

**Microbiología Médica**  
**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Medicina Clínica**  
**Universidad Miguel Hernández**

**Resistencias a Fluoroquinolonas en aislados clínicos  
de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*  
productores y no productores de Betalactamasas de  
espectro extendido: Epidemiología en nuestro medio y  
análisis genético de este fenómeno.**

Doctorando: Obdulia Victoria Noguera Moya

Directores: Dra. Gloria Royo García

Dr. Juan Carlos Rodríguez Díaz



## **Dedicatoria**

A Joaquín, Fernando e Isabel.

A mi madre.

A mi padre, *in memoriam*.





## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gloria Royo García, jefa del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Elche por su confianza y apoyo.

Al Dr. Juan Carlos Rodríguez Díaz, adjunto del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Elche, por su apoyo y ánimos, por considerarme como alguien más de su laboratorio, por sus consejos y sobre todo por su inigualable y contagioso optimismo, herramienta indispensable para abatir cualquier problema, incluida esta tesis.

A Rosa Cremades, Sofía Belda, Rafaela Ferrari, Antonio Galiana, Nati López residentes y becarios en el Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Elche, por su inestimable ayuda en la realización de la parte de biología molecular de esta tesis.

Muy especialmente al Dr. Ismael Luis Llorca Escuín, jefe de servicio de Análisis Clínicos del Hospital Vega Baja de Orihuela, por sus aportaciones a este trabajo y por su apoyo incondicional en todo momento desde que esta tesis era sólo una nebulosa ya que *hay que ser incombustible al desánimo*.

Al laboratorio de Microbiología del Hospital Vega Baja de Orihuela, especialmente a las doctoras Nieves Gonzalo y María Navarro por su ayuda en la resolución de algunas dudas.

Muy especialmente a la doctora Nieves Gonzalo, microbióloga del Hospital Vega Baja de Orihuela, por su ayuda inestimable en la revisión de este documento.

A mis compañeros del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Vega Baja de Orihuela por su apoyo y ánimos en este trabajo.

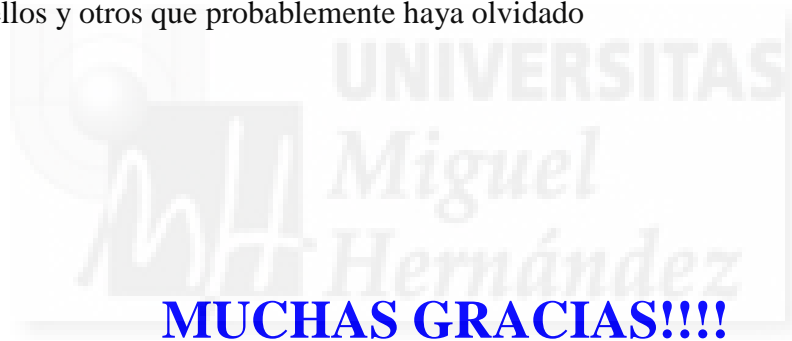
A Domingo Terrés Espinosa y Enrique Hurtado Flores, supervisores de Análisis Clínicos del Hospital Vega Baja de Orihuela, por su apoyo logístico.

A Don José Escribano (DiaSorin) y Don José Manuel Sanchís (Dade Behring, actual Siemens) por su apoyo económico, sin el cual esto no hubiera sido posible.

Al Dr. José María López Lozano del servicio de Medicina Preventiva del Hospital Vega Baja de Orihuela por su ayuda a confeccionar la estadística en alguno de los artículos.

Y por último, pero posiblemente más importante, a mi familia por su apoyo, comprensión, aguante, ánimos... frente a tantas tardes de tantos meses pasados en el laboratorio o frente al ordenador en lugar de estar con ellos.

A todos ellos y otros que probablemente haya olvidado





## ABREVIATURAS UTILIZADAS:

A	adenina
$\Delta$	incremento
aa	aminoácidos
ADN	ácido desoxiribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
AS	agar sangre
Asn	asparragina
Asp	aspartato
AUC	área total bajo la curva sérica
BLEE	betalactamasas de espectro extendido
C	citocina
CA	California
CAZ	ceftazidima
cDNA	DNA complementario
CEHEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxinas Shiga o enterohemorrágica
CI	intervalo de confianza
CMI	concentración mínima inhibitoria
CIP	ciprofloxacino
CIMg <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cmax	concentración sérica máxima
CPM	concentración preventiva de mutantes
CTX	cefotaxima



DDD	dosis diaria definida
DNA	ácido desoxiribunucleico
DNTPs	2'-deoxinucleósidos 5'-trifosfato
<i>E coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAggEC	<i>E coli</i> enteroagregativa
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ESGARS	ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
EtBr	bromuro de etidio
ETS	enfermedad de transmisión sexual
FAN	fenil-arginil- $\beta$ -naftilamida
FQ	fluorquinolona
g	gramos
G	guanina
Gly	glicina
h	horas
HCl	ácido clorhídrico
HGU	hospital general universitario
ITU	infecciones del tracto urinario

KD	kilodalton
<i>Kp</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kg	kilogramos
L	litro
LEV	levofloxacino
M	molar
McConkey	agar McConkey
mg	miligramos
min	minutos
MHa	Mueller Hinton agar
MHc	Mueller Hinton caldo
ml	mililitros
mM	milimolar
MXF	moxifloxacino
n	número de casos
NA	acido nalidíxico
NaOH	hidróxido de sodio
ng	nanogramos
OR	odds ratio
p	nivel de significación estadística
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Phe	fenilalanina
pmol	picomolar
QRDR	quinole resistance determining region

r	coeficiente de correlación estadística
R	resistente
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
S	sensible
Ser	serina
<i>S pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Sta aureus</i>	<i>Stafilococcus aureus</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxinas Shiga o enterohemorrágica
T	timina
TBE	1xTris-borate-EDTA buffer
TE	1xTris-EDTA buffer
Thr	treonina
Tm	temperatura de melting
TRIS	TRIS (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH)) <sub>3</sub>
Tyr	tirosina
U	uracilo
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFC	unidad formadora de colonias
USA	Estados Unidos de América
UV	ultravioleta
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
μg	microgramos
μl	microlitros

°C

grados centígrados



# 1.- INDICE



# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1.- Características generales de las Enterobacterias.**

1.1.1.- Hábitat.

1.1.2.-Características morfológicas y fenotípicas.

1.1.3.-Características antigénicas y estructurales.

1.1.4.-Virulencia y factores de virulencia.

1.1.5.-Importancia clínica.

## **1.2.- Escherichia coli.**

## **1.3.- Klebsiella pneumoniae.**

## **1.4.- Betalactamasas de espectro extendido.**

1.4.1.- Definición y clasificación de betalactamasas de espectro extendido.

1.4.2.- Diversidad de tipos de BLEE.

1.4.3.- Epidemiología de las BLEE.

1.4.4.- Factores de riesgo para la colonización e infección.

1.4.5.- Infecciones adquiridas en la comunidad.

## **1.5.- Fluoroquinolonas.**

1.5.1.- Mecanismo de acción.

1.5.2.- Clasificación y espectro antimicrobiano.

### **1.6.- Resistencias en *Enterobacteriaceae*: *E coli* y *K pneumoniae*.**

1.6.1.- Resistencia a betalactámicos por BLEE.

1.6.2.-Resistencia a quinolonas.

1.6.3.-Resistencia a betalactámicos y a quinolonas: multiresistencias.

### **1.7.- Microarrays en Microbiología medica.**

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

## **3. MATERIAL Y METODOS**

### **3.1.- Materiales utilizados en la realización de las técnicas.**

3.1.1.- Reactivos.

3.1.2.- Material inventariable.

3.1.3.- Material fungible

3.1.4.- Medios de cultivo y soluciones.

**3.2.- Frecuencias de BLEE y de resistencia a ciprofloxacino en nuestro medio en cepas de *E coli* y *K pneumoniae*.**

**3.3.-Determinación de la concentración preventiva de mutantes (CPM) resistentes a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de *E coli* productoras y no productoras de BLEES.**

3.3.1.- Fundamento.

3.3.2.- Técnica para la determinación de la concentración preventiva de mutantes resistentes a FQ.

3.3.3.- Cepas de *Escherichia coli*.

3.3.4.- Caracterización de las BLEE.

3.3.5.- Determinación de las CMI de las cepas.

3.4.5.1.- Material empleado para la realización de la sensibilidad mediante dilución en agar.

3.4.5.2.- Procedimiento seguido en la realización de la sensibilidad mediante dilución en agar.

3.3.6.- Test estadístico.

#### **3.4.- Generación de mutantes a fluoroquinolonas**

3.4.1.- Fundamento.

3.4.2.- Cepas originales.

3.4.3.- Antibióticos ensayados.

3.4.4.- Concentración mínima inhibitoria de las fluoroquinolonas ensayadas en cepas salvajes.

3.4.5.- Generación de mutantes.

3.4.6.- Concentración mínima inhibitoria de las fluoroquinolonas ensayadas en los mutantes generados.

3.4.6.1.- Materiales empleados.

3.4.6.2.- Procedimiento para la realización del E-test.

3.4.7.- Confirmación de la estabilidad de las mutaciones.

3.4.8.- Mantenimiento del mutante.



### **3.5.-Caracterización genotípica de los mutantes a quinolonas.**

#### 3.5.1.- Técnicas moleculares.

##### 3.5.1.1.- Metodología y técnicas generales.

3.5.1.1.1.- Extracción de ADN por Chelex.

3.5.1.1.2.- Estimación de la cantidad de ADN extraído.

3.5.1.1.2.1.- Tinción con Bromuro de Etidio.

3.5.1.1.2.2.- Espectrofotómetro.

3.5.1.1.3.- Desarrollo de las técnicas de PCR.

3.5.1.1.4.- Visualización de las reacciones de PCR.

3.5.1.1.5.- Purificación de los productos de PCR.

3.5.1.1.6.- Visualización del ADN purificado.

3.5.1.1.7.- Medida de la concentración del ADN purificado.

##### 3.5.1.2.- Metodología y técnicas específicas.

3.5.1.2.1.- Secuenciación del gen *gyrA* de *E coli*.

3.5.1.2.2.- Secuenciación del gen *parC* de *E coli*.

3.5.1.2.3.- Secuenciación del gen *gyrA* de *K pneumoniae*.

3.5.1.2.4.-Secuenciación del gen *parC* de *K pneumoniae*.

3.5.1.2.5.- Análisis de secuencias.

### **3.6.- Análisis de microarrays.**

3.6.1.- Fundamento.

3.6.2.- Cepas.

3.6.3.- Modelo experimental.

3.6.3.1.- Extracción del RNA.

3.6.3.2.- Chequeo del RNA en gel de agarosa.

3.6.3.3.- Síntesis de cDNA.

3.6.3.4.-Hibridación y escaneado del E.coli Genome 2.0 array.

Análisis de los controles.

3.6.3.5.-Análisis bioinformático de los resultados obtenidos con la técnica de microarrays.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1.-Evolución de las cepas productoras de BLEE y de la resistencia a fluoroquinolonas en el Hospital General Universitario de Elche.**

4.1.1.- Evolución de las cepas de *Escherichia coli* resistentes a ciprofloxacino productoras o no de BLEE.

4.1.2.-Evolución de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino productoras o no de BLEE.

### **4.2.- Evolución de la resistencia a ciprofloxacino: influencia de los criterios de eliminación de duplicados.**

4.2.1.- Resistencia en *Escherichia coli*: influencia de los criterios de eliminación de duplicados.

4.2.2.-Resistencia en *Klebsiella pneumoniae*: influencia de los criterios de eliminación de duplicados.

**4.3.- Determinación de la concentración preventiva de mutantes resistentes a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* productoras y no productoras de betalactamasas de espectro extendido.**

**4.4.- Generación in vitro de mutantes tras exposición a fluoroquinolonas. Relación con la presencia de betalactamasas de espectro extendido**

4.4.1.- Generación in vitro de mutantes de *Escherichia coli*

4.4.2.- Generación in vitro de mutantes de *Klebsiella pneumoniae*

**4.5.- Caracterización genética de las cepas de *Escherichia coli*.**

4.5.1.- Detección de mutaciones en el gen *gyrA* de *E coli*.

4.5.2.-Detección de mutaciones en el gen *parC* de *E coli*.

**4.6.- Caracterización genética de las cepas de *Klebsiella pneumoniae*.**

4.6.1.- Detección de mutaciones en el gen *gyrA* de *K pneumoniae*

4.6.2.- Detección de mutaciones en el gen *parC* de *K pneumoniae*.

**4.7.- Análisis de microarrays en cepas de *Escherichia coli* con la plataforma GENECHIP® de AFFYMETRIX®**

4.7.1.- Análisis estadístico.

4.7.2- Comparaciones hechas entre las condiciones estudiadas.

4.7.3-Análisis de resultados

**5. DISCUSION**

**6. CONCLUSIONES**

**7. BIBLIOGRAFÍA**

**8. APÉNDICES:**

**APÉNDICE 1.- SONDAS CONSIDERADAS SIGNIFICATIVAS EN LAS  
DISTINTAS COMPARACIONES.**

**APÉNDICE 2.- COMUNICACIONES A CONGRESOS.**

**APÉNDICE 3.- ARTICULOS PUBLICADOS.**

**APÉNDICE 4.- ACCÉSIT A PREMIOS.**

# 1.- INTRODUCCIÓN



## **1.1.- Características generales de las Enterobacterias.**

La familia *Enterobacteriaceae* comprende una amplia variedad de géneros y especies. La mayoría de enterobacterias relevantes desde un punto de vista clínico las podemos ver en la tabla 1<sup>1,2</sup>.

Los miembros de esta familia suelen llamarse “entéricos” ya que el hábitat principal de muchos de ellos es el tracto gastrointestinal inferior de algunos vertebrados e invertebrados. Este término puede crear confusión y puede ocultar la amplia distribución de los miembros de esta familia<sup>1</sup>.

### **1.1.1.- Hábitat:**

Las enterobacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza (plantas, suelo, agua...). Su hábitat natural, al menos de los miembros significativos desde el punto de vista clínico, es el tracto gastrointestinal inferior de humanos y otros animales. Son un componente importante de la flora intestinal en humanos<sup>1,2</sup>.

