-step strategy. *Antimicrob Agents Chemother*. 59(9):5838-5840.
- Guinto VT**, De Guia B, Festin MR, Dowswell T. (2010). Different antibiotic regimens for treating asymptomatic bacteriuria in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 9:CD007855.
- Guo Q**, Tomich AD, McElheny CL, Cooper VS, Stoesser N, Wang M, Sluis-Cremer N, Doi Y. (2016). Glutathione-S-transferase FosA6 of *Klebsiella pneumoniae* origin conferring fosfomicin resistance in ESBL-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 71(9):2460-2465.
- Hajdu S**, Lassnigg A, Graninger W, Hirschl AM, Presterl E. (2009). Effects of vancomycin, daptomycin, fosfomicin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Orthop Res*. 27(10):1361-1365.
- Hansen LH**, Jensen LB, Sorensen HI, Sorensen SJ. (2007). Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 60(1):145-147.
- Hendlin D**, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, Wolf FJ, Miller TW, Chaiet L, Kahan FM, Foltz EL, Woodruff HB, Mata JM, Hernandez S, Mochales S. (1969). Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomyces. *Science*. 166(3901):122-123.
- Herring CD**, Blattner FR. (2004). Conditional lethal amber mutations in essential *Escherichia coli* genes. *J Bacteriol*. 186(9):2673-2681.

- Hirsch EB**, Raux BR, Zucchi PC, Kim Y, McCoy C, Kirby JE, Wright SB, Eliopoulos GM. (2015). Activity of fosfomicin and comparison of several susceptibility testing methods against contemporary urine isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 46(6):642-647.
- Ho PL**, Chan J, Lo WU, Lai EL, Cheung YY, Lau TCK, Chow KH. (2013a) Prevalence and molecular epidemiology of plasmid-mediated fosfomicin resistance genes among blood and urinary *Escherichia coli* isolates. *J Med Microbiol*. 62(Pt 11):1707-1713.
- Ho PL**, Chan J, Lo WU, Law PY, Li Z, Lai EL, Chow KH. (2013b) Dissemination of plasmid-mediated fosfomicin resistance *fosA3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* from livestock and other animals. *J Appl Microbiol*. 114(3):695-702.
- Ho PL**, Ng KY, Lo WU, Law PY, Lai EL, Wang Y, Chow KH. (2015). Plasmid-mediated OqxAB is an important mechanism for nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 60(1):537-543.
- Ho PL**, Wong RC, Yip KS, Loke SL, Leung MS, Mak GC, Chow FK, Tsang KW, Que TL, COMBAT study group. (2007). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates from women: emerging multidrug resistance phenotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 59(4):439-445.
- Hooper D**. (2005). Urinary tract agents: nitrofurantoin and methenamine. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (Eds.). *Principles and practice of infectious diseases* (6ª edición). Elsevier, pp. 473-478. Philadelphia, Estados Unidos.
- Hou J**, Huang X, Deng Y, He L, Yang T, Zeng Z, Chen Z, Liu JH. (2012). Dissemination of the fosfomicin resistance gene *fosA3* with CTX-M β -lactamase genes and *rmtB* carried on IncFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 56(4):2135-2138.
- Hou J**, Yang X, Zeng Z, Lv L, Yang T, Lin D, Liu JH. (2013). Detection of the plasmid-encoded fosfomicin resistance gene *fosA3* in *Escherichia coli* of food-animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 68(4):766-770.
- Huang Y**, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang DN. (2003). Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*. 301 (5633):616-620.
- Humayun MZ**, Zhang Z, Butcher AM, Moshayedi A, Saier MH Jr. (2017). Hopping into a hot seat: role of DNA structural features on IS5-mediated gene activation and inactivation under stress. *PLoS One*. 12(6):e0180156.
- Hutley EJ**, Chand MA, Hounsome G, Kelsey MC. (2010). Fosfomicin: an oral agent for urinary infection caused by extended spectrum beta-lactamase producing organisms. *J Infect*. 60(4):308-309.
- Huttner A**, Stedwarson A. (2018). Nitrofurans: nitrofurazone, furazidone, and nitrofurantoin. En: Grayson ML, Cosgrove SE, Crowe SM, Hope W, McCarthy JS,

-
- Mills J, Mouton JW, Norrby SR, Paterson DL (Eds.). Kucer's the use of antibiotics (7ª edición). Hodder Arnold/ASM Press, pp. 1784-1798. Londres, Reino Unido.
- Island MD, Kadner RJ.** (1993). Interplay between the membrane-associated UhpB and UhpC regulatory proteins. *J Bacteriol.* 175(16):5028-5034.
- Ito R, Mustapha MM, Tomich AD, Callaghan JD, McElheny CL, Mettus RT, Shanks RMQ, Sluis-Cremer N, Doi Y.** (2017). Widespread fosfomicin resistance in Gram-negative bacteria attributable to the chromosomal *fosA* gene. *mBio.* 8(4):e00749-17.
- Ito R, Pacey MP, Mettus RT, Sluis-Cremer N, Doi Y.** (2018). Origin of the plasmid-mediated fosfomicin resistance gene *fosA3*. *J Antimicrob Chemother.* 73(2):373-376.
- Jiang S, Gilpin ME, Attia M, Ting YL, Berti PJ.** (2011). Lyme disease enolpyruvyl-UDP-GlcNAc synthase: fosfomicin-resistant MurA from *Borrelia burgdorferi*, a fosfomicin-sensitive mutant, and the catalytic role of the active site Asp. *Biochemistry.* 50(12):2205-2212.
- Jiang Y, Shen P, Wei Z, Liu L, He F, Shi K, Wang Y, Wang H, Yu Y.** (2015). Dissemination of a clone carrying a *fosA3*-harbouring plasmid mediates high fosfomicin resistance rate of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *Int J Antimicrob Agents.* 45(1):66-70.
- Johnson JR, Drawz SM, Porter S, Kuskowski MA.** (2013). Susceptibility to alternative oral antimicrobial agents in relation to sequence type ST131 status and coresistance phenotype among recent *Escherichia coli* isolates from U.S. veterans. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(10):4856-4860.
- Jolivet-Gougeon A, Bonnaure-Mallet M.** (2014). Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discov Today Technol.* 11:49-56.
- Joukhadar C, Klein N, Dittrich P, Zeitlinger M, Geppert A, Skhirtladze K, Frossard M, Heinz G, Müller M.** (2003). Target site penetration of fosfomicin in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother.* 51(5):1247-1252.
- Kaase M, Szabados F, Anders A, Gatermann SG.** (2014). Fosfomicin susceptibility in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from Germany. *J Clin Microbiol.* 52(6):1893-1897.
- Kammire LD, Donofrio PD.** (2007). Nitrofurantoin neuropathy: a forgotten adverse effect. *Obstet Gynecol.* 110 (2 Pt 2):510-512.
- Karageorgopoulos DE, Wang R, Yu XH, Falagas ME.** (2012). Fosfomicin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 67(2):255-268.
- Karlowsky JA, Denisuik AJ, Lagacé-Wiens PR, Adam HJ, Baxter MR, Hoban DJ, Zhanel GG.** (2014). In vitro activity of fosfomicin against *Escherichia coli* isolated from

patients with urinary tract infections in Canada as part of the CANWARD surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(2):1252-1256.

Kashanian J, Hakimian P, Blute M Jr, Wong J, Khanna H, Wise G, Shabsigh R. (2008). Nitrofurantoin: the return of an old friend in the wake of growing resistance. *BJU Int.* 102(11):1634-1637.

Keating GM. (2013). Fosfomicin trometamol: a review of its use as a single-dose oral treatment for patients with acute lower urinary tract infections and pregnant women with asymptomatic bacteriuria. *Drugs.* 73(17):1951-1966.

Kim DH, Lees WJ, Kempell KE, Lane WS, Duncan K, Walsh CT. (1996). Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomicin. *Biochemistry.* 35(15):4923-4928.

Klontz EH, Tomich AD, Günther S, Lemkul JA, Deredge D, Silverstein Z, Shaw JF, McElheny C, Doi Y, Wintrode PL, MacKerell AD Jr, Sluis-Cremer N, Sundberg EJ. (2017). Structure and dynamics of FosA-mediated fosfomicin resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(11):e01572-17.

Kobayashi S, Kuzuyama T, Seto H. (2000). Characterization of the *fomA* and *fomB* gene products from *Streptomyces wedmorensis*, which confer fosfomicin resistance on *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(3):647-650.

Koulaouzidis A, Bhat S, Moschos J, Tan C, De Ramon A. (2007). Nitrofurantoin-induced lung- and hepatotoxicity. *Ann Hepatol.* 6(2):119-121.

Krcmery S, Hromec J, Demesova D. (2001). Treatment of lower urinary tract infection in pregnancy. *Int J Antimicrob Agents.* 17(4):279-282.

Kurabayashi K, Tanimoto K, Tomita H, Hirakawa H. (2017). Cooperative actions of CRP-cAMP and FNR increase the fosfomicin susceptibility of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) by elevating the expression of *glpT* and *uhpT* under anaerobic conditions. *Front Microbiol.* 8:426.

Lee M, Bozzo P, Einarson A, Koren G. (2008). Urinary tract infections in pregnancy. *Can Fam Physician.* 54(6):853-854.

Lee SY, Park YJ, Yu JK, Jung S, Kim Y, Jeong SH, Arakawa Y. (2012). Prevalence of acquired fosfomicin resistance among extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Korea and IS26-composite transposon surrounding *fosA3*. *J Antimicrob Chemother.* 67(12):2843-2847.

Legat FJ, Maier A, Dittrich P, Zenahlik P, Kern T, Nuhsbaumer S, Frossard M, Salmhofer W, Kerl H, Müller M. (2003). Penetration of fosfomicin into inflammatory lesions in

- patients with cellulitis or diabetic foot syndrome. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(1):371-374.
- Lemieux MJ**, Huang Y, Wang DN. (2004a). The structural basis of substrate translocation by the *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily. *Curr Opin Struct Biol.* 14(4):405-412.
- Lemieux MJ**, Huang Y, Wang DN. (2004b). Glycerol-3-phosphate transporter of *Escherichia coli*: structure, function and regulation. *Res Microbiol.* 155(8):623-629.
- Li J**, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z, Hao H. (2019). The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob Resist Infect Control.* 8:44.
- Li L**, Liao X, Yang Y, Sun J, Li L, Liu B, Yang S, Ma J, Li X, Zhang Q, Liu Y. (2013). Spread of *oqxAB* in *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* predominantly by IncHI2 plasmids. *J Antimicrob Chemother.* 68(10):2263-2268.
- Li Y**, Zheng B, Li Y, Zhu S, Xue F, Liu J. (2015). Antimicrobial susceptibility and molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical *Escherichia coli* isolates in Mainland China. *PLoS One.* 10(8):e0135269.
- Lipman J**, Udy AA, Roberts JA. (2011). Do we understand the impact of altered physiology, consequent interventions and resultant clinical scenarios in the intensive care unit? The antibiotic story. *Anaesth Intensive Care.* 39(6):999-1000.
- Liu HY**, Lin HC, Lin YC, Yu SH, Wu WH, Lee YJ. (2011). Antimicrobial susceptibilities of urinary extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to fosfomycin and nitrofurantoin in a teaching hospital in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 44(5):364-368.
- Liu P**, Chen S, Wu ZY, Qi M, Li XY, Liu CX. (2020). Mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist.* 22:238-243.
- Livermore DM**, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. (2011). What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents.* 37(5):415-419.
- Lu CL**, Liu CY, Huang YT, Liao CH, Teng LJ, Turnidge JD, Hsueh PR. (2011). Antimicrobial susceptibilities of commonly encountered bacterial isolates to fosfomycin determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(9):4295-4301.
- Lu PL**, Hsieh YJ, Lin JE, Huang JW, Yang TY, Lin L, Tseng SP. (2016). Characterisation of fosfomycin resistance mechanisms and molecular epidemiology in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 48(5):564-568.

- Lucas AE**, Ito R, Mustapha MM, McElheny CL, Mettus RT, Bowler SL, Kantz SF, Pacey MP, Pasculle AW, Cooper VS, Doi Y. (2017). Frequency and mechanisms of spontaneous fosfomicin nonsusceptibility observed upon disk diffusion testing of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 56(1):e01368-17.
- Lumbiganon P**, Villar J, Laopaiboon M, Widmer M, Thinkhamrop J, Carroli G, Duc Vy N, Mignini L, Festin M, Prasertcharoensuk W, Limpongsanurak S, Liabsuetrakul T, Sirivatanapa P, World Health Organization Asymptomatic Bacteriuria Trial Group. (2009). One-day compared with 7-day nitrofurantoin for asymptomatic bacteriuria in pregnancy: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol.* 113(2 Pt 1):339-345.
- Ma Y**, Xu X, Guo Q, Wang P, Wang W, Wang M. (2015). Characterization of *fosA5*, a new plasmid-mediated fosfomicin resistance gene in *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol.* 60(3):259-264.
- Manson JM**, Hancock LE, Gilmore MS. (2010). Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(27):12269-12274.
- Maraki S**, Samonis G, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, Mavromanolakis E, Falagas ME. (2009). Susceptibility of urinary tract bacteria to fosfomicin. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(10):4508-4510.
- Marchese A**, Bozzolasco M, Gualco L, Debbia EA, Schito GC, Schito AM. (2003a). Effect of fosfomicin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 22(Suppl 2):95-100.
- Marchese A**, Gualco L, Debbia EA, Schito GC, Schito AM. (2003b). In vitro activity of fosfomicin against gram-negative urinary pathogens and the biological cost of fosfomicin resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 22(Suppl 2):53-59.
- Marshall AD, Dempsey OJ.** (2013). Is “nitrofurantoin lung” on the increase? *Br Med J.* 346:f3897.
- Matzi V**, Lindenmann J, Porubsky C, Kugler SA, Maier A, Dittrich P, Smolle-Jüttner FM, Joukhadar C. (2010). Extracellular concentrations of fosfomicin in lung tissue of septic patients. *J Antimicrob Chemother.* 65(5):995-998.
- Mazzei T**, Cassetta MI, Fallani S, Arrigucci S, Novelli A. (2006). Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of antimicrobial agents for the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents.* 28(Suppl 1):S35-S41.
- McAleese FM, Foster TJ.** (2003). Analysis of mutations in the *Staphylococcus aureus* *clfB* promoter leading to increased expression. *Microbiology (Reading).* 149(Pt 1):99-109.

- McCoy AJ**, Sandlin RC, Maurelli AT. (2003). *In vitro* and *in vivo* functional activity of *Chlamydia* MurA, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase involved in peptidoglycan synthesis and fosfomicin resistance. *J Bacteriol.* 185(4):1218-1228.
- McMurry LM**, Aldema-Ramos ML, Levy SB. (2002). Fe(2+)-tetracycline-mediated cleavage of the Tn10 tetracycline efflux protein TetA reveals a substrate binding site near glutamine 225 in transmembrane helix 7. *J Bacteriol.* 184(18):5113-5120.
- Mendes AC**, Rodrigues C, Pires J, Amorim J, Ramos MH, Novais Â, Peixe L. (2016). Importation of fosfomicin resistance *fosA3* gene to Europe. *Emerg Infect Dis.* 22(2):346-348.
- Mendoza C**, García JM, Llana J, Méndez FJ, Hardisson C, Ortiz JM. (1980). Plasmid-determined resistance to fosfomicin in *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 18(2):215-219.
- Metzker ML**. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 11(1):31-46.
- Michalopoulos A**, Virtzili S, Rafailidis P, Chalevelakis G, Damala M, Falagas ME. (2010). Intravenous fosfomicin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clin Microbiol Infect.* 16(2):184-186.
- Michalopoulos AS**, Livaditis IG, Gougoutas V. (2011). The revival of fosfomicin. *Int J Infect Dis.* 15(11):732-739.
- Mihailescu R**, Furustrand T, Corvec S, Oliva A, Betrisey B, Borens O, Trampuz A. (2014). High activity of Fosfomicin and Rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm in vitro and in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(5):2547-2553.
- Mikuniya T**, Kato Y, Ida T, Maebashi K, Monden K, Kariyama R, Kumon H. (2007). Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomicin in a rat urinary tract infection model. *J Infect Chemother* 13(5):285-290.
- Miró JM**, Entenza JM, Del Río A, Velasco M, Castañeda X, Garcia de la Mària C, Giddey M, Armero Y, Pericàs JM, Cervera C, Mestres CA, Almela M, Falces C, Marco F, Moreillon P, Moreno A, Hospital Clinic Experimental Endocarditis Study Group. (2012). High-dose daptomycin plus fosfomicin is safe and effective in treating methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(8):4511-4515.
- Mottaghizadeh F**, Mohajjel Shoja H, Haeili M, Darban-Sarokhalil D. (2020). Molecular epidemiology and nitrofurantoin resistance determinants of nitrofurantoin-non-susceptible *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections. *J Glob Antimicrob Resist.* 21:335-339.

- Muller AE**, Verhaegh EM, Harbarth S, Mouton JW, Huttner A. (2017). Nitrofurantoin's efficacy and safety as prophylaxis for urinary tract infections: a systematic review of the literature and meta-analysis of controlled trials. *Clin Microbiol Infect.* 23(6):355-362.
- Munita JM, Arias CA.** (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr.* 4(2):10.1128.
- Muñoz-Dávila MJ.** (2014). Role of old antibiotics in the era of antibiotic resistance. Highlighted nitrofurantoin for the treatment of lower urinary tract infections. *Antibiotics (Basel).* 3(1):39-48.
- Naber KG**, Schito G, Botto H, Palou J, Mazzei T. (2008). Surveillance study in Europe and Brazil on clinical aspects and antimicrobial resistance epidemiology in females with cystitis (ARESC): implications for empiric therapy. *Eur Urol.* 54(5):1164-1175.
- Nakamura G**, Wachino J, Sato N, Kimura K, Yamada K, Jin W, Shibayama K, Yagi T, Kawamura K, Arakawa Y. (2014). Practical agar-based disk potentiation test for detection of fosfomicin-nonsusceptible *Escherichia coli* clinical isolates producing glutathione S-transferases. *J Clin Microbiol.* 52(9):3175-3179.
- Neuner EA**, Sekeres J, Hall GS, van Duin D. (2012). Experience with fosfomicin for treatment of urinary tract infections due to multidrug-resistant organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(11):5744-5748.
- Nikaido H.** (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(4):593-656.
- Nilsson AI**, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. (2003). Biological costs and mechanisms of fosfomicin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(9):2850-2858.
- Nys S**, Terporten PH, Hoogkamp-Korstanje JA, Stobberingh EE, Susceptibility Surveillance Study Group. (2008). Trends in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from urology services in the Netherlands (1998-2005). *J Antimicrob Chemother.* 62(1):126-132.
- Ohkoshi Y**, Sato T, Suzuki Y, Yamamoto S, Shiraishi T, Ogasawara N, Yokota SI. (2017). Mechanism of reduced susceptibility to fosfomicin in *Escherichia coli* clinical isolates. *Biomed Res Int.* 2017:5470241.
- Olekhovich IN, Kadner RJ.** (2002). Mutational scanning and affinity cleavage analysis of UhpA-binding sites in the *Escherichia coli* *uhpT* promoter. *J Bacteriol.* 184(10):2682-2691.
- Oliva A**, Furustrand T, Maiolo EM, Jeddari S, Betrisey B, Trampuz A. (2014). Activities of fosfomicin and rifampin on planktonic and adherent *Enterococcus faecalis* strains in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(3):1284-1293.

- Ongun S**, Aslan G, Avkan-Oguz V. (2012). The effectiveness of single-dose fosfomycin as antimicrobial prophylaxis for patients undergoing transrectal ultrasound-guided biopsy of the prostate. *Urol Int.* 89(4):439-444.
- Oteo J**, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, Fernández S, Lázaro E, de Abajo FJ, Campos J, Spanish ESBL-EARS-Net Study Group. (2010). Parallel increase in community use of fosfomycin and resistance to fosfomycin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 65(11):2459-2463.
- Pagès JM**, James CE, Winterhalter M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 6(12):893-903.
- Parker S**, Lipman J, Koulenti D, Dimopoulos G, Roberts JA. (2013). What is the relevance of fosfomycin pharmacokinetics in the treatment of serious infections in critically ill patients? A systematic review. *Int J Antimicrob Agents.* 42(4):289-293.
- Parker SL**, Frantzeskaki F, Wallis SC, Diakaki C, Giamarellou H, Koulenti D, Karaiskos I, Lipman J, Dimopoulos G, Roberts JA. (2015). Population pharmacokinetics of fosfomycin in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(10):6471-6476.
- Parsonage D**, Newton GL, Holder RC, Wallace BD, Paige C, Hamilton CJ, Dos Santos PC, Redinbo MR, Reid SD, Claiborne A. (2010). Characterization of the N-acetyl- α -D-glucosaminyl l-malate synthase and deacetylase functions for bacillithiol biosynthesis in *Bacillus anthracis*. *Biochemistry.* 49(38):8398-8414.
- Partridge SR**, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 31(4):e00088-17.
- Paterson DL**, **Bonomo RA**. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18(4):657-686.
- Perdigao-Neto LV**, Oliveira MS, Rizek CF, Carrilho CM, Costa SF, Levin AS. (2014). Susceptibility of multiresistant gram-negative bacteria to fosfomycin and performance of different susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(3):1763-1767.
- Pfausler B**, Spiss H, Dittrich P, Zeitlinger M, Schmutzhard E, Joukhadar C. (2004). Concentrations of fosfomycin in the cerebrospinal fluid of neurointensive care patients with ventriculostomy-associated ventriculitis. *J Antimicrob Chemother.* 53(5):848-852.
- Piddock LJ**. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 19(2):382-402.

- Pogliano J**, Pogliano N, Silverman JA. (2012). Daptomycin-mediated reorganization of membrane architecture causes mislocalization of essential cell division proteins. *J Bacteriol.* 194(17):4494-4504.
- Pogue JM**, Marchaim D, Abreu-Lanfranco O, Sunkara B, Mynatt RP, Zhao JJ, Bheemreddy S, Hayakawa K, Martin ET, Dhar S, Kaye KS, Lephart PR. (2013). Fosfomicin activity versus carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and vancomycin-resistant *Enterococcus*, Detroit, 2008-10. *J Antibiot (Tokyo).* 66(10):625-627.
- Pontikis K**, Karaiskos I, Bastani S, Dimopoulos G, Kalogirou M, Katsiari M, Oikonomou A, Poulakou G, Roilides E, Giamarellou H. (2014). Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomicin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 43(1):52-59.
- Poole K.** (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 56(1):20-51.
- Poulsen HO**, Johansson A, Granholm S, Kahlmeter G, Sundqvist M. (2013). High genetic diversity of nitrofurantoin- or mecillinam-resistant *Escherichia coli* indicates low propensity for clonal spread. *J Antimicrob Chemother.* 68(9):1974-1977.
- Presterl E**, Hajdu S, Lassnigg AM, Hirschl AM, Holinka J, Graninger W. (2009). Effects of azithromycin in combination with vancomycin, daptomycin, fosfomicin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(8):3205-3210.
- Puerto AS**, Fernandez JG, del Castillo J de D, Pino MJ, Angulo GP. (2006). In vitro activity of beta-lactam and non-beta-lactam antibiotics in extended-spectrum beta-lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 54(2):135-139.
- Rehman MA**, Yin X, Persaud-Lachhman MG, Diarra MS. (2017). First detection of a fosfomicin resistance gene, *fosA7*, in *Salmonella enterica* serovar *Heidelberg* isolated from broiler chickens. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(8):e00410-417.
- Rhodes NJ**, Gardiner BJ, Neely MN, Grayson ML, Ellis AG, Lawrentschuk N, Frauman AG, Maxwell KM, Zembower TR, Scheetz MH. (2015). Optimal timing of oral fosfomicin administration for pre-prostate biopsy prophylaxis. *J Antimicrob Chemother.* 70(7):2068-2073.
- Rigsby RE**, Fillgrove KL, Beihoffer LA, Armstrong RN. (2005). Fosfomicin resistance proteins: a nexus of glutathione transferases and epoxide hydrolases in a metalloenzyme superfamily. *Methods Enzymol.* 401:367-379.
- Roberts AA**, Sharma SV, Strankman AW, Duran SR, Rawat M, Hamilton CJ. (2013). Mechanistic studies of FosB: a divalent-metal-dependent bacillithiol-S-transferase

- that mediates fosfomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Biochem J*. 451(1):69-79.
- Roberts MC.** (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*. 245(2):195-203.
- Robinson JT,** Thorvaldsdóttir H, Wenger AM, Zehir A, Mesirov JP. (2017). Variant review with the Integrative Genomics Viewer (IGV). *Cancer Res*. 77(21):31-34.
- Rodríguez-Baño J,** Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, Tórtola T, Mirelis B, Navarro G, Cuenca M, Esteve M, Peña C, Llanos AC, Cantón R, Pascual A. (2008). Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med*. 168(17):1897-1902.
- Rodríguez-Martínez JM,** Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother*. 17(2):149-182.
- Rodríguez-Martínez JM,** Díaz de Alba P, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernández-Cuenca F, Rodríguez Baño J, Martínez-Martínez L, Pascual Á. (2013). Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 68(1):68-73.
- Roussos N,** Karageorgopoulos DE, Samonis G, Falagas ME. (2009). Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomycin for the treatment of patients with systemic infections. *Int J Antimicrob Agents*. 34(6):506-515.
- Saier MH Jr,** Kukita C, Zhang Z. (2017). Transposon-mediated directed mutation in bacteria and eukaryotes. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 22:1458-1468.
- Sakamoto Y,** Furukawa S, Ogihara H, Yamasaki M. (2003). Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (*cya*) mutants of *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 67(9):2030-2033.
- Saltoglu N,** Karali R, Yemisen M, Ozaras R, Balkan II, Mete B, Tabak F, Mert A, Hondur N, Ozturk R. (2015). Comparison of community-onset healthcare-associated and hospital-acquired urinary infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and antimicrobial activities. *Int J Clin Pract*. 69(7):766-770.
- Samonis G,** Karageorgopoulos DE, Kofteridis DP, Matthaiou DK, Sidiropoulou V, Maraki S, Falagas ME. (2009). *Citrobacter* infections in a general hospital: characteristics and outcomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 28(1):61-68.
- Sánchez GV,** Baird AM, Karlowsky JA, Master RN, Bordon JM. (2014). Nitrofurantoin retains antimicrobial activity against multidrug-resistant urinary *Escherichia coli* from US outpatients. *J Antimicrob Chemother*. 69(12):3259-3262.

- Sánchez GV**, Master RN, Karlowsky JA, Bordon JM. (2012). In vitro antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* isolates among US outpatients from 2000 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(4):2181-2183.
- Sandegren L**, Lindqvist A, Kahlmeter G, Andersson DI. (2008). Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 62(3):495-503.
- Sastry S**, Clarke LG, Alrowais H, Query AM, Shutt KA, Doi Y. (2015). Clinical appraisal of fosfomicin in the era of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(12):7355-7361.
- Sastry S**, Doi Y. (2016). Fosfomicin: resurgence of an old companion. *J Infect Chemother.* 22(5):273-280.
- Sato N**, Kawamura K, Nakane K, Wachino J, Arakawa Y. (2013). First detection of fosfomicin resistance gene *fosA3* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy individuals in Japan. *Microb Drug Resist.* 19(6):477-482.
- Sauermann R**, Karch R, Langenberger H, Kettenbach J, Mayer-Helm B, Petsch M, Wagner C, Sautner T, Gattringer R, Karanikas G, Joukhadar C. (2005). Antibiotic abscess penetration: fosfomicin levels measured in pus and simulated concentration-time profiles. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(11):4448-4454.
- Schito GC**. (2003). Why fosfomicin trometamol as first line therapy for uncomplicated UTI? *Int J Antimicrob Agents.* 22(Suppl. 2):79-83.
- Scotti M**, Lacharme-Lora L, Wagner M, Chico-Calero I, Losito P, Vázquez-Boland JA. (2006). Coexpression of virulence and fosfomicin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial *in vitro-in vivo* paradox. *Nat Med.* 12(5):515-517.
- Seoane A**, Sangari FJ, Lobo JM. (2010). Complete nucleotide sequence of the fosfomicin resistance transposon Tn2921. *Int J Antimicrob Agents.* 35(4):413-414.
- Shi J**, Cui F, Ge M. (2001). The epoxidation of cis-propenylphosphonic acid to fosfomicin by *Penicillium* sp. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 41(3):353-356.
- Shi J**, Mao NF, Wang L, Zhang HB, Chen Q, Liu H, Tang X, Jin T, Zhu CT, Li FB, Sun LH, Xu XM, Xu YQ. (2014). Efficacy of combined vancomycin and fosfomicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms *in vivo*. *PLoS One.* 9(12):e113133.
- Siguier P**, Gourgouyere E, Chandler M. (2014). Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 38(5):865-891.
- Singh KV**, Weinstock GM, Murray BE. (2002). An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(6):1845-1850.

- Singh N**, Gandhi S, McArthur E, Moist L, Jain AK, Liu AR, Sood MM, Garg AX. (2015). Kidney function and the use of nitrofurantoin to treat urinary tract infections in older women. *CMAJ*. 187(9):648-656.
- Singkham-In U**, Muhummudaree N, Chatsuwat T. (2020). *fosA3* overexpression with transporter mutations mediates high-level of fosfomicin resistance and silencing of *fosA3* in fosfomicin-susceptible *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase clinical isolates. *PLoS One*. 15(8):e0237474.
- Skarzynski T**, Mistry A, Wonacott A, Hutchinson SE, Kelly VA, Duncan K. (1996). Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomicin. *Structure*. 4(12):1465-1474.
- Sorensen AH**, Hansen LH, Johannesen E, Sorensen SJ. (2003). Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox. *Antimicrob Agents Chemother*. 47(2):798-799.
- Sorlózano A**, Gutierrez J, Jimenez A, de Dios Luna J, Martínez JL. (2007). Contribution of a new mutation in *parE* to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol*. 45(8):2740-2742.
- Sorlózano A**, Jimenez-Pacheco A, de Dios Luna Del Castillo J, Sampedro A, Martinez-Brocal A, Miranda-Casas C, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. (2014). Evolution of the resistance to antibiotics of bacteria involved in urinary tract infections: A 7-year surveillance study. *Am J Infect Control*. 42(10):1033-1038.
- Sorlózano-Puerto A**, Gómez-Luque JM, Luna-Del-Castillo JD, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. (2017). Etiological and resistance profile of bacteria involved in urinary tract infections in young children. *Biomed Res Int*. 2017:4909452.
- Souli M**, Galani I, Boukovalas S, Gourgoulis MG, Chryssouli Z, Kanellakopoulou K, Panagea T, Giamarellou H. (2011). In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomicin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(5):2395-2397.
- Sun F**, Qu F, Ling Y, Mao P, Xia P, Chen H, Zhou D. (2013). Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiol*. 8(7):877-886.
- Sun H**, Li S, Xie Z, Yang F, Sun Y, Zhu Y, Zhao X, Jiang S. (2012). A novel multidrug resistance plasmid isolated from an *Escherichia coli* strain resistant to aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother*. 67(7):1635-1638.
- Takahata S**, Ida T, Hiraishi T, Sakakibara S, Maebashi K, Terada S, Muratani T, Matsumoto T, Nakahama C, Tomono K. (2010). Molecular mechanisms of fosfomicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 35(4):333-337.

- Tan IL**, Polydefkis MJ, Ebenezer GJ, Hauer P, McArthur JC. (2012). Peripheral nerve toxic effects of nitrofurantoin. *Arch Neurol.* 69(2):265-268.
- Teoh XY**, Bt Mahyuddin FN, Ahmad W, Chan SY. (2020). Formulation strategy of nitrofurantoin: co-crystal or solid dispersion? *Pharm Dev Technol.* 25(2):245-251.
- Thomas CM, Nielsen KM.** (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 3(9):711-721.
- Tseng SP**, Wang SF, Kuo CY, Huang JW, Hung WC, Ke GM, Lu PL. (2015). Characterization of fosfomicin resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from human and pig in Taiwan. *PLoS One.* 10(8):e0135864.
- Tseng SP**, Wang SF, Ma L, Wang TY, Yang TY, Siu LK, Chuang YC, Lee PS, Wang JT, Wu TL, Lin JC, Lu PL. (2017). The plasmid-mediated fosfomicin resistance determinants and synergy of fosfomicin and meropenem in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 50(5):653-661.
- Usta TA**, Dogan O, Ates U, Yucel B, Onar Z, Kaya E. (2011). Comparison of single-dose and multiple-dose antibiotics for lower urinary tract infection in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet.* 114(3):229-233.
- van de Mheen L**, Smits SM, Terpstra WE, Leyte A, Bekedam DJ, van den Akker ES. (2014). Haemolytic anaemia after nitrofurantoin treatment in a pregnant woman with G6PD deficiency. *BMJ Case Rep.* 2014:bcr2013010087.
- Vardakas KZ**, Legakis NJ, Triarides N, Falagas ME. (2016). Susceptibility of contemporary isolates to fosfomicin: a systematic review of the literature. *Int J Antimicrob Agents.* 47(4):269-285.
- Vervoort J**, Xavier BB, Stewardson A, Coenen S, Godycki-Cwirko M, Adriaenssens N, Kowalczyk A, Lammens C, Harbarth S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. (2014). An in vitro deletion in *ribE* encoding lumazine synthase contributes to nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(12):7225-7233.
- Vervoort J**, Xavier BB, Stewardson A, Coenen S, Godycki-Cwirko M, Adriaenssens N, Kowalczyk A, Lammens C, Harbarth S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. (2015). Metagenomic analysis of the impact of nitrofurantoin treatment on the human faecal microbiota. *J Antimicrob Chemother.* 70(7):1989-1992.
- Větrovský T, Baldrian P.** (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One.* 8(2):e57923.
- Vieira AT**, Teixeira MM, Martins FS. (2013). The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front Immunol.* 4:445.

- Villa L**, Guerra B, Schmogger S, Fischer J, Helmuth R, Zong Z, García-Fernández A, Carattoli A. (2015). IncA/C plasmid carrying *bla*(NDM-1), *bla*(CMY-16), and *fosA3* in a *Salmonella enterica* serovar *Corvallis* strain isolated from a migratory wild bird in Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(10):6597-6600.
- Visalli MA**, Murphy E, Projan SJ, Bradford PA. (2003). AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(2):665-669.
- Wachino J**, Yamane K, Suzuki S, Kimura K, Arakawa Y. (2010). Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(7):3061-3064.
- Wagenlehner FME**, Hoyme U, Kaase M, Funfstuck R, Naber KG, Schmiemann G. (2011). Uncomplicated urinary tract infections. *Dtsch Arztebl Int.* 108(24):415-423.
- Wand ME**, Taylor HV, Auer JL, Bock LJ, Hind CK, Jamshidi S, Rahman KM, Sutton JM. (2019). Evaluating the level of nitroreductase activity in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates to support strategies for nitro drug and prodrug development. *Int J Antimicrob Agents.* 54(5):538-546.
- Wang Y**, Lo WU, Lai EL, Chow KH, Ho PL. (2015). Complete sequence of the multidrug-resistant IncL/M plasmid pIMP-HB623 cocarrying *bla*_{IMP-34} and *fosC2* in an *Enterobacter cloacae* strain associated with medical travel to China. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(9):5854-5856.
- Whiteway J**, Koziarz P, Veall J, Sandhu N, Kumar P, Hoecher B, Lambert IB. (1998). Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of *nfsA* and *nfsB* in development of resistance to 5-nitrofurán derivatives in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 180(21):5529-5539.
- Wijma RA**, Huttner A, Koch BCP, Mouton JW, Muller AE. (2018). Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroloxline. *J Antimicrob Chemother.* 73(11):2916-2926.
- Williams G, Craig JC.** (2011). Long-term antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 4(4):CD001534.
- Wilson DN.** (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol.* 12(1):35-48.
- World Health Organization.** (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Summary report published as technical document with reference number: WHO/HSE/PED/AIP/2014.2. Geneva, Suiza.
- Xiang DR**, Li JJ, Sheng ZK, Yu HY, Deng M, Bi S, Hu FS, Chen W, Xue XW, Zhou ZB, Doi Y, Sheng JF, Li LJ. (2015). Complete sequence of a novel IncR-F33:A-B- plasmid, pKP1034, harboring *fosA3*, *blaKPC-2*, *blaCTX-M-65*, *blaSHV-12*, and *rmtB* from an




- epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 strain in China. Antimicrob Agents Chemother. 60(3):1343-1348.
- Xie M**, Lin D, Chen K, Chan EW, Yao W, Chen S. (2016). Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from retail meat that harbor *blaCTX-M* and *fosA3* genes. Antimicrob Agents Chemother. 60(4):2450-2455.
- Xu H**, Miao V, Kwong W, Xia R, Davies J. (2011). Identification of a novel fosfomicin resistance gene (*fosA2*) in *Enterobacter cloacae* from the Salmon River, Canada. Lett Appl Microbiol. 52(4):427-429.
- Xu L**, Wu D, Liu L, Zheng Q, Song Y, Ye L, Sha S, Kang J, Xin Y, Ma Y. (2014). Characterization of mycobacterial UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyle transferase (MurA). Res Microbiol. 165(2):91-101.
- Xu Q**, Jiang J, Zhu Z, Xu T, Sheng ZK, Ye M, Xu X, Wang M. (2019). Efflux pumps AcrAB and OqxAB contribute to nitrofurantoin resistance in an uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* isolate. Int J Antimicrob Agents. 54(2):223-227.
- Yang TY**, Lu PL, Tseng SP. (2019). Update on fosfomicin-modified genes in *Enterobacteriaceae*. J Microbiol Immunol Infect. 52(1):9-21.
- Yang X**, Liu W, Liu Y, Wang J, Lv L, Chen X, He D, Yang T, Hou J, Tan Y, Xing L, Zeng Z, Liu JH. (2014). F33: A-: B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of *fosA3* and *blaCTX-M-55/-14/-65* in *Escherichia coli* from chickens in China. Front Microbiol. 5:688.
- Yao H**, Wu D, Lei L, Shen Z, Wang Y, Liao K. (2016). The detection of fosfomicin resistance genes in *Enterobacteriaceae* from pets and their owners. Vet Microbiol. 193:67-71.
- Zhanel GG**, Hisanaga TL, Laing NM, DeCorby MR, Nichol KA, Weshnoweski B, Johnson J, Noreddin A, Low DE, Karlowsky JA, NAUTICA Group, Hoban DJ. (2006). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatients urinary tract infection isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). Int J Antimicrob Agents. 27(6):468-475.
- Zhanel GG**, Hoban DJ, Karlowsky JA. (2001). Nitrofurantoin is active against vancomycin-resistant enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 45(1):324-326.
- Zhang X**, Zhang Y, Wang F, Wang C, Chen L, Liu H, Lu H, Wen H, Zhou T. (2018). Unravelling mechanisms of nitrofurantoin resistance and epidemiological characteristics among *Escherichia coli* clinical isolates. Int J Antimicrob Agents. 52(2):226-232.