### **1.1.2.- Características morfológicas y fenotípicas:**

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son anaerobios facultativos, Gram negativas y no formadores de esporas. Fermentan la glucosa y otros azúcares. Reducen los nitratos a nitritos, producen catalasa y son oxidasa negativos. Tienen forma de bastón. En ellos son comunes los apéndices de superficie que pueden ser móviles (flagelos peritricos) o inmóviles. Crecen en peptona o medios con extracto de carne sin la adición de cloruro de sodio. Crecen bien en agar MacConkey<sup>1,2</sup>.

Tabla 1: Géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae* con importancia clínica.

GENERO	ESPECIE
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> <i>C. diversus (koseri)</i> <i>C. amalonaticus</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>E. tarda</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i> <i>E. aerogenes</i> <i>E. sakazakii</i>
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> <i>E. fergusonii</i>
<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i>
<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
<i>Pantoea</i>	<i>P. dispersa</i>
<i>Plesiomonas</i>	<i>P. shigelloides</i>
<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i> <i>P. vulgaris</i> <i>P. penneri</i>
<i>Providencia</i>	<i>P. stuartii</i> <i>P. rettgeri</i>
<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i>
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i> <i>S. flexneri</i> <i>S. sonnei</i> <i>S. boydii</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>

### 1.1.3.- Características antigénicas y estructurales:

La pared celular de las enterobacterias está compuesta por mureína, lipoproteínas, fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos y tiene una disposición laminar. La capa de lipoproteína-mureína constituye alrededor del 20% de la pared de la célula y es responsable de la rigidez celular. El 80% restante de la pared celular se une con los lípidos de la lipoproteína para formar la capa laminar. El lipopolisacárido contiene las cadenas polisacáridas específicas que determinan la antigenicidad de las diversas especies (el tipo O) y su componente lipídico es la estructura responsable de la actividad endotóxica. En el caso de ciertas especies de *Enterobacteriaceae* la estructura antigénica desempeña un papel importante en la clasificación epidemiológica. Los antígenos O (antígeno somático, lipopolisacárido), H (antígeno flagelar protéico) y K (antígeno capsular polisacárido) son los principales componentes que se usan en la tipificación serológica.

En la figura 1 podemos ver de forma muy esquemática la estructura de una enterobacteria, en concreto de su envoltura celular.



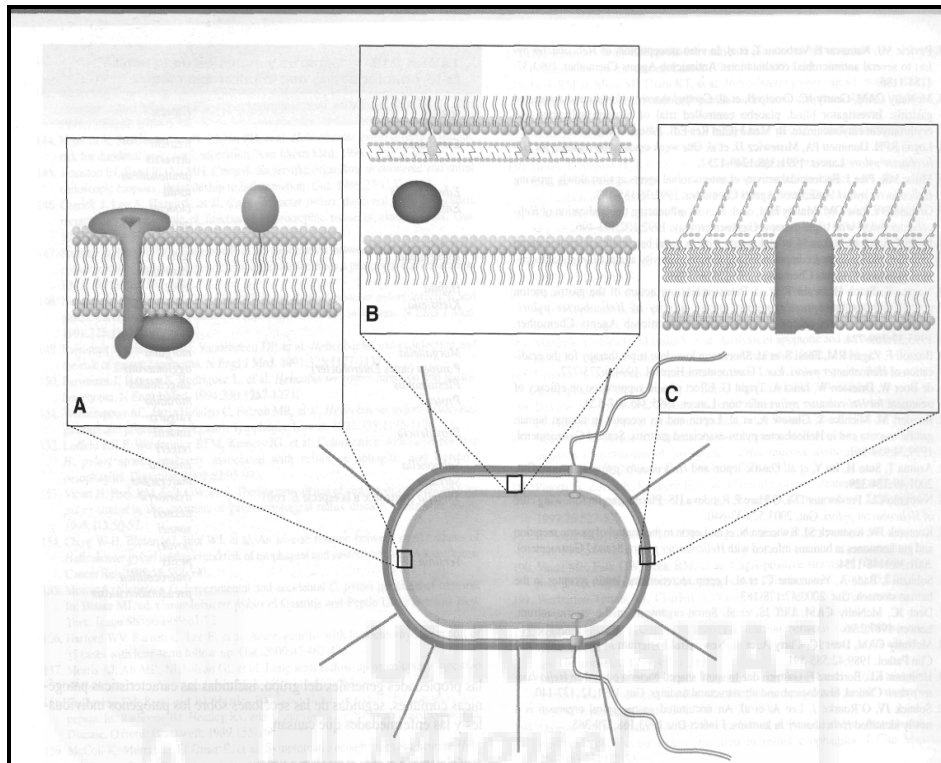


Figura 1. Esquema de la envoltura de una enterobacteria. **A, La membrana citoplásmica** tiene una bicapa fosfolipídica, proteínas transmembranarias, proteínas periféricas de membrana y lipoproteínas. **B, El espacio periplásmico** está rodeado por la membrana interna y externa e incluye proteínas solubles. La capa de peptidoglicano, compuesta por disacáridos y entrecruzamientos peptídicos, se asocia a la hoja interna de la membrana externa a través de unión covalente a la lipoproteína. **C, La capa de membrana externa** tiene una hoja interna de fosfolípidos y una hoja externa de lipopolisacáridos. Las proteínas porinas que regulan el paso de moléculas atraviesan la membrana<sup>1</sup>.

#### **1.1.4.- Virulencia y factores de virulencia.**

La capacidad de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* para causar enfermedades es muy variable. Esto depende de los factores de virulencia específicos implicados en el proceso patológico. Entre estos factores de virulencia encontramos: adhesinas, sistemas de secreción y toxinas, adquisición de hierro, lipopolisacárido y cápsulas, plásmidos<sup>1</sup>.

Así podemos encontrar que con respecto al hombre existen especies que son primariamente comensales, patógenos oportunistas o patógenos potentes.

Otros factores a tener en cuenta en la virulencia de estos microorganismos son los relacionados con aspectos como: selección por el uso de antibióticos, existencia de enfermos con disminución en la respuesta inmune por enfermedad o como consecuencia de la administración de agentes inmunosupresores y citotóxicos.

Las infecciones oportunistas pueden darse siempre que existan factores predisponentes locales como pueden ser: aquellos que rompen las barreras físicas constituidas por la piel y las mucosas (heridas, quemaduras, catéteres) o las fisiológicas del árbol respiratorio (intubación), de la vía urinaria (sondas) o de la vía genital (dispositivos intrauterinos). También facilitan las infecciones oportunistas situaciones que conlleven disminución de las defensas globales inespecíficas, principalmente fagocitosis y de la respuesta inmune del huésped, que puede estar disminuida por una enfermedad de base. Así en las infecciones nosocomiales, hasta dos tercios son secundarias a la colocación de sondas vesicales, instrumentación de la vejiga o cirugía de las vías urinarias bajas.

Todos los bacilos entéricos oportunistas son capaces de causar enfermedades similares, pero la epidemiología, la frecuencia, la gravedad y el tratamiento de estas enfermedades difieren para las distintas especies.

#### **1.1.5- Importancia clínica.**

Las *Enterobacteriaceae* causan una amplia variedad de infecciones tanto en la comunidad como nosocomiales y afectan tanto a huéspedes sanos como a aquellos con enfermedades preexistentes.

Las enterobacterias producen entre otros: diarreas en neonatología, diarrea del viajero, ITU, meningitis en neonatos.

Son causa frecuente de infecciones nosocomiales como: ITU, neumonías, infecciones del torrente sanguíneo, infecciones en heridas, sepsis por catéteres. Las ITU son además las infecciones nosocomiales más frecuentes y la causa más común de bacteriemias. Son las bacterias más frecuentemente aisladas en ITU asociadas a catéteres o manipulación del tracto urinario en pacientes hospitalizados (*E coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus mirabilis*, otras enterobacterias, *P aeruginosa*, enterococos).

Son los gérmenes más frecuentemente aislados en pacientes con cistitis adquiridas en la comunidad (*E coli*, *Klebsiella spp*, otras enterobacterias...).

Todas las *Enterobacteriaceae* han sido implicadas en infecciones intraabdominales: peritonitis, colangitis y otras.

Representan el 80% de los aislados clínicamente significativos de bacilos Gram negativos y el 50% de los aislados clínicamente significativos en los laboratorios de Microbiología. Suponen casi el 50% de los casos de sepsis y más del 70% de las infecciones del tracto urinario<sup>2</sup>. También son importantes en las infecciones de cavidad

peritoneal y vías respiratorias y pueden aislarse de otros lugares (líquido cefalorraquídeo, sinovial y abscesos).

Muchas especies causan infecciones extraintestinales pero la mayoría de éstas están producidas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens*. Entre estas infecciones extraintestinales tenemos infecciones del tracto urinario, infecciones respiratorias, de heridas, sepsis e infecciones del sistema nervioso central<sup>1,2</sup>.

Dentro de esta familia tenemos a *E coli* como causa frecuente de infecciones del tracto urinario y *Klebsiella spp* y *Enterobacter spp* son causa importante de neumonías.

### 1.2.- *Escherichia coli*

El género *Escherichia* (género típico de la familia *Enterobacteriaceae*) está compuesto por especies móviles e inmóviles. Hay 5 especies en este género: *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* y *E. vulneris*. La especie tipo es *Escherichia coli* (*E coli*)<sup>1,3</sup>.

*E coli* es la enterobacteria habitualmente aislada de muestras humanas. Forma parte de la flora habitual del intestino en individuos sanos. Algunas cepas pueden causar infecciones extra e intra intestinales tanto en personas sanas como en inmunocomprometidas<sup>1,3</sup>. Es también un importante patógeno en animales y ocasiona elevados costes en la producción de alimentos debido a las enfermedades que provoca en los mismos.

Es la especie más frecuente de anaerobio facultativo encontrado en el tracto gastrointestinal (TGI) humano y también el patógeno más frecuentemente hallado de la familia *Enterobacteriaceae*.

Se distingue de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* por su capacidad para fermentar la lactosa y otros azúcares y para producir indol a partir de triptófano. Casi todas las cepas son móviles. *Escherichia coli* enteroinvasiva suele ser inmóvil y puede no fermentar la lactosa.

Figura 2: Foto de *Escherichia coli*.



Las cepas patogénicas se diferencian de las comensales en que producen factores de virulencia específicos y que pueden estar codificados en bacteriófagos, plásmidos o en fragmentos del cromosoma.

Cepas patogénicas:

*E coli* patogénica extraintestinal: es la causa más frecuente de infecciones de tracto urinario (ITU), es también causa principal de meningitis neonatal y puede ocasionar una amplia variedad de otras infecciones extraintestinales (neumonía nosocomial, colecistitis y colangitis, peritonitis, celulitis, osteomielitis y artritis infecciosa). Es también una de las principales causas de bacteriemia, sepsis y meningitis neonatales (la 2ª tras *Streptococcus agalactiae*)<sup>1,3</sup>.

*E coli* patogénica intestinal: Hay al menos 4 categorías de *E coli* productoras de diarrea: *E coli* productora de toxinas Shiga o enterohemorrágica (STEC o CEHEC), *E coli* enterotoxigénica (ETEC), *E coli* enteropatógena (EPEC) y *E coli* enteroinvasiva (EIEC). El significado clínico de otras categorías de *E coli* productores de diarreas, incluida *E coli* enteroagregativa (EAaggEC), no está claro<sup>3</sup>.

Estas cepas son causa común de diarrea infantil en países en vías de desarrollo y diarreas del viajero (EPEC y ETEC), diarreas sanguinolentas y síndrome hemolítico urémico (*E coli* enterohemorrágica), insuficiencia renal en niños (*E coli* enterohemorrágica) y diarrea persistente en personas infectadas por el VIH (*E coli* enteroagregativa)<sup>1</sup>.

### **1.3.- *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* (*K pneumoniae*) es un patógeno importante en humanos aislado con frecuencia de muestras provenientes de cualquier lugar pero principalmente del tracto respiratorio o urinario. Es ubicuo, incluidos los alimentos y el agua.

Su principal factor de virulencia es la cápsula de polisacáridos ya que evita la fagocitosis<sup>1</sup>. Sólo *K pneumoniae* y *Raoultella spp* son encapsulados, pero las cepas de cualquier género pueden crecer como colonias mucoides o rugosas<sup>4</sup>.

Figura 3: Foto de *Klebsiella pneumoniae*.



Generalmente dos especies del género *Klebsiella* se asocian a enfermedades en humanos: *K pneumoniae* y *K oxytoca*. La mayoría de cepas de *klebsiella* fermentan la lactosa (excepto *K ozaenae* y *K rhinoscleromatis*, subespecies de *K pneumoniae*) y crecen formando colonias muy mucosas debido a la producción de una cápsula de polisacárido muy abundante. Son inmóviles.

*K pneumoniae* puede causar ITU y neumonía en personas sanas aunque casi todas las infecciones que produce son nosocomiales o bien ocurren en personas debilitadas por enfermedades subyacentes. Entre las infecciones nosocomiales causadas por *K*

*pneumoniae* tenemos: ITU, neumonía, infección de heridas, infección de dispositivos intravasculares y otros dispositivos invasivos, vías biliares, peritonitis y meningitis.

Es la segunda causante, tras *E coli*, de bacteriemia por Gram negativas y bacteriemia que resulta de ITU.

*K pneumoniae* es el 7º agente más común causante de infecciones nosocomiales, ITU, infecciones del torrente sanguíneo, cardiovasculares, oído, nariz y garganta. Es el cuarto causante de neumonía hospitalaria.

Aunque sea un agente menos prevalente que otros, causa infecciones muy significativas. Así, siendo aislada 3 veces menos que *E coli* en heridas quirúrgicas, la probabilidad de causar infección de la herida es mayor (68% *K pneumoniae* y 31% *E coli*). Pese a la probabilidad 4 a 5 veces menor que la de los microorganismos Gram positivos de causar sepsis, es 2 veces más probable que cause mortalidad.