8. PUBLICACIONES



Article

Characterization of Fosfomycin and Nitrofurantoin Resistance Mechanisms in *Escherichia coli* Isolated in Clinical Urine Samples

Antonio Sorlozano-Puerto ¹, Isaac Lopez-Machado ¹, Maria Albertuz-Crespo ¹, Luis Javier Martinez-Gonzalez ² and Jose Gutierrez-Fernandez ^{1,3,*}

¹ Department of Microbiology, School of Medicine and PhD Program in Clinical Medicine and Public Health, University of Granada-ibs, 18016 Granada, Spain; asp@ugr.es (A.S.-P.); isloma@correo.ugr.es (I.L.-M.); albertuzmaria@correo.ugr.es (M.A.-C.)

² Pfizer-University of Granada-Junta de Andalucía Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO), 18016 Granada, Spain; luisjavier.martinez@genyo.es

³ Laboratory of Microbiology, Virgen de las Nieves University Hospital-ibs, 18014 Granada, Spain

* Correspondence: josegf@ugr.es

Received: 17 July 2020; Accepted: 24 August 2020; Published: 24 August 2020



Abstract: Fosfomycin and nitrofurantoin are antibiotics of choice to orally treat non-complicated urinary tract infections (UTIs) of community origin because they remain active against bacteria resistant to other antibiotics. However, epidemiologic surveillance studies have detected a reduced susceptibility to these drugs. The objective of this study was to determine possible mechanisms of resistance to these antibiotics in clinical isolates of fosfomycin- and/or nitrofurantoin-resistant UTI-producing *Escherichia coli*. We amplified and sequenced *murA*, *glpT*, *uhpT*, *uhpA*, *ptsI*, *cyaA*, *nfsA*, *nfsB*, and *ribE* genes, and screened plasmid-borne fosfomycin-resistance genes *fosA3*, *fosA4*, *fosA5*, *fosA6*, and *fosC2* and nitrofurantoin-resistance genes *oqxA* and *oqxB* by polymerase chain reaction. Among 29 isolates studied, 22 were resistant to fosfomycin due to deletion of *uhpT* and/or *uhpA* genes, and 2 also possessed the *fosA3* gene. Some modifications detected in sequences of NfsA (His11Tyr, Ser33Arg, Gln67Leu, Cys80Arg, Gly126Arg, Gly154Glu, Arg203Cys), NfsB (Gln44His, Phe84Ser, Arg107Cys, Gly192Ser, Arg207His), and RibE (Pro55His), and the production of truncated NfsA (Gln67 and Gln147) and NfsB (Glu54), were associated with nitrofurantoin resistance in 15/29 isolates; however, the presence of *oqxAB* plasmid genes was not detected in any isolate. Resistance to fosfomycin was associated with the absence of transporter UhpT expression and/or the presence of antibiotic-modifying enzymes encoded by *fosA3* plasmid-mediated gene. Resistance to nitrofurantoin was associated with modifications of NfsA, NfsB, and RibE proteins. The emergence and spread of these resistance mechanisms, including transferable resistance, could compromise the future usefulness of fosfomycin and nitrofurantoin against UTIs. Furthermore, knowledge of the genetic mechanisms underlying resistance may lead to rapid DNA-based testing for resistance.

Keywords: *Escherichia coli*; fosfomycin; nitrofurantoin; antimicrobial resistance

1. Introduction

The high incidence of urinary tract infections (UTIs) and their usually mild character means that most patients receive empirical antibiotic treatment. However, clinicians are now faced with major challenges due to multiple factors, including population aging, the presence of allergies or adverse reactions to antibiotics, an increased number of immunodepressed patients, and, especially, high rates of multi-resistant pathogens, which can cause therapeutic failure. A good alternative option may be to return to antibiotics such as fosfomycin and nitrofurantoin [1].

The characteristics of fosfomycin and nitrofurantoin make them especially useful for UTI treatment, including their rapid oral absorption, high urine concentration, and bactericidal activity against a wide range of Gram-negative and Gram-positive bacteria. Both are first-line treatments for non-complicated UTIs of community origin [2]. They have also been reported to preserve their activity against multi-resistant microorganisms, especially uropathogenic enterobacteria such as *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates [3], although these are usually less susceptible to fosfomycin and nitrofurantoin than are non-producers [4,5].

Currently, resistance to fosfomycin or nitrofurantoin is not common in our setting, and >85% of bacteria isolated in UTIs are susceptible to these antibiotics. Nonetheless, the gradual decrease in susceptibility to these drugs may lead to their contraindication as an empirical treatment in the future [1]. Any expansion of their clinical utilization would, therefore, require the adoption of epidemiological surveillance measures to detect the possible emergence of resistance [6]. With this background, the objective of this study was to explore possible molecular mechanisms underlying the resistance of clinical isolates of UTI-producing *E. coli* to fosfomycin and nitrofurantoin in our setting.

2. Methods

2.1. Bacterial Isolates

The study included clinical isolates of fosfomycin- and/or nitrofurantoin-resistant *E. coli* with significant bacterial count selected from among urine cultures conducted for UTI analysis in the Microbiology Laboratory of Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain). They were identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) as part of the routine microbiology laboratory workup [1]. A disk diffusion procedure (Kirby–Bauer) was also conducted on agar Mueller–Hinton plates, using McFarland 0.5 bacterial inoculum and disks with 200 µg fosfomycin supplemented with 50 µg glucose-6-phosphate (G6P) or disks with 300 µg nitrofurantoin. Each isolate was defined as “susceptible,” “intermediate,” or “resistant” according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints [7]. For fosfomycin, an inhibition zone diameter ≥ 16 mm was considered susceptible, 13–15 mm intermediate, and ≤ 12 mm resistant; for nitrofurantoin, an inhibition zone diameter of ≥ 17 mm was considered susceptible, 15–16 mm intermediate and ≤ 14 mm resistant. *E. coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was used as the control strain in the susceptibility assays.

Furthermore, in order to identify *E. coli* isolates producing fosfomycin resistance-mediating glutathione S-transferases, 20 µL sodium phosphonoformate (PPF) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was added at a concentration of 50 mg/mL on a second disk with 200 µg fosfomycin supplemented with 50 µg G6P, located at a distance of 30–35 mm from the first. After overnight incubation at 36 ± 1 °C, diameters of the growth inhibition zone were compared between the first disk (with PPF) and the second (without PPF). A difference of ≥ 5 mm between diameters was considered to confirm the phenotypic presence of the enzyme [8]. All assays were performed in duplicate.

2.2. Carbohydrate Utilization Test

All isolates were studied to determine the capacity for bacterial growth in the presence of a single source of carbon, *sn*-glycerol 3-phosphate (G3P), or G6P, using a previously described procedure [9]. After incubating bacteria in Mueller–Hinton broth for 24 h at 36 ± 1 °C in agitation, they were collected by centrifugation and resuspended in normal saline solution (0.9% NaCl). After five washes (to remove any remains that may act as carbon source), bacterial suspensions were then streaked onto M9 minimal medium agar supplemented with glucose (as a positive growth control), with G3P or G6P at 0.2% (w/v). Bacterial growth was determined after incubation at 36 ± 1 °C for 48 h. All assays were performed in duplicate. The absence of bacterial growth or poor growth with no colony formation in

media supplemented with G3P or G6P was considered to indicate GlpT or UhpT function deficiency, respectively [9].

2.3. PCR Amplification

Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify *murA*, *glpT*, *uhpT*, *uhpA*, *ptsI*, *cyaA*, *nfsA*, *nfsB*, and *ribE* genes of *E. coli*, using previously reported procedures [5,9], separately amplifying two fragments (*cyaA1* and *cyaA2*) for the *cyaA* gene. The primer pairs used are listed in Table 1. DNA was obtained from clinical isolates and *E. coli* ATCC 25922 (used as control strain) using the PureLink Microbiome DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). One microliter of the purified DNA was added to a master mix containing PCR buffer (1×), MgCl₂ (2 mM), dNTPs (0.4 mM), primers (0.4 μM), and Taq polymerase (1.25 U).

Table 1. Primers used for amplification and sequencing of the *Escherichia coli* genes involved in fosfomycin or nitrofurantoin resistance.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Amplicon Size (bp)	Reference
<i>murA</i>	5'-AAACAGCAGACGGTCTATGG-3'	5'-CCATGAGTTTATCGACAGAACG-3'	1542	
<i>glpT</i>	5'-GCGAGTCGCGAGTTTTCATTG-3'	5'-GGCAAATATCCACTGGCACC-3'	1785	
<i>uhpT</i>	5'-TTTTGAACGCCAGACACC-3'	5'-AGTCAGGGGCTATTTGATGG-3'	1667	[9]
<i>uhpA</i>	5'-GATCGCGGTGTTTTTCAG-3'	5'-GATACTCCACAGGCCAAAACC-3'	771	
<i>ptsI</i>	5'-GAAAGCGGTGAACATCTGG-3'	5'-TCCTTCTGTCTGTCGGAAAC-3'	1908	
<i>cyaA1</i>	5'-AACCAGGCGCGAAAAGTGG-3'	5'-TGATGGCTGATGATCGACTC-3'	1559	[9]
<i>cyaA2</i>	5'-AAAGTCAGCCGTGAACGC-3'	5'-ACCTTCTGGGATTGCTGG-3'	1648	This study
<i>nfsA</i>	5'-ATTTTCTCGGCCAGAAGTGC-3'	5'-AGAATTTCAACCAGGTGACC-3'	1036	[5]
<i>nfsB</i>	5'-CTTCGCGATCTGATCAACG-3'	5'-CAACAGCAGCCTATGATGAC-3'	923	
<i>ribE</i>	5'-AAGGGAAGCAGCGCACGAA-3'	5'-GGACAACCTGCCAGGAGTAGA-3'	634	This study
<i>fosA3</i>	5'-GCGTCAAGCCTGGCATT-3'	5'-GCCGTCAGGGTCGAGAAA-3'	282	[10]
<i>fosA4</i>	5'-CTGGCGTTTTATCAGCGGT-3'	5'-CTTCGCTGCGGTGTCTTT-3'	230	[11]
<i>fosA5</i>	5'-TATTAGCGAAGCCGATTTGCT-3'	5'-CCCCTATACGGCTGCTCG-3'	177	
<i>fosA6</i>	5'-GCTACGGTTCAGCTTCCAGA-3'	5'-CGAGCGTGGCGTTTTATCAG-3'	242	This study
<i>fosC2</i>	5'-CGTTCGTTGAGTTCTATAC-3'	5'-CTTGATAGGGTTTAGACTTC-3'	334	[8]
<i>oqxA</i>	5'-GACAGCGTCGCACAGAATG-3'	5'-GGAGACGAGGTGGTATGGA-3'	339	[12]
<i>oqxB</i>	5'-CGAAGAAAGACCTCCTACCC-3'	5'-CGCCGCAATGAGATACA-3'	240	

PCR amplification of *murA*, *glpT*, *uhpT*, *cyaA1*, *cyaA2*, *nfsA*, *nfsB*, and *ribE* genes was performed as follows: 2 min of denaturation at 94 °C, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and extension at 72 °C for 2 min (1 min for *nfsA*, *nfsB*, and *ribE*), with a final period of extension at 72 °C for 5 min. The same conditions were used for the amplification of *uhpA* and *ptsI* genes except that the annealing temperature was 57 °C.

For the isolates in which *uhpT* or *uhpA* genes could not be detected by the aforementioned procedure, a new PCR was designed using an outer primer pair (*uhpT*-F₂: 5'-GATGTTAATCGGTATGGCGGC-3'; *uhpT*-R₂: 5'-CAGTCGCTGGCGGAACAAAT-3'; *uhpA*-F₂: 5'-CGTAATTCTGGAGCTCACCG-3'; *uhpA*-R₂: 5'-CGCCTGCGTTAGCCAGTAA-3'). Besides re-amplification with outer primers, the amplification specificity was increased by using the forward outer primer with the reverse inner primer and the forward inner primer with the reverse outer primer.

Plasmid-borne fosfomycin resistance genes *fosA3*, *fosA4*, *fosA5*, *fosA6*, and *fosC2* and nitrofurantoin resistance genes *oqxA* and *oqxB* were screened by PCR amplification with the primers listed in Table 1, following previously reported procedures [8,10–12].

All PCR products were separated in 0.8% agarose gel and visualized under UV light after staining with ethidium bromide.

2.4. Nucleotide Sequencing

Pools of 8 and 10 amplicons were established, and each amplicon was equimolarly normalized in the pool. Each pool was tagged (tagged and fragmented) using the Nextera XT transposome, which fragments the DNA and then tags it with adapter sequences in a single step. The tagged DNA was amplified with 12 PCR cycles. The PCR step also adds index 1 (i7), index 2 (i5), and full adapter sequences required for cluster formation. Each DNA sample was purified using 30 μ L of AMPure XP beads and was resuspended in 50 μ L of water. Then, it was quantified using a Qubit[®] 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) and normalized. Pools were sequenced in a high cartridge of 300 cycles using a NextSeq platform. Data were mapped against the reference sequence of *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 (NCBI Reference Sequence: NC_000913.3). A BAM file was generated, followed by a variant calling, and the most representative variants were recorded. The online Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN) platform (<http://provean.jcvi.org/index.php>) was used to predict the impact of identified amino acid substitutions on the biological function of each protein [13]. PROVEAN is able to provide predictions for any type of protein sequence variation, including single or multiple amino acid substitutions, insertions, or deletions. The platform introduces a delta alignment score based on the reference and variant versions of a protein query sequence with respect to sequence homologs collected from the NCBI protein database through BLAST. If the PROVEAN score (P-score) was equal to or below a predefined cutoff of -2.5 , the protein variant was predicted to have a "deleterious" effect (potential loss of protein structure or function). If the P-score was above the threshold, the variant was predicted to have a "neutral" effect (no alteration in the structure or function of the protein).

3. Results

A total of 29 fosfomycin- and/or nitrofurantoin-resistant clinical isolates were identified: 8 were resistant to both fosfomycin and nitrofurantoin, 14 were resistant to fosfomycin and susceptible to nitrofurantoin, and 7 were susceptible to fosfomycin and resistant to nitrofurantoin. Figure 1 depicts PCR amplification of chromosomal genes *murA*, *glpT*, *uhpT*, *uhpA*, *ptsI*, *cyaA* (*cyaA1* and *cyaA2*), *nfsA*, *nfsB*, and *ribE* in *E. coli* ATCC 25922.

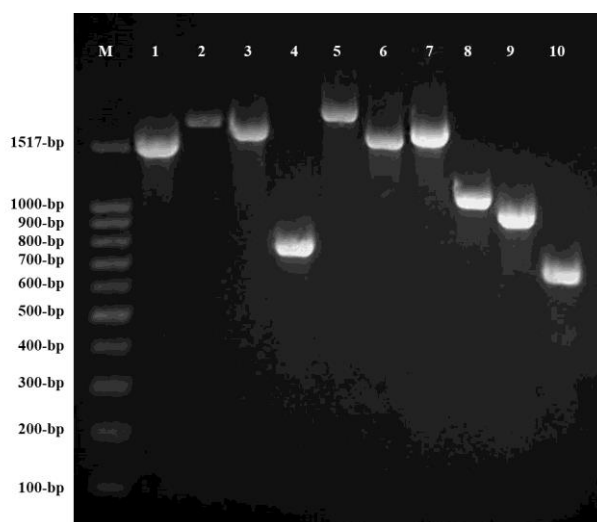


Figure 1. Electrophoresis results of polymerase chain reaction (PCR) products in *Escherichia coli* ATCC 25922 on 0.8% agarose gel. M: Molecular weight. Lines 1 to 10: PCR products of *murA* (1542 bp), *glpT* (1785 bp), *uhpT* (1667 bp), *uhpA* (771 bp), *ptsI* (1908 bp), *cyaA1* (1559 bp), *cyaA2* (1648 bp), *nfsA* (1036 bp), *nfsB* (923 bp), and *ribE* (634 bp), respectively.

3.1. Fosfomycin Resistance

Table 2 summarizes the characteristics of the 22 fosfomycin-resistant (inhibition zone diameter ≤ 12 mm around the disk with 200 μg fosfomycin supplemented with 50 μg glucose-6-phosphate) and 7 fosfomycin-susceptible (inhibition zone diameter ≥ 16 mm around the disk with 200 μg fosfomycin supplemented with 50 μg glucose-6-phosphate) clinical isolates of *E. coli* according to the CLSI procedure, displaying the diameter of the bacterial growth inhibition in the presence of PPF, the bacterial growth capacity in the presence of G3P or G6P as sole carbon source, and the amino acid substitutions in MurA, GlpT, UhpT, UhpA, PtsI, and CyaA proteins detected in each isolate.

Three of the twenty-two fosfomycin-resistant isolates (strains 789, 809, and 853) showed a single substitution in the amino acid sequence of MurA (Leu370Ile), categorized as neutral (no alteration in structure or function of the protein) in the PROVEAN analysis (P-score: -1.995).

Twelve amino acid substitutions were detected in GlpT: Glu448Lys (P-score: 0.486, categorized as neutral), in all isolates, both resistant and susceptible; Ala16Thr (P-score: -0.713 , categorized as neutral), and Phe133Cys (P-score: -5.549), Gly135Trp (P-score: -7.756), Ala197Val (P-score: -3.472), and Leu373Arg (P-score: -5.328), all categorized as deleterious (potential loss of protein structure or function), in susceptible isolates alone; and Met52Leu (P-score: -1.261), Leu297Phe (P-score: -2.375), Glu443Gln (P-score: 0.014), and Gln444Glu (P-score: -0.106), all four categorized as neutral, and Gly84Asp (P-score: -6.056) and Pro212Leu (P-score: -9.698), both categorized as deleterious, in resistant isolates alone.

No amplification product of the *uhpT* gene was obtained from strains 11 and 26 using the two primer pairs reported above (loss of entire gene). Amino acid substitution in UhpT (Glu350Gln), categorized as neutral (P-score: -0.016), was observed in 16 of the 22 fosfomycin-resistant isolates but in none of the susceptible isolates.

The *uhpA* gene was detected in all fosfomycin-susceptible isolates, and two of these showed substitution of Arg46Cys in the protein sequence, categorized as neutral (P-score: -0.268). By contrast, this gene was detected in only 1 of the 22 fosfomycin-resistant isolates: strain 26 (wild-type).

Three amino acid substitutions were detected in PtsI: Arg367Lys (P-score: 0.842), in all isolates, both resistant and susceptible; Ala306Thr (P-score: 0.030), in two susceptible isolates alone; and Val25Ile (P-score: -0.606), in 10 resistant isolates alone; and all three substitutions were categorized as neutral in the PROVEAN analysis.

Finally, 11 amino acid substitutions were detected in CyaA: Asn142Ser (P-score: 0.016, categorized as neutral), in all isolates; Gly222Ser (P-score: -3.447 , categorized as deleterious), in one of the seven susceptible isolates; Ala349Glu (P-score: 2.261), Glu362Asp (P-score: -0.286), Asp837Glu (P-score: 0.123), and Thr840Ala (P-score: -0.314) all four categorized as neutral; and Ser356Leu (P-score: -2.624) and Gly359Glu (P-score: -3.077) both categorized as deleterious, in some susceptible and resistant isolates; and Ala363Ser (P-score: 0.900), Ala363Gly (P-score: -0.251), and Ser352Thr (P-score: -0.645) all three categorized as neutral, in fosfomycin-resistant isolates alone.

The effect of these amino acid substitutions on transporters GlpT and UhpT in resistant and susceptible isolates was evaluated by testing bacterial growth on M9 minimal medium agar supplemented with G3P or G6P (substrates for GlpT or UhpT, respectively). As reported in Table 2, all isolates grew on M9 medium with G3P, indicating no significant loss of GlpT function with any substitution detected in the amino acid sequence of this transporter. However, fosfomycin-resistant isolates did not grow or showed poor growth on the medium containing G6P, because of the loss of function of UhpT due to the complete deletion of *uhpT* (strains 11 and 26) and/or *uhpA* genes (strains 11, 17, 66, 381, 387, 462, 632, 752, 757, 776, 789, 792, 795, 799, 809, 853, 854, 860, 871, 883 and 891).

Table 2. Susceptibility to fosfomycin according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) procedure and supplemented with phosphonate (PPF); bacterial growth on M9 minimal medium agar supplemented with *sn*-glycerol 3-phosphate (G3P) or glucose-6-phosphate (G6P); and amino acid substitutions in MurA, GlpT, UhpT, UhpA, PtsI, and CyaA proteins in 29 clinical isolates of *Escherichia coli*.

Strain	Fosfomycin Disk ¹	Clinical Category ²	Fosfomycin Disk Plus PPF ³	G3P ⁴	G6P ⁵	MurA	GlpT	Amino Acid Substitutions in UhpT
11	6	R	6	+	–	None	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Not detected
17	6	R	6	+	–	None	Glu448Lys	Glu350Gln
26	12	R	12	+	– ^a	None	Gly84Asp Glu448Lys	Not detected
66	6	R	13	+	–	None	Glu448Lys	Glu350Gln
302	29	S	30	+	+	None	Glu448Lys	None
334	31	S	32	+	+	None	Glu448Lys	None

Table 2. Cont.

Strain	Fosfomycin Disk ¹	Clinical Category ²	Fosfomycin Disk Plus PPF ³	G3P ⁴	G6P ⁵	MurA	GlpT	Amino Acid Substitution UhpT
381	6	R	6	+	–	None	Glu448Lys	Glu350Gln
387	6	R	6	+	–	None	Glu448Lys	Glu350Gln
462	12	R	13	+	–	None	Glu448Lys	Glu350Gln
632	6	R	6	+	–	None	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln
751	30	S	32	+	+	None	Ala16Thr Glu448Lys	None
752	11	R	11	+	–	None	Pro212Leu Glu448Lys	Glu350Gln

Table 2. Cont.

Strain	Fosfomycin Disk ¹	Clinical Category ²	Fosfomycin Disk Plus PPF ³	G3P ⁴	G6P ⁵	MurA	GlpT	Amino Acid Substitution UhpT
757	6	R	6	+	– ^a	None	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	None
776	12	R	12	+	– ^a	None	Glu448Lys	Glu350Gln
789	6	R	6	+	–	Leu370Ile	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln
792	6	R	6	+	–	None	Glu448Lys	Glu350Gln
795	6	R	6	+	–	None	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln

Table 2. Cont.

Strain	Fosfomycin Disk ¹	Clinical Category ²	Fosfomycin Disk Plus PPF ³	G3P ⁴	G6P ⁵	MurA	GlpT	Amino Acid Substitution UhpT
797	20	S	21	+	+	None	Ala16Thr Leu373Arg Glu448Lys	None
799	6	R	7	+	–	None	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	None
802	30	S	30	+	+	None	Phe133Cys Gly135Trp Ala197Val Glu448Lys	None
809	6	R	6	+	–	Leu370Ile	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln
853	6	R	8	+	–	Leu370Ile	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln

Table 2. Cont.

Strain	Fosfomycin Disk ¹	Clinical Category ²	Fosfomycin Disk Plus PPF ³	G3P ⁴	G6P ⁵	MurA	GlpT	Amino Acid Substitutions UhpT
854	6	R	6	+	–	None	Glu448Lys	None
860	6	R	7	+	–	None	Met52Leu Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	None
871	6	R	14	+	– ^a	None	Leu297Phe Glu443Gln Gln444Glu Glu448Lys	Glu350Gln
872	35	S	35	+	+	None	Glu448Lys	None
883	11	R	12	+	–	None	Glu448Lys	Glu350Gln
891	11	R	11	+	–	None	Glu448Lys	Glu350Gln
892	21	S	21	+	+	None	Glu448Lys	None

¹ Diameter (in mm) of the bacterial growth inhibition halo around the disk with 200 µg fosfomycin supplemented with 50 µg glucose-6-phosphate. ² Clinical categories of each isolate against fosfomycin according to CLSI breakpoints (S: susceptible; R: resistant). ³ Diameter (in mm) of the bacterial growth inhibition halo around the disk with 200 µg fosfomycin supplemented with 50 µg glucose-6-phosphate and 20 µL sodium phosphonoformate (PPF) in order to identify *E. coli* isolates producing glutathione S-transferases (between-diameter difference of ≥5 mm considered to confirm the phenotypic presence of the enzyme). ⁴ Bacterial growth on M9 minimal medium agar supplemented with 0.2% *sn*-glycerol 3-phosphate (all isolates showed growth). ⁵ Bacterial growth on M9 minimal medium agar supplemented with 0.2% *sn*-glycerol 3-phosphate. ^a Only poor growth was observed after 48 h of incubation. Not detected: gene not detected by PCR after amplification with specific primers (loss of the entire gene). None: no amino acid substitutions found.

Furthermore, fosfomycin resistance-mediating glutathione S-transferase was observed in two of the fosfomycin-resistant isolates (strains 66 and 871) due to a significantly increased bacterial growth inhibition halo (≥ 5 mm) in the presence of PPF (Table 2). This phenotypic finding was confirmed by PCR amplification of the *fosA3* gene in both isolates (Figure 2). No *fosA4*, *fosA5*, *fosA6*, and *fosC2* plasmid genes were detected in any isolate.

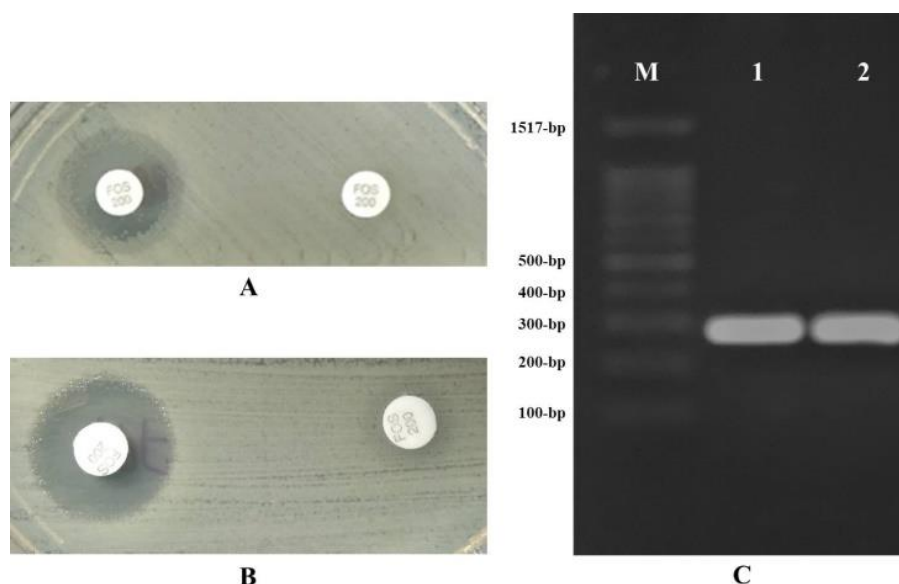


Figure 2. Detection of fosfomycin resistance-mediating glutathione S-transferase (sodium phosphonoformate test) and *fosA3* gene (electrophoresis) in strains 66 and 871. (A,B) Phenotypic detection of fosfomycin resistance-mediating glutathione S-transferase in strains 66 and 871, respectively, showing an increase of ≥ 5 mm in growth inhibition halo around the disk of 200 μg fosfomycin supplemented with 50 μg G6P plus sodium phosphonoformate in comparison to the disk containing 200 μg fosfomycin supplemented with 50 μg G6P alone. All assays were performed in duplicate in all isolates, obtaining the same between-assay results; (C) Electrophoresis results for the PCR products of *fosA3* gene (282 bp) on 0.8% agarose gel in strains 66 (line 1) and 871 (line 2). M: molecular weight.

3.2. Nitrofurantoin Resistance

Table 3 summarizes the characteristics of the 15 nitrofurantoin-resistant or intermediate isolates (inhibition zone diameter ≤ 14 mm or 13–15 mm, respectively, around the disk with 300 μg nitrofurantoin) and the 14 nitrofurantoin-susceptible (inhibition zone diameter ≥ 17 mm around the disk with 300 μg nitrofurantoin) clinical isolates of *E. coli* according to the CLSI procedure. Amino acid substitutions in NfsA, NfsB, or RibE proteins were detected in all isolates.

Among the 15 nitrofurantoin-resistant or nitrofurantoin-intermediate and 14 nitrofurantoin-susceptible isolates, 14 amino acid substitutions were detected in the NfsA protein: Glu58Asp (P-score: -1.866), Ile117Thr (P-score: -0.634), Lys141Glu (P-score: 1.207), Gln147Arg (P-score: -1.170), and Gly187Asp (P-score: 1.554) all of these categorized as neutral in the PROVEAN analysis (no alteration in structure or function of the protein), in susceptible isolates; Asp19Asn (P-score: -2.091) and Ser180Asn (P-score: 0.071) both categorized as neutral, and His11Tyr (P-score: -5.746), Ser33Arg (P-score: -2.526), Gln67Leu (P-score: -5.860), Cys80Arg (P-score: -11.148), Gly126Arg (P-score: -7.544), Gly154Glu (P-score: -7.608), and Arg203Cys (P-score: -7.090) all of these categorized as deleterious (potential loss of protein structure or function), only in isolates with some level of resistance (resistant or intermediate). In addition, a single nucleotide mutation in the *nfsA* gene was detected in strains 757 and 802, leading to truncation of the NfsA sequence in Gln67 (Gln67stop; CAA to TAA) and Gln147 (Gln147stop; CAG to TAG), respectively. These mutations produced 66 and 146 amino acid long proteins, respectively, instead of a wild-type protein with 240 amino acids.

Table 3. Susceptibility to nitrofurantoin according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) procedure and amino acid substitutions in NfsA, NfsB, or RibE proteins of 29 clinical isolates of *Escherichia coli*.

Strain	Nitrofurantoin Disk ¹	Clinical Category ²	Amino Acid Substitutions in		
			NfsA	NfsB	RibE
11	11	R	Ile117Thr Gly126Arg Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Truncated at Glu54	None
17	27	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	None
26	24	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	None
66	14	R	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu Arg207His	None
302	14	R	None	Gly66Asp Met75Ile Val93Ala Ala174Glu Arg207His	None
334	15	I	Gln67Leu	Gly66Asp Met75Ile Val93Ala Arg107Cys	Pro55His
381	25	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	None
387	21	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	None
462	14	R	Cys80Arg Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu Gly192Ser	None
632	20	S	Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	None
751	14	R	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp Arg203Cys	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Val51Ile
752	22	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	None

Table 3. Cont.

Strain	Nitrofurantoin Disk ¹	Clinical Category ²	Amino Acid Substitutions in		
			NfsA	NfsB	RibE
757	16	I	Glu58Asp Truncated at Gln67	Val93Ala Lys122Arg	None
776	19	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	None
789	24	S	Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	None
792	25	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	None
795	16	I	His11Tyr Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	None
797	12	R	Ile117Thr Lys141Glu Gly154Glu Gly187Asp	Leu22Ile Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	Val51Ile
799	13	R	Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	None
802	12	R	Truncated at Gln147	Met75Ile Val93Ala	None
809	28	S	Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	None
853	20	S	Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	None
854	16	I	None	Gly66Asp Met75Ile Val93Ala	None
860	20	S	Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	None

Table 3. Cont.

Strain	Nitrofurantoin Disk ¹	Clinical Category ²	Amino Acid Substitutions in		
			NfsA	NfsB	RibE
871	24	S	Glu58Asp Ile117Thr Lys141Glu Gln147Arg Gly187Asp	Val93Ala	None
872	15	I	Asp19Asn Ser33Arg Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gln44His Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	None
883	13	R	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Phe84Ser Val93Ala Ala174Glu	None
891	23	S	Ile117Thr Lys141Glu Gly187Asp	Gly66Asp Val93Ala Ala174Glu	None
892	10	R	None	Gly66Asp Met75Ile Val93Ala	None

¹ Diameter (in mm) of bacterial growth inhibition halo around the disk with 300 µg nitrofurantoin. ² Clinical categories of each isolate against nitrofurantoin according to CLSI breakpoints (S: susceptible; I: intermediate; R: resistant). None: no amino acid substitutions were found.

Eleven amino acid substitutions were detected in NfsB: Gly66Asp (P-score: −1.775), Val93Ala (P-score: 2.155), and Ala174Glu (P-score: 1.621) all of these categorized as neutral, in susceptible isolates; and Leu22Ile (P-score: 0.334), Met75Ile (P-score: 2.094), and Lys122Arg (P-score: −0.179) all of these categorized as neutral, and Gln44His (P-score: −4.800), Phe84Ser (P-score: −5.862), Arg107Cys (P-score: −7.863), Gly192Ser (P-score: −5.961), and Arg207His (P-score: −4.966) all of these categorized as deleterious, in isolates with some level of resistance (resistant or intermediate). In addition, a single nucleotide mutation in the *nfsB* gene (GAA to TAA) was detected in strain 11, leading to a truncation of the NfsB sequence in Glu54.

Two amino acid substitutions in RibE were detected in three isolates with some level of resistance: Val51Ile (P-score: −0.363, categorized as neutral) and Pro55His (P-score: −8.840, categorized as deleterious). Finally, no *oqxAB* plasmid gene was detected in any isolate.

4. Discussion

4.1. Mechanisms of Resistance to Fosfomycin in *E. coli*

Mechanisms of resistance to fosfomycin described in various bacteria include the modification or overexpression of target molecule MurA, a reduced permeability, and irreversible antibiotic modification. The first two mechanisms are chromosomal, whereas the third can be chromosomal or encoded in transferable multi-resistance plasmids [14].

4.1.1. Modification or Overexpression of the Target (MurA)

The main action mechanism of fosfomycin is inhibition of the first step of peptidoglycan synthesis. Its chemical structure is analogous to that of phosphoenolpyruvate (PEP), therefore blocking the active center of enzyme UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA), covalently binding to the residue of cysteine Cys115 and preventing the binding of the substrate with the enzyme. In *E. coli*,

amino acid substitutions in the active center of MurA, specifically Cys115Asp, are related to fosfomycin resistance [15] but are not common in clinical isolates of this species due to a drastic reduction in bacterial cell viability [16]. Only a few reports have associated amino acid substitutions in the MurA sequence of *E. coli* with resistance, especially Asp369Asn and Leu370Ile [9]. The latter was detected in 3 of the 22 fosfomycin-resistant isolates in the present study (strains 789, 809, and 853) but the protein variant was predicted to have a neutral effect in the PROVEAN analysis, with no alteration in the structure or function of the protein. Although previous crystallization studies found that leucine in position 370 of MurA does not interfere with its binding to fosfomycin, the fact that it is a highly preserved residue suggests an important role in the binding of PEP and therefore fosfomycin to the active site of the enzyme [9].