*K pneumoniae* es una causa frecuente de ITU (hasta el 7% de ITU en Europa y el 12% en USA).

Los portadores la llevan en nasofaringe e intestino. Las heces son probablemente la fuente fundamental de las infecciones en los pacientes. Aproximadamente 1/3 de los pacientes son portadores de *K pneumoniae* en heces, pero esta tasa puede incrementarse hasta 3 veces durante la hospitalización o con el uso de antimicrobianos en adultos. En niños la tasa de portadores puede ser del 90-100% incluso sin tratamiento antimicrobiano previo<sup>4</sup>.

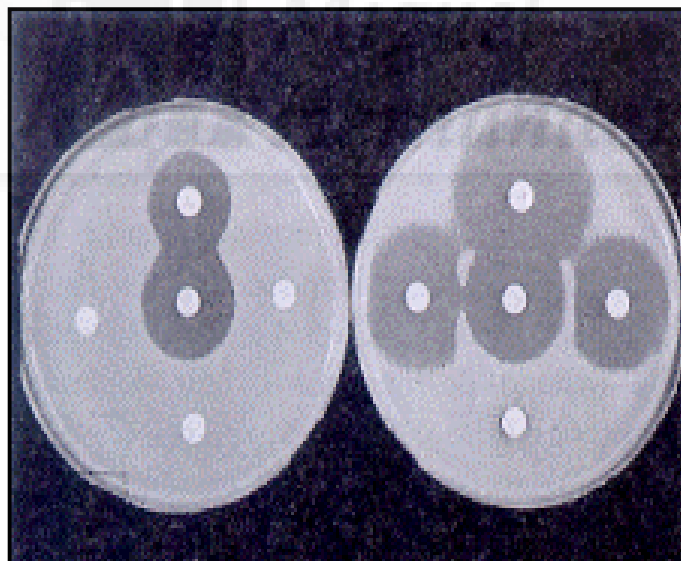


## 1.4.- Betalactamasas de espectro extendido

### 1.4.1.- Definición y clasificación de betalactamasas de espectro extendido.

No hay un consenso definitivo sobre la definición de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). La más comúnmente aceptada es: BLEE son  $\beta$ -lactamasas que confieren resistencia a las penicilinas, a las cefalosporinas incluidas las de amplio espectro y al aztreonam, pero no a las cefamicinas ni a los carbapenemes. Son inhibidas por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico<sup>5,6</sup>.

Figura 4: Método de detección de BLEE mediante difusión en agar.



Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican según 2 esquemas generales: **la clasificación molecular de Ambler** que las clasifica en 4 clases mayores de la A a la D y está basada

en características de similitud de aminoácidos. Así tenemos serin β-lactamasas clases A, C y D y metalo β-lactamasas clase B. Y la **clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros** considerando similitud funcional de substratos y perfil inhibitor. Hay 4 grupos principales y múltiples subgrupos<sup>5</sup>. Actualmente el número de BLEES caracterizadas supera las 200 (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

En la siguiente tabla (tabla 2) podemos ver una clasificación más actualizada de las betalactamasas.

Tabla 2: Clasificación de betalactamasas (modificado de 7):

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB <sup>a</sup>	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99 ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI <sup>b</sup>	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxymino-β-lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxymino-β-lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, ceftipime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxymino-β-lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftipime	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxymino-β-lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxymino-β-lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfb-1
NI	4	Unknown					

<sup>a</sup>CA: ácido clavulánico, TZB: tazobactam; NI: no incluido

El término BLEE hace referencia a  $\beta$ -lactamasas del grupo 2be de Bush-Jacoby-Medeiros y también al grupo 2de que comparte muchas características comunes con 2be. Las BLEE del grupo 2be derivan del grupo de  $\beta$ -lactamasas 2b (TEM-1, TEM-2 y SHV-1): hidrolizan penicilina y ampicilina y en menor medida carbenicilina o cefalotina. TEM-1 es la  $\beta$ -lactamasa plasmídica más común en bacilos entéricos Gram negativos resistentes a ampicilina (por ejemplo *E coli*). La mayoría de *K pneumoniae* producen SHV-1. TEM-2 es menos común pero presenta las mismas propiedades.

Con la excepción de las BLEE tipo OXA (clase D de Ambler), las BLEE pertenecen a la clase molecular A de Ambler<sup>5,6</sup>.

#### 1.4.2- Diversidad de tipos de BLEE<sup>5,6</sup>.

- 1) Tipo SHV: son las más frecuentemente halladas en aislados clínicos. La primera BLEE descrita se diferenciaba en un solo aminoácido de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 (recambio de glicina por serina en la posición 238) y se la designó SHV-2. Posteriormente se han encontrado microorganismos portadores de SHV-2 en todos los países. La presión ejercida por las cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación fue la responsable de su aparición. Se han detectado en *Enterobacteriaceae* y brotes de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp* productoras de SHV.
- 2) Tipo TEM: derivadas de TEM-1 y 2. Se han descrito unas 100  $\beta$ -lactamasas derivadas de TEM, la mayoría son BLEE. Algunas son menos susceptibles a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y tienen una actividad insignificante frente a cefalosporinas de amplio espectro. Otros mutantes de  $\beta$ -lactamasas tipo TEM

mantiene su capacidad de hidrolizar cefalosporinas de 3ª generación y son también resistentes a los inhibidores.

- 3) CTX-M y Toho betalactamasas: son  $\beta$ -lactamasas con una actividad más potente frente a cefotaxima que a ceftazidima y están estructuralmente relacionadas. Durante años las  $\beta$ -lactamasas CTX-M se encontraban fundamentalmente en Sudamérica, países orientales y Europa del Este. Recientemente se han descrito también en Europa Occidental y Norteamérica. Probablemente las BLEE CTX-M sean actualmente las más frecuentes. No se ha estudiado la relación entre consumo de antibióticos y aparición de CTX-M.
- 4) OXA-BLEE (2de): hidrolizan cloxacilina y cefalosporinas de amplio espectro. Se han descrito principalmente en *Pseudomonas aeruginosa* pero se han detectado en muchas otras bacterias Gram negativas (*E coli*).
- 5) PER: comparte sólo alrededor de un 25-27% de homología con  $\beta$ -lactamasas tipo TEM y SHV.
- 6) VEB-1 BES-1 y otras BLEE: existen otras muchas  $\beta$ -lactamasas mediadas por plásmidos o asociadas a integrones descritas recientemente. Son  $\beta$ -lactamasas no TEM ni SHV y se han encontrado en numerosas localizaciones geográficas.

Tabla 3: Familias de betalactamasas de importancia clínica (modificado de 7)

Enzyme family <sup>a</sup>	Functional group or subgroup	No. of enzymes <sup>b,c</sup>	Representative enzymes
CMY	1, 1c	50	CMY-1 to CMY-50
TEM	2b, 2bc, 2br, 2ber	172	
	2b	12	TEM-1, TEM-2, TEM-13
	2bc	79	TEM-3, TEM-10, TEM-26
	2br	36	TEM-30 (IRT-2), TEM-31 (IRT-1), TEM-163
	2ber	9	TEM-50 (CMT-1), TEM-158 (CMT-9)
SHV	2b, 2bc, 2br	127	
	2b	30	SHV-1, SHV-11, SHV-89
	2bc	37	SHV-2, SHV-3, SHV-115
	2br	5	SHV-10, SHV-72
CTX-M	2bc	90	CTX-M-1, CTX-M-44 (Toho-1) to CTX-M-92
PER	2bc	5	PER-1 to PER-5
VEB	2bc	7	VEB-1 to VEB-7
GES	2f	15 <sup>d</sup>	GES-2 to GES-7 (IBC-1) to GES-15
KPC	2f	9	KPC-2 to KPC-10
SME	2f	3	SME-1, SME-2, SME-3
OXA	2d, 2dc, 2df	158	
	2d	5	OXA-1, OXA-2, OXA-10
	2dc	9	OXA-11, OXA-14, OXA-15
	2df	48 <sup>e</sup>	OXA-23 (ARI-1), OXA-51, OXA-58
IMP	3a	26	IMP-1 to IMP-26
VIM	3a	23	VIM-1 to VIM-23
IND	3a	8	IND-1, IND-2, IND-2a, IND-3 to IND-7

<sup>a</sup>Familias de enzimas según estructura primaria de aminoácidos.

<sup>b</sup>Recopilado hasta diciembre de 2009.

<sup>c</sup>La suma de los subgrupos en cada familia no siempre es igual al número total de enzimas en cada familia.

<sup>d</sup>GES-1, a diferencia de otros miembros de la familia GES, tiene poca interacción detectable con imipenem.

### 1.4.3.- Epidemiología de las BLEE.

Los microorganismos productores de BLEE se detectaron por primera vez en Alemania (*K pneumoniae*, 1983). Posteriormente, la mayoría de informes aparecidos en la primera década tras este descubrimiento se hicieron en Francia. En los años 90 el número de cepas de *K pneumoniae* productoras de BLEE fue en aumento. Posteriormente se ha visto una reducción en la incidencia de cepas de *K pneumoniae*

productoras de BLEE en algunas zonas de Europa occidental mientras que se ha visto un incremento en zonas de Europa del Este. Hay una considerable diferencia geográfica en la aparición de BLEE entre los distintos países europeos (por ejemplo prevalencia de BLEE en *K pneumoniae* en UCI va desde el 3% en Suecia al 34% en Portugal)<sup>5,6</sup>.

En el resto de países (USA, América del Sur y Central, África y Oriente Medio, Australia y Asia) y desde su descripción en 1983 en Alemania, han ido surgiendo en todos los continentes cepas de *K pneumoniae* y *K spp* productoras de BLEE tipo TEM y SHV y otros tipos no TEM, no SHV, tipo CTX-M. Se han descrito también estas enzimas en microorganismos distintos de *K pneumoniae* como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella enterica*.

La mayoría de estudios que describen infecciones por microorganismos productores de BLEE hacen referencia a *K pneumoniae*.

Muchas BLEE están codificadas en grandes plásmidos. Dada su presencia en estos plásmidos la diseminación clonal y diseminación a otras cepas es factible.

Las UCI son a menudo el epicentro de producción de BLEE en los hospitales. Se ha descrito también la introducción de BLEE en UCI desde otros servicios del hospital y viceversa. Numerosos servicios se han visto afectados por brotes de BLEE (Neurocirugía, Unidad de quemados, Nefrología, Ginecología y Obstetricia, Hematología, Oncología e instalaciones de crónicos y geriátricos)<sup>5,6</sup>.

En nuestro medio se ha visto que el porcentaje de cepas de *E coli* productoras de BLEE es elevado y que muestra una clara tendencia al incremento. Este aumento también es notable para las cepas procedentes del ámbito extrahospitalario<sup>8</sup>.

#### **1.4.4- Factores de riesgo para la colonización e infección.**

Según numerosos estudios, estos factores de riesgo son: pacientes muy graves con estancias prolongadas en el hospital y con dispositivos invasivos (catéteres urinarios, tubos endotraqueales, cateterismo venoso central) durante un largo período de tiempo.

Otros factores de riesgo menos universales según los estudios son: presencia de sondas nasogástricas, gastrostomías o yeyunostomías, catéteres arteriales, nutrición parenteral, cirugía reciente, hemodiálisis, úlceras de decúbito y status nutricional deficiente.

El uso de antibióticos es también otro factor de riesgo para la adquisición de un microorganismo productor de BLEE (cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación, ceftazidima, cefalosporinas más aztreonam). Otros antibióticos descritos como asociados a infecciones por microorganismos productores de BLEE son quinolonas, trimetropinsulfametoxazol, aminoglucósidos y metronidazol<sup>5,6</sup>.

#### **1.4.5- Infecciones adquiridas en la comunidad:**

En los últimos años se han publicado una gran variedad de informes sobre infecciones adquiridas en la comunidad con microorganismos productores de BLEE (*Salmonella*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*). Algunos autores han estudiado los factores de riesgo para infecciones por *Escherichia coli* productor de BLEE en pacientes no hospitalizados: diabetes mellitus, uso previo de quinolonas, ITU recurrentes, ingresos hospitalarios previos y pacientes ancianos fueron factores independientes de riesgo<sup>5,6</sup>.

## 1.5. Fluoroquinolonas

Las quinolonas son antibióticos sintéticos análogos del ácido nalidíxico, el primer agente antibacteriano desarrollado de esta familia. Se emplean habitualmente y en general para el tratamiento de infecciones por *E coli* tanto en humanos como en animales.

Se consideran una clase relativamente nueva de antimicrobianos de amplio y potente espectro de acción. Dado su amplio espectro y excelente actividad in vitro se pensó que en principio sería raro el desarrollar resistencias frente a estos antibióticos. Sin embargo el número de resistencias ha ido aumentando desde su introducción en la década de los 80-90 hasta ahora<sup>9,10,11,12</sup>.

### 1.5.1- Mecanismo de acción.

La enzima DNA girasa es una topoisomerasa de tipo II que cataliza el superenrollamiento negativo del DNA procariótico, utilizando la energía liberada por la hidrólisis del ATP. Así pues, la DNA girasa introduce superenrollamientos en la doble hélice dando lugar a la estructura tridimensional altamente condensada del DNA.

La función de la topoisomerasa IV es poco conocida aunque se sabe que, a diferencia de la DNA girasa, es una enzima incapaz de catalizar el superenrollamiento del DNA pero sí es capaz de controlar su relajación. Ambas enzimas presentan una gran homología en las secuencias y son estructuralmente muy parecidas<sup>9,10,12</sup>.

Tanto la DNA girasa como la topoisomerasa IV son proteínas tetraméricas constituidas por dos subunidades. La DNA girasa está constituida por las subunidades GyrA y GyrB y la topoisomerasa IV por las subunidades ParC y ParE<sup>9,10,12</sup>. La proteína



ParC es homóloga a la proteína GyrA, mientras que la subunidad ParE es homóloga a la subunidad GyrB.

Estas enzimas, dependiendo del tipo de bacteria, representan la diana principal o secundaria de la acción antimicrobiana de las quinolonas. La DNA girasa es la diana principal de las fluoroquinolonas en las bacterias Gram negativas, mientras que la topoisomerasa IV parece ser la diana principal de muchas fluoroquinolonas en las bacterias Gram positivas, como *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*<sup>10,12</sup>.

El principal mecanismo de acción de las quinolonas es la inhibición de las enzimas DNA girasa y topoisomerasa IV. Interfieren en el metabolismo bacteriano del DNA ya que estas enzimas (DNA girasa y topoisomerasa IV) controlan y modifican la topología del DNA en las células.

El mecanismo de acción de las fluoroquinolonas es bastante complejo. La inhibición ocurre por la interacción del antibiótico con el complejo formado por el DNA y la DNA girasa o Topoisomerasa IV. Al unirse las fluoroquinolonas a las subunidades de la DNA girasa aparecen extremos libres de DNA sobre los que actuarán exonucleasas produciendo la muerte celular<sup>10,13</sup>. El mecanismo último de acción bactericida no se conoce bien.

La diana principal de las quinolonas depende del compuesto considerado, y puede diferir entre Gram positivas y Gram negativas. En Gram positivas la diana primaria es, en muchos casos, la Topoisomerasa IV, mientras que en los Gram negativos es la DNA girasa. Las fluoroquinolonas desarrolladas más recientemente, como moxifloxacino y clinafloxacino, presentan una afinidad similar por ambas dianas<sup>13</sup>.

### 1.5.2- Clasificación y espectro antimicrobiano.

Por analogía con otras familias de antibióticos, puede establecerse un criterio de clasificación de las quinolonas por generaciones (tabla 4).

En comparación con el ácido nalidíxico, las nuevas fluoroquinolonas han mejorado las propiedades farmacocinéticas, incluyendo una mayor absorción oral, un incremento de la concentración máxima en el suero, concentraciones mayores en los tejidos y tiempos más largos de vida media<sup>14</sup>.

Tabla 4: Clasificación de las principales quinolonas y espectro antimicrobiano correspondiente.

Clasificación	Agentes	Espectro antimicrobiano	Indicaciones
<b>Primera generación</b>	Acido nalidíxico Acido pipemídico Cinoxacina	Bacterias Gram negativas (a excepción de <i>Pseudomonas spp</i> )	ITU no complicadas
<b>Segunda generación</b>	Norfloxacin Lomefloxacin Enoxacina Ofloxacin	Bacterias Gram negativas (incluyendo <i>Pseudomonas spp</i> ) Algunas bacterias Gram positivas y algunos patógenos intracelulares. Poca actividad frente a <i>Sta. aureus</i> y <i>S. pneumoniae</i>	ITU complicadas y no complicadas. Pielonefritis, ETS, infecciones de tejidos suaves y piel.
<b>Tercera generación</b>	Ciprofloxacina Levofloxacina Pefloxacino Esparfloxacina Gatifloxacina	Como la 2ª generación, pero mayor actividad frente a Gram positivos (neumococos sensibles y resistentes a penicilina) y mayor actividad frente a patógenos intracelulares	Exacerbaciones agudas de bronquitis crónica, neumonía adquirida en la comunidad
<b>Cuarta generación</b>	Moxifloxacina Trovafloracina	Mismo espectro de actividad que los de 3ª generación. Anaerobios.	Igual a los de 1ª, 2ª y 3ª generación (sin incluir ITU complicadas y pielonefritis). Infecciones abdominales, pélvicas y neumonía nosocomial.

## **1.6.- Resistencias en *Enterobacteriaceae*: *E coli* y *K pneumoniae*.**

### **1.6.1.- Resistencia a betalactámicos por BLEE.**

En el año 2003 el 20,6% de todos los aislados de *K pneumoniae* de pacientes ingresados en UCI en USA eran no susceptibles a cefalosporinas de 3ª generación<sup>15,16</sup>. También se observó esto en el 5,8% de *E coli* aislados de pacientes en UCI. Esto suponía un aumento del 47% comparando con las tasas de resistencia del año 1998 al 2002 para *K pneumoniae* y similares para *E coli*. Otros estudios internacionales informan sobre tasas superiores de resistencia en *K pneumoniae* en hospitales y principalmente en UCI<sup>17</sup>.

La resistencia a cefalosporinas de 3ª generación en *Enterobacteriaceae* está causada típicamente por la producción de betalactamasas. Los genes que codifican las BLEE se hayan con frecuencia en plásmidos que contienen también genes que codifican resistencias a aminoglucósidos y sulfonamidas. Además muchas especies de *Enterobacteriaceae* tienen mutaciones que confieren resistencias de alto nivel a quinolonas. Esto quiere decir que las *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE en hospitales y UCI son normalmente resistentes a múltiples antibióticos.

Las *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE son más prevalentes en los hospitales pero están apareciendo y diseminándose también en la comunidad y hay datos que nos hablan de la elevada prevalencia de infecciones asociadas con especies productoras de BLEE en la comunidad<sup>18,19</sup>. El cuadro típico de infección adquirida en la comunidad producida por BLEE es la ITU (a veces asociada con bacteriemia) debida a *E coli* productora de CTX-M en mujeres ancianas. Estos aislados suelen ser resistentes a

los agentes empleados habitualmente en las ITU (ciprofloxacino, trimetopinsulfametoxazol, gentamicina).

Los factores de riesgo para la adquisición de estas infecciones fueron diabetes mellitus, tratamiento previo con quinolonas, ITU recurrentes, ingreso hospitalario previo y edad avanzada en pacientes varones<sup>20</sup>. En otro estudio señalan la hospitalización en los 3 meses previos, tratamiento antibiótico en los 3 meses previos, edad mayor de 60 años, varón, infección por *K pneumoniae*, uso previo de cefalosporinas de 3ª generación, de 2ª generación, de quinolonas y penicilina<sup>21</sup>.

#### **1.6.2.- Resistencia a quinolonas.**

Las quinolonas son antibióticos ampliamente usados en el tratamiento de ITU por *E coli* y también pueden usarse en otras infecciones causadas por miembros de la familia de *Enterobacteriaceae*<sup>15</sup>. Los porcentajes de resistencia a quinolonas en *E coli* fueron 7,3% en UCI, 8,2% en servicios distintos de UCI y una media de 3,6% de pacientes no ingresados<sup>16</sup>.

El tratamiento previo con quinolonas es un factor de riesgo independiente para adquirir resistencias a quinolonas<sup>22,23</sup>.

Los mecanismos de resistencia a las quinolonas descritos son:

- alteraciones por mutaciones en la diana del antibiótico en la región QRDR (quinolone resistance-determining region)
- disminución del antibiótico dentro de la bacteria, bien por cambios en la permeabilidad de la membrana y en la expresión de porinas o bien por cambios en los mecanismos de expulsión activa<sup>9,10</sup>.

- resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR): son plásmidos que codifican una familia de pentapéptidos que interfieren en el mecanismo de acción de las quinolonas en la DNA girasa y en la Topoisomerasa IV, produciendo resistencias de bajo nivel<sup>24</sup>.

Estos mecanismos pueden presentarse solos o en combinación, pero se ha visto que las mutaciones en *gyr A* son el mecanismo más frecuente e importante en las bacterias Gram negativas<sup>25,26,27</sup>.

Las modificaciones en la diana están generalmente localizadas en dominios específicos de cada subunidad GyrA, GyrB, ParC y ParE. Estos cambios provienen de mutaciones espontáneas en los genes que codifican estas subunidades (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*) y que pueden existir en escaso número en grandes poblaciones bacterianas. En las subunidades GyrA y ParC, los cambios en los aminoácidos están generalmente localizados en la región amino terminal que contiene el lugar activo, el lugar donde se une al DNA. En las subunidades GyrB y ParE las mutaciones son menos comunes y suelen estar localizadas en la porción media de la subunidad, en el dominio implicado en interacciones con las subunidades complementarias (GyrA y ParC respectivamente)<sup>9,10</sup>.

El desarrollo de resistencias a las fluoroquinolonas es un proceso gradual que resulta de la acumulación de sustituciones aminoacídicas en estas subunidades. Generalmente cuantas más sustituciones mayores CMI. La mayoría de las mutaciones se concentran en la región QRDR (quinolone resistance-determining region).

En las bacterias Gram negativas, la DNA girasa suele ser la diana para las fluoroquinolonas (Topoisomerasa IV en las Gram positivas). Mutaciones en *gyrA*

aparecen en aislados con bajo nivel de resistencia, mientras que las CMI más elevadas se asocian con mutaciones adicionales principalmente en *parC*, pero también en *gyrB* y *parE*. Otros mecanismos que afecten a las bombas de expulsión activa pueden incrementar esta resistencia.

Este patrón de adquisición progresiva de resistencias por mutaciones, implica que la potencia de la fluoroquinolona frente a la diana principal y la secundaria afectará a la probabilidad de seleccionar los primeros mutantes resistentes. Por lo tanto las fluoroquinolonas con un alto índice terapéutico es poco probable que seleccionen primeros mutantes.

Las fluoroquinolonas son moléculas pequeñas y atraviesan la membrana externa a través de las porinas que forman canales de difusión. También atraviesan la membrana citoplasmática por difusión<sup>12</sup>. La pérdida de permeabilidad de membrana por mutaciones en genes estructurales o reguladores de las porinas (en *E coli* genes *ompC* y *ompF*, en *K pneumoniae* genes *ompK35* y *ompK36*) es otra de las formas de resistencia, pero no justifica *per se* la aparición de resistencias frente a quinolonas<sup>28</sup>. La resistencia causada por disminución de la fluoroquinolona en la bacteria, requiere la presencia incrementada de sistemas de expulsión activa de la fluoroquinolona desde el citoplasma<sup>9</sup>. En la mayoría de los casos esta sobreexpresión de bombas de expulsión ocurre por mutaciones cromosómicas.

En *E coli* el sistema AcrAB es probablemente el sistema de expulsión activa más importante<sup>29</sup>. Este sistema tiene un amplio rango de sustratos incluyendo quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, ampicilina, rifampicina, disolventes orgánicos, colorantes, desinfectantes y detergentes. La des-represión de este gen *acrAB* no produce resistencias de alto nivel, pero conduce a un bajo nivel de resistencias a diferentes

grupos de antibióticos no relacionados estructuralmente, conduce a la multirresistencia, la CMI de la mayoría de antibióticos aumenta entre 2 y 4 veces<sup>9</sup>.

Como ya hemos señalado los principales mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas identificados son: mutaciones cromosómicas que causan reducción en la afinidad de las fluoroquinolonas por la DNA girasa y la Topoisomerasa IV y sobreexpresión de bombas endógenas de multirresistencia<sup>9,10,13</sup>.

Se ha descrito también un mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas mediado por plásmidos en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* transferible a *Escherichia coli* en el laboratorio<sup>24,30</sup>.

En 1998 se publicó por primera vez la existencia de una cepa clínica de *Klebsiella pneumoniae* aislada en un cultivo de orina que contenía un plásmido cuyos transconjugantes en *Escherichia coli* incrementaban la resistencia a ácido nalidíxico y a ciprofloxacino<sup>30</sup>. Este plásmido, denominado pMG252, aumenta de 4 a 8 veces la resistencia debida a mutaciones definidas en la DNA girasa, porinas o bombas de expulsión activa<sup>31</sup> y facilita la selección de mutantes resistentes a quinolonas, por mecanismos que aún no se conocen. El gen asociado con resistencia a quinolonas se ha designado como *qnr*. La resistencia a quinolonas asociada con plásmidos que contengan *qnr* ha aparecido en *E coli* y *K pneumoniae*<sup>32,33,34</sup>.

Se ha observado que la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, aunque es de bajo nivel, también facilita la selección de resistencia de alto nivel a quinolonas<sup>30</sup>. Así, cuando *qnr* se expresa en una cepa deficiente en porinas, las CMI para ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino aumentan de 8 a 32 veces. Existe un efecto aditivo de los distintos mecanismos de resistencia a quinolonas con la presencia de *qnr*<sup>13,31</sup>.

El gen *qnr* se encuentra, en las cepas en las que se ha descrito, en plásmidos transmisibles por conjugación. Estudios realizados con el plásmido en el que se describió por primera vez, pMG252, revelan que *qnr* se encuentra en un plásmido con amplio rango de hospedador transmisible por conjugación a especies como *K pneumoniae*, *E coli*, *C freundii*, *S typhimurium* o *P aeruginosa*<sup>30</sup>. Muchos genes de resistencia, como los que codifican betalactamasas plasmídicas, se encuentran localizados dentro de elementos móviles de este tipo, y también dentro de transposones, lo cual, como se sabe, potencia su diseminación<sup>13</sup>.

La diseminación horizontal de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas abre la posibilidad de una rápida expansión de la resistencia a estos antimicrobianos, tanto en patógenos animales como en seres humanos, más aún con el extenso uso que se hace de las mismas.

### **1.6.3.- Resistencia a betalactámicos y a quinolonas: Multiresistencias.**

Se ha informado en diversas publicaciones que cepas de *K pneumoniae* productoras de BLEE fueron resistentes a quinolonas y viceversa en porcentajes no desdeñables (18% y 60% respectivamente). Es importante señalar que existe una relación estadísticamente significativa entre la resistencia a quinolonas y betalactámicos<sup>23</sup>, y sea circunstancial o no, pMG252 contiene la betalactamasa de espectro ampliado FOX-5<sup>35</sup>. Así, se abre una vía de corresponsión a dos familias muy importantes de antimicrobianos, sobre todo en cepas con algún mecanismo de resistencia a quinolonas como la pérdida de porinas, donde la presencia de *qnr* facilita alcanzar altos niveles de resistencia.



La resistencia a cefalosporinas de 3ª generación en *Enterobacteriaceae* está causada típicamente por la producción de betalactamasas de espectro ampliado. Los genes que codifican las BLEE se hayan con frecuencia en plásmidos que contienen también genes que codifican resistencias a otros antibióticos. Además muchas especies de *Enterobacteriaceae* tienen mutaciones que confieren resistencias de alto nivel a quinolonas. Esto quiere decir que las *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE en hospitales y UCI son normalmente resistentes a múltiples antibióticos.