4.1.2. Permeability Reduction

Fosfomycin can use two transport systems to access the bacterial cytoplasm: glycerol-3-phosphate transporter (GlpT) and hexose phosphate transporter (UhpT). They are induced by the presence of their substrates (G3P and G6P, respectively) and require high levels of cyclic AMP (cAMP), whose synthesis depends on the enzyme adenylate cyclase (CyaA) and is regulated by the phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (PtsI) system. The expression of GlpT is determined by a repressor gene, *glpR*, given that the interaction of GlpR with G3P increases transcription of the *glpT* gene. The expression of UhpT is in turn controlled by various regulating genes (*uhpA*, *uhpB*, and *uhpC*) [14]. This mechanism of action is unique; it does not confer cross-resistance to other antibiotics and it favors additive action with beta-lactams, aminoglycosides, glycopeptides, and fluoroquinolones, among others [17].

GlpT and UhpT are transporters with an extensive amino acid sequence homology that appear in several bacterial species with a high degree of conservation [14]. Various studies of *E. coli* have identified modifications of these proteins and/or proteins that regulate their expression (UhpA, PtsI, and CyaA) due to gene mutations or complete loss [9,18–21]. However, although the most important fosfomycin-resistance mechanism in this bacterium, modifications in chromosomal genes *uhpT*, *glpT*, *uhpA*, *ptsI*, or *cyaA* are reported to carry a high fitness cost, and clinical isolates with this resistance are known to be outcompeted by isolates susceptible to fosfomycin [22].

In the present study, all clinical isolates of *E. coli* presented substitutions in the amino acid sequence of GlpT. Some of them were detected in fosfomycin-susceptible isolates (Ala16Thr, Phe133Cys, Gly135Trp, Ala197Val, Leu373Arg, and Glu448Lys). Hence, these substitutions do not appear to be related per se to an alteration in GlpT function or resistance to the antibiotic. Other substitutions were solely detected in resistant isolates (Met52Leu, Leu297Phe, Glu443Gln, and Gln444Glu) but were classified as neutral in the PROVEAN analysis and would have no impact on the biological function of this protein. According to the PROVEAN analysis, only Gly84Asp and Pro212Leu substitutions could be significantly related to an alteration of GlpT functionality; however, the two isolates with this substitution (strains 26 and 752) proved able to grow in the presence of G3P. Hence, all isolates grew on M9 medium with G3P, indicating no significant loss of GlpT function with any substitution detected in the amino acid sequence of this transporter.

Among the 22 fosfomycin-resistant *E. coli* isolates, 4 showed no amino acid substitution in UhpT, 16 showed one substitution (Glu350Gln) and 2 were defective in UhpT due to gene loss (strains 11 and 26). We highlight that the *uhpA* gene was detected in strain 26 alone and that none of the 22 fosfomycin-resistant isolates were able to grow in the presence of G6P. In the UhpA sequence, the only substitution was Arg46Cys, which was only detected in two fosfomycin-susceptible isolates; therefore, it does not appear to be related per se to an alteration in the function of these proteins or to antibiotic resistance. According to our findings, all of the resistant isolates analyzed were defective in the UhpT transport system due to *uhpT* and/or *uhpA* deletion and showed no growth or only poor growth in a medium containing G6P as sole carbon source. Therefore, this finding supports the hypothesis that fosfomycin resistance in *E. coli* is most frequently attributable to blockage of the entry pathway of

the antibiotic into the bacteria, mainly due to modifications in the UhpT transporter or its regulating proteins [18,19].

All of the *E. coli* clinical isolates in the present study showed substitutions in PtsI and CyaA. Given that some of these were detected in fosfomycin susceptible isolates (Ala306Thr and Arg367Lys in PtsI; Asn142Ser, Gly222Ser, Ala349Glu, Ser356Leu, Gly359Glu, Glu362Asp, Asp837Glu, and Thr840Ala in CyaA), they do not appear to be related per se to an alteration in the function of these proteins or to antibiotic resistance. Some other substitutions in these proteins were only detected in resistant isolates (Val25Ile in PtsI; Ser352Thr, Ala363Ser, and Ala363Gly in CyaA), as in previous studies [9]; nevertheless, their contribution to antibiotic resistance in these isolates cannot be affirmed, given that they were categorized as neutral in the PROVEAN analysis and there was no alteration in the function of GlpT, which was permeable to G3P. Therefore, it cannot be affirmed that amino acid substitutions in PtsI and CyaA contributed to resistance to fosfomycin in the clinical isolates of *E. coli* in the present study.

4.1.3. Enzymatic Modification of Fosfomycin

Two mechanisms may underlie fosfomycin resistance due to the action of modifying enzymes: epoxide ring opening, catalyzed by FosA enzymes (glutathione S-transferase), FosB (L-cysteine thiol transferase), or FosX (hydrolase epoxide); or antibiotic phosphorylation by FomA, FomB, or FosC enzymes [23]. Among these enzymes, FosA3 is the most widely described in *E. coli* plasmids, largely in Eastern Asia countries, although its detection is infrequent in Europe [11]. To our knowledge, this is the first time that the *fosA3* gene has been detected in clinical isolates of *E. coli* in Spain (strains 66 and 871). Both isolates were also defective in the UhpT transport system due to *uhpA* deletion; however, the importance of this finding is that this plasmid-mediated gene may accelerate the dissemination of fosfomycin resistance in the near future.

4.2. Mechanisms of Resistance to Nitrofurantoin in *E. coli*

Nitrofurantoin is a prodrug of the nitrofuran family and exerts its antibiotic activity via multiple mechanisms of action, although none have been fully elucidated. It is known to inhibit: (i) protein synthesis, (ii) aerobic metabolism, (iii) nucleic acid synthesis, and (iv) cell wall synthesis. Its active form is generated within the bacterium by the action of nitroreductase enzymes, which reduce the nitro group coupled to the furan heterocyclic ring, giving rise to active intermediate metabolites that inhibit the synthesis of proteins involved in DNA, RNA, and carbohydrate metabolism.

Various studies have attributed resistance to nitrofurantoin in *E. coli* to the loss of intracellular nitroreductase activity via sequential mutations in *nfsA* and *nfsB* genes, which encode oxygen-insensitive nitroreductases, as well as to deletions affecting the active center of *ribE*, although the latter have not yet been reported in clinical isolates. Mutations in genes encoding oxygen-sensitive nitroreductases have not yet been described [5,24]. However, as in the case of fosfomycin, this nitrofurantoin resistance is reported to confer a high biological cost, and clinical isolates with this resistance are known to be outcompeted by susceptible isolates, reducing the likelihood of its detection in clinical isolates [5].

All *E. coli* clinical isolates in the present study showed substitutions in the amino acid sequence of NfsA and/or NfsB. As reported above, some were detected in nitrofurantoin-susceptible isolates (Glu58Asp, Ile117Thr, Lys141Glu, Gln147Arg, and Gly187Asp in NfsA; and Gly66Asp, Val93Ala, and Ala74Glu in NfsB). Although some of these (positions Ile117 and Lys141 in NfsA; Gly66 and Val93 in NfsB) have been associated with resistance in other studies [5,24,25], they were all classified as neutral in the PROVEAN analysis. Hence, none of these substitutions appear to be related per se to an alteration in the function of these proteins or to resistance to the antibiotic.

Other substitutions were detected in resistant isolates alone (His11Tyr, Asp19Asn, Ser33Arg, Gln67Leu, Cys80Arg, Gly126Arg, Gly154Glu, Ser180Asn, Arg203Cys, and truncation at Gln67 and Gln147 in NfsA; Leu22Ile, Gln44His, Met75Ile, Phe84Ser, Arg107Cys, Lys122Arg, Gly192Ser, Arg207His, and truncation at Glu54 in NfsB; Val51Ile and Pro55His in RibE). Some of these (His11, Ser33, Gln67, Gln147, and Arg203 in NfsA; Gln44, Met75, Arg107, Lys122, Gly192, and Arg207 in NfsB)

have been associated with nitrofurantoin resistance in other studies [5,24–26]. According to the PROVEAN analysis, His11Tyr, Ser33Arg, Gln67Leu, Cys80Arg, Gly126Arg, Gly154Glu, and Arg203Cys in NfsA; Gln44His, Phe84Ser, Arg107Cys, Gly192Ser, and Arg207His in NfsB; and Pro55His in RibE were predicted to have a deleterious impact on the protein structure. Production of truncated NfsA (Gln67 and Gln147) or NfsB (Glu54) may have resulted in the inability or reduced ability of nitrofurantoin-resistant isolates to reduce the nitrofurantoin and produce active intermediates from the compound. Hence, these amino acid substitutions and/or truncated proteins would be related to nitrofurantoin resistance.

According to various studies, NfsA inactivation followed by NfsB inactivation is the main mechanism for high-level nitrofurantoin resistance in *E. coli* [5,26]. However, several of our nitrofurantoin-resistant clinical isolates did not show any modification in the NfsA sequence compatible with resistance (strains 66, 302, 799, 854, 883, and 892). Among these six isolates, we only detected substitutions in the NfsB sequence compatible with resistance (Arg207His) in the first two. However, we cannot affirm its association with resistance in the other four, although they presented various amino acid substitutions. Therefore, the mechanism that produces nitrofurantoin resistance in these four isolates is yet to be elucidated. Some authors have affirmed that NfsB inactivation in the presence of a wild-type *nfsA* gene cannot be associated with resistance [26]; in contrast, according to our findings, certain NfsB modifications requiring no previous NfsA alterations may be responsible for the functional alteration of bacterial nitroreductases, as also previously reported [24].

More recently, it has been reported that the presence of OqxAB (a plasmid-encoded multidrug efflux pump that confers reduced susceptibility to quinolones, tigecycline, chloramphenicol, trimethoprim, and disinfectants such as quaternary ammonium compounds) would also enhance nitrofurantoin resistance via an active antibiotic expulsion mechanism in *E. coli* isolates with previous nitroreductase modifications, because it has not been possible to relate the presence of OqxAB per se in the bacterium to antibiotic resistance levels [27]. This plasmid has been widely detected in *E. coli* and other enterobacteria, both in human and animal isolates, mainly in China [25,27]; although its presence has also been reported in Europe [28,29], including Spain [30]. However, this plasmid was not detected in any of our series of isolates, indicating that nitrofurantoin resistance must involve mechanisms other than antibiotic extrusion.

Finally, as in the present study, there have been reports of nitrofurantoin-resistant *E. coli* isolates with no amino acid substitutions in NfsA, NfsB, and RibE, or presence of the *oqxAB* plasmid, indicating the need to identify new mechanisms that explain nitrofurantoin resistance in this bacterium [27].

5. Conclusions

These results suggest that the emergence of fosfomicin resistance in clinical isolates of *E. coli* in our setting is largely attributable to the absence of expression of transporter UhpT due to complete deletion of the *uhpT* and/or *uhpA* regulating genes, reducing the permeability of the bacterium to the antibiotic. To our knowledge, we report for the first time the presence in Spain of the plasmid gene *fosA3*, responsible for the enzyme glutathione S-transferase, which inactivates the antibiotic. We consider this finding to be of major epidemiological importance, given its potential dissemination not only in *E. coli* but also other bacteria. Nitrofurantoin resistance can be explained, at least in part, by the presence of specific modifications in NfsA, NfsB, or RibE proteins. The presence of *oqxAB* plasmid genes does not appear to represent an important resistance mechanism among *E. coli* clinical isolates in our setting at the present time. The emergence and spread of these resistance mechanisms, including transferable resistance, could compromise the future usefulness of fosfomicin and nitrofurantoin against UTIs.

Author Contributions: Conceptualization: A.S.-P. and J.G.-F.; Methodology: A.S.-P., I.L.-M., M.A.-C., L.J.M.-G. and J.G.-F.; Formal Analysis: A.S.-P. and I.L.-M.; Investigation: A.S.-P., I.L.-M. and M.A.-C.; Validation: A.S.-P. and J.G.-F.; Writing—Original Draft Preparation: A.S.-P.; Writing—Review & Editing: A.S.-P., I.L.-M. and J.G.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgments: The authors are grateful to Concepción Gimeno Cardona, Head of the Microbiology Laboratory of the University General Hospital of Valencia, Associate Professor of Microbiology at Valencia University and Coordinator of the External Quality Control Program of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (Spanish abbreviation: SEIMC), for critically reviewing the article and providing input into the final paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sorlozano, A.; Jimenez-Pacheco, A.; de Dios Luna Del Castillo, J.; Sampedro, A.; Martinez-Brocal, A.; Miranda-Casas, C.; Navarro-Marí, J.M.; Gutiérrez-Fernández, J. Evolution of the resistance to antibiotics of bacteria involved in urinary tract infections: A 7-year surveillance study. *Am. J. Infect. Control* **2014**, *42*, 1033–1038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Vardakas, K.Z.; Legakis, N.J.; Triarides, N.; Falagas, M.E. Susceptibility of contemporary isolates to fosfomycin: A systematic review of the literature. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2016**, *47*, 269–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Falagas, M.E.; Kastoris, A.C.; Kapaskelis, A.M.; Karageorgopoulos, D.E. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum beta-lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: A systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 43–50. [[CrossRef](#)]
4. Sánchez-García, J.M.; Sorlózano-Puerto, A.; Navarro-Marí, J.M.; Gutiérrez Fernández, J. Evolution of the antibiotic-resistance of microorganisms causing urinary tract infections: A 4-year epidemiological surveillance study in a hospital population. *Rev. Clin. Esp.* **2019**, *219*, 116–123. [[CrossRef](#)]
5. Sandegren, L.; Lindqvist, A.; Kahlmeter, G.; Andersson, D.I. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *62*, 495–503. [[CrossRef](#)]
6. Giske, C.G. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21*, 899–905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 27th ed.; CLSI supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2017.
8. Nakamura, G.; Wachino, J.; Sato, N.; Kimura, K.; Yamada, K.; Jin, W.; Shibayama, K.; Yagi, T.; Kawamura, K.; Arakawa, Y. Practical agar-based disk potentiation test for detection of fosfomycin-nonsusceptible *Escherichia coli* clinical isolates producing glutathione S-transferases. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 3175–3179. [[CrossRef](#)]
9. Takahata, S.; Ida, T.; Hiraishi, T.; Sakakibara, S.; Maebashi, K.; Terada, S.; Muratani, T.; Matsumoto, T.; Nakahama, C.; Tomono, K. Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 333–337. [[CrossRef](#)]
10. Hou, J.; Huang, X.; Deng, Y.; He, L.; Yang, T.; Zeng, Z.; Chen, Z.; Liu, J.H. Dissemination of the fosfomycin resistance gene *fosA3* with CTX-M β -lactamase genes and *rmtB* carried on IncFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2135–2138. [[CrossRef](#)]
11. Benzerara, Y.; Gallah, S.; Hommeril, B.; Genel, N.; Decré, D.; Rottman, M.; Arlet, G. Emergence of plasmid-mediated fosfomycin-resistance genes among *Escherichia coli* isolates, France. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1564–1567. [[CrossRef](#)]
12. Chen, X.; Zhang, W.; Pan, W.; Yin, J.; Pan, Z.; Gao, S.; Jiao, X. Prevalence of *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 3423–3427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Choi, Y.; Chan, A.P. PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 2745–2747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Castañeda-García, A.; Blázquez, J.; Rodríguez-Rojas, A. Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomycin resistance. *Antibiotics* **2013**, *2*, 217–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kim, D.H.; Lees, W.J.; Kempell, K.E.; Lane, W.S.; Duncan, K.; Walsh, C.T. Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry* **1996**, *35*, 4923–4928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Herring, C.D.; Blattner, F.R. Conditional lethal amber mutations in essential *Escherichia coli* genes. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 2673–2681. [[CrossRef](#)]
17. Falagas, M.E.; Vouloumanou, E.K.; Samonis, G.; Vardakas, K.Z. Fosfomycin. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, *29*, 321–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lucas, A.E.; Ito, R.; Mustapha, M.M.; McElheny, C.L.; Mettus, R.T.; Bowler, S.L.; Kantz, S.F.; Pacey, M.P.; Pasculle, A.W.; Cooper, V.S.; et al. Frequency and mechanisms of spontaneous fosfomycin nonsusceptibility observed upon disk diffusion testing of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *56*, e01368-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Tseng, S.P.; Wang, S.F.; Kuo, C.Y.; Huang, J.W.; Hung, W.C.; Ke, G.M.; Lu, P.L. Characterization of fosfomycin resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from human and pig in Taiwan. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wachino, J.; Yamane, K.; Suzuki, S.; Kimura, K.; Arakawa, Y. Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 3061–3064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Li, Y.; Zheng, B.; Li, Y.; Zhu, S.; Xue, F.; Liu, J. Antimicrobial susceptibility and molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical *Escherichia coli* isolates in Mainland China. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135269. [[CrossRef](#)]
22. Nilsson, A.I.; Berg, O.G.; Aspevall, O.; Kahlmeter, G.; Andersson, D.I. Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2850–2858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Karageorgopoulos, D.E.; Wang, R.; Yu, X.H.; Falagas, M.E. Fosfomycin: Evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 255–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Vervoort, J.; Xavier, B.B.; Stewardson, A.; Coenen, S.; Godycki-Cwirko, M.; Adriaenssens, N.; Kowalczyk, A.; Lammens, C.; Harbarth, S.; Goossens, H.; et al. An in vitro deletion in ribE encoding lumazine synthase contributes to nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 7225–7233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhang, X.; Zhang, Y.; Wang, F.; Wang, C.; Chen, L.; Liu, H.; Lu, H.; Wen, H.; Zhou, T. Unravelling mechanisms of nitrofurantoin resistance and epidemiological characteristics among *Escherichia coli* clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2018**, *52*, 226–232. [[CrossRef](#)]
26. Whiteway, J.; Koziarz, P.; Veall, J.; Sandhu, N.; Kumar, P.; Hoecher, B.; Lambert, I.B. Oxygen-insensitive nitroreductases: Analysis of the roles of nfsA and nfsB in development of resistance to 5-nitrofurans derivatives in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 5529–5539. [[CrossRef](#)]
27. Ho, P.L.; Ng, K.Y.; Lo, W.U.; Law, P.Y.; Lai, E.L.; Wang, Y.; Chow, K.H. Plasmid-mediated oqxAB is an important mechanism for nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *60*, 537–543. [[CrossRef](#)]
28. Campos, J.; Mourão, J.; Marçal, S.; Machado, J.; Novais, C.; Peixe, L.; Antunes, P. Clinical *Salmonella Typhimurium* ST34 with metal tolerance genes and an IncHI2 plasmid carrying oqxAB-aac(6′)-Ib-cr from Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 843–845. [[CrossRef](#)]
29. Dotto, G.; Giacomelli, M.; Grilli, G.; Ferrazzi, V.; Carattoli, A.; Fortini, D.; Piccirillo, A. High prevalence of oqxAB in *Escherichia coli* isolates from domestic and wild lagomorphs in Italy. *Microb. Drug Resist.* **2014**, *20*, 118–123. [[CrossRef](#)]
30. Rodríguez-Martínez, J.M.; Díaz de Alba, P.; Briales, A.; Machuca, J.; Lossa, M.; Fernández-Cuenca, F.; Rodríguez Baño, J.; Martínez-Martínez, L.; Pascual, Á. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 68–73. [[CrossRef](#)]



9. ANEXOS



Anexo I: Secuencia del gen *murA* y de la proteína MurA en *E. coli*

Gen *murA*

En rojo se muestra la secuencia del gen *murA* en *E. coli*, cepa K-12, subcepa MG1655, secuencia de referencia NCBI: NC_000913.3. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 1542 pb).

AAACAGCAGACGGTCTATGGTCCGCTGATGGAATATATTGCGGATAACCGCATTCATGCTGTGTGATCAAAGCG
TATACCCCTGCGGAGTGGGCGCGGATCGCAAACCTGAACGGCTTTTGTAGCTATGGGCGATTGCGCGGTAGCGGAT
ATGAATTGTTAACTGAGAACAACAACTAAATGGATAAAATTTTCGTGTTTCAGGGGCCAACGAAGCTCCAGGGCGAAGTC
ACAATTTCCGGCGCTAAAAATGCTGCTCTGCCTATCCTTTTTGCCGCACTACTGGCGGAAGAACCGGTAGAGATCC
AGAACGTCCCGAACTGAAAGACGTCGATACATCAATGAAGCTGCTAAGCCAGCTGGGTGCGAAAGTAGAACGT
AATGGTTCTGTGCATATTGATGCCCGGACGTTAATGTATTCTGCGCACCTTACGATCTGGTTAAAACCATGCGTGC
TTCTATCTGGGCGCTGGGGCCGCTGGTAGCGCGCTTTGGTCAGGGGCAAGTTTCACTACCTGGCGGTTGTACGAT
CGGTGCGCGTCCGGTTGATCTACACATTTCTGGCCTCGAACAAATTAGGCGCGACCATCAAACCTGGAAGAAGGTTA
CGTTAAAGCTCCGTCGATGGTCTTTGAAAGGTGCACATATCGTGATGGATAAAGTCAGCGTTGGCGCAACGGT
GACCATCATGTGTGCTGCAACCCTGGCGGAAGGCACCACGATTATTGAAAACGCAGCGCGTGAACCGGAAATCGT
CGATACCGCGAATTCCTGATTACGCTGGGTGCGAAAATTAGCGGTCAGGGCACCGATCGTATCGTCATCGAAGG
TGTGGAACGTTTAGCGCGCGGTGTCTATCGCGTTCTGCCGATCGTATCGAAAACCGGTAATTCCTGGTGGCGGC
GGCGATTTCTCGCGGCAAAATTATCTGCCGTAACGCGCAGCCAGATACTCTCGACGCCGTGCTGGCGAAACTGCG
TGACGCTGGAGCGGACATCGAAGTCGGCGAAGACTGGATTAGCCTGGATATGCATGGCAAACGTCGGAAGGCTG
TTAACGTACGTACCGCGCCGATCCGGCATTCCCGACCGATATGCAGGCCAGTTCACGCTGTTGAACCTGGTGGC
AGAAGGGACCGGTTTATCACCGAAACGGTCTTTGAAAACCGCTTTATGCATGTGCCAGAGCTGAGCCGATGGG
CGCGCACGCCGAAATCGAAAGCAATACCGTTATTTGTCACGGTGTGAAAAACTTTCTGGCGCACAGGTTATGGCA
ACCGATCTGCGTGCATCAGCAAGCCTGGTGTGCTGGCTGTATTGCGGAAGGGACGACGGTGGTTGATCGTATT
TATCACATCGATCGTGGCTACGAACGCATTGAAGACAACTGCGCGCTTTAGGTGCAATATTGAGCGTGTGAAA
GGCGAATAATCGTCTGAGAGCTGGCAGCCCGTTGCGGGGGTACC GCCAGACCACTCATTTTTTCGGTTTAGTGT
AGCTACGCATCAACTGCGTTCTGTGATAAACTCATGG

Proteína MurA

MDKFRVQGP TKLQGEVTSI GAKNAALPILFAALLAEEPVEIQNVPKLKDVDTSMKLLSQLGAKVERN GSVHIDARDVNV
FCAPYDLVK TMRASI WALGPLVARFGQGVSLPGGCTIGAR PVDLHISGLEQLGATIKLEEGVVKASVDGR LKGAHIVM
DKVSVGATV TIMCAATLAEGTTI IENAAREPEIVDTANFLITL GAKISGQGTDRIVIEGVERLGGVYRVL PDRIETGTFV
AAAI SRGKII CRNAQPDTL DAVLAKLRDAGADIEVGEDWISL DMHGKRPKAVNVRTAPHPAFPTDMQAQFTLLNLVAE
GTGFITETV FENRFMHVPELSR MGAAHAEIESNTVICHGVEKLSGAQVMATDLRASASLVLAGCIAEGTTVVDR IYHIDRG
YERIEDKLRALGANIERVKGE

Relación entre la secuencia del gen *murA* y de la proteína MurA

atg	gat	aaa	ttt	cgt	gtt	cag	ggg	cca	acg	aag	ctc	cag	ggc	gaa
M	D	K	F	R	V	Q	G	P	T	K	L	Q	G	E
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
gtc	aca	att	tcc	ggc	gct	aaa	aat	gct	gct	ctg	cct	atc	ctt	ttt
V	T	I	S	G	A	K	N	A	A	L	P	I	L	F
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
gcc	gca	cta	ctg	gcg	gaa	gaa	ccg	gta	gag	atc	cag	aac	gtc	ccg
A	A	L	L	A	E	E	P	V	E	I	Q	N	V	P
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
aaa	ctg	aaa	gac	gtc	gat	aca	tca	atg	aag	ctg	cta	agc	cag	ctg
K	L	K	D	V	D	T	S	M	K	L	L	S	Q	L
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoina en *E. coli* y *K. pneumoniae*

ggt	gcg	aaa	gta	gaa	cgt	aat	ggt	tct	gtg	cat	att	gat	gcc	cgc
G	A	K	V	E	R	N	G	S	V	H	I	D	A	R
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
gac	gtt	aat	gta	ttc	tgc	gca	cct	tac	gat	ctg	gtt	aaa	acc	atg
D	V	N	V	F	C	A	P	Y	D	L	V	K	T	M
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
cgt	gct	tct	atc	tgg	gcg	ctg	ggg	ccg	ctg	gta	gcg	cgc	ttt	ggt
R	A	S	I	W	A	L	G	P	L	V	A	R	F	G
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
cag	ggg	caa	gtt	tca	cta	cct	ggc	ggt	tgt	acg	atc	ggt	gcg	cgt
Q	G	Q	V	S	L	P	G	G	C	T	I	G	A	R
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
ccg	gtt	gat	cta	cac	att	tct	ggc	ctc	gaa	caa	tta	ggc	gcg	acc
P	V	D	L	H	I	S	G	L	E	Q	L	G	A	T
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
atc	aaa	ctg	gaa	gaa	ggt	tac	gtt	aaa	gct	tcc	gtc	gat	ggt	cgt
I	K	L	E	E	G	Y	V	K	A	S	V	D	G	R
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
ttg	aaa	ggt	gca	cat	atc	gtg	atg	gat	aaa	gtc	agc	gtt	ggc	gca
L	K	G	A	H	I	V	M	D	K	V	S	V	G	A
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
acg	gtg	acc	atc	atg	tgt	gct	gca	acc	ctg	gcg	gaa	ggc	acc	acg
T	V	T	I	M	C	A	A	T	L	A	E	G	T	T
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
att	att	gaa	aac	gca	gcg	cgt	gaa	ccg	gaa	atc	gtc	gat	acc	gcg
I	I	E	N	A	A	R	E	P	E	I	V	D	T	A
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
aac	ttc	ctg	att	acg	ctg	ggt	gcg	aaa	att	agc	ggt	cag	ggc	acc
N	F	L	I	T	L	G	A	K	I	S	G	Q	G	T
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
gat	cgt	atc	gtc	atc	gaa	ggt	gtg	gaa	cgt	tta	ggc	ggc	ggt	gtc
D	R	I	V	I	E	G	V	E	R	L	G	G	G	V
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
tat	cgc	gtt	ctg	ccg	gat	cgt	atc	gaa	acc	ggt	act	ttc	ctg	gtg
Y	R	V	L	P	D	R	I	E	T	G	T	F	L	V
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
gcg	gcg	gcg	att	tct	cgc	ggc	aaa	att	atc	tgc	cg	aac	gcg	cag
A	A	A	I	S	R	G	K	I	I	C	R	N	A	Q
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
cca	gat	act	ctc	gac	gcc	gtg	ctg	gcg	aaa	ctg	cg	gac	gct	gga
P	D	T	L	D	A	V	L	A	K	L	R	D	A	G
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
gcg	gat	atc	gaa	gtc	ggc	gaa	gac	tgg	att	agc	ctg	gat	atg	cat
A	D	I	E	V	G	E	D	W	I	S	L	D	M	H
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
ggc	aaa	cgt	ccg	aag	gct	gtt	aac	gta	cgt	acc	gcg	ccg	cat	ccg
G	K	R	P	K	A	V	N	V	R	T	A	P	H	P
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
gca	ttc	ccg	acc	gat	atg	cag	gcc	cag	ttc	acg	ctg	ttg	aac	ccg
A	F	P	T	D	M	Q	A	Q	F	T	L	L	N	L
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
gtg	gca	gaa	ggg	acc	ggg	ttt	atc	acc	gaa	acc	gtc	ttt	gaa	aac
V	A	E	G	T	G	F	I	T	E	T	V	F	E	N
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330

cgc	ttt	atg	cat	gtg	cca	gag	ctg	agc	cgt	atg	ggc	gcg	cac	gcc
R	F	M	H	V	P	E	L	S	R	M	G	A	H	A
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
gaa	atc	gaa	agc	aat	acc	gtt	att	tgt	cac	ggt	gtt	gaa	aaa	ctt
E	I	E	S	N	T	V	I	C	H	G	V	E	K	L
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
tct	ggc	gca	cag	gtt	atg	gca	acc	gat	ctg	cgt	gca	tca	gca	agc
S	G	A	Q	V	M	A	T	D	L	R	A	S	A	S
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
ctg	gtg	ctg	gct	ggc	tgt	att	gcg	gaa	ggg	acg	acg	gtg	gtt	gat
L	V	L	A	G	C	I	A	E	G	T	T	V	V	D
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
cgt	att	tat	cac	atc	gat	cgt	ggc	tac	gaa	cgc	att	gaa	gac	aaa
R	I	Y	H	I	D	R	G	Y	E	R	I	E	D	K
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
ctg	cgc	gct	tta	ggt	gca	aat	att	gag	cgt	gtg	aaa	ggc	gaa	taa
L	R	A	L	G	A	N	I	E	R	V	K	G	E	Stop
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	

Anexo II: Secuencia del gen *glpT* y de la proteína GlpT en *E. coli*

Gen *glpT*

En rojo se muestra la secuencia del gen *glpT* en *E. coli*, cepa K-12, subcepa MG1655, secuencia de referencia NCBI: NC_000913.3. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 1785 pb).

CGGAGTCGCGAGTTTTCATTGTTATCCCTCTGAAGTTCGTTTTTACCATTTAGCCATAGTAAAAACATGAATTGTTT
 GATTTTCGCGCATATTCGCTCATAATTCGAAAGTGAAACGTGATTTTCATGCGTCATTTTGAACATTTTGAAATCTTAT
 TTAATAATGTGTGCGGCAATTCACATTTAATTTATGAATGTTTTCTTAACATCGCGGCAACTCAAGAAACGGCAGGT
 TCTCTACTGAATCAGGCTGTTAATCATAAATAAGACCACGGGCCACGGAGGCTATCAATGTTGAGTATTTTTAAA
 CCAGCGCCACAAAAGCGCGCTTACCTGCCGCGGAGATCGATCCGACTTATCGTCGATTGCGCTGGCAAATTTTCC
 TGGGGATATTTCTTTGGCTATGCGGCTTACTATTTGGTTTCGTAAGAACTTTGCGCTTGTCTATGCCTTATCTGGTTGAG
 CAGGGATTCTCACGCGGTGATTTAGGTTTTGCCCTTCGGGGATCTCGATTGCTTATGGATTTTGCAAATTCATCAT
 GGGTTCGGTATCGGATCGCTCGAATCCGCGCGTTTTCTGCCCGCAGGTTTGATTCTGGCGGCGGCAGTGATGTTG
 TTTATGGGCTTTGTGCCATGGGCGACGTGAGCATTGCGGTGATGTTGTACTGTTTCTCTGCGGTTGGTTCC
 AGGGGATGGGGTGGCCGCCGTGTGGTCTACTATGGTGCCTGTTGGTTCGAGAAAGAACGTGGCGGCATTGTG
 TCAGTGTGGAAGTGTGCGCACAACGTGCGTGGTGGTATTCCGCCGCTGCTGTTCTGCTGGGGATGGCCTGGTTC
 AATGACTGGCATGCGGCGCTCTATATGCCTGCTTTCTGCGCCATTCTGGTGGCATTATTCGCCTTTTCGATGATGCC
 CGATACCCCGCAATCCTGTGGCTTGGCGCGATCGAAGAGTACAAAAATGATTATCCGGACGACTATAACGAAAA
 AGCGGAACAGGAGCTGACGGCGAAGCAAATCTTCATGCAGTACGTACTGCCGAACAACTGCTGTGGTATATCGC
 CATCGCCAACGTGTTTCGTTTATCTGCTGCGTTACGGCATCCTCGACTGGTACCAGACTTATCTGAAAGAGGTTAAG
 CATTTTCGCGCTAGATAAATCCTCCTGGGCTACTTCTTTATGAATATGCAGGATTTCCGGGCACTCTGCTGTGCGG
 CTGGATGTCGGATAAAGTCTTCGGTGGCAACCGTGGGGCAACCGGCGTTTTCTTTATGACTGTTGACCATCGCG
 ACTATCGTTTACTGGATGAACCCGGCAGGTAACCCAACCGTGCATATGATTTGTATGATTGTTATCGGCTTCTGAT
 CTACGGTCTGTGATGCTGATCGGTCTGCATGCGCTGGAAGTGGCACCAGAAAAAGCGGCAGGTACGGCAGCGG
 GCTTTACCGGGCTGTTTGGTTACCTGGGCGGTTCCGGTGGCGGCGAGCGCGATTGTTGGCTACACCGTGGACTTCT
 TCGGCTGGGATGGCGGCTTATGGTAATGATTGGCGGCAGCATTCTGGCGGTTATCTGTTGATTGTTGTGATGAT
 TGGCGAAAAACGTGCCATGAACAATTACTGCAAGAACGCAACGGAGGCTAATGGCATGAAATTGACGCTGAAA
 AACCTTAGCATGGCGATCATGATGAGCACTATAGTCATGGGAAGCAGTGCAATGGCGGCGGACAGCAACGAAAA
 AATAGTCATCGCCATCGCGGTGCCAGTGGATATTTGCC

Proteína GlpT

MLSIFKPAPHKARLPAAEIDPTYRRLRWQIFLGIFFGYAAYLYLVRKNFALAMPYLVEQGFSRGDLGFALSIGSIAYGFSKFI
 MGSVSDRSNPRVFLPAGLILAAVMLFMGFVPWATSSIAVMFVLLFLCGWFQGMGWPPCGRTMVHWWWSQKERG
 GIVSVWNCAHNVGGGIPPLFLGMAWFNDWHAALYMPAFCAILVALFAMMRDTPQSCGLPIIEYKNDYPDDY
 NEKAEQELTAKQIFMQYVLPNKLWYIAIANVFVYLLRYGILDWSPTYLKEVKHFALDKSSWAYFLYFYAGIPGTLGCGW
 MSDKVFRGNRGATGVFFMTLVTIATIVYWMNPAGNPTVDMICMIVIGFLIYGPVMLIGLHALELAPKKAAGTAAGFTG
 LFGYLGGSVAASAIVGYTVDFFGWDGGFMVMIGGSILAVILLIVVMIGEKRRHEQLLQERNNG

Relación entre la secuencia del gen *glpT* y de la proteína GlpT

atg	ttg	agt	att	ttt	aaa	cca	gcg	cca	cac	aaa	gcg	cgc	tta	cct
M	L	S	I	F	K	P	A	P	H	K	A	R	L	P
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
gcc	gcg	gag	atc	gat	ccg	act	tat	cgt	cga	ttg	cgc	tgg	caa	att
A	A	E	I	D	P	T	Y	R	R	L	R	W	Q	I
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
ttc	ctg	ggg	ata	ttc	ttt	ggc	tat	gcg	gct	tac	tat	ttg	gtt	cgt
F	L	G	I	F	F	G	Y	A	A	Y	Y	L	V	R
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoina en *E. coli* y *K. pneumoniae*

aag	aac	ttt	gcg	ctt	gct	atg	cct	tat	ctg	gtt	gag	cag	gga	ttc
K	N	F	A	L	A	M	P	Y	L	V	E	Q	G	F
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
tca	cgc	ggt	gat	tta	ggt	ttt	gcc	ctt	tcg	ggg	atc	tcg	att	gct
S	R	G	D	L	G	F	A	L	S	G	I	S	I	A
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
tat	gga	ttt	tcg	aaa	ttc	atc	atg	ggt	tcg	gta	tcg	gat	cgc	tcg
Y	G	F	S	K	F	I	M	G	S	V	S	D	R	S
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
aat	ccg	cgc	ggt	ttc	ctg	ccc	gca	ggt	ttg	att	ctg	gcg	gcg	gca
N	P	R	V	F	L	P	A	G	L	I	L	A	A	A
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
gtg	atg	ttg	ttt	atg	ggc	ttt	gtg	cca	tgg	gcg	acg	tcg	agc	att
V	M	L	F	M	G	F	V	P	W	A	T	S	S	I
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
gcg	gtg	atg	ttt	gta	ctg	ttg	ttc	ctc	tgc	ggt	tgg	ttc	cag	ggg
A	V	M	F	V	L	L	F	L	C	G	W	F	Q	G
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
atg	ggg	tgg	ccg	ccg	tgt	ggt	cgt	act	atg	gtg	cac	tgg	tgg	tcg
M	G	W	P	P	C	G	R	T	M	V	H	W	W	S
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
cag	aaa	gaa	cgt	ggc	ggc	att	gtg	tca	gtg	tgg	aac	tgt	gcg	cac
Q	K	E	R	G	G	I	V	S	V	W	N	C	A	H
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
aac	gtc	ggt	ggt	ggt	att	ccg	ccg	ctg	ctg	ttc	ctg	ctg	ggg	atg
N	V	G	G	G	I	P	P	L	L	F	L	L	G	M
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
gcc	tgg	ttc	aat	gac	tgg	cat	gcg	gcg	ctc	tat	atg	cct	gct	ttc
A	W	F	N	D	W	H	A	A	L	Y	M	P	A	F
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
tgc	gcc	att	ctg	gtg	gca	tta	ttc	gcc	ttt	gcg	atg	atg	cgc	gat
C	A	I	L	V	A	L	F	A	F	A	M	M	R	D
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
acc	ccg	caa	tcc	tgt	ggc	ttg	ccg	ccg	atc	gaa	gag	tac	aaa	aat
T	P	Q	S	C	G	L	P	P	I	E	E	Y	K	N
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
gat	tat	ccg	gac	gac	tat	aac	gaa	aaa	gcg	gaa	cag	gag	ctg	acg
D	Y	P	D	D	Y	N	E	K	A	E	Q	E	L	T
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
gcg	aag	caa	atc	ttc	atg	cag	tac	gta	ctg	ccg	aac	aaa	ctg	ctg
A	K	Q	I	F	M	Q	Y	V	L	P	N	K	L	L
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
tgg	tat	atc	gcc	atc	gcc	aac	gtg	ttc	gtt	tat	ctg	ctg	cgt	tac
W	Y	I	A	I	A	N	V	F	V	Y	L	L	R	Y
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
ggc	atc	ctc	gac	tgg	tca	ccg	act	tat	ctg	aaa	gag	gtt	aag	cat
G	I	L	D	W	S	P	T	Y	L	K	E	V	K	H
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
ttc	gcg	cta	gat	aaa	tcc	tcc	tgg	gcc	tac	ttc	ctt	tat	gaa	tat
F	A	L	D	K	S	S	W	A	Y	F	L	Y	E	Y
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
gca	ggt	att	ccg	ggc	act	ctg	ctg	tgc	ggc	tgg	atg	tcg	gat	aaa
A	G	I	P	G	T	L	L	C	G	W	M	S	D	K
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315

gtc	ttc	cgt	ggc	aac	cgt	ggg	gca	acc	ggc	gtt	ttc	ttt	atg	aca
V	F	R	G	N	R	G	A	T	G	V	F	F	M	T
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
ctg	gtg	acc	atc	gcg	act	atc	gtt	tac	tgg	atg	aac	ccg	gca	ggt
L	V	T	I	A	T	I	V	Y	W	M	N	P	A	G
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
aac	cca	acc	gtc	gat	atg	att	tgt	atg	att	gtt	atc	ggc	ttc	ctg
N	P	T	V	D	M	I	C	M	I	V	I	G	F	L
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
atc	tac	ggt	cct	gtg	atg	ctg	atc	ggt	ctg	cat	gcg	ctg	gaa	ctg
I	Y	G	P	V	M	L	I	G	L	H	A	L	E	L
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
gca	ccg	aaa	aaa	gcg	gca	ggt	acg	gca	gcg	ggc	ttt	acc	ggg	ctg
A	P	K	K	A	A	G	T	A	A	G	F	T	G	L
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
ttt	ggt	tac	ctg	ggc	ggt	tcg	gtg	gcg	gcg	agc	gcg	att	gtt	ggc
F	G	Y	L	G	G	S	V	A	A	S	A	I	V	G
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
tac	acc	gtg	gac	ttc	ttc	ggc	tgg	gat	ggc	ggc	ttt	atg	gta	atg
Y	T	V	D	F	F	G	W	D	G	G	F	M	V	M
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
att	ggc	ggc	agc	att	ctg	gcg	gtt	atc	ttg	ttg	att	gtt	gtg	atg
I	G	G	S	I	L	A	V	I	L	L	I	V	V	M
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435
att	ggc	gaa	aaa	cgt	cgc	cat	gaa	caa	tta	ctg	caa	gaa	cgc	aac
I	G	E	K	R	R	H	E	Q	L	L	Q	E	R	N
436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
gga	ggc	taa												
G	G	Stop												
451	452													

Anexo III: Secuencia del gen *uhpT* y de la proteína UhpT en *E. coli*

Gen *uhpT*

En rojo se muestra la secuencia del gen *uhpT* en *E. coli*, cepa K-12, subcepa MG1655, secuencia de referencia NCBI: NC_000913.3. En verde se indica la zona de hibridación de los cebadores internos (tamaño del amplificado: 1667 pb) y en azul la zona de hibridación de los cebadores externos (tamaño del amplificado: 1995 pb).