Como factores de riesgo, entre otros, para la adquisición de microorganismos productores de BLEE se han señalado el uso previo de cefalosporinas de 3ª generación y quinolonas.

Por otra parte los porcentajes de resistencia a quinolonas en *E coli* fueron 7,3% en UCI, 8,2% en servicios distintos de UCI y una media de 3,6% de pacientes no ingresados<sup>16</sup>. Estos porcentajes aumentan en cepas de *K pneumoniae* y *E coli* productores de BLEE<sup>22,36</sup>.

Las quinolonas no suelen ser antibióticos adecuados para infecciones serias causadas por *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE ya que con frecuencia estas son resistentes también a estos antibióticos. Además la multiresistencia entre *K pneumoniae* y *E coli* productoras de BLEE está aumentando<sup>15,22,37,38</sup>.

La resistencia a quinolonas asociada con plásmidos que contengan *qnr* ha aparecido en *E coli* y *K pneumoniae*<sup>32,33,34</sup>. La identificación de *qnr* en cepas clínicas de *K pneumoniae* productoras de betalactamasas plasmídicas aisladas en Estados Unidos, y su hallazgo en cepas de *E coli* procedentes del sudeste asiático indican la emergencia de este nuevo mecanismo de resistencia a quinolonas en aislados clínicos. Además, la

posibilidad de su diseminación a otros géneros de bacterias Gram negativas podría agravar el problema.

Como resumen, en cuanto a resistencias se refiere, podemos señalar los hechos siguientes: se ha incrementado el número de aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas tanto en el ambiente hospitalario como en infecciones en la comunidad<sup>8,39,40</sup>. Se ha descrito también un incremento en el número de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a quinolonas así como también la asociación entre la presencia de BLEE y la resistencia a quinolonas<sup>20,21,41,42,43,44</sup>. Se han comunicado como factores de riesgo para la adquisición de microorganismos productores de BLEE el uso previo de cefalosporinas de 3ª generación y quinolonas<sup>20,21,41,42,43,44</sup>. Se ha visto el tratamiento previo con quinolonas como un factor de riesgo independiente para adquirir resistencias a quinolonas. Se ha descrito la aparición de resistencia a quinolonas asociada con plásmidos en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Muchos genes de resistencia, como los que codifican betalactamasas plasmídicas, se encuentran localizados dentro de elementos móviles de este tipo y esto potencia su diseminación.

### **1.7.- Microarrays en Microbiología medica.**

Los microarrays se basan fundamentalmente en la complementariedad de las bases nitrogenadas que componen el DNA. Consisten en un soporte sólido sobre el que se fijan de una manera ordenada (“array”) una serie de sondas moleculares. El soporte puede ser una membrana de nitrocelulosa o de nylon. Las sondas pueden ser clones de

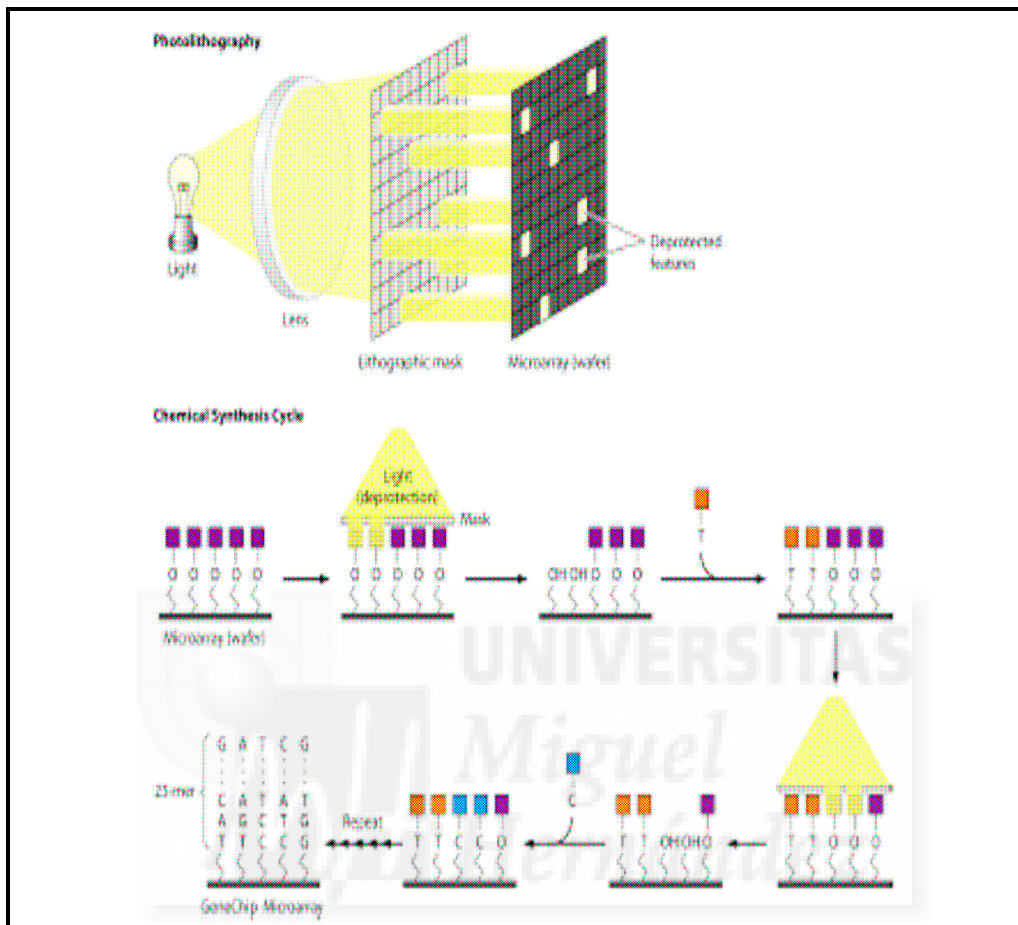
DNA, productos de la PCR, oligonucleótidos sintéticos, proteínas, tejidos... Hay diferentes tipos de array en función de: tipo de soporte, marcado de las muestras, tamaño del array, número/ densidad de sondas fijadas en el soporte etc<sup>45,46</sup>.

Como vemos existen muchos tipos de microarrays (de proteínas, de tejidos, de DNA, de expresión...). Dentro de los arrays de expresión tenemos los microarrays de oligonucleótidos, y dentro de éstos GeneChip® Affymetrix®<sup>47</sup>. Nosotros nos centraremos en GeneChip® Affymetrix® (Santa Clara, CA, USA).

En estos arrays, oligonucleótidos sintéticos de secuencias definidas interrogan (probe) al cRNA o al DNA proveniente de la muestra (target). Las secuencias definidas o probes se sintetizan directamente en un sustrato de vidrio (chip) según la tecnología VLSIPS® (very-large-scale immobilized polymer synthesis). Esta tecnología se ha desarrollado en el entorno de la microelectrónica y combina técnicas químicas de análisis en fase sólida con técnicas fotolitográficas adaptadas de la industria de los semiconductores. Cada sonda está especificada independientemente y se sintetizan directamente sobre el chip. Decenas de miles de sondas (50.000) pueden ser sintetizadas por centímetro cuadrado de sustrato de vidrio. Un conjunto de sondas se denomina array y se fabrica según una serie de pasos cíclicos<sup>45</sup>.

En definitiva, un microarray consiste en un soporte sólido en el que de manera ordenada se fijan elementos que funcionan como detectores moleculares en altas densidades.

Figura 5: Microarrays de GeneChip® Affymetrix®.



Entre las aplicaciones de la técnica de microarrays de DNA y de una manera más específica en Microbiología médica tenemos<sup>45,46</sup>:

- Investigación de la patogenia bacteriana, genes específicos de patogenicidad.
- Epidemiología molecular de ciertos microorganismos.
- Diagnóstico microbiológico.
- Estudio de mecanismos de acción y de resistencias a agentes antimicrobianos.

- Detección de genes específicos o regiones del genoma de un microorganismo (genotipificación).
- Detección de mutaciones puntuales en ciertos genes.
- Análisis de expresión de mRNA.





## **2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



En los últimos años se está incrementando el número de aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en nuestro medio, tanto en el ambiente hospitalario como en infecciones en la comunidad. Estas cepas tienen además una elevada corresponsabilidad a fluoroquinolonas y aún no se ha establecido claramente las causas asociadas a este fenómeno. Nuestro trabajo pretende el estudio de la resistencia a fluoroquinolonas en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y su relación con la presencia de betalactamasas de espectro extendido.

Por ello pretendemos estudiar la resistencia a fluoroquinolonas en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y su relación con la presencia de BLEE, planteándonos los siguientes objetivos:

1. Estudiar la evolución en la resistencia a fluoroquinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, tanto productoras como no productoras de betalactamasas de espectro extendido en el Área de Salud de Elche en un período de 17 años.
2. Determinar la relación existente entre la resistencia a fluoroquinolonas y la producción de betalactamasas de espectro extendido mediante la determinación de la concentración preventiva de mutantes.
3. Aportar datos que ayuden a explicar la relación entre la resistencia a fluoroquinolonas y la producción de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* mediante la caracterización genética de mutantes a fluoroquinolonas en diferentes modelos in vitro.



4. Estudiar mediante microarrays el genoma completo de *Escherichia coli* con objeto de aportar datos sobre la interacción entre la resistencia a fluoroquinolonas y la presencia de betalactamasas de espectro extendido.



# **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1.- Materiales utilizados en la realización de las técnicas.

#### 3.1.1.- Reactivos.

- ABI PRISM Big Dye Terminator v.3.1. Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem)
- ácido acetil salicílico (ASA) (Sigma)
- ácido bórico (Sigma)
- ácido clorhídrico (HCl) (Merck)
- Agarosa (GibcoBRL)
- Agarosa NuSieve (Instrumentos Científicos)
- Agua destilada estéril 10 ml (Meinsol)
- Agua destilada estéril 1.000ml (Braun)
- Agua destilada estéril 10 L (Baxter)
- Amplitaq Gold PCR Master Mix 2x 250 units/5 ml (Applied Biosystem)
- Antibióticos (polvo valorado): ciprofloxacino (Bayer), levofloxacino (Hoechst) y moxifloxacino (Bayer).
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Bromuro de etidio (EtBr) solución al 1% (AppliChem)
- Cepa control de calidad E. coli ATCC ® 25922
- Ciclohexano (Sigma)
- Cloruro de magnesio (ClMg<sub>2</sub>) (Ecogen)
- Columnas de purificación GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech)
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Amersham Pharmacia Biotech)
- EcoTaq (Taq polimerasa con su tampón 10x) (Ecogen)

- EDTA (Life Technologies)
- Enzimas de restricción: *HinfI* (Gibco-BRL) y *HaeII* (Amersham Pharmacia Biotech)
- Etanol absoluto (Panreac)
- E-test de ciprofloxacino (AB Biodisk®)
- E-test de levofloxacino (AB Biodisk®)
- E-test de moxifloxacino (AB Biodisk®)
- Exo SAP it (2000rnx) (Amersham)
- Fenil-Arginil- $\beta$ -naftilamida (FAN) (Sigma)
- Glicerina (Vorquímica, SL)
- Hi-Di Formamide, Genetic Analysis Grade (25 ml) (Applied Biosystem)
- Hidróxido sódico (Sigma)
- Medio de cultivo Columbia Blood Agar (Biomedics)
- Medio de cultivo McConkey (Biomedics)
- Medio de cultivo Mueller Hinton agar (Difco)
- Medio de cultivo Mueller Hinton caldo (Difco)
- Performer DTR Gel Filtration Cartridges (108c) (Pascual Furió)
- Peso molecular control: 50 y 100 pares de bases (Amersham Pharmacia Biotech)
- Suero fisiológico 0,9% de 10ml (Braun)
- TRIS (Bio-Rad)

### 3.1.2.- Material inventariable.

- Bandejas de plástico para transporte del gel, lavados y detección

- Baño de agua (Atom)
- Cámara fría 4°C (Sadfe)
- Centrífuga (Heraeus)
- Congelador -80°C (Revco)
- Equipo de electroforesis para cubeta pequeña y grande (gel de 15x20) (Ecogen)
- Espectrofotómetro Genephor (Pharmacia Biotech)
- Estufa de 37°C (Sadfe)
- Fuente de electroforesis (Pharmacia Biotech)
- Máscara para protección de la luz UV (US Safety)
- Microcentrífuga (Heraeus)
- Pipeta de 10µl (Eppendorf)
- Pipeta 100µl (Eppendorf)
- Pipeta 1000µl (Eppendorf)
- Replicador Steer
- Sistema automatizado Wider (Francisco Soria Melguizo S.A.)
- Termociclador Gene Amp PCR System 2.400 (Perkin Elmer)
- Trasiluminador TVC 312-A (Spectroline)

### **3.1.3.- Material fungible**

- Asas de siembra (Francisco Soria Melguizo SA)
- Escobillones (Biomedics)
- Filtros 0,22µm (Millipore)
- Guantes desechables (Palex)
- Papel parafilm (Durviz)

- Pipetas pasteur punta capilar (Bromatos)
- Placas Petri 100mm (Soria Genlab)
- Puntas de pipeta de 100µl (Francisco Soria Melguizo SA)
- Puntas de pipeta de 1000µl (Francisco Soria Melguizo SA)
- Puntas de pipeta con filtro de 10µl (Francisco Soria Melguizo SA)
- Puntas de pipeta con filtro de 100µl (Francisco Soria Melguizo SA)
- Puntas de pipeta con filtro de 1000µl (Francisco Soria Melguizo SA)
- Tubos cónicos plástico 10ml, 15ml y 20ml (Deltalab)
- Tubos de 1,5 y 2,0 ml con tapón de rosca (Sarstedt)
- Tubos de 0,2 µl para PCR (Molecular Bioproducts)
- Tubos Eppendorf (Francisco Soria Melguizo SA)

#### **3.1.4.- Medios de cultivo y soluciones.**

- Bromuro de etidio 500 µg/ml:

Disolver 50 mg de bromuro de etidio en 100 ml de agua destilada estéril. Almacenar a 4°C en un frasco protegido de la luz, durante no más de un año. El stock hay que diluirlo 1/1000 para obtener una concentración de trabajo de 0,5 µg/ml.