GATGTTAATCGGTATGGCGGCGGCAGAGTGTCCACAAAAGAGGCGGCAGGGGCGGCGACGGGGTTTGTCCGGC
TTGTTTGCTTATCTGGGGGCGTCGCTTGCTGGTTGGCCGCTGGCGAAAAGTACTCGATACCTGGCACTGGAGCGGA
TTTTTTGTGTTATCTCTATCGCCGCCGGGATTTCCGCACTGCTGTTACTGCCTTTTTGAACGCCAGACACCGCGC
GAAGCGTGATGCATCTCACTTTTCACTTCATATCCGGCAAAAATAAGAAATTTCCAGGTTTTGCTGGACGCTAT
CTCAGGCCTGATTTGCTGCTGATTTTTACAATGCATGCCTCACGCAGGTATTCATTTTCAGGAGTAACCCATGCTGGC
TTTCTTAAACCAGTTTCGAAGCCGACCCTGGACCTCCGCTCGAAGTGCAGGCGCAAAATGTGGTTCAAACCGTTC
ATGCAATCCTACCTGGTGGTCTTTATCGGCTACCTGACGATGTACCTGATTGCAAGAATTTAACATCGCGCAGA
ACGATATGATTTGCACTACGGGTTGAGCATGACGCAGCTGGGGATGATCGGCCTGGGTTTCTCCATCACTTATGG
CGTGGGTAAAACGCTGGTTTCTACTACGCCGACGGCAAAAACACCAAAACAATTCTGCCGTTTCATGCTGATCCTC
TCTGCTATTTGATGCTGGGCTTCAGTGCCAGTATGGGCAGCGGCTCGGTTAGCCTGTTCTGATGATTGCCCTTCTA
CGCCTTAAGCGGCTTTTTCCAGAGTACCGGCGGTTCTGTCAGTTACTCCACCATCACCAATGGACGCCGCGTCTG
AAACGCGGGACATTCCTCGGTTTCTGGAATATTTCTACAACCTTGGCGGTGCAGGCGCAGCAGGTGTGGCCTG
TTCGGGGCAAATTACCTGTTTCGATGGCCATGTCATCGGCATGTTTATCTTCCCGTCGATTATCGCGCTGATTGTCGG
TTTTATCGCCTGCGTTACGGCAGCGACTCCCCGGAATCTTATGGCCTCGGCAAAGCTGAAGAACTGTTCCGGCA
GGAGATCAGCGAAGAGGACAAAAGAGACAGAATCTACCGATATGACCAAGTGGCAGATCTTTGTTGAGTATGTGC
TGAAAAACAAAGTATCTGGCTGCTGTGCTTCGCAACATTTTCTCTATGTGGTACGTATTGGTATCGACCAGTG
GTCAACCGTATACGCGTTCCAGGAAGTAAACTCTCTAAAGCGGTGGCGATTACAGGGCTTTACGCTGTTTGAAGCT
GGTGCCTGGTGGTACGCTGCTGTGGGGCTGGCTCTGACCTGGCGAACGGTCCCGTGGCCTGGTGGCCTGC
ATCGCGCTGGCCTGATTATCGCCACGCTCGGTGTGTATCAACATGCCAGTAACGAATATATCTATCTGGCTTCTCT
CTTTGCGTTGGGTTTCTGGTCTTTGGCCCGCAATTGTTGATTGGTGTGGCTGCTGTTGGCTTTGTACCTAAAAAG
CGATTGGCCTGCCGATGGTATTAAGGCACCTTTGCTTACCTGATTGGTACAGCTTTGCCAAGTTAGGTCTGGG
AATGATTGCCGATGGGACGCCGATTCGGCCTTACCGGCTGGGCGGACCTTCGCCGCGCTGGATATCGCCGC
GATTGGTTGTATCTGCCTGATGGCGATAGTGGCGGTAATGGAAGAACGCAAAATCCGCCGCGAGAAAAAATCA
GCAGTTGACAGTGGCATAACGTAACCTGGTGACTTTTGGCCGGCATGACGCCGGGCTTTTTTTATTATCCGTGAC
TTCCAGCGTAGTGAAGGCAAACCTTCTCGCATCAATAGCCCTGACTGGTTAGTTTTAGCGCGGGGATCACTGGC
AGAGAAAGAAACGCCATCTGAATAAACGGCTCATCGGGTAACGGACCGCATTACGGGCGGCGGCTTTCAAGGC
GTCAATTTGTTCCGCCAGCGACTG

Proteína UhpT

MLAFLNQVRKPTLDLPLEVRRKMWFKPFMQSYLVVFIGYLTMYLIRKNFNIAQNDMISTYGLSMTQLGMIGLGSITYG
VGKTLVSYADGKNTKQFLPFMLILSAICMLGFSASMGSGSVSLFLMIAFYALSGFFQSTGGSCSYSTITKWTPRRKRGT
LGFWNISHNLGGAGAAGVALFGANYLFDGHVIGMFIFPSIILVGFGLRYGSDSPESYGLGKAEELFGEIIEEDKETES
TDMTKWQIFVEYVLKNKVIWLLCFANIFLYVVRIGIQWSTVYAFQELKLSKAVAIQGFLLFEAGALVGTLLWGWLSDL
ANGRRGLVACIALALIIATLGVYQHASNEYIYLALFLGFLVFGPQLLIGVAAVGFVPKKAIGAADGIKGTFAYLIGDSFAK
LGLGMIADGTPVFGLTGWAGTFAALDIAAIGCICLMAIVAVMEERKIRREKKIQQLTVA

Relación entre la secuencia del gen *uhpT* y de la proteína UhpT

atg	ctg	gct	ttc	tta	aac	cag	gtt	cgc	aag	ccg	acc	ctg	gac	ctt
M	L	A	F	L	N	Q	V	R	K	P	T	L	D	L
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoina en *E. coli* y *K. pneumoniae*

ccg	ctc	gaa	gtg	cgg	cgc	aaa	atg	tgg	ttc	aaa	ccg	ttc	atg	caa
P	L	E	V	R	R	K	M	W	F	K	P	F	M	Q
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
tcc	tac	ctg	gtg	gtc	ttt	atc	ggc	tac	ctg	acg	atg	tac	ctg	att
S	Y	L	V	V	F	I	G	Y	L	T	M	Y	L	I
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
cgc	aag	aac	ttt	aac	atc	gcg	cag	aac	gat	atg	att	tcg	acc	tac
R	K	N	F	N	I	A	Q	N	D	M	I	S	T	Y
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
ggg	ttg	agc	atg	acg	cag	ctg	ggg	atg	atc	ggc	ctg	ggt	ttc	tcc
G	L	S	M	T	Q	L	G	M	I	G	L	G	F	S
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
atc	act	tat	ggc	gtc	ggt	aaa	acg	ctg	ggt	tcc	tac	tac	gcc	gac
I	T	Y	G	V	G	K	T	L	V	S	Y	Y	A	D
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
ggc	aaa	aac	acc	aaa	caa	ttc	ctg	ccg	ttc	atg	ctg	atc	ctc	tct
G	K	N	T	K	Q	F	L	P	F	M	L	I	L	S
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
gct	att	tgt	atg	ctg	ggc	ttc	agt	gcc	agt	atg	ggc	agc	ggc	tcg
A	I	C	M	L	G	F	S	A	S	M	G	S	G	S
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
ggt	agc	ctg	ttc	ctg	atg	att	gcc	ttc	tac	gcc	tta	agc	ggc	ttt
V	S	L	F	L	M	I	A	F	Y	A	L	S	G	F
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
ttc	cag	agt	acc	ggc	ggt	tcg	tcg	agt	tac	tcc	acc	atc	acc	aaa
F	Q	S	T	G	G	S	C	S	Y	S	T	I	T	K
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
tgg	acg	ccg	cgt	cgt	aaa	cgc	ggg	aca	ttc	ctc	ggt	ttc	tgg	aat
W	T	P	R	R	K	R	G	T	F	L	G	F	W	N
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
att	tct	cac	aac	ctt	ggc	ggt	gca	ggc	gca	gca	ggt	gtg	gcg	ctg
I	S	H	N	L	G	G	A	G	A	A	G	V	A	L
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
ttc	ggg	gca	aat	tac	ctg	ttc	gat	ggc	cat	gtc	atc	ggc	atg	ttt
F	G	A	N	Y	L	F	D	G	H	V	I	G	M	F
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
atc	ttc	ccg	tcg	att	atc	gcg	ctg	att	gtc	ggt	ttt	atc	ggc	ctg
I	F	P	S	I	I	A	L	I	V	G	F	I	G	L
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
cgt	tac	ggc	agc	gac	tcc	ccg	gaa	tct	tat	ggc	ctc	ggc	aaa	gct
R	Y	G	S	D	S	P	E	S	Y	G	L	G	K	A
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
gaa	gaa	ctg	ttc	ggc	gag	gag	atc	agc	gaa	gag	gac	aaa	gag	aca
E	E	L	F	G	E	E	I	S	E	E	D	K	E	T
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
gaa	tct	acc	gat	atg	acc	aag	tgg	cag	atc	ttt	ggt	gag	tat	gtg
E	S	T	D	M	T	K	W	Q	I	F	V	E	Y	V
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
ctg	aaa	aac	aaa	gtg	atc	tgg	ctg	ctg	tgc	ttc	gcc	aac	att	ttc
L	K	N	K	V	I	W	L	L	C	F	A	N	I	F
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
ctc	tat	gtg	gta	cgt	att	ggt	atc	gac	cag	tgg	tca	acc	gta	tac
L	Y	V	V	R	I	G	I	D	Q	W	S	T	V	Y
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285

gcg	ttc	cag	gaa	ctg	aaa	ctc	tct	aaa	gcg	gtg	gcg	att	cag	ggc
A	F	Q	E	L	K	L	S	K	A	V	A	I	Q	G
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
ttt	acg	ctg	ttt	gaa	gct	ggg	gcg	ctg	gtc	ggg	acg	ctg	ctg	tgg
F	T	L	F	E	A	G	A	L	V	G	T	L	L	W
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
ggc	tgg	ctc	tct	gac	ctg	gcg	aac	ggg	cgc	cgt	ggc	ctg	gtg	gcc
G	W	L	S	D	L	A	N	G	R	R	G	L	V	A
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
tgc	atc	gcg	ctg	gcg	ctg	att	atc	gcc	acg	ctc	ggg	gtg	tat	caa
C	I	A	L	A	L	I	I	A	T	L	G	V	Y	Q
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
cat	gcc	agt	aac	gaa	tat	atc	tat	ctg	gct	tct	ctc	ttt	gcg	ttg
H	A	S	N	E	Y	I	Y	L	A	S	L	F	A	L
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
ggg	ttc	ctg	gtc	ttt	ggc	ccg	caa	ttg	ttg	att	ggg	gtg	gct	gct
G	F	L	V	F	G	P	Q	L	L	I	G	V	A	A
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
gtt	ggc	ttt	gta	cct	aaa	aaa	gcg	att	ggc	gct	gcc	gat	ggg	att
V	G	F	V	P	K	K	A	I	G	A	A	D	G	I
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
aaa	ggc	acc	ttt	gct	tac	ctg	att	ggg	gac	agc	ttt	gcc	aag	tta
K	G	T	F	A	Y	L	I	G	D	S	F	A	K	L
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
ggg	ctg	gga	atg	att	gcc	gat	ggg	acg	ccg	gta	ttc	ggc	ctt	acc
G	L	G	M	I	A	D	G	T	P	V	F	G	L	T
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
ggc	tgg	gca	ggc	acc	ttc	gcc	gcg	ctg	gat	atc	gcc	gcg	att	ggg
G	W	A	G	T	F	A	A	L	D	I	A	A	I	G
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435
tgt	atc	tgc	ctg	atg	gcg	ata	gtg	gcg	gta	atg	gaa	gaa	cgc	aaa
C	I	C	L	M	A	I	V	A	V	M	E	E	R	K
436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
atc	cgc	cgc	gag	aaa	aaa	att	cag	cag	ttg	aca	gtg	gca	taa	
I	R	R	E	K	K	I	Q	Q	L	T	V	A	Stop	
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463		

Anexo IV: Secuencia del gen *uhpA* y de la proteína UhpA en *E. coli*

Gen *uhpA*

En rojo se muestra la secuencia del gen *uhpA* en *E. coli*, cepa K-12, subcepa MG1655, secuencia de referencia NCBI: NC_000913.3. En verde se indica la zona de hibridación de los cebadores internos (tamaño del amplificado: 771 pb) y en azul la zona de hibridación de los cebadores externos (tamaño del amplificado: 1164 pb).

CGTAATTCTGGAGCTCACCGTTTCGCAACCATCCGGGCGTAATGACCCACGTTTGTGGCCTTTTGGCCGCCGCGCTT
TTAACGTTGAAGGCATTCTTTGTCTGCCGATTGAGGACAGCGACAAAAGCCATATCTGGCTACTGGTCAATGACGA
CCAGCGTCTGGAGCAGATGATAAGCCAAATCGATAAGCTGGAAGATGTCGTGAAAGTGCAGCGTAATCAGTCCG
ATCCGACGATGTTAACAAGATCGCGGTGTTTTTTCAGTAACCGCTCAAGGCTTGAACAACATCGCGCTTATCGTTA
AGGTAAGCGCGTATTTTTTTTACCCGCCAGGACAAGACCATGATCACCGTTGCCCTTATAGACGATCACCTCATCGT
CCGCTCCGGCTTTGCGCAGCTGCTGGGGCTGGAACCTGATTTGCAGGTAGTTGCCGAGTTTGGTTCGGGGCGCGA
GGCGCTGGCGGGGCTGCCGGGGCGCGGTGTGCAGGTGTGATTTGCGATATCTCCATGCCGATATCTCCGGTCT
GGAGCTGCTAAGCCAGCTGCCGAAAGTATGGCGACGATTATGCTCTCCGTTACAGACAGTCTGCGCTGTTGA
GCAGGCGCTTAACGCGGGGGCACGCGGCTTTCTTCCAAACGCTGTAGCCCGGATGAACTCATTGCTGCGGTGCA
TACGTTGCCACGGGCGGCTGTTATCTGACGCCGATATTGCCATTAAGTGGCATCCGGTCTGTCAGGACCCGCTA
ACCAAACGTGAACGCCAGGTGGCGGAAAACTGGCGCAAGGAATGGCGGTGAAAGAGATTGCCCGCAACTGG
GCTTGTACCGAAAAAGGTACACGTCCATCGCCCAATCTGATGGAAAACTGGGCGTCAGTAACGACGTAGAGC
TGGCGCGCCGATGTTTGTGCTGGTGAAGAAGACGTTGTTCTCCCGTTAATTACCGTTATTGCCTGCTTTTTTA
TCTTCTGCGCATGGTTTTGCTGTGGAGTATCAGCCTGCATCTGGTTGAGCGCCCTGATATGGCGGTGCTGTGA
TTCCGTTTGGTCTGCGTCTGGGGTAATGCTGCAATGCCCGCGCGGATACTGGCCGTTATTGCTGGGCGCGGAG
TGGCTGCTGATTTACTGGCTAACGCAGGCG

Proteína UhpA

MITVALIDDHLIVRSGFAQLLGLPDLQVVAEFGSGREALAGLPGRGVQVCICDISMPDISGLELLSPLPKGMATIMLSV
HDSPALVEQALNAGARGFLSKRCSPELIIAAVHTVATGGCYLTPDIAIKLASGRQDPLTKRERQVAEKLAQGMVAVKEIA
AELGLSPKTVHVRANLMEKLGVSNDVELARRMFDGW

Relación entre la secuencia del gen *uhpA* y de la proteína UhpA

atg	atc	acc	gtt	gcc	ctt	ata	gac	gat	cac	ctc	atc	gtc	cgc	tcc
M	I	T	V	A	L	I	D	D	H	L	I	V	R	S
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ggc	ttt	gcg	cag	ctg	ctg	ggg	ctg	gaa	cct	gat	ttg	cag	gta	gtt
G	F	A	Q	L	L	G	L	E	P	D	L	Q	V	V
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
gcc	gag	ttt	ggt	tcg	ggg	cgc	gag	gcg	ctg	gcg	ggg	ctg	ccg	ggg
A	E	F	G	S	G	R	E	A	L	A	G	L	P	G
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
cgc	ggt	gtg	cag	gtg	tgt	att	tgc	gat	atc	tcc	atg	ccc	gat	atc
R	G	V	Q	V	C	I	C	D	I	S	M	P	D	I
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
tcc	ggt	ctg	gag	ctg	cta	agc	cag	ctg	ccg	aaa	ggt	atg	gcg	acg
S	G	L	E	L	L	S	Q	L	P	K	G	M	A	T
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
att	atg	ctc	tcc	gtt	cac	gac	agt	cct	gcg	ctg	gtt	gag	cag	gcg
I	M	L	S	V	H	D	S	P	A	L	V	E	Q	A
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en E. coli y K. pneumoniae

ctt	aac	gcg	ggg	gca	cgc	ggc	ttt	ctt	tcc	aaa	cgc	tgt	agc	ccg
L	N	A	G	A	R	G	F	L	S	K	R	C	S	P
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
gat	gaa	ctg	att	gct	gcg	gtg	cat	acg	gtt	gcc	acg	ggc	ggc	tgt
D	E	L	I	A	A	V	H	T	V	A	T	G	G	C
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
tat	ctg	acg	ccg	gat	att	gcc	att	aaa	ctg	gca	tcc	ggc	cgc	cag
Y	L	T	P	D	I	A	I	K	L	A	S	G	R	Q
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
gac	ccg	cta	acc	aaa	cgt	gaa	cgc	cag	gtg	gcg	gaa	aaa	ctg	gcg
D	P	L	T	K	R	E	R	Q	V	A	E	K	L	A
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
caa	gga	atg	gcg	gtg	aaa	gag	att	gcc	gcc	gaa	ctg	ggc	ttg	tca
Q	G	M	A	V	K	E	I	A	A	E	L	G	L	S
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
ccg	aaa	acg	gta	cac	gtc	cat	cgc	gcc	aat	ctg	atg	gaa	aaa	ctg
P	K	T	V	H	V	H	R	A	N	L	M	E	K	L
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
ggc	gtc	agt	aac	gac	gta	gag	ctg	gcg	cgc	cgc	atg	ttt	gat	ggc
G	V	S	N	D	V	E	L	A	R	R	M	F	D	G
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
tgg	tga													
W	Stop													
196														

Anexo V: Secuencia del gen *ptsI* y de la proteína PtsI en *E. coli*

Gen *ptsI*

En rojo se muestra la secuencia del gen *ptsI* en *E. coli*, cepa K-12, subcepa MG1655, secuencia de referencia NCBI: NC_000913.3. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 1908 pb).

GAAAGCGTTGAACATCTGGTTAAACTGATGGCGGAACTCGAGTAATTTCCCGGTTCTTTTAAAAATCAGTCACA
 AGTAAGGTAGGGTTATGATTTTCAAGCATTTTAGCATCCCCGGTATCGCTTTTCGGTAAAGCTCTGCTTCTGAAAGA
 AGACGAAATTGTCATTGACCGGAAAAAATTTCTGCCGACCAGGTTGATCAGGAAGTTGAACGTTTTCTGAGCGG
 TCGTGCCAAGGCATCAGCCAGCTGAAAACGATCAAAACGAAAGCTGGTGAACGTTTCGGTGAAGAAAAAGAAG
 CCATCTTTGAAGGGCATATTATGCTGCTCGAAGATGAGGAGCTGGAGCAGGAAATCATAGCCCTGATTAAGATA
 AGCACATGACAGCTGACGCAGCTGCTCATGAAGTTATCGAAGGTCAGGCTTCTGCCCTGGAAGAGCTGGATGATG
 AATACCTGAAAGAACGTGCGGCTGACGTACGTGATATCGGTAAGCGCCTGCTGCGCAACATCCTGGGCCTGAAGA
 TTATCGACCTGAGCGCCATTGAGGATGAAGTCATTCTGGTTGCCGCTGACCTGACGCCGTCGAAACCCGACAGCT
 GAACCTGAAGAAGGTGCTGGGTTTCATCACCGACGCGGTTGGCCGACTTCCCACACCTCTATCATGGCGGTTCT
 CTGGAACCTACCTGCTATCGTGGGTACCGGTAGCGTCACCTCTCAGGTGAAAAATGACGACTATCTGATTCTGGATG
 CCGTAAATAATCAGGTTTACGTCAATCCAACCAACGAAGTTATTGATAAAATGCGCGCTGTTGAGGAGCAAGTGGC
 TTCTGAAAAAGCAGAGCTTGCTAAACTGAAAGATCTGCCAGCTATTACGCTGGACGGTCACCAGGTAGAAATATG
 CGTAACATTGGTACGGTTCGTGACGTTGAAGGTGACAGAGCGTAACGGCGCTGAAGGCGTTGGTCTGTATCGTAC
 TGAGTTCCTGTTTCATGGACCGGACGCACTGCCACTGAAGAAGAAGAGTTTGTGCTTACAAAGCAGTGGCTGA
 AGCGTGTGGCTCGCAAGCGTTATCGTTCGTACCATGGACATCGGCGGCGACAAAGAGCTGCCATACATGAACTT
 CCCGAAAGAAGAGAACCGTTCCTCGGCTGGCGCGCTATCCGTATCGCGATGGATCGTAGAGAGATCCTGCGCGA
 TCAGCTCCGCGCTATCCTGCGTGCCTCGGCTTTCGGTAAATTGCGCATTATGTTCCCGATGATCATCTCTGTTGAAG
 AAGTGCCTGCACTGCGCAAAGAGATCGAAATCTACAAACAGGAACTGCGCGACGAAGGTAAAGCGTTTGACGAG
 TCAATTGAAATCGGCGTAATGGTGGAAACACCGGCTGCCGCAACAATTGCACGTCAATTTAGCCAAAGAAGTTGAT
 TTCTTTAGTATCGGCACCAATGATTTAACGCAGTACACTCTGGCAGTTGACCGTGGTAATGATATGATTTACACCT
 TTACCAGCCAATGTCACCGTCCGTGCTGAACTTGATCAAGCAAGTTATTGATGCTTCTCATGCTGAAGGCAAAATGG
 ACTGGCATGTGTGGTGAAGCTTGTGCGCATGAACGTGCTACACTTCTGTTGCTGGGGATGGGTCTGGACGAATTC
 TCTATGAGCGCCATTTCTATCCCGCGCATTAAAGAAGATTATCCGTAACACGAACTTCGAAGATGCGAAGGTGTTAG
 CAGAGCAGGCTCTTGCTCAACCGACAACGGACGAGTTAATGACGCTGGTTAACAAAGTTTCATTGAAGAAAAACAA
 TCTGCTAAATCCACGAGATGCGGCCCAATTTACTGCTTAGGAGAAGATCATGGGTTTGTTCGATAAACTGAAATCTC
 TGGTTTCCGACGACAAGAAGGA

Proteína PtsI

MISGILASPGIAFGKALLLKEDEVIDRKKISADQVDQEVERFLSGRAKASAQLETIKTKAGETFGEEKEAIFEGHIMLLEDE
 ELEQEIIALIKDKHMTADAAAHEVIEGQASALEELDDEYLKERAADVDRDIGKRLRNILGLKIIDLQDEVIQVAADLTPSE
 TAQLNLKVLGFITDAGGRTSHTSIMARSLELPAIVGTGSVTSQVKNDYLLDQVAVNNQVYVNPTEVIDKMRVQEQV
 ASEKAEALAKLDLPAITLDGHQVEVCANIGTVRDVEGAERNGAEGVGLYRTEFLFMDRDLAPTEEEQFAAYKAVAEACG
 SQAVIVRTMDIGGDKELPYMNFPEENPFLGWRAIRIAMDRREILRDQLRAILRASAFGLKRMIFPMIISVEEVRALRKEI
 EIYKQELRDEGKAFDESIEIGVMVETPAAATIAHRLAKEVDFFSIGTNDLTQYTLAVDRGNDMISHLYQPMSPSVLNLIKQ
 VIDASHAEGKWTGMCGELAGDERATLLLLGMGLDEFMSAISIPRIKKIIRNTNFEDAKVLAEQALAQPTTDELMTLVN
 KFIEKTIC

Relación entre la secuencia del gen *ptsI* y de la proteína PtsI

atg	att	tca	ggc	att	tta	gca	tcc	ccg	ggt	atc	gct	ttc	ggt	aaa
M	I	S	G	I	L	A	S	P	G	I	A	F	G	K
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en *E. coli* y *K. pneumoniae*

gct	ctg	ctt	ctg	aaa	gaa	gac	gaa	att	gtc	att	gac	cgg	aaa	aaa
A	L	L	L	K	E	D	E	I	V	I	D	R	K	K
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
att	tct	gcc	gac	cag	gtt	gat	cag	gaa	gtt	gaa	cgt	ttt	ctg	agc
I	S	A	D	Q	V	D	Q	E	V	E	R	F	L	S
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
ggt	cgt	gcc	aag	gca	tca	gcc	cag	ctg	gaa	acg	atc	aaa	acg	aaa
G	R	A	K	A	S	A	Q	L	E	T	I	K	T	K
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
gct	ggt	gaa	acg	ttc	ggt	gaa	gaa	aaa	gaa	gcc	atc	ttt	gaa	ggg
A	G	E	T	F	G	E	E	K	E	A	I	F	E	G
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
cat	att	atg	ctg	ctc	gaa	gat	gag	gag	ctg	gag	cag	gaa	atc	ata
H	I	M	L	L	E	D	E	E	L	E	Q	E	I	I
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
gcc	ctg	att	aaa	gat	aag	cac	atg	aca	gct	gac	gca	gct	gct	cat
A	L	I	K	D	K	H	M	T	A	D	A	A	A	H
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
gaa	ggt	atc	gaa	ggt	cag	gct	tct	gcc	ctg	gaa	gag	ctg	gat	gat
E	V	I	E	G	Q	A	S	A	L	E	E	L	D	D
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
gaa	tac	ctg	aaa	gaa	cgt	gcg	gct	gac	gta	cgt	gat	atc	ggt	aag
E	Y	L	K	E	R	A	A	D	V	R	D	I	G	K
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
cgc	ctg	ctg	cgc	aac	atc	ctg	ggc	ctg	aag	att	atc	gac	ctg	agc
R	L	L	R	N	I	L	G	L	K	I	I	D	L	S
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
gcc	att	cag	gat	gaa	gtc	att	ctg	gtt	gcc	gct	gac	ctg	acg	ccg
A	I	Q	D	E	V	I	L	V	A	A	D	L	T	P
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
tcc	gaa	acc	gca	cag	ctg	aac	ctg	aag	aag	gtg	ctg	ggt	tcc	atc
S	E	T	A	Q	L	N	L	K	K	V	L	G	F	I
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
acc	gac	gcg	ggt	ggc	cgt	act	tcc	cac	acc	tct	atc	atg	gcg	cgt
T	D	A	G	G	R	T	S	H	T	S	I	M	A	R
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
tct	ctg	gaa	cta	cct	gct	atc	gtg	ggt	acc	ggt	agc	gtc	acc	tct
S	L	E	L	P	A	I	V	G	T	G	S	V	T	S
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
cag	gtg	aaa	aat	gac	gac	tat	ctg	att	ctg	gat	gcc	gta	aat	aat
Q	V	K	N	D	D	Y	L	I	L	D	A	V	N	N
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
cag	ggt	tac	gtc	aat	cca	acc	aac	gaa	ggt	att	gat	aaa	atg	cgc
Q	V	Y	V	N	P	T	N	E	V	I	D	K	M	R
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
gct	ggt	cag	gag	caa	gtg	gct	tct	gaa	aaa	gca	gag	ctt	gct	aaa
A	V	Q	E	Q	V	A	S	E	K	A	E	L	A	K
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
ctg	aaa	gat	ctg	cca	gct	att	acg	ctg	gac	ggt	cac	cag	gta	gaa
L	K	D	L	P	A	I	T	L	D	G	H	Q	V	E
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
gta	tgc	gct	aac	att	ggt	acg	ggt	cgt	gac	ggt	gaa	ggt	gca	gag
V	C	A	N	I	G	T	V	R	D	V	E	G	A	E
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285

cgt	aac	ggc	gct	gaa	ggc	gtt	ggt	ctg	tat	cgt	act	gag	ttc	ctg
R	N	G	A	E	G	V	G	L	Y	R	T	E	F	L
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
ttc	atg	gac	cgc	gac	gca	ctg	ccc	act	gaa	gaa	gaa	cag	ttt	gct
F	M	D	R	D	A	L	P	T	E	E	E	Q	F	A
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
gct	tac	aaa	gca	gtg	gct	gaa	gcg	tgt	ggc	tcg	caa	gcg	gtt	atc
A	Y	K	A	V	A	E	A	C	G	S	Q	A	V	I
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
gtt	cgt	acc	atg	gac	atc	ggc	ggc	gac	aaa	gag	ctg	cca	tac	atg
V	R	T	M	D	I	G	G	D	K	E	L	P	Y	M
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
aac	ttc	ccg	aaa	gaa	gag	aac	ccg	ttc	ctc	ggc	tgg	cgc	gct	atc
N	F	P	K	E	E	N	P	F	L	G	W	R	A	I
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
cgt	atc	gcg	atg	gat	cgt	aga	gag	atc	ctg	cgc	gat	cag	ctc	cgc
R	I	A	M	D	R	R	E	I	L	R	D	Q	L	R
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
gct	atc	ctg	cgt	gcc	tcg	gct	ttc	ggt	aaa	ttg	cgc	att	atg	ttc
A	I	L	R	A	S	A	F	G	K	L	R	I	M	F
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
ccg	atg	atc	atc	tct	gtt	gaa	gaa	gtg	cgt	gca	ctg	cgc	aaa	gag
P	M	I	I	S	V	E	E	V	R	A	L	R	K	E
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
atc	gaa	atc	tac	aaa	cag	gaa	ctg	cgc	cac	gaa	ggt	aaa	gcg	ttt
I	E	I	Y	K	Q	E	L	R	D	E	G	K	A	F
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
gac	gac	tca	att	gaa	atc	ggc	gta	atg	gtg	gaa	aca	ccg	gct	gcc
D	E	S	I	E	I	G	V	M	V	E	T	P	A	A
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435
gca	aca	att	gca	cgt	cat	tta	gcc	aaa	gaa	gtt	gat	ttc	ttt	agt
A	T	I	A	R	H	L	A	K	E	V	D	F	F	S
436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
atc	ggc	acc	aat	gat	tta	acg	cag	tac	act	ctg	gca	gtt	gac	cgt
I	G	T	N	D	L	T	Q	Y	T	L	A	V	D	R
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465
ggt	aat	gat	atg	att	tca	cac	ctt	tac	cag	cca	atg	tca	ccg	tcc
G	N	D	M	I	S	H	L	Y	Q	P	M	S	P	S
466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
gtg	ctg	aac	ttg	atc	aag	caa	gtt	att	gat	gct	tct	cat	gct	gaa
V	L	N	L	I	K	Q	V	I	D	A	S	H	A	E
481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495
ggc	aaa	tgg	act	ggc	atg	tgt	ggt	gag	ctt	gct	ggc	gat	gaa	cgt
G	K	W	T	G	M	C	G	E	L	A	G	D	E	R
496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
gct	aca	ctt	ctg	ttg	ctg	ggg	atg	ggt	ctg	gac	gaa	ttc	tct	atg
A	T	L	L	L	L	G	M	G	L	D	E	F	S	M
511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525
agc	gcc	att	tct	atc	ccg	cgc	att	aag	aag	att	atc	cgc	aac	acg
S	A	I	S	I	P	R	I	K	K	I	I	R	N	T
526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
aac	ttc	gaa	gat	gcg	aag	gtg	tta	gca	gag	cag	gct	ctt	gct	caa
N	F	E	D	A	K	V	L	A	E	Q	A	L	A	Q
541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en E. coli y K. pneumoniae

ccg	aca	acg	gac	gag	tta	atg	acg	ctg	gtt	aac	aag	ttc	att	gaa
P	T	T	D	E	L	M	T	L	V	N	K	F	I	E
556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
gaa	aaa	aca	atc	tgc	taa									
E	K	T	I	C	Stop									
571	572	573	574	575										

Anexo VI: Secuencia del gen *cyaA* y de la proteína CyaA en *E. coli*

Gen *cyaA*

En rojo se muestra la secuencia del gen *cyaA* en *E. coli*, cepa K-12, subcepa MG1655, secuencia de referencia NCBI: NC_000913.3. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores para la amplificación del fragmento *cyaA1* (tamaño del amplificado: 1559 pb) y en verde la zona de hibridación de los cebadores para la amplificación del fragmento *cyaA2* (tamaño del amplificado: 1648 pb).