El bromuro de etidio es un agente mutágeno y tóxico por lo que su manipulación debe realizarse con precaución y su eliminación debe hacerse en recipientes especiales siguiendo las normas establecidas de manejo de sustancias tóxicas.

- Medio de congelación Tripticasa-soja-glicerol:

Para preparar 100 ml de medio, disolver 3g de medio Triptic Soy Broth (Difco) en 85ml de agua destilada y añadir 15ml de glicerol, calentar hasta su completa disolución y

autoclavar a 121°C durante 15 min. Alicuotar de forma estéril en tubos de congelación, esperar a que se enfríe y guardar en cámara fría hasta su utilización.

- Medio Mueller Hinton agar:

Disolver 38g de polvo en 1L de agua. Calentar hasta lograr su completa disolución, con agitación frecuente y autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

- Medio Mueller Hinton caldo:

Disolver 21g de polvo en 1L de agua. Calentar hasta su completa disolución, con agitación frecuente y autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

- Solución de hidróxido sódico (NaOH) 0,1M:

Disolver 0,4g de NaOH en 100ml de agua destilada estéril.

- Soluciones madre de antibiótico:

Disolver 100mg del antibiótico en 10ml de agua destilada estéril. Realizar este proceso: añadiendo poco a poco cantidades de agua, si no se disuelve añadir gota a gota NaOH 0,1M hasta su completa disolución y posteriormente completar con agua hasta los 10ml. Posteriormente filtrar la solución y mantenerla congelada en alícuotas. No se recomienda recongelar una alícuota descongelada.

- Tampón de carga de electroforesis:

Solución al 0,7% de azul de bromofenol y 10% de glicerol, disuelto en TE 1x.

- Tampón TBE 5X:
  - 89 mM de TRIS
  - 89 mM de ácido bórico
  - 2.5 mM de EDTA.

Disolver 53,9g de TRIS, 27,5g de ácido bórico y 4,65g de EDTA en aproximadamente 200 ó 300ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8,2 con HCl, y completar con agua hasta un litro, posteriormente autoclavar y almacenar a temperatura ambiente no más de un año.

- Tampón TBE 1X:

Añadir a un volumen de TBE 5X, 4 volúmenes de agua destilada estéril. Almacenar a temperatura ambiente no más de un año.

- Tampón TE 10X:
  - 100 mM Tris/HCl, pH 8
  - 10 mM EDTA

Disolver 606 g de TRIS en un litro de agua destilada estéril y ajustar con HCl 0,1M a pH 8. Seguidamente añadir 1,86 g de EDTA. Autoclavar. Almacenar a temperatura ambiente no más de 1 año.

- Tampón TE 1X:

Añadir a 1 volumen de TE 10x, 9 volúmenes de agua destilada estéril. Almacenar a temperatura ambiente no más de 1 año.



### **3.2.- Frecuencia de BLEE y de resistencia a ciprofloxacino en nuestro medio en cepas de *E coli* y *K pneumoniae*:**

Se analizaron las bases de datos del servicio de Microbiología del HGU de Elche correspondientes al período de 17 años estudiado (septiembre de 1992- agosto de 2008). Se determinaron las frecuencias de aparición de cepas BLEE y no BLEE así como las frecuencias de aparición de cepas resistentes a ciprofloxacino en las mismas. Los programas informáticos empleados fueron Microsoft® Office Access 2003 y Microsoft® Office Excel 2003.

Así mismo se estudia también la aplicación de diferentes criterios de eliminación de duplicados en la resistencia a ciprofloxacino y en la aparición de cepas productoras de BLEE. Se compara la aplicación de los siguientes criterios:

- criterio nº 1: estudio de todos los aislados en el periodo considerado de 17 años,
- criterio nº 2: se considera sólo el primer aislado por paciente según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>48</sup>.
- criterio nº 3: se considera el primer aislado por paciente y los aislados que presentan una diferencia temporal de más de 7 días respecto al primer aislado,
- criterio nº 4: se considera el primer aislado por paciente y los aislados que presentan una diferencia temporal de más de 14 días respecto al primer aislado,
- criterio nº 5: se considera el primer aislado por paciente y los aislados que presentan una diferencia temporal de más de 21 días respecto al primer aislado,
- criterio nº 6: se considera el primer aislado por paciente y los aislados que presentan una diferencia temporal de más de 30 días respecto al primer aislado,

- criterio n° 7: se considera el primer aislado por paciente y todos los demás aislados que muestren diferencias en la sensibilidad a un grupo seleccionado de antibióticos, recomendados por European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Los antibióticos seleccionados han sido: amoxicilina, amoxicilina/ clavulánico, ampicilina, ampicilina/ sulbatam, cefotaxima, imipenem, ciprofloxacino, gentamicina y trimetopin-sulfametoxazol<sup>49</sup>.

La sensibilidad a estos antibióticos se determinó mediante un sistema de microdilución (Soria Melguizo, Spain) y los resultados dudosos fueron confirmados mediante E-test.

### **3.3.- Determinación de la concentración preventiva de mutantes (CPM) resistentes a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de *E coli* productoras y no productoras de BLEE.**

#### **3.3.1.- Fundamento.**

Caracterizar las subpoblaciones más resistentes a los antibióticos, que se generan tras exposición repetida a distintas concentraciones de éstos, utilizando un elevado inóculo bacteriano ( $10^{10}$  ufc)<sup>50,51,52,53,54</sup>.

#### **3.3.2.- Técnica para la determinación de la concentración preventiva de mutantes resistentes a FQ.**

- Preparar placas con medio Mueller-Hinton agar con concentraciones de antibiótico (0,003 a 100 µg/ml).
- Antibióticos a ensayar: ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino.
- Preparación de las cepas:
  - Preparar tubos con 5ml de caldo Mueller-Hinton
  - Cultivar una colonia en tubos de Mueller-Hinton caldo.
  - Incubar durante 24 horas a 37°C.
  - Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 3.000 rpm.
  - Retirar el sobrenadante.
  - Resuspender el sedimento en 1ml de suero fisiológico, consiguiendo así un inóculo aproximado de  $10^{10}$  ufc (inóculo validado mediante cultivos cuantitativos previos)<sup>54</sup>.
- Inoculación de las placas: el sedimento resuspendido en suero fisiológico se siembra en las placas de Mueller-Hinton con antibiótico mediante replicador de Steer.
- Tras una incubación de 24 h a 37°C se procede a la lectura de las placas para determinar la concentración mínima de antibiótico que impide el crecimiento de las subpoblaciones más resistentes del microorganismo estudiado.

### 3.3.3.- Cepas de *Escherichia coli*.

Se ensayaron 99 cepas divididas en los siguientes grupos:

- 25 cepas sensibles a ciprofloxacino, no productoras de BLEE;
- 14 cepas resistentes a ciprofloxacino, no productoras de BLEE;
- 21 cepas sensibles a ciprofloxacino, productoras de BLEE;

- 39 cepas resistentes a ciprofloxacino, productoras de BLEE.

Todas las cepas estudiadas fueron aislados clínicos de muestras de sangre y orina obtenidas de pacientes del HGU de Elche.

Para la comparación de los datos obtenidos con los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de las fluoroquinolonas estudiadas, se subdividieron los grupos anteriores en:

- A: Cepas sensibles a quinolonas no BLEE
- B: Cepas resistentes a nalidíxico no BLEE
- C: Cepas resistentes a ciprofloxacino no BLEE
- D: Cepas sensibles a quinolonas y BLEE (cefotaximasas)
- E: Cepas resistentes a nalidíxico y BLEE (cefotaximasas)
- F: Cepas resistentes a ciprofloxacino y BLEE (cefotaximasas)
- G: Cepas sensibles a quinolonas y BLEE (resistentes in vitro a cefotaxima y ceftazidima)
- H: Cepas resistentes a nalidíxico y BLEE (resistentes in vitro a cefotaxima y ceftazidima)
- I: Cepas resistentes a ciprofloxacino y BLEE (resistentes in vitro a cefotaxima y ceftazidima)

#### **3.3.4.- Caracterización fenotípica de las BLEE.**

La presencia de BLEE se determinó mediante los sistemas de fenotipado recomendados por el CLSI<sup>55</sup>: E-test (cefotaxima/ cefotaxima+ácido clavulánico y ceftazidima/ ceftazidima+ácido clavulánico) (AB Biodisk. Solna. Suecia) y difusión en

agar (cefotaxima 30 µg, cefotaxima/ácido clavulánico 30/10 µg, ceftazidima 30 µg y ceftazidima/ácido clavulánico 30/10 µg) (Oxoid, Madrid, España)<sup>6</sup>.

### 3.3.5- Determinación de las CMI de las cepas.

La CMI se determinó mediante un sistema de microdilución (Wider. Soria Melguizo. Madrid. España). La sensibilidad a fluoroquinolonas fue posteriormente confirmada mediante la técnica de dilución en agar según las recomendaciones del CLSI<sup>55</sup>.

3.3.5.1.- Material empleado para la realización de la sensibilidad mediante dilución en agar.

- Placas de Mueller Hinton agar (Difco®).
- Criterios establecidos por el CLSI.
- Cepa control: *E. coli* ATCC®25922.
- Antibióticos ensayados con las cepas a estudio: ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino.
- Las concentraciones de los antibióticos ensayadas fueron de 64 mg/L a 0.003 mg/L.

3.3.5.2.- Procedimiento seguido en la realización de la sensibilidad mediante dilución en agar.

Tras preparar una suspensión 0,5 McFarland de cada una de las cepas a estudiar, se ajusta el inóculo con suero fisiológico. Esta suspensión bacteriana será la que se

inocule en cada una de las placas mediante un replicador múltiple (replicador de Steer). Incubar las placas a 37°C durante 24h, tras las cuales se efectuará la lectura.

### **3.3.6.- Test estadístico.**

Se empleó la U de Mann-Whitney para comprobar si las CMI y las CPM de los diferentes grupos pertenecían a la misma distribución rechazando la hipótesis nula de no diferencias con una  $p < 0.05$  (SPSS, Chicago, 2002).

## **3.4.- Generación de mutantes a fluoroquinolonas**

### **3.4.1.- Fundamento.**

Conocer la capacidad de aislados clínicos de *E coli* y *K pneumoniae*, inicialmente sensibles a fluoroquinolonas, para generar resistencias a estos antibióticos tras exposición repetida a concentraciones subinhibitorias de los mismos.

### **3.4.2.- Cepas originales.**

Se ensayaron dos cepas de *K pneumoniae* sensibles a fluoroquinolonas, una de ellas productora de BLEE (CTX-M-9), y dos cepas de *E coli* sensibles a fluoroquinolonas, una productora de BLEE (CTX-M-14). Las cuatro cepas provenían de infecciones urinarias de pacientes de nuestro medio (Departamento 20 de la Comunidad Valenciana). La identificación de las BLEE se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III.

Hasta el momento del estudio, las cepas se mantuvieron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en medio tripticasa soja-glicerol.

#### **3.4.3.- Antibióticos ensayados.**

- Ciprofloxacino (Bayer)
- Moxifloxacino (Bayer)
- Levofloxacino (Hoechst)

#### **3.4.4.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fluoroquinolonas ensayadas en cepas salvajes.**

La CMI se determinó mediante un sistema de microdilución (Wider. Soria Melguizo. Madrid. España). La sensibilidad a fluoroquinolonas fue posteriormente confirmada mediante la técnica de E-test.

#### **3.4.5.- Generación de mutantes.**

- Preparar tubos con 5 ml de MH líquido con las siguientes concentraciones de antibióticos: 0, 0.015, 0.125 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .
- Hacer una suspensión 0,5 McFarland de la cepa salvaje con suero fisiológico e inocular 500 $\mu\text{l}$  en tubos de MH líquido con los antibióticos e incubar 24h a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Posteriormente y cada día, durante 25 días, dar pases de 500  $\mu\text{l}$  a nuevos tubos de antibióticos con las mismas concentraciones.
- Los días 0, 5, 10, 15, 20 y 25, además de dar los pases, se siembran en placa de MH las cepas para estudiar su sensibilidad antibiótica. Si ésta está alterada, se

congela el mutante tras comprobar la estabilidad de la mutación con pases en medios sin antibióticos<sup>56,57</sup>.

### **3.4.6.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fluoroquinolonas ensayadas en los mutantes generados.**

La CMI se determinó mediante la técnica de E-test.

#### 3.4.6.1.- Materiales empleados.

- Placas de Mueller Hinton agar (Difco®).
- Cepa control: *E coli* ATCC® 25922.
- Antibióticos ensayados: Ciprofloxacino, moxifloxacino y levofloxacino (AB Biodisk®) (0,002-32 µg/ml).

#### 3.4.6.2.- Procedimiento para la realización del E-test.

- Emulsionar varias colonias bien aisladas procedentes de un cultivo fresco en suero fisiológico estéril. La suspensión de los microorganismos debe utilizarse antes de los 15 minutos posteriores a su preparación. Comparar la turbidez de la suspensión con el estándar 0,5 McFarland.
- Se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión del inóculo y se presiona contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido. Sembrar completa y uniformemente la superficie del agar (siembra en césped). Esperar a que el exceso de humedad sea absorbido y que la superficie del agar esté completamente seca.



- Aplicar las tiras de E-test sobre el agar con la escala de la CMI hacia arriba, y las siglas del antibiótico hacia el borde externo de la placa. Comprobar que toda la zona del gradiente antibiótico esté en contacto (sin burbujas) con la superficie del agar. No mover la tira una vez aplicada. Incubar a 37°C durante 24 horas.
- Tras esta incubación efectuar la lectura de la CMI en el punto de intersección de la elipse de inhibición con la tira (lectura realizada siguiendo las recomendaciones del fabricante).

#### **3.4.7.- Confirmación de la estabilidad de las mutaciones.**

Se dan 5 pases a medios sin antibiótico y después, se vuelve a determinar la CMI para confirmar la disminución de la sensibilidad. La CMI se determinó mediante E-test. Aquellos mutantes que duplicaron su CMI son los que posteriormente se utilizaron para determinar las posibles mutaciones que originaron estos incrementos en la CMI<sup>56,57</sup>.