AACCAGGCGCGAAAAGTGGTAACGGTTACCTTTGACATACGAAATATCCCGAATGCCGCGTGTACCGTTGATGTT
 GCGGGAATCACAGTCATGACGGGTAGCAAATCAGGCGATACGTCATGTACCTCTATATTGAGACTCTGAAACAGA
 GACTGGATGCCATAAATCAATTGCGTGTGGATCGCGCGCTTGCTGCTATGGGGCTGCATCCAACAGGTCTACA
 GTCTACTGCCGACATTGTTGCACTATCACCATCCGCTAATGCCGGTTACCTTGATGGTAACGTTCCCAAAGGCATT
 TGCCTTTACACGCCTGATGAAACTCAACGCCACTACCTGAACGAGCTTGAAGTGTATCGTGGAAATGTCAGTACAGG
 ATCCGCCGAAAGGTGAGCTTCCAATTACTGGTGTATACCCATGGGCAGCACCTCGTCCGTAGGGCAAAGTTGTTCC
 CTCTGACCTGGATATCTGGGTCTGTCATCAATCTGGCTCGATAGCGAAGAGCGCCAATTGCTACAACGTAATGT
 AGCCTGCTGGAAAAGTGGGCCCTCGCTGGGTGTGGAAGTCAGCTTCTTCTGATTGATGAAAACCGCTTCCGTC
 ATAATGAAAGCGGCAGCCTGGGGGGCGAAGATTGTGGCTCCACCCAGCATATACTGCTGCTTGACGAATTTTATC
 GTACCGCGTGCCTCGCCGTAAGCGTATTCTGTGGAATATGGTGCCGTGCGACGAAGAAGAGCATTACGACG
 ACTATGTGATGACGCTTTACGCGCAGGGCGTGTGACGCCAAATGAATGGCTGGATCTCGGTGGCTTAAGCTCGC
 TTTCTGCTGAAGAGTACTTTGGTGCCAGCCTTTGGCAGCTCTACAAGAGTATCGATTCCCCATACAAAGCGGTA
 GAAAACACTGCTGCTGGAAGCCTATTCTGGGAATACCCGAACCCACGCTGCTGCGGAAAGATATCAAACAGCG
 TTTGCACGACGGCGAGATTGTATCGTTTGGTCTCGATCCATACTGCATGATGCTGGAGCGTGTACTGAATACCTG
 ACGGCGATTGAAGATTTTACCGTCTGGATTTAGTACGTCGCTGCTTCTATTTAAAAGTGTGCGAAAGCTCAGCC
 GTGAACGCGCCTGCGTAGGCTGGCGTCGCGCAGTGTGAGCCAGTTAGTGAGCGAGTGGGGTTGGGACGAAGCT
 CGTCTGGCAATGCTCGATAACCGCGCTAACTGGAAGATTGATCAGGTGCGTGAGGCGCACAAACGAGTTGCTCGAC
 GCGATGATGCAGAGCTACCCTAATCTGATCCGCTTTGCGCGTCGCAATAACCTTAGCGTCTCCGCCAGTCCGCGAG
 ATATCGGCGTGTGACGCGTAAGCTGTATGCCGCTTTGAAGCATTACCAGGTAAAGTGACGCTGGTAAACCCGC
 AGATTTACCCGATCTCTCGGAACCGAATCTGACCTTTATTTATGTGCCGCCGGGCCGGGCTAACCGTTCAGGTTG
 GTATCTGTATAACCGCGCGCAAATATTGAGTCGATCATCAGCCATCAGCCGCTGGAATATAACCGTTACCTGAAT
 AAAGTGGTGGCGTGGGCATGGTTAACGGCCTGCTGACCTCGCGCACCCGTTTGTATATTAAGGTAACGGCATT
 GTCGATTTGCCTAAGTTGCAGGAGATGGTCGCCGACGTGTCGCACCATTTCCCGTGCCTTACCTGCACCGACAC
 CGAAGGCGCTCTACAGCCCGTGTGAGATCCGCCATCTGGCGATTATCGTTAACCTGGAATATGACCCGACAGCGG
 CGTTCCGCAATCAGGTGGTGCATTTGATTTCCGTAAGCTGGATGTCTTCAGCTTTGGCGAGAATCAAAATTGCCT
 GGTAGGTAGCGTTGACCTGCTGTACCGCAACTCGTGAACGAAGTGCGTACGCTGCACTTCAACGGCGAGCAATC
 GATGATCGAAGCCCTGAAAATCTCTCGCAAATGCATCAGGACGCCGACCCGAGATAGCGTGGAAAGTCTT
 CTGTTATAGCCAGCATCTGCGCGGCTTAATTCGTAAGCTGCGTGCAGCAACTGGTTTCTGAGTGTATTGAATTGCGTC
 TTTCCAGCACCCGCCAGGAAACCGGGCGTTTCAAGGCGCTGCGCGTTTCTGGTCAAACCTGGGGTTGTTCTTCGA
 ACGCCTGAATGTATCGGTACAGAACTGAAAACGCCATCGAGTTTTATGGCGGATTTGCGATAACAACTGCAC
 GGCCTGTCAGTGCAGTTGAAACCAATCACGTCAAATTACCGCGGTGGTGGACGGCTTTGCCAGCGAAGGGATC
 ATCCAGTTCTTTTTCGAAGAAACGCAAGACGAGAATGGCTTAAATATCTACATTCTCGACGAAAGCAACCGGGTTG
 AGGTATATCACCCTGCGAAGGCGCAAAGAGGAGCTGGTACGTGACGTGACGTGCTTACTCGTATCGCATG
 ACCGTTTACCTACGGCTCAAGCTTCACTCAACTCAACCTGCCGAGTTCTATCAGATTGTGAAGTTGATGGTCGT
 GAACAGGTGATCCGTTCCGCACAAAATCTATCGGTAACATGCCGCTGCCAATCAGGATCAGGATACGATACGCCGCTAT
 TACAGCAATATTTTTCGTGATGAACGTGCCGAAAGCGAGGCTTATCCGGCATGCAATCTTAGCGGAAACTGACT
 GTTTCACCCGCTGCTGCGTCGCCGCTGTTCCAGCAAATCCAGAAGGT

Proteína CyaA

MYLYIETLKQRLDAINQLRVDRLAAMGPAFQQVYLLPTLLHYHHPLMPGYLDGNVPGICLYTPDETQR
 HYLNELELYRGMVSVQDPPKGELPITGVYTMGSTSSVGQSCSSDLIWWCHQSWLDSEERQLLQRKCSLLEN
 WAASLGVVSVFFLIDENRFRHNESGLGGEDCGSTQHILLLDEFYRTAVRLAGKRILWNMVPCEEEHYDDY

VMTLYAQGVLTNPNEWLDLGGSSLSAEYFGASLWQLYKSIDSPYKAVLKTLLLEAYSWEYPNPRLLAKDIKQ
 RLHDGEIVSFGLDPCMMLEERVTEYLTAIEDFTRLDLVRRFCYLVKCEKLSRERACVGRRAVLSQLVSEWG
 WDEARLAMLNDRANWKIDQVREAHNELLDAMMQSYRNLIRFARRNLSVSASPQDIGVLRKLYAAFEA
 LPGKVTLVNPQISPDLSEPNLTFIYVPPGRANRSGWYLYNRAPNIESIISHQPLEYNRYLNKLVAAWAFNGLL
 TSRRTRYIKGNIGIVDLPKLEQEMVADVSHHFPLRLPAPTPKALYSPCEIRHLAIIVNLEYDPTAAFRNQVVHFD
 RKLDFVFSFGENQNCLVGSVDLLYRNSWNEVRTLHFNGEQSMIEALKTILGKMHQDAAPPDSVEVFCYSQHL
 RGLIRTRVQQLVSEICELRLSSTRQETGRFKALRVSGQTWGLFFERLNVSVQKLENAIEFYGAISHNKLHGLSV
 QVETNHVKLPAVVDGFASEGIIQFFFEETQDENGFNIIYLDENRVEVYHHCEGSKEELVRDVSRYSSSHDR
 FTYGSSFINFLPQFYQIVKVDGREQVIPFRTKSIGNMPPANQDHDTPLLQQYFS

Relación entre la secuencia del gen *cyaA* y de la proteína CyaA

atg	tac	ctc	tat	att	gag	act	ctg	aaa	cag	aga	ctg	gat	gcc	ata
M	Y	L	Y	I	E	T	L	K	Q	R	L	D	A	I
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
aat	caa	ttg	cgt	gtg	gat	cgc	gcg	ctt	gct	gct	atg	ggg	cct	gca
N	Q	L	R	V	D	R	A	L	A	A	M	G	P	A
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
ttc	caa	cag	gtc	tac	agt	cta	ctg	ccg	aca	ttg	ttg	cac	tat	cac
F	Q	Q	V	Y	S	L	L	P	T	L	L	H	Y	H
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
cat	ccg	cta	atg	ccg	ggt	tac	ctt	gat	ggt	aac	gtt	ccc	aaa	ggc
H	P	L	M	P	G	Y	L	D	G	N	V	P	K	G
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
att	tgc	ctt	tac	acg	cct	gat	gaa	act	caa	cgc	cac	tac	ctg	aac
I	C	L	Y	T	P	D	E	T	Q	R	H	Y	L	N
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
gag	ctt	gaa	ctg	tat	cgt	gga	atg	tca	gta	cag	gat	ccg	ccg	aaa
E	L	E	L	Y	R	G	M	S	V	Q	D	P	P	K
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
ggt	gag	ctt	cca	att	act	ggt	gta	tac	acc	atg	ggc	agc	acc	tcg
G	E	L	P	I	T	G	V	Y	T	M	G	S	T	S
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
tcc	gta	ggg	caa	agt	tgt	tcc	tct	gac	ctg	gat	atc	tgg	gtc	tgt
S	V	G	Q	S	C	S	S	D	L	D	I	W	V	C
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
cat	caa	tcc	tgg	ctc	gat	agc	gaa	gag	cgc	caa	ttg	cta	caa	cgt
H	Q	S	W	L	D	S	E	E	R	Q	L	L	Q	R
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
aaa	tgt	agc	ctg	ctg	gaa	aac	tgg	gcc	gcc	tcg	ctg	ggt	gtg	gaa
K	C	S	L	L	E	N	W	A	A	S	L	G	V	E
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
gtc	agc	ttc	ttc	ctg	att	gat	gaa	aac	cgc	ttc	cgt	cat	aat	gaa
V	S	F	F	L	I	D	E	N	R	F	R	H	N	E
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
agc	ggc	agc	ctg	ggg	ggc	gaa	gat	tgt	ggc	tcc	acc	cag	cat	ata
S	G	S	L	G	G	E	D	C	G	S	T	Q	H	I
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
ctg	ctg	ctt	gac	gaa	ttt	tat	cgt	acc	gcc	gtg	cgt	ctc	gcc	ggt
L	L	L	D	E	F	Y	R	T	A	V	R	L	A	G
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
aag	cgt	att	ctg	tgg	aat	atg	gtg	ccg	tgc	gac	gaa	gaa	gag	cat
K	R	I	L	W	N	M	V	P	C	D	E	E	E	H
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210

tac	gac	gac	tat	gtg	atg	acg	ctt	tac	gcg	cag	ggc	gtg	ctg	acg
Y	D	D	Y	V	M	T	L	Y	A	Q	G	V	L	T
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
cca	aat	gaa	tgg	ctg	gat	ctc	ggg	ggc	tta	agc	tcg	ctt	tct	gct
P	N	E	W	L	D	L	G	G	L	S	S	L	S	A
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
gaa	gag	tac	ttt	ggg	gcc	agc	ctt	tgg	cag	ctc	tac	aag	agt	atc
E	E	Y	F	G	A	S	L	W	Q	L	Y	K	S	I
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
gat	tcc	cca	tac	aaa	gcg	gta	ctg	aaa	aca	ctg	ctg	ctg	gaa	gcc
D	S	P	Y	K	A	V	L	K	T	L	L	L	E	A
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
tat	tcc	tgg	gaa	tac	ccg	aac	cca	cgt	ctg	ctg	gcg	aaa	gat	atc
Y	S	W	E	Y	P	N	P	R	L	L	A	K	D	I
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
aaa	cag	cgt	ttg	cac	gac	ggc	gag	att	gta	tcg	ttt	ggg	ctc	gat
K	Q	R	L	H	D	G	E	I	V	S	F	G	L	D
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
cca	tac	tgc	atg	atg	ctg	gag	cgt	ggt	act	gaa	tac	ctg	acg	gcg
P	Y	C	M	M	L	E	R	V	T	E	Y	L	T	A
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
att	gaa	gat	ttt	acc	cgt	ctg	gat	tta	gta	cgt	cgc	tgc	ttc	tat
I	E	D	F	T	R	L	D	L	V	R	R	C	F	Y
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
tta	aaa	gtg	tgc	gaa	aag	ctc	agc	cgt	gaa	cgc	gcc	tgc	gta	ggc
L	K	V	C	E	K	L	S	R	E	R	A	C	V	G
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
tgg	cgt	cgc	gca	gtg	ttg	agc	cag	tta	gtg	agc	gag	tgg	ggg	tgg
W	R	R	A	V	L	S	Q	L	V	S	E	W	G	W
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
gac	gaa	gct	cgt	ctg	gca	atg	ctc	gat	aac	cgc	gct	aac	tgg	aag
D	E	A	R	L	A	M	L	D	N	R	A	N	W	K
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
att	gat	cag	gtg	cgt	gag	gcg	cac	aac	gag	ttg	ctc	gac	gcg	atg
I	D	Q	V	R	E	A	H	N	E	L	L	D	A	M
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
atg	cag	agc	tac	cgt	aat	ctg	atc	cgc	ttt	gcg	cgt	cgc	aat	aac
M	Q	S	Y	R	N	L	I	R	F	A	R	R	N	N
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
ctt	agc	gtc	tcc	gcc	agt	ccg	cag	gat	atc	ggc	gtg	ctg	acg	cgt
L	S	V	S	A	S	P	Q	D	I	G	V	L	T	R
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
aag	ctg	tat	gcc	gcg	ttt	gaa	gca	tta	cca	ggg	aaa	gtg	acg	ctg
K	L	Y	A	A	F	E	A	L	P	G	K	V	T	L
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435
gta	aac	ccg	cag	att	tca	ccc	gat	ctc	tcg	gaa	ccg	aat	ctg	acc
V	N	P	Q	I	S	P	D	L	S	E	P	N	L	T
436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
ttt	att	tat	gtg	ccg	ccg	ggc	cgg	gct	aac	cgt	tca	ggg	tgg	tat
F	I	Y	V	P	P	G	R	A	N	R	S	G	W	Y
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465
ctg	tat	aac	cgc	gcg	cca	aat	att	gag	tcg	atc	atc	agc	cat	cag
L	Y	N	R	A	P	N	I	E	S	I	I	S	H	Q
466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480

ccg	ctg	gaa	tat	aac	cgt	tac	ctg	aat	aaa	ctg	gtg	gcg	tgg	gca
P	L	E	Y	N	R	Y	L	N	K	L	V	A	W	A
481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495
tgg	ttt	aac	ggc	ctg	ctg	acc	tcg	cgc	acc	cgt	ttg	tat	att	aaa
W	F	N	G	L	L	T	S	R	T	R	L	Y	I	K
496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
ggt	aac	ggc	att	gtc	gat	ttg	cct	aag	ttg	cag	gag	atg	gtc	gcc
G	N	G	I	V	D	L	P	K	L	Q	E	M	V	A
511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525
gac	gtg	tcg	cac	cat	ttc	ccg	ctg	cgc	tta	cct	gca	ccg	aca	ccg
D	V	S	H	H	F	P	L	R	L	P	A	P	T	P
526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
aag	gcg	ctc	tac	agc	ccg	tgt	gag	atc	cgc	cat	ctg	gcg	att	atc
K	A	L	Y	S	P	C	E	I	R	H	L	A	I	I
541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555
gtt	aac	ctg	gaa	tat	gac	ccg	aca	gcg	gcg	ttc	cgc	aat	cag	gtg
V	N	L	E	Y	D	P	T	A	A	F	R	N	Q	V
556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
gtg	cat	ttc	gat	ttc	cgt	aag	ctg	gat	gtc	ttc	agc	ttt	ggc	gag
V	H	F	D	F	R	K	L	D	V	F	S	F	G	E
571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585
aat	caa	aat	tgc	ctg	gta	ggg	agc	gtt	gac	ctg	ctg	tac	cgc	aac
N	Q	N	C	L	V	G	S	V	D	L	L	Y	R	N
586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
tcg	tgg	aac	gaa	gtg	cgt	acg	ctg	cac	ttc	aac	ggc	gag	caa	tcg
S	W	N	E	V	R	T	L	H	F	N	G	E	Q	S
601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615
atg	atc	gaa	gcc	ctg	aaa	act	att	ctc	ggc	aaa	atg	cat	cag	gac
M	I	E	A	L	K	T	I	L	G	K	M	H	Q	D
616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
gcc	gca	ccg	cca	gat	agc	gtg	gaa	gtc	ttc	tgt	tat	agc	cag	cat
A	A	P	P	D	S	V	E	V	F	C	Y	S	Q	H
631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645
ctg	cgc	ggc	tta	att	cgt	act	cgc	gtg	cag	caa	ctg	gtt	tct	gag
L	R	G	L	I	R	T	R	V	Q	Q	L	V	S	E
646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660
tgt	att	gaa	ttg	cgt	ctt	tcc	agc	acc	cgc	cag	gaa	acc	ggg	cgt
C	I	E	L	R	L	S	S	T	R	Q	E	T	G	R
661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675
ttc	aag	gcg	ctg	cgc	gtt	tct	ggg	caa	acc	tgg	ggg	ttg	ttc	ttc
F	K	A	L	R	V	S	G	Q	T	W	G	L	F	F
676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690
gaa	cgc	ctg	aat	gta	tcg	gta	cag	aaa	ctg	gaa	aac	gcc	atc	gag
E	R	L	N	V	S	V	Q	K	L	E	N	A	I	E
691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705
ttt	tat	ggc	gcg	att	tcg	cat	aac	aaa	ctg	cac	ggc	ctg	tca	gtg
F	Y	G	A	I	S	H	N	K	L	H	G	L	S	V
706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
cag	gtt	gaa	acc	aat	cac	gtc	aaa	tta	ccg	gcg	gtg	gtg	gac	ggc
Q	V	E	T	N	H	V	K	L	P	A	V	V	D	G
721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735
ttt	gcc	agc	gaa	ggg	atc	atc	cag	ttc	ttt	ttc	gaa	gaa	acg	caa
F	A	S	E	G	I	I	Q	F	F	F	E	E	T	Q
736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750

gac	gag	aat	ggc	ttt	aat	atc	tac	att	ctc	gac	gaa	agc	aac	cgg
D	E	N	G	F	N	I	Y	I	L	D	E	S	N	R
751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765
gtt	gag	gta	tat	cac	cac	tgc	gaa	ggc	agc	aaa	gag	gag	ctg	gta
V	E	V	Y	H	H	C	E	G	S	K	E	E	L	V
766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780
cgt	gac	gtc	agt	cgc	ttc	tac	tcg	tca	tcg	cat	gac	cgt	ttt	acc
R	D	V	S	R	F	Y	S	S	S	H	D	R	F	T
781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795
tac	ggc	tca	agc	ttc	atc	aac	ttc	aac	ctg	ccg	cag	ttc	tat	cag
Y	G	S	S	F	I	N	F	N	L	P	Q	F	Y	Q
796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810
att	gtg	aag	gtt	gat	ggt	cgt	gaa	cag	gtg	att	ccg	ttc	cgc	aca
I	V	K	V	D	G	R	E	Q	V	I	P	F	R	T
811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825
aaa	tct	atc	ggt	aac	atg	ccg	cct	gcc	aat	cag	gat	cac	gat	acg
K	S	I	G	N	M	P	P	A	N	Q	D	H	D	T
826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840
ccg	cta	tta	cag	caa	tat	ttt	tcg	tga						
P	L	L	Q	Q	Y	F	S	Stop						
841	842	843	844	845	846	847	848							

Anexo VII: Secuencia del gen *murA* y de la proteína MurA en *K. pneumoniae*

Gen *murA*

En rojo se muestra la secuencia del gen *murA* en *K. pneumoniae* ATCC 13883, secuencia de referencia NCBI: KN046818.1. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 1439 pb).

CGGAGACCGCAAACCTCAATGCTTCTAAGCTGTGGGGGATCCCCTGCAGCGTATGTGAATTTTAATAGAGAACA
 GAATCAATGGATAAATTCCTGTTCCAGGGGCCGACTCGCCTTCAGGGTGAAGTCACCATCTCCGGGGCAAAAAAC
 GCCGCCCTGCCAATCCTCTTTCCGCGCTGCTTCCGAAGAGCCGGTAGAGATCCAAAACGTACCTAAGCTGAAAAG
 ACATCGATACCACCATGAAGCTGCTGAGCCAGCTGGGCGCGAAGGTCGAGCGCAATGGTTCGGTATGGATTGAC
 GCCGGCCCGGTGCATGTATTCTGTGCTCCGTACGATCTGGTGAACCATGCGCGCCTCTATCTGGGCGCTGGGCC
 CGTTGGTGGCGGCTTCGGTCAGGGGCAAGTTTCTGCTGCGGGCTGCGCTATCGGCGCGCGTCCGGTCGATC
 TGCATATTAGCGGTCTGGAGCAGCTGGGCGCCGAGATCAAACCTGGAAGAAGGTTATGTCAAAGCCTCGGTGAGC
 GGTCGCCTGAAAGGCGCGCATATTGTGATGGATAAGGTGAGCGTCGGCGCCACCCTAACCATCATGAGCGCAGC
 GACGCTTGGGAGGGAAACGACGATTATTGAAAACGCCGCTCGCGAGCCGAGATTGTGCATACCGCAACTTCT
 GAACGCGCTGGGCGCAAAAATCACAGGCCAGGGTAGCGATCGCATTACCATCGAAGGCGTGCAGCGCCTGGGCC
 GCGGCGTCTACCGTGTGCTGCCTGACCGTATTGAAACCGGGACTTCTGGTGGCCGCGCGGATTTCCGGCGGCA
 AGATCCTCTGCCGTAACGCGCAGCCGGATACCTGGATGCCGTAAGCTGCGCGACGCCGGGGCTGAC
 ATCGAAACGGGCGAAGACTGGATCAGCCTCGATATGCACGGCAACCGTCCGAAAGCGGTCAACGTGCGTACCGC
 GCCGACCCGGGCTTCCCGACCGATATGCAGGCCAGTTACGCTGCTTAACCTGGTAGCGGAAGGGACCGGCGT
 GATACCGAAACGATCTTTGAAAACCGTTCATGCACATTCCGGAGCTGATCCGTATGGGCGCGCACGCGGAGAT
 CGAGAGCAATACCGCTATCTGTCACGGCGTGAAGCAGCTTTCTGGCGCGCAGGTGATGGCGACCGATTGCGCGC
 GTCGCGGAGCCTGGTGTGCTGGCCGGCTGATCGCTGAAGGGACCACCATCGTGCATCGCATCTATCATATCGATCG
 CGGCTATGAGCGTATCGAAGATAAATGCAGGGCGTGGGCGCAATATTCAACGCGTGAAGGGCGAGTAAACCGC
 GTCCTGACAGCGCCCGGGACGTTGTTCCGGGGCGCTGTCGAGCAATCACATCACTTGTGATCTTCTTCTGACGC
 ATCATCTGCGTTCTGTGC

Proteína MurA

MDKFRVQGPTRLQGEVTISGAKNAALPILFSALLAEEPVEIQNVPKLDIDTTMKLLSQLGAKVERNGSVWIDAGPVDV
 FCAPYDLVKTMRASIWALGPLVARFGQGVSLPGGCAIGARPVDLHISGLEQLGAEIKLEEGYVKASVSGRLKGAHIVM
 DKVSVGATVTIMSAAATLAEGTTIENAAREPEIVDTANFLNALGAKITQGSDRITIEGVQRLGGGVYRVLPDRIETGTF
 VAAAISGGKILCRNAQPTLDVAVLAKLRDAGADIETGEDWISLDMHGNRPKAVNVRTAPHPGFPDMQAQFTLLNLV
 AEGTGVITETIFENRFMHPELIRMGAAHAEIESNTAICHGVKQLSGAQVMATDLRASASLVLAGCIAEGTTIVDRIYHIDR
 GYERIEDKLQALGANIQRVKGE

Relación entre la secuencia del gen *murA* y de la proteína MurA

atg	gat	aaa	ttc	cgt	ggt	cag	ggg	ccg	act	cgc	ctt	cag	ggt	gaa
M	D	K	F	R	V	Q	G	P	T	R	L	Q	G	E
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
gtc	acc	atc	tcc	ggg	gca	aaa	aac	gcc	gcc	ctg	cca	atc	ctc	ttt
V	T	I	S	G	A	K	N	A	A	L	P	I	L	F
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
tcc	gcg	ctg	ctt	gcc	gaa	gag	ccg	gta	gag	atc	caa	aac	gta	cct
S	A	L	L	A	E	E	P	V	E	I	Q	N	V	P
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
aag	ctg	aaa	gac	atc	gat	acc	acc	atg	aag	ctg	ctg	agc	cag	ctg
K	L	K	D	I	D	T	T	M	K	L	L	S	Q	L
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoina en *E. coli* y *K. pneumoniae*

ggc	gcg	aag	gtc	gag	cgc	aat	ggt	tcg	gta	tgg	att	gac	gcc	ggc
G	A	K	V	E	R	N	G	S	V	W	I	D	A	G
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
ccg	gtc	gat	gta	ttc	tgt	gct	ccg	tac	gat	ctg	gtg	aaa	acc	atg
P	V	D	V	F	C	A	P	Y	D	L	V	K	T	M
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
cgc	gcc	tct	atc	tgg	gcg	ctg	ggc	ccg	ttg	gtg	gcg	cgt	ttc	ggt
R	A	S	I	W	A	L	G	P	L	V	A	R	F	G
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
cag	ggg	caa	gtt	tct	ctg	cct	ggc	ggc	tgc	gct	atc	ggc	gcg	cgt
Q	G	Q	V	S	L	P	G	G	C	A	I	G	A	R
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
ccg	gtc	gat	ctg	cat	att	agc	ggt	ctg	gag	cag	ctg	ggc	gcc	gag
P	V	D	L	H	I	S	G	L	E	Q	L	G	A	E
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
atc	aaa	ctg	gaa	gaa	ggt	tat	gtc	aaa	gcc	tcg	gtc	agc	ggt	cgc
I	K	L	E	E	G	Y	V	K	A	S	V	S	G	R
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
ctg	aaa	ggc	gcg	cat	att	gtg	atg	gat	aag	gtg	agc	gtc	ggc	gcc
L	K	G	A	H	I	V	M	D	K	V	S	V	G	A
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
acc	gta	acc	atc	atg	agc	gca	gcg	acg	ctt	gcg	gag	gga	acg	acg
T	V	T	I	M	S	A	A	T	L	A	E	G	T	T
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
att	att	gaa	aac	gcc	gct	cgc	gag	ccg	gag	att	gtc	gat	acc	gcc
I	I	E	N	A	A	R	E	P	E	I	V	D	T	A
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
aac	ttc	ctg	aac	gcg	ctg	ggc	gca	aaa	atc	aca	ggc	cag	ggt	agc
N	F	L	N	A	L	G	A	K	I	T	G	Q	G	S
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
gat	cgc	att	acc	atc	gaa	ggc	gtg	cag	cgc	ctg	ggc	ggc	ggc	gtc
D	R	I	T	I	E	G	V	Q	R	L	G	G	G	V
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
tac	cgt	gtg	ctg	cct	gac	cg	att	gaa	acc	ggg	act	ttc	ctg	gtg
Y	R	V	L	P	D	R	I	E	T	G	T	F	L	V
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
gcc	gcg	gcg	att	tcc	ggc	ggc	aag	atc	ctc	tgc	cgt	aac	gcg	cag
A	A	A	I	S	G	G	K	I	L	C	R	N	A	Q
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
ccg	gat	acc	ctg	gat	gcc	gta	ctg	gcg	aag	ctg	cg	gac	gcc	ggg
P	D	T	L	D	A	V	L	A	K	L	R	D	A	G
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
gct	gac	atc	gaa	acg	ggc	gaa	gac	tgg	atc	agc	ctc	gat	atg	cac
A	D	I	E	T	G	E	D	W	I	S	L	D	M	H
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
ggc	aac	cgt	ccg	aaa	gcg	gtc	aac	gtg	cgt	acc	gcg	ccg	cac	ccg
G	N	R	P	K	A	V	N	V	R	T	A	P	H	P
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
ggc	ttc	ccg	acc	gat	atg	cag	gcc	cag	ttc	acg	ctg	ctt	aac	ctg
G	F	P	T	D	M	Q	A	Q	F	T	L	L	N	L
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
gta	gcg	gaa	ggg	acc	ggc	gtg	atc	acc	gaa	acg	atc	ttt	gaa	aac
V	A	E	G	T	G	V	I	T	E	T	I	F	E	N
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330

cgc	ttc	atg	cac	att	ccg	gag	ctg	atc	cgt	atg	ggc	gcg	cac	gcg
R	F	M	H	I	P	E	L	I	R	M	G	A	H	A
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
gag	atc	gag	agc	aat	acc	gct	atc	tgt	cac	ggc	gtg	aag	cag	ctt
E	I	E	S	N	T	A	I	C	H	G	V	K	Q	L
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
tct	ggc	gcg	cag	gtg	atg	gcg	acc	gat	ttg	cgc	gcg	tcg	gcg	agc
S	G	A	Q	V	M	A	T	D	L	R	A	S	A	S
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
ctg	gtg	ctg	gcc	ggc	tgt	atc	gct	gaa	ggg	acc	acc	atc	gtc	gat
L	V	L	A	G	C	I	A	E	G	T	T	I	V	D
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
cgc	atc	tat	cat	atc	gat	cgc	ggc	tat	gag	cgt	atc	gaa	gat	aaa
R	I	Y	H	I	D	R	G	Y	E	R	I	E	D	K
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
ctg	cag	gcg	ctg	ggc	gcc	aat	att	caa	cgc	gtg	aag	ggc	gag	taa
L	Q	A	L	G	A	N	I	Q	R	V	K	G	E	Stop
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	

Anexo VIII: Secuencia del gen *glpT* y de la proteína GlpT en *K. pneumoniae*

Gen *glpT*

En rojo se muestra la secuencia del gen *murA* en *K. pneumoniae* ATCC 13883, secuencia de referencia NCBI: KN046818.1. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 1642 pb).

ATTCGCGCGTTATTTGAGCGTGGTTATGTGATTCGTGCTCACATTGGAACGTTTTGTCATATTTCTGTAACAAATTGTCGATGTTTCACAGTATCAACTCTACGTATTGCCTACCATCGCGACCATATTTGAAGTTGGTGATTAATCTGGGATT TTGTCGTGACGTACAGTAGAAAACAGCAAGGGCCACGGAGGCTGATATGTTAAGTATTTTAAACCCGCGCGCAT AAAGCGCGTTTCCAGCAGCGGAGATTGACCCGCTATATCGCCGATTACGCTGGCAGATTTTATTGGCATCTTTT TTGGTTATGCCGCTACTATTTGGTTCGTAAGAACTTTGCCCTGGCGATGCCTTATCTTATCGAGCAGGGGTTCTCT CGTGCGACCTCGGCTTCGCCCTTCCGGTATCTCCATCGCCTATGGATTTTCGAAATTCATCATGGGATCGGTCTC TGACCGCTCGAATCCGCGCATTTTCTGCCGGCTGGCTTATCCTGGCCGCGCTGGTGATGCTGGTGGTGGGCTTC GTGCCGTGGGCGACGTCCAGCATCATGATAATGTTCTGTGCTGCTGTTCTCTGCCGGCTGGTTCCAGGGGATGGGC TGGCCGCGTGGCGCGGACCATGGTGCATGGTGGTGCAGAAAGAGCGCGGTGGGATTGTCTCGGTGTGGAA CTGCGCGCATAACGTCCGGCGCGGCATTCCGCCGCTGCTGTTCTGTTAGGGATGGCGTGGTTTAACTGACTGGCA CGCGGCGCTGTATATGCCGGCATTCCGGCGCATTCTGCTGGCGATTTTGCCTTTGCGATGATGCGCGACACCCCG CAGTCTGCCGCTGCCGCCGATTGAAGAATATAAAACGACTACCCGGACGATTACAGCGAAAAGCACGAAGAA GAGCTGACGGCGAAGCAGATCTTTATGCAGTACATTCTGCCGAACAAGCTGCTGTGGTACATCGCTATCGCTAACG TCTTCGTTTATCTGCTGCGCTACGGCATTCTCGACTGGTCCGCCACCTACCTGAAAGAAGTTAAACACTTCGCGCTG GATAAATCCTCCTGGGCTATTTCTGTACGAGTACGCGGGGATCCCGGGCACGCTGCTGTGCCGGCTGGATGTCCG GACAAAGTGTTTAAAGGCAACCCGCGGCGCCACCGGCGTGTCTTTATGACCCTGGTGACCATCGCCACTGTGCTTT ACTGGTGAACCCGCGGGTAATCCGGGCGTGCATATGGCCTGTATGATCATCATTGGCTTCTGATCTACGGCCC GGTGATGCTGATTGGTCTGCATGCCCTCGAGCTGGCGCCGAAAAAGCCGCGGGACCGCCGCGGGCTTACCGG GCCTGTTCCGGCTATTTGGCGGTTCCGTGGCCGCGAGCGCTATCGTCCGGCTACACCGTGCATTTCTCGGCTGGGA CGGGCGCTTTATGGTGTATGATCGGCGGCGAGCGTGTGGCGGTTATCCTGCTGGTTATCGTGATGCTCGGTGAACG TCGCCATACCAACAGCTGAAACAAGCCTAAGGAGCGGCGATGAAAATGAAACTACCGCGCTGATGAGCGGAA TGATTCTGTCCAGTTCGGCGCTGTGCTTCAGTCCGACAGCGGCTGATAAAAT

Proteína GlpT

MLSIFKPAAHKARLPAAEIDPLYRRLRWQIFIGIFFGYAAAYLVRKNFALAMPYLIEQGFSRGDLGFSGISIAYGFSKFM GSVSDRNSPRIFLPAGLILAALVLMGMFVPWATSSIMIMFVLLFLCGWFQGMGWPPCGRMTMVHWWWSQKERGGIV SVWNCANHNVGGGIPLLFLGLMAWFNDWHAALYMPAFGAILLAIFAFAMMRDTPQSCGLPPIEEYKNDYPPDYSEK HEEELTAKQIFMQYILPNKLLWYIAIANVFVYLLRYGILDWSPTYLKEVKHFALDKSSWAYFLYEYAGIPGTLCCGWMMSDK VFKGNRGATGVFFMTLVTIATVVYWLNPNGNPGVDMACMIIGFLIYGPVMLIGLHALELAPKKAAGTAAGFTGLFGYL GGSVAASAIVGYTVDFGWDGGFMVMIGGSVLAVILLVIVMLGERRHHQQLKQA

Relación entre la secuencia del gen *glpT* y de la proteína GlpT

atg	tta	agt	att	ttt	aaa	ccc	gcc	gcg	cat	aaa	gcg	cgt	ttg	cca
M	L	S	I	F	K	P	A	A	H	K	A	R	L	P
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
gca	gcg	gag	att	gac	ccg	cta	tat	cgc	cga	tta	cgc	tgg	cag	att
A	A	E	I	D	P	L	Y	R	R	L	R	W	Q	I
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
ttt	att	ggc	atc	ttt	ttt	ggt	tat	gcc	gcc	tac	tat	ttg	gtt	cgt
F	I	G	I	F	F	G	Y	A	A	Y	Y	L	V	R
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en *E. coli* y *K. pneumoniae*

aag	aac	ttt	gcc	ctg	gcg	atg	cct	tat	ctt	atc	gag	cag	ggg	ttc
K	N	F	A	L	A	M	P	Y	L	I	E	Q	G	F
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
tct	cgt	ggc	gac	ctc	ggc	ttc	gcc	ctt	tcc	ggt	atc	tcc	atc	gcc
S	R	G	D	L	G	F	A	L	S	G	I	S	I	A
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
tat	gga	ttt	tcg	aaa	ttc	atc	atg	gga	tcg	gtc	tct	gac	cgc	tcg
Y	G	F	S	K	F	I	M	G	S	V	S	D	R	S
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
aat	ccg	cgc	att	ttc	ctg	ccg	gct	ggc	ttg	atc	ctg	gcc	gcg	ctg
N	P	R	I	F	L	P	A	G	L	I	L	A	A	L
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
gtg	atg	ctg	gtg	atg	ggc	ttc	gtg	ccg	tgg	gcg	acg	tcc	agc	atc
V	M	L	V	M	G	F	V	P	W	A	T	S	S	I
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
atg	ata	atg	ttc	gtg	ctg	ctg	ttc	ctc	tgc	ggc	tgg	ttc	cag	ggg
M	I	M	F	V	L	L	F	L	C	G	W	F	Q	G
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
atg	ggc	tgg	ccg	ccg	tgc	ggc	cgg	acc	atg	gtg	cac	tgg	tgg	tcg
M	G	W	P	P	C	G	R	T	M	V	H	W	W	S
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
cag	aaa	gag	cgc	ggt	ggg	att	gtc	tcg	gtg	tgg	aac	tgc	gcg	cat
Q	K	E	R	G	G	I	V	S	V	W	N	C	A	H
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
aac	gtc	ggc	ggc	ggc	att	ccg	ccg	ctg	ctg	ttc	ctg	tta	ggg	atg
N	V	G	G	G	I	P	P	L	L	F	L	L	G	M
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
gcg	tgg	ttt	aac	gac	tgg	cac	gcg	gcg	ctg	tat	atg	ccg	gca	ttc
A	W	F	N	D	W	H	A	A	L	Y	M	P	A	F
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
ggc	gcc	att	ctg	ctg	gcg	att	ttc	gcc	ttt	gcg	atg	atg	cgc	gac
G	A	I	L	L	A	I	F	A	F	A	M	M	R	D
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
acc	ccg	cag	tcc	tgc	ggt	ctg	ccg	ccg	att	gaa	gaa	tat	aaa	aac
T	P	Q	S	C	G	L	P	P	I	E	E	Y	K	N
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
gac	tac	ccg	gac	gat	tac	agc	gaa	aag	cac	gaa	gaa	gag	ctg	acg
D	Y	P	D	D	Y	S	E	K	H	E	E	E	L	T
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
gcg	aag	cag	atc	ttt	atg	cag	tac	att	ctg	ccg	aac	aag	ctg	ctg
A	K	Q	I	F	M	Q	Y	I	L	P	N	K	L	L
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
tgg	tac	atc	gct	atc	gct	aac	gtc	ttc	gtt	tat	ctg	ctg	cgc	tac
W	Y	I	A	I	A	N	V	F	V	Y	L	L	R	Y
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
ggc	att	ctc	gac	tgg	tcg	ccg	acc	tac	ctg	aaa	gaa	gtt	aaa	cac
G	I	L	D	W	S	P	T	Y	L	K	E	V	K	H
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
ttc	gcg	ctg	gat	aaa	tcc	tcc	tgg	gcc	tat	ttc	ctg	tac	gag	tac
F	A	L	D	K	S	S	W	A	Y	F	L	Y	E	Y
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
gcg	ggg	atc	ccg	ggc	acg	ctg	ctg	tgc	ggc	tgg	atg	tcg	gac	aaa
A	G	I	P	G	T	L	L	C	G	W	M	S	D	K
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315

gtg	ttt	aaa	ggc	aac	cgc	ggc	gcc	acc	ggc	gtg	ttc	ttt	atg	acc
V	F	K	G	N	R	G	A	T	G	V	F	F	M	T
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
ctg	gtg	acc	atc	gcc	act	gtc	gtt	tac	tgg	ctg	aac	ccg	ccg	ggt
L	V	T	I	A	T	V	V	Y	W	L	N	P	P	G
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
aat	ccg	ggc	gtc	gat	atg	gcc	tgt	atg	atc	atc	att	ggc	ttc	ctg
N	P	G	V	D	M	A	C	M	I	I	I	G	F	L
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
atc	tac	ggc	ccg	gtg	atg	ctg	att	ggt	ctg	cat	gcc	ctc	gag	ctg
I	Y	G	P	V	M	L	I	G	L	H	A	L	E	L
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
gcg	ccg	aaa	aaa	gcc	gcc	ggg	acc	gcc	gcg	ggc	ttc	acc	ggc	ctg
A	P	K	K	A	A	G	T	A	A	G	F	T	G	L
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
ttc	ggc	tat	ctt	ggc	ggt	tcc	gtg	gcc	gcg	agc	gct	atc	gtc	ggc
F	G	Y	L	G	G	S	V	A	A	S	A	I	V	G
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
tac	acc	gtc	gat	ttc	ttc	ggc	tgg	gac	ggc	ggc	ttt	atg	gtg	atg
Y	T	V	D	F	F	G	W	D	G	G	F	M	V	M
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
atc	ggc	ggc	agc	gtg	ctg	gcg	gtt	atc	ctg	ctg	gtt	atc	gtg	atg
I	G	G	S	V	L	A	V	I	L	L	V	I	V	M
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435
ctc	ggt	gaa	cgt	cgc	cat	cac	caa	cag	ctg	aaa	caa	gcc	taa	
L	G	E	R	R	H	H	Q	Q	L	K	Q	A	Stop	
436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448		

Anexo IX: Secuencia del gen *uhpT* y de la proteína UhpT en *K. pneumoniae*

Gen *uhpT*

En rojo se muestra la secuencia del gen *uhpT* en *K. pneumoniae* ATCC 13883, secuencia de referencia NCBI: KN046818.1. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 1543 pb).

GCGCTGGTTTTACAATGCC TGGTTATTACGCAGGCATAAAAAATCAGCTCAGGAGATACCCATGCTGGCCTTTCT
 GAATCAGGTGCGCAAGCCGACCCTGGATCTGCCGCTCGATGTGCGGCGCAAATGTGGTTCAAACCTTTCATGCA
 GTCCTATCTGGTGGTTTTATCGGCTACCTGACCATGTAATTGATCCGCAAGAACTTAAACATCGCGCAGAACGACA
 TGATCTCCACTACGGGTTGAGCATGACGCAGCTGGGGATGATTGGCCTGGGCTTCTCCATCACCTACGGCGTGG
 GCAAGACGCTGGTCTCTTATTATGCCGACGGCAAAAACACCAAGCAGTTCCTGCCGTTTATGCTGATCTCTCCGC
 ATCTGTATGCTGGGCTTTAGCGCCAGCATGGGGGCGGGTCTACCAGCCTGTTCTGATGATCGCCTTCTATGCGC
 TGAGCGGTTTCTCCAGAGCACGGCGGCTCGTGAGCTATCCACCATCACCAAGTGGACGCCAGACGCAAAC
 GCGGCACTTCTCGGCTTCTGGAATATCTCCACAACCTCGGCGGCGGGGCGGGCGGGCGTGGCGCTGTTTG
 GCGCCAATATCTGTTCCAGCGCCATGTGATCGGCATGTTTATCTCCCGTCGATTATTGCGCTGATCGTTGGCTTT
 ATCGGCTGCGCTACGGTAGCGACTCTCCGGAATCTACGGCCTCGGCACGGCGGAAGAGCTGTTTGGCGAAGC
 GATCAGCGAAGAGGACAAAGAGACCGAAGAAAATGCGATGACCAAGTGGCAGATCTTTGTTGAGTACGTGCTGA
 AAAACAAAGTGATCTGGCTGCTGTGCTTCTCAACATCTTCTCTACGTGGTGCATCGGTATCGATCAGTGGTCC
 ACCGTGTATGCCTCCAGGAGCTGAAGCTGTCTAAAGAGGTGGCGATTACGGGCTTTACCCTGTTTGAAGTCGGC
 GCGCTGGTTGGCAGCTGCTGTGGGGCTGGTTGTGGATCTGGCCAACGGCCGCCGCGCGTGGTGGCCTGCATC
 GCGCTGGCGCTGATTATCGCCACCCTCGGGGTTTACCAACATGCCAGCAACCAGTACGTCTATCTGGCCTCTTATT
 TGGCTGGGCTTCTGGTGTGGTCCGAGCTGTTGATCGGCGTCGCCGCCGTCGGTTTCGTACCGAAAAAAGC
 GATCGGCGCCCGGATGGAATCAAGGGCACCTTCGCCTATCTGATCGGCGATAGCTTCGCCAAACTGGGTCTTGG
 GATGATCGCCGACGGCACCCCGGCTTCGGCCTGACCGGCTGGGCGGCGACCTTTGCGGCGCTGGACGCCGCCGC
 CGTCCGCTGTATCTGCTGATGGCCATCGTGGCTATCTTGAAGAGCGTAAAATTCGCCGCGAGAAAAAGAACC
 TATTTTGCAGACCGCCTGATTCACCAGGATTTGGTAACCTTGCCCGCCTTCGCGCCGGGCTTTTTATTCTTGGC
 CATTATGCCAGGTCCGACAGTCGACAGC

Proteína UhpT

MLAFLNQVRKPTLDLPLDVRKMWFKPFMQSYLVVFIGYLTMYLIRKFNIAQNDMISTYGLSMTQLGMIGLGSITY
 GVGKTLVSYADGKNTKQFLPFMLILSAICMLGFSASMGAGSTSLFLMIAFYALSGFFQSTGGSCSYSTITKWTPRRKRG
 TFLGFWNISHNLGGAGAAGVALFGANYLFDGHVIGMFIFFSIIALVIGFIGLRYGSDSPESYGLGTAEEELFGEAISEEDKET
 EENAMTKWQIFVEYVLKNKVIWLLCFNIFLYVVRIGIDQWSTVYAFQELKLSKEVAIQGFTLFEVGALVGTLLWGWLSD
 LANGRRALVACIALALIATLGVYQHASNQVYVYLAFLGFLVFGPQLLIGVAAVGFVPKKAIGAADGIKGTFFAYLIGDSF
 AKLGLMIADGTPVFGLTGWAGTFAALDAAAVGCICLMAIVAIFEERKIRREKKNRILQTA

Relación entre la secuencia del gen *uhpT* y de la proteína UhpT

atg	ctg	gcc	ttt	ctg	aat	cag	gtg	cgc	aag	ccg	acc	ctg	gat	ctg
M	L	A	F	L	N	Q	V	R	K	P	T	L	D	L
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ccg	ctc	gat	gtg	cgg	cgc	aaa	atg	tgg	ttc	aaa	cct	ttc	atg	cag
P	L	D	V	R	R	K	M	W	F	K	P	F	M	Q
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
tcc	tat	ctg	gtg	gtt	ttc	atc	ggc	tac	ctg	acc	atg	tac	ttg	atc
S	Y	L	V	V	F	I	G	Y	L	T	M	Y	L	I
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en *E. coli* y *K. pneumoniae*

cgc	aag	aac	ttt	aac	atc	gcg	cag	aac	gac	atg	atc	tcc	acc	tac
R	K	N	F	N	I	A	Q	N	D	M	I	S	T	Y
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
ggg	ttg	agc	atg	acc	cag	ctg	ggg	atg	att	ggc	ctg	ggc	ttc	tcc
G	L	S	M	T	Q	L	G	M	I	G	L	G	F	S
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
atc	acc	tac	ggc	gtg	ggc	aag	acg	ctg	gtc	tct	tat	tat	gcc	gac
I	T	Y	G	V	G	K	T	L	V	S	Y	Y	A	D
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
ggc	aaa	aac	acc	aag	cag	ttc	ctg	ccg	ttt	atg	ctg	atc	ctc	tcc
G	K	N	T	K	Q	F	L	P	F	M	L	I	L	S
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
gcc	atc	tgt	atg	ctg	ggc	ttt	agc	gcc	agc	atg	ggg	gcg	ggt	tct
A	I	C	M	L	G	F	S	A	S	M	G	A	G	S
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
acc	agc	ctg	ttc	ctg	atg	atc	gcc	ttc	tat	gcg	ctg	agc	ggt	ttc
T	S	L	F	L	M	I	A	F	Y	A	L	S	G	F
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
ttc	cag	agc	acc	ggc	ggc	tcg	tgc	agc	tat	tcc	acc	atc	acc	aag
F	Q	S	T	G	G	S	C	S	Y	S	T	I	T	K
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
tgg	acg	ccc	aga	cgc	aaa	cgc	ggc	act	ttc	ctc	ggc	ttc	tgg	aat
W	T	P	R	R	K	R	G	T	F	L	G	F	W	N
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
atc	tcc	cac	aac	ctc	ggc	ggc	gcg	ggc	gcg	gcg	ggc	gtg	gcg	ctg
I	S	H	N	L	G	G	A	G	A	A	G	V	A	L
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
ttt	ggc	gcc	aac	tat	ctg	ttc	gac	ggc	cat	gtg	atc	ggc	atg	ttt
F	G	A	N	Y	L	F	D	G	H	V	I	G	M	F
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
atc	ttc	ccg	tcg	att	att	gcg	ctg	atc	gtt	ggc	ttt	atc	ggc	ctg
I	F	P	S	I	I	A	L	I	V	G	F	I	G	L
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
cgc	tac	ggt	agc	gac	tct	ccg	gaa	tcc	tac	ggc	ctc	ggc	acg	gcg
R	Y	G	S	D	S	P	E	S	Y	G	L	G	T	A
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
gaa	gag	ctg	ttt	ggc	gaa	gcg	atc	agc	gaa	gag	gac	aaa	gag	acc
E	E	L	F	G	E	A	I	S	E	E	D	K	E	T
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
gaa	gaa	aat	gcg	atg	acc	aag	tgg	cag	atc	ttt	gtt	gag	tac	gtg
E	E	N	A	M	T	K	W	Q	I	F	V	E	Y	V
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
ctg	aaa	aac	aaa	gtg	atc	tgg	ctg	ctg	tgc	ttc	tcc	aac	atc	ttc
L	K	N	K	V	I	W	L	L	C	F	S	N	I	F
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
ctc	tac	gtg	gtg	cgt	atc	ggt	atc	gat	cag	tgg	tcc	acc	gtg	tat
L	Y	V	V	R	I	G	I	D	Q	W	S	T	V	Y
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
gcc	ttc	cag	gag	ctg	aag	ctg	tct	aaa	gag	gtg	gcg	att	cag	ggc
A	F	Q	E	L	K	L	S	K	E	V	A	I	Q	G
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
ttt	acc	ctg	ttt	gaa	gtc	ggc	gcg	ctg	gtt	ggc	acg	ctg	ctg	tgg
F	T	L	F	E	V	G	A	L	V	G	T	L	L	W
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315

ggc	tgg	ttg	tcg	gat	ctg	gcc	aac	ggc	cgc	cgc	gcg	ctg	gtg	gcc
G	W	L	S	D	L	A	N	G	R	R	A	L	V	A
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
tgc	atc	gcg	ctg	gcg	ctg	att	atc	gcc	acc	ctc	ggg	ggt	tac	caa
C	I	A	L	A	L	I	I	A	T	L	G	V	Y	Q
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
cat	gcc	agc	aac	cag	tac	gtc	tat	ctg	gcc	tct	tta	ttt	gcg	ctg
H	A	S	N	Q	Y	V	Y	L	A	S	L	F	A	L
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
ggc	ttc	ctg	gtg	ttt	ggt	ccg	cag	ctg	ttg	atc	ggc	gtc	gcc	gcc
G	F	L	V	F	G	P	Q	L	L	I	G	V	A	A
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
gtc	ggt	ttc	gta	ccg	aaa	aaa	gcg	atc	ggc	gcc	gcc	gat	ggt	atc
V	G	F	V	P	K	K	A	I	G	A	A	D	G	I
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
aag	ggc	acc	ttc	gcc	tat	ctg	atc	ggc	gat	agc	ttc	gcc	aaa	ctg
K	G	T	F	A	Y	L	I	G	D	S	F	A	K	L
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
ggt	ctt	ggg	atg	atc	gcc	gac	ggc	acc	ccg	gtc	ttc	ggc	ctg	acc
G	L	G	M	I	A	D	G	T	P	V	F	G	L	T
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
ggc	tgg	gcc	ggc	acc	ttt	gcg	gcg	ctg	gac	gcc	gcc	gcc	gtc	ggc
G	W	A	G	T	F	A	A	L	D	A	A	A	V	G
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435
tgt	atc	tgc	ctg	atg	gcc	atc	gtg	gct	atc	ttt	gaa	gag	cg	aaa
C	I	C	L	M	A	I	V	A	I	F	E	E	R	K
436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
att	cg	cg	gag	aaa	aag	aac	cg	att	ttg	cag	acc	gcg	tga	
I	R	R	E	K	K	N	R	I	L	Q	T	A	Stop	
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463		

Anexo X: Secuencia del gen *uhpA* y de la proteína UhpA en *K. pneumoniae*

Gen *uhpA*

En rojo se muestra la secuencia del gen *murA* en *K. pneumoniae* ATCC 13883, secuencia de referencia NCBI: KN046818.1. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 745 pb).

TCGCTAAGGTAAGCGCCTTTACCGGATGACGCTGCGCTTATCCGGCCTACAAGCAGTGAATCCGTAGGCCGGATA
 AGGCGTTTACGCCGCATCCGGCGTTTTACGGCACCAGGACACACCATGACCACCATCGCCCTATTGACGATCAT
 TTGATTGTCCGCTCCGGCTTTGCTCAGCTGCTGGGGCTGGAAGCTGATTTTCAGGTTGTCGCCGAATTTGGTAGCG
 GCCGCGAGGCGCTGACGGGGCTACCGGGCGCGGCGTGCAGGTCTGTATCTGCGATATCTCAATGCCGGATATT
 CCGGGCTGGAGCTGCTCAGCCAGCTGCCGAAGGGGATGGCGACCATCATGCTGTGCGGTACACGATAGCCCGGCG
 CTGATCGAGCAAGCGTTGAATGCCGGCGCGCGGGCTTCTGTGAAACGCTGCAGCCCCGATGAAGTTATCGCC
 GCGGTACGCACGGTGGCGGCGGGCGGTTGCTATCTCACGCCGATATCGCCATGAAGCTGGCCCGGGCGGCCA
 GGATCCGCTACCAAACGCGAGCGTCAGGTGGCGGAAAAGCTGGCGCAGGGCATGGCGGTGAAAAGAGATTGCC
 GCCGAGCTCGGTCTGTGCGCGAAAACCGTCCACGTACACCGCGCCAACCTGCTGGAAAAGCTGGGCGTCAGCAAC
 GACGTTGAGCTGGCGCGCCGCATGTTTCGATAGCTGGCAATGAAGGCCGTCGTTCACGATTGCTGTCGGTTCAT

Proteína UhpA

MTTIALIDDLIVRSGFAQLLGLLEADFQVVAEFGSGREALTGLPGRGVQVCICDISMPDISGLELLSQLPKGMATIMLSV
 HDSPALIEQALNAGARGFLSKRCSPELIAAVRTVAAGGCYLPDIAMKLAAGRQDPLTKRERQVAEKLAQGMVAKEIA
 AELGLSPKTVHVRANLLEKLGVSNDVELARRMFDSWQ

Relación entre la secuencia del gen *uhpA* y de la proteína UhpA

atg	acc	acc	atc	gcc	ctt	att	gac	gat	cat	ttg	att	gtc	cgc	tcc
M	T	T	I	A	L	I	D	D	H	L	I	V	R	S
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ggc	ttt	gct	cag	ctg	ctg	ggg	ctg	gaa	gct	gat	ttt	cag	gtt	gtc
G	F	A	Q	L	L	G	L	E	A	D	F	Q	V	V
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
gcc	gaa	ttt	ggt	agc	ggc	cgc	gag	gcg	ctg	acg	ggg	cta	ccg	ggg
A	E	F	G	S	G	R	E	A	L	T	G	L	P	G
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
cgc	ggc	gtg	cag	gtc	tgt	atc	tgc	gat	atc	tca	atg	ccg	gat	att
R	G	V	Q	V	C	I	C	D	I	S	M	P	D	I
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
tcc	ggg	ctg	gag	ctg	ctc	agc	cag	ctg	ccg	aag	ggg	atg	gcg	acc
S	G	L	E	L	L	S	Q	L	P	K	G	M	A	T
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
atc	atg	ctg	tcg	gta	cac	gat	agc	ccg	gcg	ctg	atc	gag	caa	gcg
I	M	L	S	V	H	D	S	P	A	L	I	E	Q	A
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
ttg	aat	gcg	ggc	gcg	cgc	ggc	ttc	ctg	tcg	aaa	cgc	tgc	agc	ccc
L	N	A	G	A	R	G	F	L	S	K	R	C	S	P
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
gat	gaa	ctt	atc	gcc	gcg	gta	cgc	acg	gtg	gcg	gcg	ggc	ggt	tgc
D	E	L	I	A	A	V	R	T	V	A	A	G	G	C
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en E. coli y K. pneumoniae

tat	ctc	acg	ccg	gat	atc	gcc	atg	aag	ctg	gcc	gcc	ggg	cgc	cag
Y	L	T	P	D	I	A	M	K	L	A	A	G	R	Q
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
gat	ccg	ctc	acc	aaa	cgc	gag	cgT	cag	gtg	gcg	gaa	aag	ctg	gcg
D	P	L	T	K	R	E	R	Q	V	A	E	K	L	A
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
cag	ggc	atg	gcg	gtg	aaa	gag	att	gcc	gcc	gag	ctc	ggt	ctg	tcg
Q	G	M	A	V	K	E	I	A	A	E	L	G	L	S
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
ccg	aaa	acc	gtc	cac	gta	cac	cgC	gcc	aac	ctg	ctg	gaa	aag	ctg
P	K	T	V	H	V	H	R	A	N	L	L	E	K	L
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
ggc	gtc	agc	aac	gac	gtt	gag	ctg	gcg	cgC	cgC	atg	ttc	gat	agc
G	V	S	N	D	V	E	L	A	R	R	M	F	D	S
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
tgg	caa	tga												
W	Q	Stop												
196	197													

Anexo XI: Secuencia del gen *ptsI* y de la proteína PtsI en *K. pneumoniae*

Gen *ptsI*

En rojo se muestra la secuencia del gen *ptsI* en *K. pneumoniae* ATCC 13883, secuencia de referencia NCBI: KN046818.1. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 1875 pb).

TCTCCGCTGAAGCGAAGATGAGCAGAAAGCTGTTGAGCATCTGGTTAACTGATGGCTGAACTCGAGTAAGTTCACGGTTCTTTTTCATATCAGTCACAAGTAAGGTAGGGTTATGATTTTCAGGCATTTAGCATCCCCGGGTATCGCCTTCGGCAAAGCATTGCTGCTGAAGGAAGATGAAATTGTCATCGACCGGAAGAAAATTTCTGCCGATAAGGTTGATCAGGAAGTCGAACGTTTCTGAGCGGCCCGCCAAGGCCTCCGCCAGCTGGAGGTCATCAAACCAAAGCTGGTGAAATTTTCGGTGAAGAAAAAGAACCCATCTTCGAAGGGCATATTGCTGCTGGAAGATGAGGAGCTTGAGCAGGAAATCATAGCCCTGATTAAGATAAGCACATGACTGCCGACGCGGCAGCCAATGAAGTTATCGACGGTCAGGCCTACTGCCCTGGAAGAGCTGGATGATGAATACCTGAAAGAAGCTGCGGCTGACGTACGTGATATCGGTAAGCGCCTGCTGCGCAACATCCTTGGTCTGGCAATCATCGATCTGAGTGCATTGAGGATGAAGTCATCTCGTCCGCCCGATCTGACCCCGTCTGAAACCGCACAGCTGAACTGAAAAAGTGTGGTTTCATCACCGATGCGGGCGGTCTGATCCACACCTCTATCATGGCGGTTCCCTGGAATTGCCGGCCATCGTGGCACCAGCAGCATCACGGCGCAGGTGAAAAATGGCGACTATCTGATTCTCGACGCGGTGAACAACAGGTTCTGATCAACCCGTCTAACGAGCAAATTGAA GCGCTGCGTAGTCTGCAAGGCTCAGGTTGCGGAAGAAAAAGCCGAAGTGGCGAACTGAAAGATCTGCCGGCGAT TACCCTCGACGGCCATCAGGTTGAAGTCTGCGCAACATTGGTACCGTTCGCGATGTCGAAGGTGCTGAGCGCAA CGGCGCCGAAGGCGTAGGTTCTGTATCGTACCGAATTCCTGTTTCATGGACCGTGACGCGCTGCCAACTGAAGAAGA ACAGTTTTCGGGCTTATAAGCGGTGGCTGAGGCTGTGGTTCTCAGGCCGTTATCGTCCGTACCATGGATATCGGG GCGCAAAAGAGCTGCCGTACATGAACTTCCCGAAAGAAGAGAACCCGTTCTCGGCTGGCGTGGCGTGCCTGCGTATT GCGATGGATCGTAAAGAGATCCTGCGCGACAGGTTGCGGCCATCCTGCGTGCCTCCGCTTTCGGTAAGCTGCGC ATTATGTTCCCGATGATCATCTCTGTTGAAGAAGTGCCTGCGCTGAAGAAAGAGATCGAAATCTACAAACAGGAA CTGCGTGACGAAGGTAAAGCATTGACGAATCCATTGAGATCGGCGTGATGGTGGAAACACCGGCTGCGGCGAC TATTGCTCGTCATCTGGCCAAAGAAGTTGATTTCTTTAGTATCGGCCACCAATGATTTAACGCAATATACTCTGGCAG TTGACCGTGGTAAATGATATGATTTACATCTTACCAGCCGATGTCACCGTCTGACTGAATCTGATTAAGCAAGTT ATTGATGCTTCTACGCTGAAGGTAATGGACTGGCATGTGCGGTGAGCTTGCAGGCGATGAACGTGCTACACTT CTGTTGCTGGGTATGGGGCTGGACGAATTCTATGAGCGCCATTTCCATCCCGCGCATCAAGAAGATTATTCGTA ATACGAACTTCGAAGATGCGAAAGTATTAGCAGAGCAGGCTTGTCTCAACCGACAACGACGAGTTAATGACGC TGGTTAACAAAGTTCATTGAAGAAAAACAATCTGCTAATCCACGAGATGCGCGGCCAAATTAAGTCTGCTTA

Proteína PtsI

MISGILASPGIAFGKALLLKEDEIVDRKKISADKVDQEVERFLSRAKASAQLEVIKTKAGETFGEEKEAIFEGHIMLLEDE ELEQEIIALIKDKHMTADAAAANEVIDGQATALEELDDEYLKERAADVDRDIGKRLRNILGLAIIDLSAIQDEVILVAADLTPS ETAQLNLKVLGFITDAGGRSHTSIMARSLELPAIVGTGSITAQVKNQDYLILDVAVNNQVNLINPSNEQIEALRSLQAQVA EEKAEALAKLKDLPAILDGHQVEVCANIGTVRDVEGAERNGAEGVGLYRTEFLFMDRDALPTEEEQFAAYKAVAEACGS QAVIVRTMDIGGDKELPYMNFPEENPFLGWRAVRIAMDRKEILRDQVRAILRASAFGLKRMIFPMIISVEEVRAALKKEI EIYKQELRDEGKAFDESIEIGVMVETPAAATIAHRLAKEVDFFSIGTNDLTQYTLAVDRGNDMISHLYQPMSPSVLNLIKQ VIDASHAEGKWTGMCDELADGERATLLLLGMGLDEFSMSAISIPRIKKIIRNTNFEDAKVLAEQALAQPTTDELMTLVN KFIIEKTIC

Relación entre la secuencia del gen *ptsI* y de la proteína PtsI

atg	att	tca	ggc	att	tta	gca	tcc	ccg	ggt	atc	gcc	ttc	ttc	aaa
M	I	S	G	I	L	A	S	P	G	I	A	F	G	K
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
gca	ttg	ctg	ctg	aag	gaa	gat	gaa	att	gtc	atc	gac	cgg	aag	aaa
A	L	L	L	K	E	D	E	I	V	I	D	R	K	K
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en *E. coli* y *K. pneumoniae*

att	tct	gcc	gat	aag	gtt	gat	cag	gaa	gtc	gaa	cgt	ttc	ctg	agc
I	S	A	D	K	V	D	Q	E	V	E	R	F	L	S
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
ggc	cgc	gcc	aag	gcc	tcc	gcc	cag	ctg	gag	gtc	atc	aaa	acc	aaa
G	R	A	K	A	S	A	Q	L	E	V	I	K	T	K
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
gct	ggt	gaa	act	ttc	ggt	gaa	gaa	aaa	gaa	gcc	atc	ttc	gaa	ggg
A	G	E	T	F	G	E	E	K	E	A	I	F	E	G
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
cat	att	atg	ctg	ctg	gaa	gat	gag	gag	ctt	gag	cag	gaa	atc	ata
H	I	M	L	L	E	D	E	E	L	E	Q	E	I	I
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
gcc	ctg	att	aaa	gat	aag	cac	atg	act	gcc	gac	gcg	gca	gcc	aat
A	L	I	K	D	K	H	M	T	A	D	A	A	A	N
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
gaa	gtt	atc	gac	ggt	cag	gcc	act	gcc	ctg	gaa	gag	ctg	gat	gat
E	V	I	D	G	Q	A	T	A	L	E	E	L	D	D
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
gaa	tac	ctg	aaa	gaa	cgt	gcg	gct	gac	gta	cgt	gat	atc	ggt	aag
E	Y	L	K	E	R	A	A	D	V	R	D	I	G	K
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
cgc	ctg	ctg	cgc	aac	atc	ctt	ggt	ctg	gca	atc	atc	gat	ctg	agt
R	L	L	R	N	I	L	G	L	A	I	I	D	L	S
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
gcg	att	cag	gat	gaa	gtc	atc	ctc	gtc	gcc	gcc	gat	ctg	acc	ccg
A	I	Q	D	E	V	I	L	V	A	A	D	L	T	P
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
tct	gaa	acc	gca	cag	ctg	aac	ctg	aaa	aaa	gtg	ctg	ggt	ttc	atc
S	E	T	A	Q	L	N	L	K	K	V	L	G	F	I
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
acc	gat	gcg	ggc	ggt	cgt	acc	tcc	cac	acc	tct	atc	atg	gcg	cgt
T	D	A	G	G	R	T	S	H	T	S	I	M	A	R
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
tcc	ctg	gaa	ttg	ccg	gcc	atc	gtg	ggc	acc	ggc	agc	atc	acg	gcg
S	L	E	L	P	A	I	V	G	T	G	S	I	T	A
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
cag	gtg	aaa	aat	ggc	gac	tat	ctg	att	ctc	gac	gcg	gtg	aac	aac
Q	V	K	N	G	D	Y	L	I	L	D	A	V	N	N
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
cag	gtt	ctg	atc	aac	ccg	tct	aac	gag	caa	att	gaa	gcg	ctg	cgt
Q	V	L	I	N	P	S	N	E	Q	I	E	A	L	R
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
agt	ctg	cag	gct	cag	gtt	gcg	gaa	gaa	aaa	gcc	gaa	ctg	gcg	aaa
S	L	Q	A	Q	V	A	E	E	K	A	E	L	A	K
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
ctg	aaa	gat	ctg	ccg	gcg	att	acc	ctc	gac	ggc	cat	cag	ggt	gaa
L	K	D	L	P	A	I	T	L	D	G	H	Q	V	E
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
gtc	tgc	gcc	aac	att	ggt	acc	gtt	cgc	gat	gtc	gaa	ggt	gct	gag
V	C	A	N	I	G	T	V	R	D	V	E	G	A	E
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
cgc	aac	ggc	gcc	gaa	ggc	gta	ggt	ctg	tat	cgt	acc	gaa	ttc	ctg
R	N	G	A	E	G	V	G	L	Y	R	T	E	F	L
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300

ttc	atg	gac	cgt	gac	gcg	ctg	cca	act	gaa	gaa	gaa	cag	ttt	gcg
F	M	D	R	D	A	L	P	T	E	E	E	Q	F	A
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
gct	tat	aaa	gcg	gtg	gct	gag	gcc	tgt	ggg	tct	cag	gcc	gtt	atc
A	Y	K	A	V	A	E	A	C	G	S	Q	A	V	I
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
gtc	cgt	acc	atg	gat	atc	ggc	ggc	gac	aaa	gag	ctg	ccg	tac	atg
V	R	T	M	D	I	G	G	D	K	E	L	P	Y	M
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
aac	ttc	ccg	aaa	gaa	gag	aac	ccg	ttc	ctc	ggc	tgg	cgt	gcc	gtg
N	F	P	K	E	E	N	P	F	L	G	W	R	A	V
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
cgt	att	gcg	atg	gat	cgt	aaa	gag	atc	ctg	cgc	gac	cag	gtt	cgc
R	I	A	M	D	R	K	E	I	L	R	D	Q	V	R
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
gcc	atc	ctg	cgt	gcc	tcc	gct	ttc	ggg	aag	ctg	cgc	att	atg	ttc
A	I	L	R	A	S	A	F	G	K	L	R	I	M	F
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
ccg	atg	atc	atc	tct	ggt	gaa	gaa	gtg	cgt	gcg	ctg	aag	aaa	gag
P	M	I	I	S	V	E	E	V	R	A	L	K	K	E
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
atc	gaa	atc	tac	aaa	cag	gaa	ctg	cgt	gac	gaa	ggg	aaa	gca	ttt
I	E	I	Y	K	Q	E	L	R	D	E	G	K	A	F
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
gac	gaa	tcc	att	gag	atc	ggc	gtg	atg	gtg	gaa	aca	ccg	gct	gcg
D	E	S	I	E	I	G	V	M	V	E	T	P	A	A
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435
gcg	act	att	gct	cgt	cat	ctg	gcc	aaa	gaa	ggt	gat	ttc	ttt	agt
A	T	I	A	R	H	L	A	K	E	V	D	F	F	S
436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
atc	ggc	acc	aat	gat	tta	acg	caa	tat	act	ctg	gca	ggt	gac	cgt
I	G	T	N	D	L	T	Q	Y	T	L	A	V	D	R
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465
ggg	aat	gat	atg	att	tca	cat	ctt	tac	cag	ccg	atg	tca	ccg	tct
G	N	D	M	I	S	H	L	Y	Q	P	M	S	P	S
466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
gta	ctg	aat	ctg	att	aag	caa	ggt	att	gat	gct	tct	cac	gct	gaa
V	L	N	L	I	K	Q	V	I	D	A	S	H	A	E
481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495
ggg	aaa	tgg	act	ggc	atg	tgc	ggg	gag	ctt	gcg	ggc	gat	gaa	cgt
G	K	W	T	G	M	C	G	E	L	A	G	D	E	R
496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
gct	aca	ctt	ctg	ttg	ctg	ggg	atg	ggg	ctg	gac	gaa	ttc	tct	atg
A	T	L	L	L	L	G	M	G	L	D	E	F	S	M
511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525
agc	gcc	att	tcc	atc	ccg	cgc	atc	aag	aag	att	att	cgt	aat	acg
S	A	I	S	I	P	R	I	K	K	I	I	R	N	T
526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
aac	ttc	gaa	gat	gcg	aaa	gta	tta	gca	gag	cag	gct	ctt	gct	caa
N	F	E	D	A	K	V	L	A	E	Q	A	L	A	Q
541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555
ccg	aca	acg	gac	gag	tta	atg	acg	ctg	ggt	aac	aag	ttc	att	gaa
P	T	T	D	E	L	M	T	L	V	N	K	F	I	E
556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570

gaa	aaa	aca	atc	tgc	taa
E	K	T	I	C	Stop
571	572	573	574	575	

Anexo XII: Secuencia del gen *cyaA* y de la proteína CyaA en *K. pneumoniae*

Gen *cyaA*

En rojo se muestra la secuencia del gen *murA* en *K. pneumoniae* ATCC 13883, secuencia de referencia NCBI: KN046818.1. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores para la amplificación del fragmento *cyaA1* (tamaño del amplificado: 1515 pb) y en verde la zona de hibridación de los cebadores para la amplificación del fragmento *cyaA2* (tamaño del amplificado: 1603 pb).