#### **3.4.8.- Mantenimiento del mutante.**

Los mutantes se mantienen congelados en medio tripticasa-soja-glicerol a -70°C.

### **3.5.-Caracterización genotípica de los mutantes a quinolonas.**

#### **3.5.1.- Técnicas moleculares.**

##### **3.5.1.1.- Metodología y técnicas generales.**

3.5.1.1.1- Extracción de ADN por Chelex:

- Preparación del Chelex:
  - pesar 5 gramos y diluir en 50 ml de agua destilada estéril. Alicuotar 500  $\mu$ l.
- Extracción del ADN de las cepas de *E coli* y *K pneumoniae*:
  - mezclar la colonia y el Chelex
  - calentar 10 minutos a 94°C
  - congelar a -70°C durante 10 minutos
  - repetir el proceso dos veces más
  - centrifugar 5 minutos a 3000 rpm,
  - separar el sobrenadante y congelarlo

3.5.1.1.2.- Estimación de la cantidad de ADN extraído.

Se hace una estimación aproximada de la cantidad y de la pureza de ADN extraído mediante observación en gel de agarosa y medición con espectrofotómetro 260/280nm (Nanodrop, Fisher Scientific, USA).

3.5.1.1.2.1.- Tinción con bromuro de etidio (EtBr).

El EtBr es tóxico y mutágeno y hay que evitar ponerlo en contacto con la piel, si esto sucede hay que aclarar con agua abundante. Hay que trabajar con doble guante. También hay que tener en cuenta que se descompone por efecto de la luz, por ello hay que almacenarlo en la oscuridad.

La luz ultravioleta es peligrosa sobre todo para los ojos, hay que protegerse con unas gafas especiales.

Técnica:

- Preparar un gel de agarosa de 40 ml al 0,8% (40 ml de TBE 1x + 320 mg de agarosa).
- Calentar en el microondas aproximadamente 45 segundos, llevándolo a ebullición pero sin que hierva demasiado.
- Añadir 90-100  $\mu$ l de EtBr al gel cuando no esté demasiado caliente (65°C). Siempre se utiliza la misma proporción al teñir los geles: 90 $\mu$ l de EtBr por cada 40 ml de TBE 1x, que viene a ser una concentración final de 0,5  $\mu$ g/ml. La presencia de EtBr durante la electroforesis permite examinar la marcha de la misma tantas veces como sea necesario, pero hay que tener en cuenta que se intercala entre los pares de bases del ADN y por ello reduce la movilidad electroforética del mismo en un 15%.
- Verter con cuidado el gel en la cubeta previamente preparada, cuidando que no se formen burbujas que desvíen la trayectoria del ADN cuando migre y de que los pocillos estén bien hechos.
- Cuando el gel haya solidificado sumergirlo en la cubeta que deberá estar llena de la misma solución de TE 1X con la misma concentración de EtBr (aproximadamente 350 ml). El gel debe quedar sumergido por lo menos 2 mm para que corra bien el ADN.
- Cargar los pocillos con la mezcla de 1  $\mu$ l de ADN con 9  $\mu$ l de tampón de carga. Es conveniente poner un control de peso molecular (ladder) sobre todo en los primeros geles para controlar la tinción del gel.

- Aplicar un voltaje de 90V durante 30 minutos. El ADN tiene carga negativa por lo que hay que ponerlo cerca del polo negativo (negro) para que migre en dirección de la corriente eléctrica, hacia el polo positivo (rojo). Si al aplicar el voltaje vemos que se producen burbujas (electrolisis) de abajo a arriba de la cubeta es porque los electrodos están bien colocados.
- Visualizar en el transiluminador de luz UV, viendo que el ADN no esté degradado y cuantificándolo de forma semicuantitativa por comparación entre los ADNs que se estén mirando en el mismo gel. También se puede fotografiar para examinarlo más tarde.
- Resultado: banda ancha de alto peso molecular: ADN extraído sin degradación. Si se observa smear continuo o trozos de bajo peso molecular con pocos fragmentos de mayor peso se debe a la degradación del ADN por nucleasas.

#### 3.5.1.1.2.2.- Espectrofotómetro.

Se realiza utilizando un espectrofotómetro de 260/280nm; hay que señalar que la medida puede no ser completamente exacta ya que el ADN no se suele disolver bien y suele estar en forma de grumos más o menos grandes.

#### 3.5.1.1.3.- Desarrollo de las técnicas de PCR.

- Toda la reacción debe realizarse en frío.
- Preparar una Master Mix para las cepas a amplificar con los siguientes componentes, que se diferencian en los primeros en función del gen a amplificar (*gyrA* y *parC*):
  - Master Mix: 7.5  $\mu$ l

- Primer: 0.5  $\mu$ l
- Primer: 0,5  $\mu$ l
- Agua destilada 4,5  $\mu$ l
- DNA: 2  $\mu$ l
- Añadir la taq polimerasa y dar un pulso de centrifuga.
- Termociclador programa:
  - Un primer ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos
  - 40 ciclos de elongación a 94°C durante 15 segundos/59°C durante 20 segundos/72°C durante 1 minuto
  - Un periodo final de 72°C durante 10 minutos
- Una vez completado el programa del termociclador se puede continuar con el paso siguiente o congelar los tubos de reacción para seguir posteriormente.

#### 3.5.1.1.4.- Visualización de las reacciones de PCR.

El ADN amplificado se visualiza mediante geles de agarosa para confirmar que las muestras amplifican.

- Gel de agarosa:
  - Coger la bandeja de plástico y cerrarla con cinta minesota
  - Vaso de precipitados añadir 400 mg de gel de agarosa de electroforesis y 40  $\mu$ l de TBE 1x, calentar al baño maría hasta disolución, añadir 200  $\mu$ l de bromuro de etidio
  - Verter sobre la bandeja evitando burbujas y poner el peine
  - Enfriar 20 minutos

- En un parafilm añadir: 9 µl de azul (80 µl de agua y 20 µl de azul 5x) y 1 µl de peso molecular como control
- 5 µl de azul y 5 µl de ADN para cada muestra
- Colocar el gel en el aparato de electroforesis y añadir en el primer pocillo el control y en el resto las muestras
- Conectar los cables a la corriente 90 milivoltios y leer tras 15-20 minutos

#### 3.5.1.1.5.- Purificación de los productos de PCR.

Se realiza con el kit: GFXTMPCRDNA and Gel Band Purification Kit.

- Rotular el tubo y la columna de purificación con el número de cada cepa a purificar.
- Colocar cada columna dentro de su tubo correspondiente.
- Añadir 500µl de tampón de captura a la columna.
- Añadir todo el ADN amplificado.
- Centrifugar 30 segundos a 16.000g.
- Decantar el líquido del tubo y volver a poner la columna dentro del mismo.
- Añadir 500µl de tampón de lavado.
- Centrifugar 30 segundos a 16.000g.
- Pasar cada columna a un tubo nuevo, el cual recogerá el ADN purificado, y desechar los tubos utilizados hasta ahora.
- Añadir 50µl de agua directamente en la matriz de la columna.
- Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 minuto a 16.000g.
- Desechar la columna y congelar el ADN purificado.

3.5.1.1.6.- Visualización del ADN purificado.

Se realiza de la misma forma que en el apartado 3.5.1.1.4, pero en este caso con geles que contengan agarosa NuSieve, que nos permitan separar mejor las distintas bandas de ADN y así poder visualizarlas claramente.

3.5.1.1.7.- Medida de la concentración del ADN purificado.

Se realiza con un espectrofotómetro (explicado en el apartado 3.5.1.1.2.2).

3.5.1.2.- Metodología y técnicas específicas.

Cada cepa de interés se sembró en una placa columbia blood agar y después de 24h de crecimiento se aisló una colonia. Como método de extracción de DNA se empleó Chelex (Bio-Rad Laboratorios) (Punto 3.5.1.1.1).

Después de la extracción se llevó cada muestra de DNA a una concentración final de DNA de 50 ng/μl y a continuación se amplificó por PCR (GeneAmp system 9700, Applied Biosystems) (Punto 3.5.1.1.3).

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa (Puntos 3.5.1.1.4 y 3.5.1.1.6) y cuando se observó la existencia de la banda de DNA se procedió a su secuenciación.

La secuenciación de los fragmentos de DNA se realizó en Macrogen Sequencing Services (Korea), la muestra se preparó para el envío siguiendo las instrucciones de Macrogen.

3.5.1.2.1.- Secuenciación del gen *gyrA* de *E coli* mediante PCR.

Fundamento: permite detectar las mutaciones más frecuentes relacionadas con la resistencia a fluoroquinolonas. Los primers utilizados se han descrito previamente<sup>58</sup>, amplifican un fragmento de 981 pares de bases con una Tm de 59°C.

Forward: 5'- GAACTCACCTTCCAGATCCC -3'
Reverse: 5'- GAGCGCGGATATACACCTT -3'

3.5.1.2.2.- Secuenciación del gen *parC* de *E coli*:

Se utilizaron los primers descritos previamente<sup>58</sup>, amplifican un fragmento de 940 pares de bases con una Tm de 55°C.

Forward: 5'- AGCGCCTTGCGCTACATGAAT -3'
Reverse: 5'- GTGGTAGCGAAGAGGTGGTT -3'

3.5.1.2.3- Secuenciación del gen *gyrA* de *K pneumoniae*<sup>58</sup>:

Se diseñaron unos primers específicos en base a los datos obtenidos en la bibliografía, a partir de la estirpe *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 con el programa Primer-Blast (National Center for Biotechnology Information Gene Bank) para la amplificación y secuenciación de la región QRDR del gen *gyrA* de *Klebsiella pneumoniae* con una Tm de 59°C y que amplifican un fragmento de 362 pares de bases. Los primers utilizados fueron:



Forward: 5'-TGAAGCCGGTACACCGTCGC-3'
Reverse: 5'-GGTCGGCATGACGTCCGGAAT-3'

3.5.1.2.4- Secuenciación del gen *parC* de *K pneumoniae*<sup>58</sup>:

Para la amplificación y secuenciación del gen *parC* de *Klebsiella pneumoniae* con una Tm de 59°C y que amplifican un fragmento de 344 pares de bases se han utilizado los siguientes primers:

Forward: 5'-AACCGGTCCAGCGTCGCATC-3'
Reverse: 5'-CTCCTGCAGCGTGCCGTCAA-3'

3.5.1.2.5.- Análisis de las secuencias:

Las secuencias enviadas desde MacroGen fueron analizadas utilizando el programa GenBank y se compararon con secuencias de cepas sin mutación en los genes estudiados, detectando la presencia de mutaciones en los codones previamente descritos en la literatura científica. También se estudió la secuencia de aminoácidos de todo el fragmento amplificado para detectar la presencia de posibles mutaciones no descritas previamente. Todas las mutaciones se confirmaron mediante la secuenciación en las dos direcciones.

### **3.6.- Análisis de microarrays.**

#### **3.6.1.- Fundamento.**

Como hemos anotado en la introducción, en los microarrays cada una de las sondas se sintetiza y se une directamente sobre el chip. Decenas de miles de sondas (50.000) pueden ser sintetizadas por centímetro cuadrado de substrato de vidrio.

Al enfrentar el microarray con la muestra en estudio, las secuencias problema (target) hibridarán o no con las sondas del array (probe).

Se ha realizado un estudio comparativo entre distintas cepas de *E coli* mediante la técnica de microarrays (GeneChip® Affymetrix®). Con ello se pretende conocer la diferente expresión génica de cepas de *E coli* productoras y no productoras de BLEE al ser expuestas a antibióticos.

#### **3.6.2.- Cepas.**

Se analizaron 4 grupos de cepas de *Escherichia coli*:

- sensible a ciprofloxacino y no productora de BLEE
- sensible a ciprofloxacino y productora de BLEE (CTX-M-14 identificada en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III),
- resistente a ciprofloxacino y no productora de BLEE
- resistente a ciprofloxacino y productora de BLEE (CTX-M-14 identificada en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III).

Las características de las cepas ensayadas se pueden ver en la tabla 5.

El experimento se hizo por triplicado para, una vez obtenidos los resultados poder llegar a conclusiones estadísticamente significativas.

Los cuatro grupos de cepas provenían de infecciones urinarias de pacientes de nuestro medio (Departamento 20 de la Comunidad Valenciana).

Hasta el momento del estudio, las cepas se mantuvieron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en medio tripticasa soja-glicerol.

Tabla 5. Descripción de las muestras utilizadas en el análisis.

<b>E coli</b>	<b>BLEE</b>	<b>(+)/(-)</b>	<b>MUESTRAS</b>
<b>Cipro R</b>	SI	(+)	08SE1960, 08SE1711, 08SE921
		(-)	08SE1958, 08SE1709, 08SE930
	NO	(+)	08SE1954, 08SE1705, 08SE932
		(-)	08SE1952, 08SE1703, 08SE932
<b>Cipro S</b>	SI	(-)	08SE1956, 08SE1708, 08SE925
	NO	(-)	08SE1950, 08SE1702, 08SE927

BLEE betalactamasas de espectro extendido

(+) cepa expuesta a antibióticos

(-) cepa no expuesta a antibióticos.

### 3.6.3.- Modelo experimental.

- Las cepas resistentes a ciprofloxacino productora y no productora de BLEE se expusieron a una concentración de  $1\ \mu\text{g/ml}$  de ciprofloxacino durante 8 horas.

- Las cepas sensibles a ciprofloxacino productora y no productora de BLEE no se expusieron a antibiótico.
- Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los tubos durante 15 minutos a 2500g. Se recuperaron las cepas en el sedimento y se introdujeron en nitrógeno líquido de tal forma que se congelan inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- Posteriormente se enviaron las cepas congeladas al laboratorio PROGENIKA-Biopharma, S.A para su posterior procesamiento.

#### 3.6.3.1.- Extracción del RNA.

Tanto el procesamiento de las muestras como la extracción del RNA se ha realizado siguiendo los protocolos y equipos oficialmente recomendados por Affymetrix Inc.