GACGACGAATGGTGACGGTTTTTTGTTGAAATACTGAAATCCTCCGTAATTTGTACCTCGGGTTTTTGAACATCAG
GCGATATGTCTTGTACTCTATATTGAGACTGAAACAGAGACTGGATGCCATCAACCAATTGCGCGTGGATCGC
GCGCTTGCTGCCATGGGACCCGCTTTCCAGCAGGTTTACAGTCTACTGCCAACGTTATTACATTATCATCACCCGCT
GATGCCGGTTACCTTGACGGTAACGTTCCCGTGGCATTGCTCTACACGCCTGATGAAACCAACGCCACTAT
CTTGAAGAAGTGGAACTGCATCGCGGTATGCAGACTCAGGAGCCGCCGAAAGGCGAGCTGCCGATCACCGGCGT
CTACTCGATGGGCAGTACTTCTCCGTCGGCCAGAGCTGCTTCCGATCTTGATATCTGGGTATGTCACCAGGCT
GGCTGGATAGCGAAGAGCGTCAGCTGCTGCAGCGAAAATGCAGCCTGCTTGAGAGCTGGGCTGCCTCGCTCGGC
GTGGAAGTCAGCTTCTTCTGATCGACGAAAACCGTTTTCCGTCATAACGAAAGCGGTAGCCTCGGCGGCGAAGAC
TGCGGTTGACCCAGCATATCCTGTTGCTTGATGAGTTCTACCGACCCGCGGTGCGCCTCGCCGGAAGCGTATTC
TGTGGAATATGGTGGCGTGGATGAAGAAGAGCATTACGATGATTACGTGATGGGGCTGTATGCCAGGGCGTG
CTGACGCCTAACGAATGGCTCGATCTCGGCGCCTCAGTTCGCTGTCGGCGGAAGAGTACTTGGCGCCAGCCTG
TGGCAGCTGTATAAAAGTATCGACTCCCCATAAAGCGGTGCTGAAAACGCTGCTGCTGGAAGCCTACTCCTGG
GAATACCCCAATAACCGCCTGTTAGCGAAAGATCAAACAGCGTCTGCACGACGGGGAGATTGTCTCCTTCGGC
CTCGACCCGTAATGCATGATGCTGGAGCGCGTGACCACTATCTGCAGGCCATCGAAGATGAAACCCGCTCGATC
TGGTGCGCCGCTGCTTCTACCTGAAAGTTTGTGAAAACTCAGCCGGAACGCGCCTGCGTCCGCTGGCGTCGCG
AAGTCGTCAGCCAGTTGGTGAATGCCTGGGGCTGGGACGAAAAGCGTCTGATGATGCTCGACAACCGCGCAACT
GGAAAATCGATGAAGTGCAGCAAGGCGCACAACTGCTCGACGCCATGATGCAGAGCTATCGTAATCTGATCC
GCTTCGCGCGGCGCAATAACCTTAGCGTCTCCGCCAGCCGCGAGGATATTGGCGTGTGACCCGTAAGCTGTATG
CGGCTTTGAAAGCGTGCAGGGGAAAGTGACGCTGGTAAACCCGCAAATTTCCCGGATCTGTGCGAACCAGAAC
TGACCTTATCCACGTGCCGCCGGCCGCGCAACCGTACCGGTTGGTATCTGTACAACCGCGCGCCGACATGG
AATCGATCATCAGCCATCAGCCGCTGGAATATAACCGTTATCTTAATAAGCTGGTGGCCTGGGCCTGGTTAAACGG
CCTGCTGACCTCACGACCCGCTGTTTATTAAGGGCAACGGCATCGTCGATCTGGCGAAGCTGCAGGAGATGGT
GGCCGACGTGTGCAACCACTTCCCGTGCCTGCCGCGCCGACGCCAAAGGCGCTGTACAGCCCGTGCAGAAAT
CCGCCACCTGGCGATTATCGTCAACCTCGAATATGACCAACCGCGGCCCTCCGTAACCAAGGTGGTGCCTTCGAT
TTCCGTAAGCTGGATGTTTTAGCTTCCGCGAAGAGCAAAAATGCCTGATCGGCAGCGTCGACCTGCTGTATCGCA
ACTCGTGGAAACGAAGTGCGTACGCTGCACTTAAACGGCGAACAGGCGATGATCGAGGCGCTGAAAACGATCCTC
GGCAAATGCACCAGGACGCCGCGCCGCGGACAGCGTGGAGGTGTTCTGCTATAGTCAGCACCTGCGCGGCT
GATCCGACCCGCGTGCAGCAGATGATCTCGAATGTATCGAACTGCGTCTCTCCAGTACCCGCCAGGATACCGG
GCGCTTCAAAGCGCTGCGCGTCTCCGGCCAGACGTGGGGGCTGTTCTTCGAGCGGCTTAAACGTTTCGGTGCAGAA
GCTGGAAAACGCCATTGAGTTCTACGGCGCTATCTGCACAACAAGCTGCACGGGCTGTCGGTGCAGGTGGAAC
CAATCACGTTAAGCTGCCGCGGTGGTGGATGGCTTCGCCAGCGAAGGGATTATTCAGTTCTTCTTTGAAGACGC
GGATAACAACGACAGCGGCTTAAACATCTATATTCTTGATGAGAGCAACCGCGCCGAGGTCTATCATCACTGCGAG
GGCAGTAAAGAGGAGCTGGTGCAGCGCTCAGCCGCTTATTCGTCATCGCACGATCGTTTCACTACGGCTCCA
GCTTATCAACTTCAACTGCCGAGTTCTATCAGATTGTCGAGGTAGACGGGCGCACCCAGGTGATCCCTTCCG
CACCCAGGCGATTGCCGCTGCGATACCCACCAGCCAGGACGTTACCGCTCGCCGGTGTGTCAGCAGCGCTACTC
GTAGATTTGGCCCGGAGAAGGCGTGAGCCGCTATCCGAGATATTCCCTGCTGGCGCTGCGCTTAGCAGGGCTAC
GGTCTAAGTCGTCGGGTGCGCCGATAAGGCGCGATGCGCCGCTATCCGGGAAACACGTCATTAACGAACTTCC
ACCGTCTCACCG

Proteína CyaA

MYLYIETLTKQLDAINQLRVDRALAAMGPAFQQVYVYLLPTLLHYHHPLMPGYLDGNVPRGICLYTPDETQRHYLEELEL
 HRGMQTQEPPKGPITGVYSMGSTSSVQSCSSDLDIWVCHQAWLDSEERQLLQKCSLLESWAASLGVEVSFFLID
 ENRFRHNESGLGGEDCGSTQHILLDEFYRTAVRLAGKRILWNMPCDEEEHYDDYVMGLYAQGVLTPTNEWLDLGG
 LSSLSAEYFGASLWQLYKSIDSPYKAVLKTLLLEAYSWEYPNNRLLAKDIKQRLHDGEIVSFGLDPYCMMMLERVTTYLQA
 IEDETRLDLVRRCFYLVKCEKLSRERACVGRREVVSQLVNAWGWDEKRLMMLDNRANWKIDEVRKAHNELLDAM
 MQSYRNLIRFARRNNLSVSPQDIGVLTRKLYAAFEALPGKVTLVNPNQISPDLSEPNLTFIHVPPGRANRTGWYLYNRA
 PDMESIISHQPLEYNRYLNKLVAAWVFNGLLSRTRLFIKGNIGVDLAKLQEMVADVSHHFPLRLPAPTPKALYSPCEIR
 HLAIIVNLEYDPTAAFRNQVVHDFRKLDFVDFGEEQKCLIGSVDLLYRNSWNEVRTLHFNGEQAMIEALKTILGKMHQ
 DAAPPDSVEVFCYSQHLRGLIRTRVQQMISECIELRLSSTRQDTGRFKALRVSGQTWGLFFERLNVSVQKLENAIEFYGAI
 SHNKLHGLSVQVETNHVKLPAVVDFGASEGIIQFFEDADNNDSGFNIIYLDENRAEVYHHCEGSKEELVRDVSRYSS
 SHDRFTYGSFNFNLPQFYQIVEVDGRTQVIPFRTQAIAAAIPTSQDVTASPVLQQRYS

Relación entre la secuencia del gen *cyaA* y de la proteína CyaA

ttg	tac	ctc	tat	att	gag	aca	ctg	aaa	cag	aga	ctg	gat	gcc	atc
M	Y	L	Y	I	E	T	L	K	Q	R	L	D	A	I
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
aac	caa	ttg	cgc	gtg	gat	cgc	gcg	ctt	gct	gcc	atg	gga	ccc	gct
N	Q	L	R	V	D	R	A	L	A	A	M	G	P	A
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
ttc	cag	cag	gtt	tac	agt	cta	ctg	cca	acg	tta	tta	cat	tat	cat
F	Q	Q	V	Y	S	L	L	P	T	L	L	H	Y	H
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
cac	ccg	ctg	atg	ccg	ggt	tac	ctt	gac	ggt	aac	gtt	ccc	cgt	ggc
H	P	L	M	P	G	Y	L	D	G	N	V	P	R	G
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
att	tgc	ctc	tac	acg	cct	gat	gaa	acc	caa	cgc	cac	tat	ctt	gaa
I	C	L	Y	T	P	D	E	T	Q	R	H	Y	L	E
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
gaa	ctg	gaa	ctg	cat	cgc	ggt	atg	cag	act	cag	gag	ccg	ccg	aaa
E	L	E	L	H	R	G	M	Q	T	Q	E	P	P	K
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
ggc	gag	ctg	ccg	atc	acc	ggc	gtc	tac	tcg	atg	ggc	agt	act	tcc
G	E	L	P	I	T	G	V	Y	S	M	G	S	T	S
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
tcc	gtc	ggc	cag	agc	tgc	tct	tcc	gat	ctt	gat	atc	tgg	gta	tgt
S	V	G	Q	S	C	S	S	D	L	D	I	W	V	C
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
cac	cag	gcc	tgg	ctg	gat	agc	gaa	gag	cgt	cag	ctg	ctg	cag	cga
H	Q	A	W	L	D	S	E	E	R	Q	L	L	Q	R
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
aaa	tgc	agc	ctg	ctt	gag	agc	tgg	gct	gcc	tcg	ctc	ggc	gtg	gaa
K	C	S	L	L	E	S	W	A	A	S	L	G	V	E
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
gtc	agc	ttc	ttc	ctg	atc	gac	gaa	aac	cgt	ttc	cgt	cat	aac	gaa
V	S	F	F	L	I	D	E	N	R	F	R	H	N	E
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
agc	ggt	agc	ctc	ggc	ggc	gaa	gac	tgc	ggt	tcg	acc	cag	cat	atc
S	G	S	L	G	G	E	D	C	G	S	T	Q	H	I
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
ctg	ttg	ctt	gat	gag	ttc	tac	cgc	acc	gcg	gtg	cgc	ctc	gcc	ggc
L	L	L	D	E	F	Y	R	T	A	V	R	L	A	G
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195

aag	cgt	att	ctg	tgg	aat	atg	gtg	ccg	tgc	gat	gaa	gaa	gag	cat
K	R	I	L	W	N	M	V	P	C	D	E	E	E	H
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
tac	gat	gat	tac	gtg	atg	ggg	ctg	tat	gcc	cag	ggc	gtg	ctg	acg
Y	D	D	Y	V	M	G	L	Y	A	Q	G	V	L	T
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
cct	aac	gaa	tgg	ctc	gat	ctc	ggc	ggc	ctc	agt	tcg	ctg	tcg	gcg
P	N	E	W	L	D	L	G	G	L	S	S	L	S	A
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
gaa	gag	tac	ttc	ggc	gcc	agc	ctg	tgg	cag	ctg	tat	aaa	agt	atc
E	E	Y	F	G	A	S	L	W	Q	L	Y	K	S	I
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
gac	tcc	ccc	tat	aaa	gcg	gtg	ctg	aaa	acg	ctg	ctg	ctg	gaa	gcc
D	S	P	Y	K	A	V	L	K	T	L	L	L	E	A
256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
tac	tcc	tgg	gaa	tac	ccc	aat	aac	cgc	ctg	tta	gcg	aaa	gat	atc
Y	S	W	E	Y	P	N	N	R	L	L	A	K	D	I
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285
aaa	cag	cgt	ctg	cac	gac	ggg	gag	att	gtc	tcc	ttc	ggc	ctc	gac
K	Q	R	L	H	D	G	E	I	V	S	F	G	L	D
286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
ccg	tac	tgc	atg	atg	ctg	gag	cgc	gtg	acc	acc	tat	ctg	cag	gcc
P	Y	C	M	M	L	E	R	V	T	T	Y	L	Q	A
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
atc	gaa	gat	gaa	acc	cgc	ctc	gat	ctg	gtg	cgc	cgc	tgc	ttc	tac
I	E	D	E	T	R	L	D	L	V	R	R	C	F	Y
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
ctg	aaa	gtt	tgt	gaa	aaa	ctc	agc	cgc	gaa	cgc	gcc	tgc	gtc	ggc
L	K	V	C	E	K	L	S	R	E	R	A	C	V	G
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345
tgg	cgt	cgc	gaa	gtc	gtc	agc	cag	ttg	gtg	aat	gcc	tgg	ggc	tgg
W	R	R	E	V	V	S	Q	L	V	N	A	W	G	W
346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
gac	gaa	aag	cgt	ctg	atg	atg	ctc	gac	aac	cgc	gcc	aac	tgg	aaa
D	E	K	R	L	M	M	L	D	N	R	A	N	W	K
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
atc	gat	gaa	gtg	cgc	aag	gcg	cac	aac	gaa	ctg	ctc	gac	gcc	atg
I	D	E	V	R	K	A	H	N	E	L	L	D	A	M
376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
atg	cag	agc	tat	cgt	aat	ctg	atc	cgc	ttc	gcg	cgg	cgc	aat	aac
M	Q	S	Y	R	N	L	I	R	F	A	R	R	N	N
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
ctt	agc	gtc	tcc	gcc	agc	ccg	cag	gat	att	ggc	gtg	ctg	acc	cgt
L	S	V	S	A	S	P	Q	D	I	G	V	L	T	R
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
aag	ctg	tat	gcg	gcc	ttt	gaa	gcg	ctg	ccg	ggg	aaa	gtg	acg	ctg
K	L	Y	A	A	F	E	A	L	P	G	K	V	T	L
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435
gta	aac	ccg	caa	att	tcg	ccg	gat	ctg	tcg	gaa	ccg	aac	ctg	acc
V	N	P	Q	I	S	P	D	L	S	E	P	N	L	T
436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
ttt	atc	cac	gtg	ccg	ccg	ggc	cgc	gcc	aac	cgt	acc	ggt	tgg	tat
F	I	H	V	P	P	G	R	A	N	R	T	G	W	Y
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en *E. coli* y *K. pneumoniae*

ctg	tac	aac	cgc	gcg	ccg	gac	atg	gaa	tcg	atc	atc	agc	cat	cag
L	Y	N	R	A	P	D	M	E	S	I	I	S	H	Q
466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
ccg	ctg	gaa	tat	aac	cgt	tat	ctt	aat	aag	ctg	gtg	gcc	tgg	gcc
P	L	E	Y	N	R	Y	L	N	K	L	V	A	W	A
481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495
tgg	ttt	aac	ggc	ctg	ctg	acc	tca	cgc	acc	cgc	ctg	ttt	att	aag
W	F	N	G	L	L	T	S	R	T	R	L	F	I	K
496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
ggc	aac	ggc	atc	gtc	gat	ctg	gcg	aag	ctg	cag	gag	atg	gtg	gcc
G	N	G	I	V	D	L	A	K	L	Q	E	M	V	A
511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525
gac	gtg	tcg	cac	cac	ttc	ccg	ctg	cgc	ctg	ccg	gcg	ccg	acg	cca
D	V	S	H	H	F	P	L	R	L	P	A	P	T	P
526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
aag	gcg	ctg	tac	agc	ccg	tgc	gaa	atc	cgc	cac	ctg	gcg	att	atc
K	A	L	Y	S	P	C	E	I	R	H	L	A	I	I
541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555
gtc	aac	ctc	gaa	tat	gac	cca	acc	gcg	gcc	ttc	cgt	aac	cag	gtg
V	N	L	E	Y	D	P	T	A	A	F	R	N	Q	V
556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
gtg	cac	ttc	gat	ttc	cgt	aag	ctg	gat	gtt	ttc	agc	ttc	ggc	gaa
V	H	F	D	F	R	K	L	D	V	F	S	F	G	E
571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585
gag	caa	aaa	tgc	ctg	atc	ggc	agc	gtc	gac	ctg	ctg	tat	cgc	aac
E	Q	K	C	L	I	G	S	V	D	L	L	Y	R	N
586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
tcg	tgg	aac	gaa	gtg	cgt	acg	ctg	cac	ttt	aac	ggc	gaa	cag	gcg
S	W	N	E	V	R	T	L	H	F	N	G	E	Q	A
601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615
atg	atc	gag	gcg	ctg	aaa	acg	atc	ctc	ggc	aaa	atg	cac	cag	gac
M	I	E	A	L	K	T	I	L	G	K	M	H	Q	D
616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
gcc	gcg	ccg	ccg	gac	agc	gtg	gag	gtg	ttc	tgc	tat	agt	cag	cac
A	A	P	P	D	S	V	E	V	F	C	Y	S	Q	H
631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645
ctg	cgc	ggc	ctg	atc	cgc	acc	cgc	gtg	cag	cag	atg	atc	tcc	gaa
L	R	G	L	I	R	T	R	V	Q	Q	M	I	S	E
646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660
tgt	atc	gaa	ctg	cgt	ctc	tcc	agt	acc	cgc	cag	gat	acc	ggg	cgc
C	I	E	L	R	L	S	S	T	R	Q	D	T	G	R
661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675
ttc	aaa	gcg	ctg	cgc	gtc	tcc	ggc	cag	acg	tgg	ggg	ctg	ttc	ttc
F	K	A	L	R	V	S	G	Q	T	W	G	L	F	F
676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690
gag	cgg	ctt	aac	gtt	tcg	gtg	cag	aag	ctg	gaa	aac	gcc	att	gag
E	R	L	N	V	S	V	Q	K	L	E	N	A	I	E
691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705
ttc	tac	ggc	gct	atc	tcg	cac	aac	aag	ctg	cac	ggg	ctg	tcg	gtg
F	Y	G	A	I	S	H	N	K	L	H	G	L	S	V
706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
cag	gtg	gaa	acc	aat	cac	gtt	aag	ctg	ccg	gcg	gtg	gtg	gat	ggc
Q	V	E	T	N	H	V	K	L	P	A	V	V	D	G
721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735

ttc	gcc	agc	gaa	ggg	att	att	cag	ttc	ttc	ttt	gaa	gac	gcg	gat
F	A	S	E	G	I	I	Q	F	F	F	E	D	A	D
736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
aac	aac	gac	agc	ggc	ttt	aac	atc	tat	att	ctt	gat	gag	agc	aac
N	N	D	S	G	F	N	I	Y	I	L	D	E	S	N
751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765
cgc	gcc	gag	gtc	tat	cat	cac	tgc	gag	ggc	agt	aaa	gag	gag	ctg
R	A	E	V	Y	H	H	C	E	G	S	K	E	E	L
766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780
gtg	cgc	gac	gtc	agc	cgc	ttc	tat	tcg	tca	tcg	cac	gat	cgt	ttc
V	R	D	V	S	R	F	Y	S	S	S	H	D	R	F
781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795
acc	tac	ggc	tcc	agc	ttt	atc	aac	ttc	aac	ctg	ccg	cag	ttc	tat
T	Y	G	S	S	F	I	N	F	N	L	P	Q	F	Y
796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810
cag	att	gtc	gag	gta	gac	ggg	cgc	acc	cag	gtg	atc	cct	ttc	cgc
Q	I	V	E	V	D	G	R	T	Q	V	I	P	F	R
811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825
acc	cag	gcg	att	gcc	gct	gcg	ata	ccc	acc	agc	cag	gac	gtt	acc
T	Q	A	I	A	A	A	I	P	T	S	Q	D	V	T
826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840
gcc	tcg	ccg	gtg	ctg	cag	cag	cgc	tac	tcg	tag				
A	S	P	V	L	Q	Q	R	Y	S	Stop				
841	842	843	844	845	846	847	848	849	850					

Anexo XIII: Secuencia del gen *nfsA* y de la proteína NfsA en *E. coli*

Gen *nfsA*

En rojo se muestra la secuencia del gen *nfsA* en *E. coli*, cepa K-12, subcepa MG1655, secuencia de referencia NCBI: NC_000913.3. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 1036 pb).

ATTTTCTCGGCCAGAAGTGCAGATTCTGATGATTTTTCTCGGTGTTTTGCTCATGCTTCCCCTGCGGTGGTGGTTA
 TTCTCAGGTGCAAAACGTCTTGCCCCACAGCTGATGAACCGTCCACC GCAATATTCACGTT CAGAAAGAGAAAA
 AGATAATGACGCCAACCACTTGAACCTATTTGTGGCCATCGCTCCATTCGCCATTTCACTGATGAACCCATTTCCGAA
 GCGCAGCGTGAGGCGATTATTAACAGCGCCCGTGCACGCTCCAGTTCAGTTTTTTGCAGTGCAGTAGCATTATTC
 GCATTACCGACAAAAGCGTTACGTGAAGAACTGGTGACGCTGACCGGCGGGCAAAAACACGTAGCGCAAGCGGCG
 GAGTTCTGGGTGTTCTGTGCCGACTTAAACCGCATTTACAGATCTGTCCGGATGCTCAGCTCGGCCTGGCGGAAC
 AACTGTTGCTCGGTGTCGTTGATACGGCAATGATGGCGCAGAATGCATTAATCGCAGCGGAATCGCTGGGATTGG
 GCGGGGTATATATCGGCCGCTGCGCAATAATTTGAAGCGGTGACGAACTGCTTAAATTACCGCAGCATGTTCT
 TGCCGCTGTTGGGCTGTGCCTTGGCTGGCCTGCGGATAATCCGGATCTTAAGCCGCGTTTACCGGCTCCATTTT
 GGTGCATGAAAACAGCTATCAACCGCTGGATAAAGCGCACTGGCGCAGTATGACGAGCAACTGGCGGAATATT
 ACCTCACCCGTGGCAGCAATAATCGCCGGGATACCTGGAGCGATCATATCCGCCGAACAATCATTAAAGAAAGCC
 GCCATTTATTCTGGATTATTTGCACAAACAGGGTTGGGCGACGCGCTAAACC GCCACGTCGATGTATGATACGG
 GGGCTTTTGACCAGGTCTGACAGAGAGGTGCAGGGTGAATAATGCCATATTGTCCCGGGATGGAACGCTCTATTC
 GTGTAAGCGGCTGCGTGAAGCCGCTATACAGCGCGTACCTGGTTGAAATTCT

Proteína NfsA

MTPTIELICGHRISRHFHTDEPISEAQREAIINSARATSSSSFLQCSSIRITDKALREELVTLTGGQKHVAQAAEFWVFCADF
 NRHLQICPDAQLGLAEQLLLGVVDTAMMAQNALIAAESLGLGGVYIGLNRNNEAVTKLLKLPQHVLPLFLGLCLGWPA
 DNPDLKPRLPASILVHENSYPQLDKGALAQYDEQLAEYYLTRGSNNRRDTSWSDHIRRTIIESRPFILDYLHKQGWATR

Relación entre la secuencia del gen *nfsA* y de la proteína NfsA

atg	acg	cca	acc	att	gaa	ctt	att	tgt	ggc	cat	cgc	tcc	att	cgc
M	T	P	T	I	E	L	I	C	G	H	R	S	I	R
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
cat	ttc	act	gat	gaa	ccc	att	tcc	gaa	gcg	cag	cgt	gag	gcg	att
H	F	T	D	E	P	I	S	E	A	Q	R	E	A	I
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
att	aac	agc	gcc	cgt	gcg	acg	tcc	agt	tcc	agt	ttt	ttg	cag	tgc
I	N	S	A	R	A	T	S	S	S	S	F	L	Q	C
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
agt	agc	att	att	cgc	att	acc	gac	aaa	gcg	tta	cgt	gaa	gaa	ctg
S	S	I	I	R	I	T	D	K	A	L	R	E	E	L
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
gtg	acg	ctg	acc	ggc	ggg	caa	aaa	cac	gta	gcg	caa	gcg	gcg	gag
V	T	L	T	G	G	Q	K	H	V	A	Q	A	A	E
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
ttc	tgg	gtg	ttc	tgt	gcc	gac	ttt	aac	cgc	cat	tta	cag	atc	tgt
F	W	V	F	C	A	D	F	N	R	H	L	Q	I	C
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
ccg	gat	gct	cag	ctc	ggc	ctg	gcg	gaa	caa	ctg	ttg	ctc	ggt	gtc
P	D	A	Q	L	G	L	A	E	Q	L	L	L	G	V
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en E. coli y K. pneumoniae

gtt	gat	acg	gca	atg	atg	gcg	cag	aat	gca	tta	atc	gca	gcg	gaa
V	D	T	A	M	M	A	Q	N	A	L	I	A	A	E
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
tcg	ctg	gga	ttg	ggc	ggg	gta	tat	atc	ggc	ggc	ctg	cgc	aat	aat
S	L	G	L	G	G	V	Y	I	G	G	L	R	N	N
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
att	gaa	gcg	gtg	acg	aaa	ctg	ctt	aaa	tta	ccg	cag	cat	gtt	ctg
I	E	A	V	T	K	L	L	K	L	P	Q	H	V	L
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
ccg	ctg	ttt	ggg	ctg	tgc	ctt	ggc	tgg	cct	gcg	gat	att	ccg	gat
P	L	F	G	L	C	L	G	W	P	A	D	N	P	D
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
ctt	aag	ccg	cgt	tta	ccg	gcc	tcc	att	ttg	gtg	cat	gaa	aac	agc
L	K	P	R	L	P	A	S	I	L	V	H	E	N	S
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
tat	caa	ccg	ctg	gat	aaa	ggc	gca	ctg	gcg	cag	tat	gac	gag	caa
Y	Q	P	L	D	K	G	A	L	A	Q	Y	D	E	Q
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
ctg	gcg	gaa	tat	tac	ctc	acc	cgt	ggc	agc	aat	aat	cgc	cgg	gat
L	A	E	Y	Y	L	T	R	G	S	N	N	R	R	D
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
acc	tgg	agc	gat	cat	atc	cgc	cga	aca	atc	att	aaa	gaa	agc	cgc
T	W	S	D	H	I	R	R	T	I	I	K	E	S	R
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
cca	ttt	att	ctg	gat	tat	ttg	cac	aaa	cag	ggt	tgg	gcg	acg	cgc
P	F	I	L	D	Y	L	H	K	Q	G	W	A	T	R
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
att														
Stop														

Anexo XIV: Secuencia del gen *nfsB* y de la proteína NfsB en *E. coli*

Gen *nfsB*

En rojo se muestra la secuencia del gen *nfsB* en *E. coli*, cepa K-12, subcepa MG1655, secuencia de referencia NCBI: NC_000913.3. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 923 pb).

CTTCGCGATCTGATCAACGATTCTGTGGAATCTGGTGGTTGATGGTCTGGCTAAACGCGATCAAAAAAGAGTGCCT
 CCAGGCTAAAGCGGAAATCTATAGCGCATTTTCTCGCTTACCATTCTCGTTGAACCTTGAATCTGCTGGCACGC
 AAAATTACTTTACATGGAGTCTTTATGGATATCATTCTGTGCGCTTAAAGCGTCATTCCACTAAGGCATTGATG
 CCAGCAAAAACTTACCCCGAACAGGCCGAGCAGATCAAAACGCTACTGCAATACAGCCCATCCAGCACCAACT
 CCCAGCCGTGGCATTATTTATTGTTGCCAGCACGGAAGAAGTAAAGCGCGTGTGCGCAAAATCCGCTGCCGTAATT
 ACGTGTTCACGAGCGTAAAATGCTTGATGCCTCGCACGTCGTGGTGTCTGTGCAAAAACCGCGATGGACGATG
 TCTGGCTGAAGCTGGTTGTTGACCAGGAAGATGCCGATGGCCGCTTGGCCAGCCGGAAGCGAAAGCCGCGAAC
 GATAAAGGTCGCAAGTCTTCTGCTGATATGCACCGTAAAGATCTGCATGATGATGCAGAGTGGATGGCAAACAG
 GTTTATCTCAACGTCGGTAACTTCTGCTCGCGTGGCGGCTCTGGGTCTGGACCGGTACCCATCGAAGTTTTG
 ACGCCGCCATCCTCGATGCAGAATTTGGTCTGAAAGAGAAAGGCTACACCAGTCTGGTGGTTGTTCCGGTAGGTC
 ATCACAGCGTTGAAGATTTAACGCTACGCTGCCGAAATCTCGTCTGCCGCAAAACATCACCTTAACCGAAGTGTA
 ATTCTCTTGGCGGGCATCTGCCCGGCTATTTCTCTCAGATTCTCTGATTGCATAACCCTGTTTCAGCCGTCAT
 CATAGGCTGCTGTTG

Proteína NfsB

MDIISVALKRHSTKAFDASKLTPAQEQIKTLQYSPSSTNSQPWHFIVASTEEGKARVAKSAAGNYVFNERKMLDAS
 HVVVFCAKTAMDDVWLKLVVDQEDADGRFATPEAKAANDKGRKFFADMHRKDLHDDAEWMAKQVYLVNNGNLL
 GVAALGLDAVPIEGFDAAILDAEFGLKEKGYTSLVVVPVGHHSVEDFNATLPKSRPQNITLTEV

Relación entre la secuencia del gen *nfsB* y de la proteína NfsB

atg	gat	atc	att	tct	gtc	gcc	tta	aag	cgt	cat	tcc	act	aag	gca
M	D	I	I	S	V	A	L	K	R	H	S	T	K	A
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ttt	gat	gcc	agc	aaa	aaa	ctt	acc	ccg	gaa	cag	gcc	gag	cag	atc
F	D	A	S	K	K	L	T	P	E	Q	A	E	Q	I
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
aaa	acg	cta	ctg	caa	tac	agc	cca	tcc	agc	acc	aac	tcc	cag	ccg
K	T	L	L	Q	Y	S	P	S	S	T	N	S	Q	P
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
tgg	cat	ttt	att	gtt	gcc	agc	acg	gaa	gaa	ggg	aaa	gcg	cgt	gtt
W	H	F	I	V	A	S	T	E	E	G	K	A	R	V
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
gcc	aaa	tcc	gct	gcc	ggg	aat	tac	gtg	ttc	aac	gag	cgt	aaa	atg
A	K	S	A	A	G	N	Y	V	F	N	E	R	K	M
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
ctt	gat	gcc	tcg	cac	gtc	gtg	gtg	ttc	tgt	gca	aaa	acc	gcg	atg
L	D	A	S	H	V	V	V	F	C	A	K	T	A	M
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
gac	gat	gtc	tgg	ctg	aag	ctg	ggt	ggt	gac	cag	gaa	gat	gcc	gat
D	D	V	W	L	K	L	V	V	D	Q	E	D	A	D
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
ggc	cgc	ttt	gcc	acg	ccg	gaa	gcg	aaa	gcc	gcg	aac	gat	aaa	ggg
G	R	F	A	T	P	E	A	K	A	A	N	D	K	G
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en E. coli y K. pneumoniae

cgc	aag	ttc	ttc	gct	gat	atg	cac	cgt	aaa	gat	ctg	cat	gat	gat
R	K	F	F	A	D	M	H	R	K	D	L	H	D	D
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
gca	gag	tgg	atg	gca	aaa	cag	gtt	tat	ctc	aac	gtc	ggg	aac	ttc
A	E	W	M	A	K	Q	V	Y	L	N	V	G	N	F
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
ctg	ctc	ggc	gtg	gcg	gct	ctg	ggt	ctg	gac	gcg	gta	ccc	atc	gaa
L	L	G	V	A	A	L	G	L	D	A	V	P	I	E
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
ggt	ttt	gac	gcc	gcc	atc	ctc	gat	gca	gaa	ttt	ggt	ctg	aaa	gag
G	F	D	A	A	I	L	D	A	E	F	G	L	K	E
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
aaa	ggc	tac	acc	agt	ctg	gtg	gtt	gtt	ccg	gta	ggg	cat	cac	agc
K	G	Y	T	S	L	V	V	V	P	V	G	H	H	S
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
ggt	gaa	gat	ttt	aac	gct	acg	ctg	ccg	aaa	tct	cgt	ctg	ccg	caa
V	E	D	F	N	A	T	L	P	K	S	R	L	P	Q
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
aac	atc	acc	tta	acc	gaa	gtg	taa							
N	I	T	L	T	E	V	Stop							
211	212	213	214	215	216	217								

Anexo XV: Secuencia del gen *ribE* y de la proteína RibE en *E. coli*

Gen *ribE*

En rojo se muestra la secuencia del gen *ribE* en *E. coli*, cepa K-12, subcepa MG1655, secuencia de referencia NCBI: NC_000913.3. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 634 pb).

AAGGGAAGCAGCGCACGAAATATTATGCTAAATCCGCCCCCTGCGGGGCCATACTCGAACCCGAAGGAAGAA
 AATGAACATTATTGAAGCTAACGTTGCTACCCCGGACGCTCGCGTCGCCATCACCATCGCGGTTTTCAACAATT
 TCAATGACAGCCTGCTGGAAGGTGCAATTGACGCACTGAAACGTATCGGTCAGGTAAGATGAAAACATTACCG
 TTGTTTGGGTGCCTGGTGCCTATGAGCTGCCGCTGGCGGGGGTGCCTGGCTAAAACCGTAAATACGACGCGG
 TGATTGCGCTGGGTACGGTTATTCGTGGTGGCACTGCCACTTTGAATATGTCGCTGGTGGTGAAGCAACGGCT
 GCGCATGTTGCCAGGACAGCGAAATCCGGTTGCTTTGGGGTTCTGACCACTGAAAGCATTGAACAAGCGAT
 CGAACGTGCTGGCACCAAAGCTGGCAACAAAGGTGCAGAAGCTGCACTGACCGCGCTTGAATGATTAATGTATT
 GAAAGCCATCAAGGCCTGAATTAGTAAGGGGAAATCCGTGAAACCTGCTGCTCGTCGCCGCGCTCGTGAGTGTG
 CCGTCCAGGCGCTCTACTCTGCGAGTTGTCC

Proteína RibE

MNIIEANVATPDARVAITIRFNNFINDSLLEGAIDALKRIGQVKDENITVWVPGAYELPLAAGALAKTKGYDAVIALGT
 VIRGGTAHFYVAGGASNGLAHVAQDSEIPVAFGLTTESIEQAIERAGTKAGNKGAEALTALEMINVLAIKA

Relación entre la secuencia del gen *ribE* y de la proteína RibE

atg	aac	att	att	gaa	gct	aac	gtt	gct	acc	ccg	gac	gct	cgc	gtc
M	N	I	I	E	A	N	V	A	T	P	D	A	R	V
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
gcc	atc	acc	atg	gcg	cgt	ttc	aac	aac	ttt	atc	aat	gac	agc	ctg
A	I	T	I	A	R	F	N	N	F	I	N	D	S	L
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
ctg	gaa	ggt	gca	att	gac	gca	ctg	aaa	cgt	atc	ggt	cag	gta	aaa
L	E	G	A	I	D	A	L	K	R	I	G	Q	V	K
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
gat	gaa	aac	att	acc	gtt	gtt	tgg	gtg	cct	ggt	gcc	tat	gag	ctg
D	E	N	I	T	V	V	W	V	P	G	A	Y	E	L
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
ccg	ctg	gcg	gcg	ggt	gca	ctg	gct	aaa	acc	ggt	aaa	tac	gac	gcg
P	L	A	A	G	A	L	A	K	T	G	K	Y	D	A
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
gtg	att	gcg	ctg	ggt	acg	gtt	att	cgt	ggt	ggc	act	gcc	cac	ttt
V	I	A	L	G	T	V	I	R	G	G	T	A	H	F
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
gaa	tat	gtc	gct	ggt	ggt	gca	agc	aac	ggc	ctg	gcg	cat	gtt	gcc
E	Y	V	A	G	G	A	S	N	G	L	A	H	V	A
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
cag	gac	agc	gaa	att	ccg	gtt	gct	ttt	ggg	ggt	ctg	acc	act	gaa
Q	D	S	E	I	P	V	A	F	G	V	L	T	T	E
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
agc	att	gaa	caa	gcg	atc	gaa	cgt	gct	ggc	acc	aaa	gct	ggc	aac
S	I	E	Q	A	I	E	R	A	G	T	K	A	G	N
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en E. coli y K. pneumoniae

aaa	ggt	gca	gaa	gct	gca	ctg	acc	gcg	ctt	gaa	atg	att	aat	gta
K	G	A	E	A	A	L	T	A	L	E	M	I	N	V
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
ttg	aaa	gcc	atc	aag	gcc	tga								
L	K	A	I	K	A	Stop								
151	152	153	154	155	156									

Anexo XVI: Secuencia del gen *nfsA* y de la proteína NfsA en *K. pneumoniae*

Gen *nfsA*

En rojo se muestra la secuencia del gen *nfsA* en *K. pneumoniae* ATCC 13883, secuencia de referencia NCBI: KN046818.1. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 924 pb).

CGGGATCGTGCTGATGATCCCCGCCGCCCTCGTCGTGATGTGGCGGATGGCGCAGATCGTGGCCCCGAGTTAAC
 GCACTCTCCAAAGCCTGAATCCTGTCTGACAGAGAAAAACGTAATGACGCCGACCATTGAGCTGCTGCGCAGCC
 ACCGTTCCATCCGCCACTTCACCGATGCCCCCGTGAGCGACGAACAGCGCGCAGAGATTATCGCCAGCGCGCAAG
 CGGCATCTACCTCTAGTTTTTACAGTGCACCTCCATCATCCGTATTACTGACCCGGCCCTGCGTGAACGTTTGGTC
 CCGCTGACCGGCGGCCAGCAGCACGTGCGCCAGGCGGCGGAGTTTTGGTCTTCTGCGCCGACTTTAATCGCCAC
 CTGCAGATCTGCCCGCAGGCGCAGCTGGGGCTGGCGGAACAGCTGCTGATCGGCGTTGTGCATACGGCGCTGCT
 GCGCAAACGCGTTGACCGCCCGGAGTCCCTCGGACTAGGGGGCGTCTATATCGGCGGGTTGCGCAACAGCA
 TTGAGGCCGTACAGAGCTGCTGGAGCTGCCGCAGCACGTCTGCCGCTGTTGCGTCTTTCCTTGGCTGGCCGG
 CGGATAACCCGGATCAAGCCGCGGATGCCGCGGCCATGCTGGTGCATGAGAACCGCTATCAGCCGCTGGAT
 AACGCGCTGCTGGCGGAGTATGACGAACAGCTGGCGCACTATTATCTGTGCGCGGCCAGCAACGCCCGCCGCGAT
 ACCTGGAGCGACCATATCCGGCGCACTATCGTGAAAGAGAGTCGTCGTTTATTCTTGACTATCTGCATAAGCAGG
 GGTGGGCAACGCGCTGATTACGTGTACACTGCTGCTCCGGCCAGGTGATATCCGCCCGCGGCCAGGAAAGGT
 GAAAATGTGTTTCGATAGCTGAGGCC

Proteína NfsA

MTPTIELLRSHRSIRHFTDAPVSDEQRAEIIASAQAASTSSFLQCTSIIRITDPALRERLVLPTGGQQHVAQAAEFVWFCA
 DFNRLHLCIPQAQLGLAEQLLIGVVDTALLAQNALTAESLGLGGVYIGGLRNSIEAVTELELPQHVLPLFLGLCLGWPA
 DNPDIKPRMPAAMLVHENRYQPLDNALLAEYDEQLAHYYLSRGSNARRDTWSDHIRRTIVKESRPFILDYHLKQGWAT
 R

Relación entre la secuencia del gen *nfsA* y de la proteína NfsA

atg	acg	ccg	acc	att	gag	ctg	ctg	cgc	agc	cac	cgt	tcc	atc	cgc
M	T	P	T	I	E	L	L	R	S	H	R	S	I	R
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
cac	ttc	acc	gat	gcc	ccc	gtg	agc	gac	gaa	cag	cgc	gca	gag	att
H	F	T	D	A	P	V	S	D	E	Q	R	A	E	I
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
atc	gcc	agc	gcg	caa	gcg	gca	tct	acc	tct	agt	ttt	tta	cag	tgc
I	A	S	A	Q	A	A	S	T	S	S	F	L	Q	C
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
acc	tcc	atc	atc	cgt	att	act	gac	ccg	gcc	ctg	cgt	gaa	cgt	ttg
T	S	I	I	R	I	T	D	P	A	L	R	E	R	L
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
gtc	ccg	ctg	acc	ggc	ggc	cag	cag	cac	gtc	gcc	cag	gcg	gcg	gag
V	P	L	T	G	G	Q	Q	H	V	A	Q	A	A	E
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
ttt	tgg	gtc	ttc	tgc	gcc	gac	ttt	aat	cgc	cac	ctg	cag	atc	tgc
F	W	V	F	C	A	D	F	N	R	H	L	Q	I	C
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
ccg	cag	gcg	cag	ctg	ggg	ctg	gcg	gaa	cag	ctg	ctg	atc	ggc	gtt
P	Q	A	Q	L	G	L	A	E	Q	L	L	I	G	V
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en E. coli y K. pneumoniae

gtc	gat	acg	gcg	ctg	ctg	gcg	caa	aac	gcg	ttg	acc	gcc	gcc	gag
V	D	T	A	L	L	A	Q	N	A	L	T	A	A	E
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
tcc	ctc	gga	cta	ggg	ggc	gtc	tat	atc	ggc	ggg	ttg	cgc	aac	agc
S	L	G	L	G	G	V	Y	I	G	G	L	R	N	S
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
att	gag	gcc	gtc	aca	gag	ctg	ctg	gag	ctg	ccg	cag	cac	gtc	ctg
I	E	A	V	T	E	L	L	E	L	P	Q	H	V	L
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
ccg	ctg	ttc	ggt	ctt	tgc	ctt	ggc	tgg	ccg	gcg	gat	aac	ccg	gat
P	L	F	G	L	C	L	G	W	P	A	D	N	P	D
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
atc	aag	ccg	cgg	atg	ccg	gcg	gcc	atg	ctg	gtg	cat	gag	aac	cgc
I	K	P	R	M	P	A	A	M	L	V	H	E	N	R
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
tat	cag	ccg	ctg	gat	aac	gcg	ctg	ctg	gcg	gag	tat	gac	gaa	cag
Y	Q	P	L	D	N	A	L	L	A	E	Y	D	E	Q
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
ctg	gcg	cac	tat	tat	ctg	tgc	cgc	ggc	agc	aac	gcc	cgc	cgc	gat
L	A	H	Y	Y	L	S	R	G	S	N	A	R	R	D
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
acc	tgg	agc	gac	cat	atc	cgg	cgc	act	atc	gtg	aaa	gag	agt	cgf
T	W	S	D	H	I	R	R	T	I	V	K	E	S	R
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
ccg	ttt	att	ctt	gac	tat	ctg	cat	aag	cag	ggg	tgg	gca	acg	cgf
P	F	I	L	D	Y	L	H	K	Q	G	W	A	T	R
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
tga														
Stop														

Anexo XVII: Secuencia del gen *nfsB* y de la proteína NfsB en *K. pneumoniae*

Gen *nfsB*

En rojo se muestra la secuencia del gen *nfsB* en *K. pneumoniae* ATCC 13883, secuencia de referencia NCBI: KN046818.1. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 896 pb).

CAGGTGGTGAACAAGCTGAGTAAAAAGGCCAGCAGCGCCTGCGTCCGCGCTGATTTTCAGCCAAATGCGATAAG TGTTATCGCATTTTTACCCATTATCATTTGCGATCTTCGCTGTACTCTTCTCTCTGAACGCACCGGTAAGGTGCT GTAAACTGTGAGGAAGAGTTATGGATATCGTATCGGTGCGTTTGAAGCGCTATTCCACCAAGGCCCTTGACGCCAC GAAAAAGCTGACTGCCGGGAAGCGGAACAGCTGAAAACGCTGCTGCAGTACAGCCCGTCTAGCACCAACTCCC AGCCGTGGCACTTTATTGTCGCCAGCACCGATGAAGGCAAAGCTCGCGTGGCGAAAGCCGCCAGCGGCACCTACG TGTTCAACGAACGTAAAATTCTCGACGCCTCGCACGTGGTGGTGTCTGCGCGAAAACCGCGATGGACGACGCCT GGCTGCAGCGCGTGGTGGATCAGGAAGAGGCCGATGGCCGTTTCGCCACCCCGGACGCAAAGCCGCTAACCC AAGGGTCGCACCTCTTTGCCGATATGCACCGCAAAGAGCTGAAAGATGACGATCAGTGGATGGCGAAACAGGT GTATCTCAACGTCGGCAATTTCTGCTGGGCGTAGCGGCGATGGGTCTCGACGCCGTGCCGATTGAAGGGGTGCA TTTTGCATCTCGATGAGGAATTTGACCTGAAAGCCCAGGGCTACACCAGCCTGGTGGTGGTCCCGGTCCGCCA CCATAGCGTAGAAGATTTCAACGCTACCCTGCCGAAGTCGCGTCTGCCGAGTCGACGACCATTACCGAAATTTAA TTCCTTCTGCCGGGAACGCCCGGGCCATGGCGCAGCAGCGTCTCGCCGGGACTTTCTTCAACCACTC

Proteína NfsB

MDIVSVALKRYSTKAFDATTKLTAGEAEQLKTLQYSPSTNSQPWHFIVASTDEGKARVAKAASGYTFVNERKILDASH VVVFCAKTAMDDAWLQRVVDQEEADGRFATPDAKAANHKGRTRFFADMHRKELKDDDDQWMAKQVYLVGNFLLG VAAMGLDAVPIEGVDFAILDEEFDLKAQGYTSLVVVPVGHHSVEDFNATLPKSRPQSTTITEI

Relación entre la secuencia del gen *nfsB* y de la proteína NfsB

atg	gat	atc	gta	tcg	gtc	gct	ttg	aag	cgc	tat	tcc	acc	aag	gcc
M	D	I	V	S	V	A	L	K	R	Y	S	T	K	A
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ttt	gac	gcc	acg	aaa	aag	ctg	act	gcc	ggg	gaa	gcg	gaa	cag	ctg
F	D	A	T	K	K	L	T	A	G	E	A	E	Q	L
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
aaa	acg	ctg	ctg	cag	tac	agc	ccg	tct	agc	acc	aac	tcc	cag	ccg
K	T	L	L	Q	Y	S	P	S	S	T	N	S	Q	P
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
tgg	cac	ttt	att	gtc	gcc	agc	acc	gat	gaa	ggc	aaa	gct	cgc	gtg
W	H	F	I	V	A	S	T	D	E	G	K	A	R	V
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
gcg	aaa	gcc	gcc	agc	ggc	acc	tac	gtg	ttc	aac	gaa	cg	aaa	att
A	K	A	A	S	G	T	Y	V	F	N	E	R	K	I
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
ctc	gac	gcc	tcg	cac	gtg	gtg	gtg	ttc	tgc	gcg	aaa	acc	gcg	atg
L	D	A	S	H	V	V	V	F	C	A	K	T	A	M
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
gac	gac	gcc	tgg	ctg	cag	cgc	gtg	gtg	gat	cag	gaa	gag	gcc	gat
D	D	A	W	L	Q	R	V	V	D	Q	E	E	A	D
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en E. coli y K. pneumoniae

ggc	cgt	ttc	gcc	acc	ccg	gac	gca	aaa	gcc	gct	aac	cac	aag	ggt
G	R	F	A	T	P	D	A	K	A	A	N	H	K	G
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
cgc	acc	ttc	ttt	gcc	gat	atg	cac	cgc	aaa	gag	ctg	aaa	gat	gac
R	T	F	F	A	D	M	H	R	K	E	L	K	D	D
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
gat	cag	tgg	atg	gcg	aaa	cag	gtg	tat	ctc	aac	gtc	ggc	aat	ttc
D	Q	W	M	A	K	Q	V	Y	L	N	V	G	N	F
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
ctg	ctg	ggc	gta	gcg	gcg	atg	ggt	ctc	gac	gcc	gtg	ccg	att	gaa
L	L	G	V	A	A	M	G	L	D	A	V	P	I	E
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
ggg	gtc	gat	ttt	gcg	atc	ctc	gat	gag	gaa	ttt	gac	ctg	aaa	gcc
G	V	D	F	A	I	L	D	E	E	F	D	L	K	A
166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
cag	ggc	tac	acc	agc	ctg	gtg	gtg	gtc	ccg	gtc	ggc	cac	cat	agc
Q	G	Y	T	S	L	V	V	V	P	V	G	H	H	S
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
gta	gaa	gat	ttc	aac	gct	acc	ctg	ccg	aag	tcg	cgt	ctg	ccg	cag
V	E	D	F	N	A	T	L	P	K	S	R	L	P	Q
196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
tcg	acg	acc	att	acc	gaa	att	taa							
S	T	T	I	T	E	I	Stop							
211	212	213	214	215	216	217								

Anexo XVIII: Secuencia del gen *ribH* y de la proteína RibH en *K. pneumoniae*

Gen *ribH*

En rojo se muestra la secuencia del gen *ribH* en *K. pneumoniae* ATCC 13883, secuencia de referencia NCBI: KN046818.1. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 679 pb).

CCGGATGTCTGCCTGCATTAAACCACTGCGTGAGGCTTCTGATTATTAGGAAGCAGCGCTCAGAATAATATGAT
 AAAATCCGCCCCCTTGCGGGGCACATGAACCCGAAGGAAGAGTATGAACATTATTGAAGCTAACGTTGCTACCC
 CGGACGCTCGCGTCGCCATCACCATTGCGGTTTCAACAACCTTATCAATGACAGCCTGCTGGAAGGCGCGATTGA
 CGCCCTGAAACGCATTGGCCAGGTAAGATGAAAACATCACCGTCGTTTGGGTTCCAGGCGCGTATGAGCTGCC
 GCTGGCGGCTGGCGCACTGGCGAAAACCGGTAATATGACGCGGTGATCGCGCTGGGGACGGTGATTGCGGGC
 GGTACCGCCCACTTTGAATATGTGGCAGGCGGTGCCAGCAATGGCCTGGCGCATGTCGCTCAGGACAGCGAAATC
 CCGGTAGCCTTTGGTGTCTGACCACTGAAAGTATTGAACAAGCCATTGAGCGCGCTGGCACCAAAGCCGGTAAC
 AAAGGCGCAGAAGCTGCGCTGACCGCGCTGAAATGATTAACGTATTGAAAGCCATCAAGGCTGATTTTTGTAA
 GGGGAATTCCGTGAAACCTGCTGCTCGTCGCCGCGCCCGTGAGTGTGCCGTTTCAGGCGCTTACTCCTGGCAGTT
 GTCC

Proteína RibH

MNIIEANVATPDARVAITARFNNFINDSLLEGAIDALKRIGQVKDENITVWVPGAYELPLAAGALAKTGKYDAVIALGT
 VIRGGTAHFYVAGGASNGLAHVAQDSEIPVAFGVLTTESIEQAIERAGTKAGNKGAEALTALEMINVLKAIKA

Relación entre la secuencia del gen *ribH* y de la proteína RibH

atg	aac	att	att	gaa	gct	aac	gtt	gct	acc	ccg	gac	gct	cgc	gtc
M	N	I	I	E	A	N	V	A	T	P	D	A	R	V
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
gcc	atc	acc	att	gcg	cgt	ttc	aac	aac	ttt	atc	aat	gac	agc	ctg
A	I	T	I	A	R	F	N	N	F	I	N	D	S	L
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
ctg	gaa	ggc	gcg	att	gac	gcc	ctg	aaa	cgc	att	ggc	cag	gta	aaa
L	E	G	A	I	D	A	L	K	R	I	G	Q	V	K
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
gat	gaa	aac	atc	acc	gtc	gtt	tgg	gtt	cca	ggc	gcg	tat	gag	ctg
D	E	N	I	T	V	V	W	V	P	G	A	Y	E	L
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
ccg	ctg	gcg	gct	ggc	gca	ctg	gcg	aaa	acc	ggt	aaa	tat	gac	gcg
P	L	A	A	G	A	L	A	K	T	G	K	Y	D	A
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
gtg	atc	gcg	ctg	ggg	acg	gtg	att	cgc	ggc	ggt	acc	gcc	cac	ttt
V	I	A	L	G	T	V	I	R	G	G	T	A	H	F
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
gaa	tat	gtg	gca	ggc	ggt	gcc	agc	aat	ggc	ctg	gcg	cat	gtc	gct
E	Y	V	A	G	G	A	S	N	G	L	A	H	V	A
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
cag	gac	agc	gaa	atc	ccg	gta	gcc	ttt	ggt	ggt	ctg	acc	act	gaa
Q	D	S	E	I	P	V	A	F	G	V	L	T	T	E
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120

Resistencia a fosfomicina y nitrofurantoína en E. coli y K. pneumoniae

agt	att	gaa	caa	gcc	att	gag	cgc	gct	ggc	acc	aaa	gcc	ggt	aac
S	I	E	Q	A	I	E	R	A	G	T	K	A	G	N
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
aaa	ggc	gca	gaa	gct	gcg	ctg	acc	gcg	ctg	gaa	atg	att	aac	gta
K	G	A	E	A	A	L	T	A	L	E	M	I	N	V
136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
ttg	aaa	gcc	atc	aag	gcc	tga								
L	K	A	I	K	A	Stop								
151	152	153	154	155	156									

Anexo XIX: Secuencia del gen *fosA3* y de la proteína FosA3

Gen *fosA3*

En rojo se muestra la secuencia del gen plasmídico *fosA3*. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 282 pb).

```
ATGCTGCAGGGATTGAATCATCTGACGCTGGCGGTCAGCGATCTGCGTCAAGCCTGGCATTTATCAGCAGTTAC
CTGGAATGCGCCTGCACGCCAGCTGGGATAGCGGAGCCTATCTCTCCTGTGGGGCGCTGTGGCTGTGCTTGTCCG
TGGATGAGCAGCGGCGTAAAACGCCCCCTCAGGAAAGCGACTATACCCACTACGCCTTCAGCGTGGCGGAAGAA
GAGTTTGCCGGGGTGGTGGCTCTGCTGGCGCAGGCGGGGGCTGAGGTATGGAAAGATAACCGCAGTGAAGGGG
CGTCTTACTATTTCTCGACCTGACGGCCATAAGCTGGAGCTGCATGTGGGAATCTGGCGCAGCGGCTGGCCG
CCTGTCGCGAACGCCCTACAAGGGGATGGTCTTTTTTGATTGA
```

Proteína FosA3

```
MLQGLNHLTLAVSDLASSLAFYQQLPGMRLHASWDSGAYLSCGALWLCLSLDEQRRKTPPQESDYTHYAFSVAEEFFA
GVVALLAQAGAEVWKDNRSEGASYFLDPDGHKLELHVGNLAQRLAACRERPYKGMVFFD
```

Anexo XX: Secuencia del gen *fosA4* y de la proteína FosA4

Gen *fosA4*

En rojo se muestra la secuencia del gen plasmídico *fosA4*. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 241 pb).

```
ATGCTGCAGGGATTGAATCATCTGACGCTGGCGGTCAGCGATCTGGCGTCAAGCCTGGCGTTTTATCAGCGGTTA
CCTGGAATGCGTCTGCACGCCCGTTGGGATAGCGGAGCATATCTTCTGCGGGGCGTTGTGGCTATGCTTGTGCGC
TGGATGCGCAGCGGCGTAAAACGCCCGCTCAGGAAAGCGACTATACCCATTATGCTTTCAGCGTGGCGGAAGAGC
ACTTTGCCGAGGTGGTCGCCAGCTGGCGCACGCGGGGGCCGAAGTATGGAAAGACAACCGCAGCGAAGGGGC
GTCGTAATAATTTCTCGACCCTGACGGCCATAAGCTGGAAGTGCATGTGGGTCATTTGGCACAGCGGCTGGCCGCC
TGTCGGGAACGCCCGTACAAGGGGATGGTCTTTTTTACTGA
```

Proteína FosA4

```
MLQGLNHLTLAVSDLASSLAFYQRLPGMRLHARWDSGAYLSCGALWLCLSLDAQRRKTPAQESDYTHYAFSVAEEHF
AEVVAQLAHAGAEVWKDNRSEGASYFLDPDGHKLELHVGHLAQRLAACRERPYKGMVFFD
```

Anexo XXI: Secuencia del gen *fosA5* y de la proteína FosA5

Gen *fosA5*

En rojo se muestra la secuencia del gen plasmídico *fosA5*. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 187 pb).

```
ATGCTGAGTGGACTGAATCACCTGACCCTGGCAGTCAGCCAGCTGGCGCCGAGCGTGGCGTTTTATCAGCAGCTG
CTGGGCATGATGCTGCATGCCCGCTGGGACAGCGGGGCTTATCTCTCCTGCGGCGATCTGTGGCTGTGCCTGTCG
CTGGATCCGCAGCGGCGCGTTACTCCGCCGGAAGAGAGCGACTACACCCATTATGCGTTTAGTATTAGCGAAGCC
GATTTTGCTAGCTTCGCCGCCCGCCTTGAGGCTGCCGGCGTAGCGGTCTGGAAGCTGAACCGTAGCGAAGGCGCT
TCGCACTATTTCTCGATCCCGATGGCCATAAGCTGGAGCTGCACGTCGGCAGTCTCGCCAGCGTCTGGCCGCCT
GCCGCGAGCAGCCGTATAAGGGGATGGTGTTTTTTGCTGAGTGA
```

Proteína FosA5

```
MLSGLNHLTLAVSQLAPSVAFYQQLGMMMLHARWDSGAYLSCGDLWLCLSLDPQRRVTPPEESDYTHYAFSISEADFA
SFAARLEAAGVAVWKLNRSEGASHYFLDPDGHKLELHVGLAQLAACREQPYKGMVFFAE
```

Anexo XXII: Secuencia del gen *fosA6* y de la proteína FosA6

Gen *fosA6*

En rojo se muestra la secuencia del gen plasmídico *fosA6*. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 242 pb).

```
TCACTGTTCAAAAAACACCATCCCCTTATACGGCTGCTCGCGGCAGGCGGCCAGCCGCTGGGCGAGACTGCCGAC
GTGCAGCTCCAGCTTATGGCCATCGGGATCGAGGAAATAGTGCGAGGCACCTTCGCTACGGTTCAGTTCCAGAC
CGCCACGCCGGCAGCCTCAAGGCGGGCGGCGAAGCTAGCAAATCGGCTTCGCTAATACTAAACGCATAATGGG
TGTAGTCGCTCTTCCGGCGGAGTAACGCGCCGCTGCGGATCCAGCGACAGGCACAGCCACAAATCGCCGCAGG
AGAGATAAGCCCCGCTGTCCAGCGGGCATGCAGCGTCATGCCAGCAGCTGCTGATAAAACGCCACGCTCGGCG
CCAGCTGGCTGACTGCCAGGGTCAGGTGATTCAGTCCACTCAGCAT
```

Proteína FosA6

```
MLSGLNHLTLAVSQLAPSVAFYQQLGMTLHARWDSGAYLSCGDLWLCLSLDPQRRVTPPEESDYTHYAFSISEADFAS
FAARLEAAGVAVWKLNRSEGASHYFLDPDGHKLELHVGSQAQRLAACREQPYKGMVFFEQ
```

Anexo XXIII: Secuencia del gen *fosC2* y de la proteína FosC2

Gen *fosC2*

En rojo se muestra la secuencia del gen plasmídico *fosC2*. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 334 pb).

```
GTGTTACGAGGATTGAATCATATTACTATTGCAGTAAGTGACCTTGAACGTTCCGTGGAGTTCTATACGCGTCTATT  
AGGAATGAAGGCACATGTCCGCTGGGATAGTGGGGCATATCTGAGCTTGGAGGCTACTTGGATTTGCTTGTCTTG  
TGACGAAGTGCATCCGAGCCAAGATTACTGTCACATCGCGTTTGATGTTCCGAAGAGAATTCGAACCAGTTACT  
AAAAAGCTTCGCGAAGCACATGTCGTTGAATGGAAACAAAATAGAAGCGAAGGACTTCTTTATACTTGCTCGATC  
CTGACGGCCATAAATTGGAAATCCATAGCGGTAGCCTACAAAGTCGTTTGAATCGTTGAAGTCTAAACCCTATCA  
AGGGTTAGTATGGCTATAA
```

Proteína FosC2

```
MLRGLNHITIAVSDLERSVEFYRLLGMKAHVRWDSGAYLSLEATWICLSCDEVHPSQDYCHIAFDVSEENFEPVTKKLR  
EAHVVEWKQNRSEGLSLYLLDPDGHKLEIHSGSLQSRLESLSKPKPYQGLVWL
```


Anexo XXIV: Secuencia del gen *oqxA* y de la proteína OqxA

Gen *oqxA*

En rojo se muestra la secuencia del gen plasmídico *oqxA*. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 339 pb).

TGATCGACACAAATGGCCTTAAGCCAGCCCGGACAAAGGAAGTGGCGGGCTTCTCACGCTGCGTCTTGCCCGGC
 GGCTACATTTACCGGAATAAAAATAATGAGCCTGCAAAAAACCTGGGAAACATTCACCTGACCGCGCTCGGCGC
 GATGATGCTCTCCTTTCTGCTCGTGGCTGCGACGACAGCGTTCGACAGAAATGCTGCGCCTCCCGCCCCGACGGT
 AGCGCCGCTAAGGTGCTGGTGAAGTCGATCAGTCAGTGGGATAGTTTTAACGGTCGCATTGAAGCGGTGGAGAG
 CGTTCAGCTTCGCCCTCGCGTCTCGGGATACATTGATAAAGTGAATTACACTGACGGCCAGGAGGTGAAAAAGGG
 CCAGGTGCTGTTACGATAGATGACAGAACCTATCGCGCCGCGCTGGAGCAGGCGCAGGCGGGCGTTGGCAAGAG
 CCAAACGCAGGCCAGCCTCGCGCAAAGCGAGGCGAACCGCACCGATAAATTAGTCCATACCAACCTCGTCTCC
 GTGAAGAGTGGGAGCAGCGCCGGTTCAGCCGCGGTTAGGGCGCAGGCCGACATTCGCGCCGCGCAGGCGGGCGGT
 GGATGCCGCGCAGCTTAACCTCGACTTACCAAAGTGACCGCCCTATTGACGGCCGCGCCAGCCGGGCGCTGAT
 CACCAGCGTAACCTGGTCACCGCGGGCGACACCGCCAGCGTGTCTACCACCCTGGTCTCGAAAAGACGGTGT
 CGTCTACTTTGACGTCGACGAGTCAACCTACCTCACTATCAAACCTCGCCCGCCGCGGGCAAGGCGCGTCCAGC
 GATAATCAGGCGCTCCCGGTGGAGATTGGCCTGGTGGGCGAGGAGGGTTACCCCAACAGGGCAAAGTGGATT
 TCTCGATAATCAGTTAACGCCGAGTACCGGCACCATCCGCATGCGTGGCTGCTGGATAACTCGCAGCGTCTGTT
 ACGCCGGGGCTGTTTGGCCGCGTGGTCTGCCGGGCGAGCGCAGATTCAAAGCCACGCTGATCGACGACAAAGC
 GGTACTGACCGATCAGGATCGTAAATACGTCTATATCGTTGATAAAGATGGTAAAGCACAGCGCCGCGACATTAC
 CCCAGGGCGGCTGGCAGACGGTTTACGCATCGTTTACAAGGGTTGAATCCTGGGGATAGCGTCATCGTCGACG
 GCTTACAAAAAGTGTATGCCGGGTATGCCGGTTAACGCCAAAACCGTTGCCATGACCTCCAGCGCCACCCTTAA
 CTGATCCCTAATCAGAGAATCCAAGACATGGACTTTTCCCGCTTTTTATCGACAGGCCGATTTTCGCCGCGGTGCT
 GTCGATTTAATTTTTATCACCGGGT

Proteína OqxA

MSLQKTWGNIHLLTALGAMMLSFLVGCDDSVQAAPPAPTVSAAKVLVKSISQWDSFNGRIEAVESVQLRPRVSGYI
 DKVNYTDGQEVKKGQVLFITDRTYRAALEQAQAALARAKTQASLAQSEANRTDKLVHTNLSREEWEQRRSAAVQA
 QADIRAAQAAVDAAQLNLDFTKVTAPIDGRASRALITSGNLVTAGDTASVLTLLVSQKTVYVYFDVDESTYLHYQNLAR
 RGQGASSDNQALPVEIGLVGEEGYPHQGVDFLDNQLTPSTGTIRMRLDNSQRLFTPGLFARVRLPGSAEFKATLID
 DKAVLTDQDRKYVYIVDKDGKAQRDITPGRADGLRIVQKGLNPGDSVIVDGLQKVFMPGMPVNAKTVAMTSSATL
 N

Anexo XXV: Secuencia del gen *oqxB* y de la proteína OqxB

Gen *oqxB*

En rojo se muestra la secuencia del gen plasmídico *oqxB*. En azul se indica la zona de hibridación de los cebadores (tamaño del amplificado: 240 pb).

TACAAAAAGTGTATGCCGGTATGCCGGTAAACGCCAAAACCGTTGCCATGACCTCCAGCGCCACCCTTAACTG
 ATCCCTAATCAGAGAATCCAAGACATGGACTTTTCCCGCTTTTTATCGACAGGCCGATTTTCGCCGCGGTGCTGTC
 GATTTTAATTTTTATCACCGGTTAATCGCTATCCACTGCTGCCGGTGAAGCAATATCCGGATGTCGTCCCGCCGA
 GCGTCCAGGTGCGCGCGGAGTATCCCGGCGCAACCCGAAAGTGATTGCCGAGACCGTGGCGACGCCGCTGGAG
 GAAGCGATCAACGGCGTTGAAAACATGATGTACATGAAATCGGTCGCCGGCTCCGACGGCGTGTGGTACCACC
 GTCACCTTCCGCCCGGTACCGACCCGGATCAGGCGCAGGTTAGGTGCAGAACCAGCGTCCGCGCAGGCCGAAGC
 GCGTCTGCCGGAGGATGTACGCCGTCTGGGGATCACCACCAGAAGCAGTCTCCGACGCTGACCCTGGTGGTGCA
 TCTGTTCTCCCGGCGGGAAGTACGACTCGCTGTATATGCGCAACTACGCCACGCTGAAAGTGAAGGATGAGCT
 GGCGCGCTGCCCGGCGTCCGCCAGATCCAGATTTTTGGCTCCGGTGAATATGCGATGCGCGTCTGGCTGGATCC
 CAATAAGGTCGCTGCCCGCGGTCTGACGGCCTCGGATGTGGTGACGGCGATGCAGGAGCAAAACGTCCAGGTGT
 CTGCCGACAGCTTGGCGCGAGCCGCTGCCGACGAGAGCGATTTCTGATCTCCATTAACGCCAGGGCCGCTC
 TGCATACCGAAGAAGAGTTTGCAATATCATTCTGAAAACGGCGCAGGATGGCTCGCTGGTCCGCCTGCGCGACG
 TGGCGCGCATCGAGATGGGTTCCGGTAGCTATGCGCTGCGCTCCAGCTCAACAATAAGGATGCGGTCCGGGATCG
 GTATCTTCCAGTACCCGGCGCTAACGCCATCGATCTGTGAAACGCGGTACGCGCCAAAATGGCCGAGCTGGCCA
 CCCGCTTCCCGAAGATATGCAATGGGCGGCGCCGTACGACCCGACGGTTTTCTGCCGACTCCATCCGCGCGG
 TGGTGACAGCGCTGCTGGAGGCGGTAGTGTGGTGGTGTGGTAGTGATCCTGTTCTCGACACCTGGCGCGCGT
 CGATTATCCCGTTGATCGCTGTCCGGTATCGGTGGTGGGTACCTTACGATTCTATCTGCTGGGCTTCTCGCTG
 AATACCCTGAGCCTGTTCCGGGCTGGTACTGGCTATCGGTATCGTGGTGGACGACGCCATCGTGGTGGTGGAGAAC
 GTCGAGCGTAATATCGAAGAGGGGCTTGCGCCGCTTCCGCGGCGCATCAGGCGATGCGTGAGGTCTCCGGGCC
 GATTATCGCCATTGCGCTGGTGTGTGTGCGGTGTTCTGCGCATGGCGTTTTCTCCGGGGTACCCGGCCAGTTC
 TACAAACAGTTCGCGGTGACCATCGCCATCTCGACGGTGTCTCGGCCATCAACTCGTGTACGCTCTCCCGGCGC
 TGCGGGCCTGCTGTTAAAGCCGACGGCGCGAAGAAAGACCTCCACCCGGCTGATCGATCGCCTGTTTGGCT
 GGATTTTCCGTCGGTTAAACCGCTTTTCTGCGCAGCTCGAACGGTATCAGGGACTGGTAGGCAAAACGCTTGG
 ACGCCGTGGCGCAGTGTGCGGTGTACCTGTGCTGCTGCTGCGCCGCTGGGGTGTGTTTAAAGTGTCCCGG
 CGGGTTTATCCACCCAGGATAAGCTGTATCTATTGGCGCGTGAAGATGCCGGAAGGGTGTGCTGCTGGCGCG
 CACCGACGCGGTGATCCGAAAATGAGCGAGATCGGGATGAATACCGAAGGGTGTGACTATGCGGTGCTTTCC
 CGGGCTTAAACGCGTGCAGTTCACCAACACGCCGAATACCGGGACGGTCTTTTTTGGCCTGAAACGTTTCGACCA
 GCGCAAACACACGGCGCGGAAATTAACGCGGAGATCAACGCCAAAATCGCGCAAATCCAGCAGGGCTTTGGCT
 TTTCCATCTGCCGCCCGGATTTTAGGTCTGGGTGAGGTTCCGGCTACTCCCTGTACATCCAGGATCGCGGAGG
 GCTGGGCTATGGCGCGTGCAAAAGCGCGGTGAATGCGATGTCCGGGGCGATTATGCAGACGCCGGGGATGCACT
 TCCCGATCTGACTTACCAGGTAACGTGCCGAGCTGGACGTGCAGGTGATCGCGATAAGGCGAAAGCGCAG
 GGGGTATCGTAACCGATCTGTTCCGGTACGCTGCAGACCTATCTCGGCTCGTCTTATGTCAATGACTTTAACAGTT
 CGGGCGTACCTGGCGCGTGTGGCCAGGCTGACGGACCATAACCGGAGAGCGTGGAAGATATCGCCAATCTGC
 GCACCCGCAATAACAGGGCGAAATGGTACCGATCGGCAGTATGGTGAATATCAGTACCACCTACGGGCCGGATC
 CGGTGATCCGCTACAACGTTATCCGGCGGCGGACCTGATTGGCGATGCCGATCCGCGGGTCTCTCTTCTTCGCA
 GGCGATGACGCATCTGGAAGAGCTGTGCAAGCAGATCTGCCGAATGGGATGAATATTGAGTGGACGGATCTCA
 GCTTCCAGCAGGCCACCCAGGGCAACACGGCGCTGATCGTCTTCCGGTGGCGGTGCTGCTGGCATTCTCGTACT
 GGCCGCGTGTATGAAAGCTGGACCCTGCCGCTGGCGGTGATCCTTATCGTACCGATGACGATGCTCTCCGCGCT
 GTTTGGCGTCTGGCTGACCGGGGGCGATAACAACGTCTTCTGTCAGGTGGGTCTGGTGGTCTGATGGGCTGGC
 CTGTA AAAACGCCATTCTGATCGTGCAGTTTCCCGCGAGCTGGAGATCCAGGGGAAAGGCATCATGGAAGCGG
 CGCTGGAGGATGCCGCTGCGTCTGCGCCGATCGTGATGACCTCCATCGCCTTATCGCCGGGACATTCCGCT
 GATCCTCGGCCACGGCGCGGGGGCGGAAGTCCGCGCGTACCGGGATCACGGTGTCTCCGGGATGCTGGGCG
 TGACGCTTCCGGTCTGTTCTGACGCCGGTGTTCACGTGACGCTACGGAAACTGGTGACCCGAGGAAGCCGG
 TCCAGGAGGATCTGCCGCTAGCCTGCAGCAGATAACAAAAAACCGCTTACAATTTGAAGGCGGTTTTTTTT
 CGTACCAGAAAATGATTAATGCGCTTTTTTAAAGCGGGCGATCATT

Proteína OqxB

MDFSRFFIDRPIFAAVLSILIFITGLIAIPLLPVSEYPDVVPPSVQVRAEYPGANPKVIAETVATPLEEAINGVENMMYMKSVAGSDGVLVTTVTRPGTDPDQAQVQVQNRVAQAEARLPEDVRRLGITTQKQSPTLTLVVHLFSPGGKYDSLYMRNYATLKVKDELARLPGVGQIQIFGSGEYAMRVWLDPNKVAARGLTASDVVTAMQEONVQVSAGQLGAEPLQESDFLISINAQGR LHTEEEFGNIILKTAQDGSVLRDVARIE MGSGSYALRSQ LNNKDAVIGIGIFQSPGAN AIDLSNAVRAKMAELATRFPEDMQWAAAPYDPTVFVRDSIRAVVQTLLEAVVLVVLVILFLQ TWRASIIPLI AVPVSVVGTFSILYLLGFSLNTLSL FGLVLAIGIVVDDAIVVVENVERNIEEGLAPLAAA HQAMREVS GPIIAIALVLC AVFVPM AFLSGVTGQFYKQFAVTIAIS TVISAINSLTSPAL AALLLKPHGAKKDLPTRLIDR LFGWIFRPFNRFFLRSSNGYQGLVGKTLGRRGAVFAVYLLLLCAAGVMFKVVPGGFIPTQDKLYLIGGVKMPEGSSLARTDAVIRKMSEIGMNTGVDYAVAF PGLNALQFTNTPNTGTVFFGLKPF DQRKHTAAEINAEINAKIAQIQGFGFSILPPPILGLGQSGSYLYIQDRGGLGYGALQSAVNAMSGAIMQTPGMHFP ISTYQANVPQLDVQVDRDKAKAQGVSLTDLFGTLQTYLGSSYVNDFNQFGRTWRVMAQADGPYRESVEDIANLRTRNNQ GEMVPIGSMVNISTTYGDPDVIRYNGYPAADLIGDADPRVLSSSQAMTHLEELSKQILPNGMNIEWTDLSFQQATQGN TALIVFPVAVLLAFLVLAALYESWTLPLAVILIVPMTMLSALFGVWLTGGDNNV FVQVGLVLMGLACKNAILI VEFARELEIQKGIMEAALEACRLRLRPVMTSIAFIAGTIPLILGHGAGAEVRGVTGITVFSGMLGVTLFGLFLTPVFYVTLRKL VTRRKPVQEDLPA