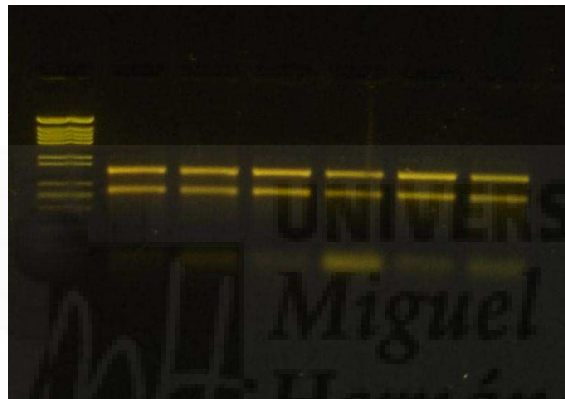
A partir de las muestras de pellets de *E coli* recibidas, se extrajo RNA total utilizando el protocolo modificado de extracción, tratamiento con DNasa y purificación del RNeasy Mini kit de Qiagen (Alameda, CA, USA). Las modificaciones incluidas en el protocolo fueron las siguientes:

- Para la lisis, el pellet bacteriano se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de lisozima 1mg/ml ya que había mucha cantidad de pellet y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Además del tratamiento con DNasa en columna incluido en el protocolo del kit, se realizó un segundo tratamiento en solución con 1 u de DNasa de Amersham (Barcelona, España) por microgramo de RNA.
- Después del tratamiento las muestras se purificaron mediante extracción con fenol: cloroformo y precipitación con acetato amónico y etanol.

### 3.6.3.2.-Chequeo del RNA en gel de agarosa.

La calidad y cantidad del RNA se estimaron mediante chequeo de una alícuota en un gel de agarosa y medida espectrofotométrica en Nanodrop (figura 6).

Figura 6: Comprobación por electroforesis en gel de agarosa de los RNAs purificados.



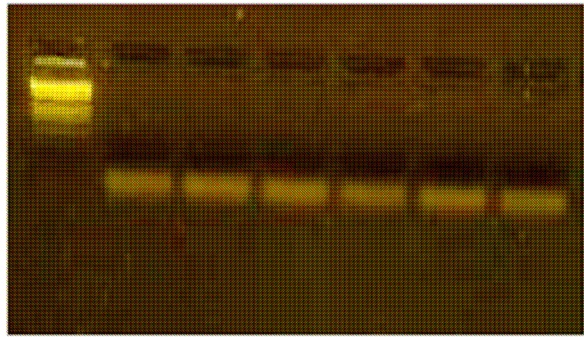
### 3.6.3.3.- Síntesis de cDNA.

A partir de 10  $\mu$ g de cada una de las muestras, se sintetizó cDNA siguiendo el protocolo recomendado por Affymetrix (Prokaryotic Simple and Array Processing, rev.4).

Los cDNAs purificados se recuperaron en un volumen de 12  $\mu$ l de buffer EB. La concentración y pureza del cDNA purificado se comprobó mediante medida espectrofotométrica.

Una vez sintetizado y purificado, se fragmentó el cDNA mediante tratamiento con DNasa I (figura 7).

Figura 7: Chequeo en gel de agarosa del cDNA fragmentado.



El cDNA fragmentado se marcó en su extremo 3' con el GeneChip DNA Labelling Reagent (Affymetrix®) utilizando transferasa terminal.

En la reacción de síntesis del cDNA se ha incluido una mezcla de 4 Poly A controls correspondientes a genes de *Bacillus subtilis* que se han incluido como controles de los procesos de síntesis de cDNA, hibridación, lavados y revelado del chip.

#### 3.6.3.4.-Hibridación y escaneado del E.coli Genome 2.0 array. Análisis de los controles.

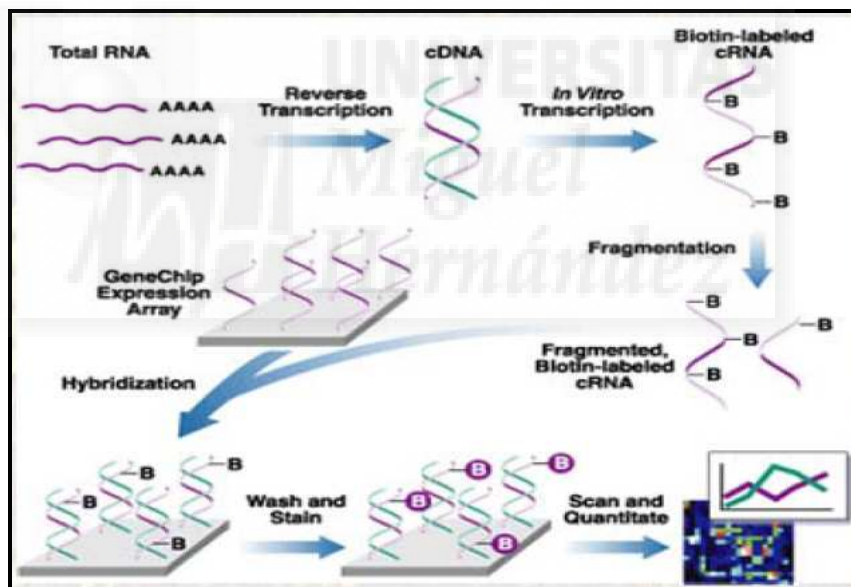
El chip utilizado fue el E\_coli\_2 (Affymetrix) que interroga 10208 secuencias.

El esquema de trabajo con los array sería el siguiente: una vez obtenidas y purificadas las muestras (DNA) éstas se marcan con una sustancia fluorescente. A continuación se procede a su hibridación con el array sintetizado previamente. Los cDNA marcados se utilizaron para preparar las mezclas de hibridación con las que se hibridaron los arrays. La hibridación se realizó a 45°C durante 16 horas. Los lavados para eliminar el exceso de DNA (el que ha hibridado inespecíficamente) así como el revelado se realizaron siguiendo los protocolos recomendados por Affymetrix.

Se procede a la inspección visual de los arrays que proporciona una idea general de la calidad del experimento. Una muestra válida se considera aquella con fondos oscuros y señales de hibridación brillantes así como con escasas señales de ruido de fondo que ocultarían la señal. Se procede a la medición de la señal. Esta señal es digitalizada y cuantificada y posteriormente se realizará el análisis de datos.

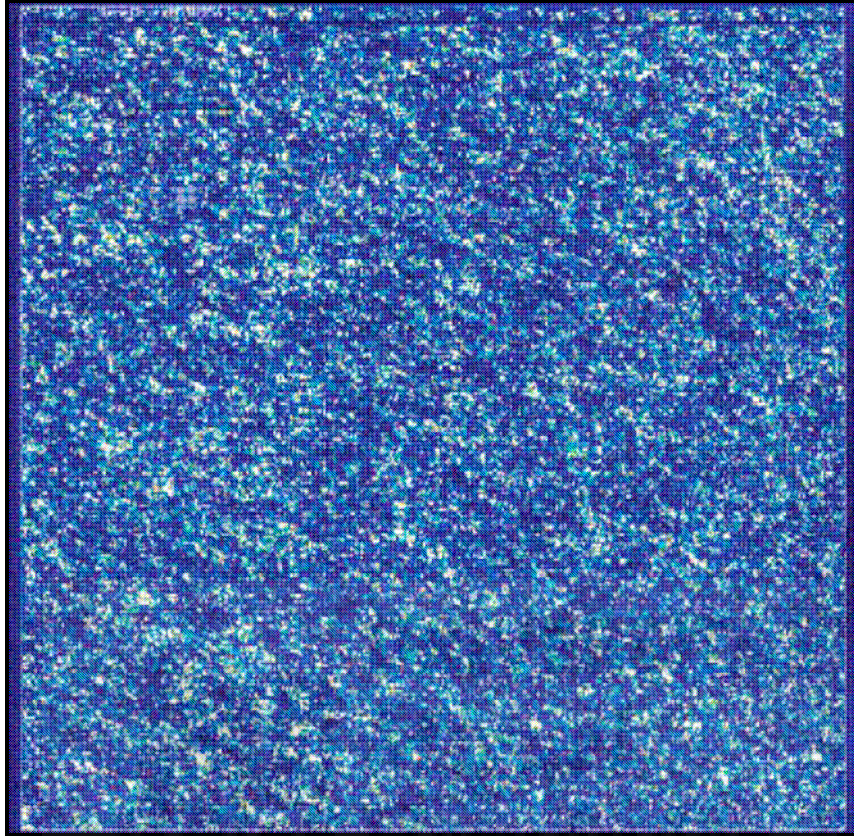
La visión general del proceso la podemos ver en la siguiente figura (figura 8).

Figura 8: Visión general del proceso de hibridación en microarrays.



El nivel de hibridación entre la sonda específica (probe) y la molécula diana (target), se indica generalmente mediante fluorescencia y se mide por análisis de imagen. Esto indica el nivel de expresión del gen. En la figura 9 podemos ver la imagen de un chip de Affymetrix hibridado.

Figura 9: Imagen de un chip de Affymetrix hibridado:



3.6.3.5.-Análisis bioinformático de los resultados obtenidos con la técnica de microarrays.

Una vez obtenidos los archivos de imágenes, éstos se transforman en datos numéricos. Para cada uno de los puntos se consideran varios ítems a analizar (dimensiones, forma, localización y parámetros estadísticos que puedan asociarse a ellos). Dada la ingente cantidad de datos que puede aportar un microarray, se hace necesaria la colaboración de un equipo multidisciplinar que pueda interpretar los mismos (bioestadístico y bioinformático además de microbiólogo).



De esta manera se obtiene una tabla de datos donde las filas serán los genes y las columnas experimentos.

El software utilizado para el procesamiento de los chips ha sido el Affymetrix® GeneChip® Command Console® (AGCC 1.1, Affymetrix®) y el Expression Console® (EC 1.1, Affymetrix®). Para realizar las comparaciones entre muestras GeneChip Operation Software (GCOS 4.0).



## **4.- RESULTADOS**



#### **4.1.- Evolución de las cepas productoras de BLEE y de la resistencia a fluoroquinolonas en el Hospital General Universitario de Elche.**

##### 4.1.1- Evolución de las cepas de *Escherichia coli* resistentes a ciprofloxacino productoras o no de BLEE:

Se observa que, considerando todos los aislados de *E coli* procesados en el laboratorio, el número de cepas de *E coli* resistentes a ciprofloxacino va aumentando durante todo el período estudiado, desde 13,8% en los primeros años hasta 34,9% al final del estudio.

En cepas no productoras de BLEE el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino es del 13,5% al inicio del estudio en 1992 y del 29,7% al final del estudio en el año 2008.

En cepas productoras de BLEE, los porcentajes siempre han sido superiores, llegando a 83,8% en el último año del estudio (tabla 6).

Analizando todos los años en conjunto, se observa que el porcentaje de cepas resistentes en cepas BLEE es mucho mayor (75,1% versus 28,4%).

Estos resultados también se observan en la gráfica nº 1; el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino va aumentando a lo largo de los años. En esta gráfica se observa también que los porcentajes de cepas de *E coli* resistentes a ciprofloxacino son superiores a los porcentajes de cepas de *K pneumoniae* a lo largo del período estudiado.

Tabla 6: Evolución en la aparición de cepas de *Escherichia coli* resistentes a ciprofloxacino BLEE y no BLEE:

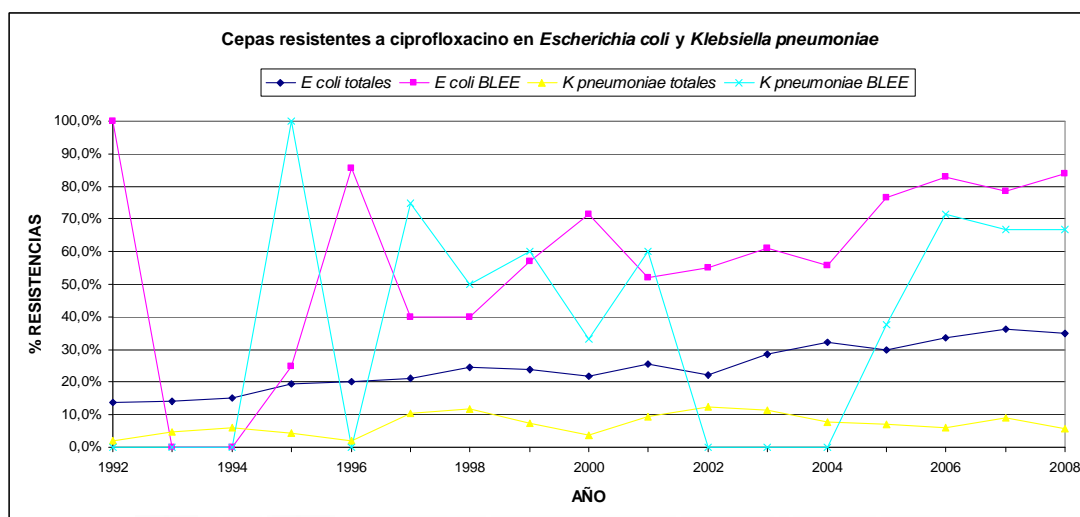
AÑO	<i>E coli</i> totales n	<i>E coli</i> Cipro R %	<i>E coli</i> BLEE n	<i>E coli</i> BLEE %	<i>E coli</i> BLEE Cipro R %	<i>E coli</i> no BLEE n	<i>E coli</i> no BLEE Cipro R %
1992	305	13,8%	1	0,3%	100,0%	304	13,5%
1993	534	14,2%	1	0,2%	0,0%	533	14,3%
1994	540	15,2%	8	1,5%	0,0%	532	15,4%
1995	575	19,3%	4	0,7%	25,0%	571	19,3%
1996	622	20,3%	7	1,1%	85,7%	615	19,5%
1997	653	21,1%	5	0,8%	40,0%	648	20,9%
1998	760	24,6%	15	2,0%	40,0%	745	24,3%
1999	780	23,7%	14	1,8%	57,1%	766	23,1%
2000	922	21,8%	7	0,8%	71,4%	915	21,4%
2001	837	25,4%	23	2,7%	52,2%	814	24,7%
2002	955	22,3%	29	3,0%	55,2%	926	21,3%
2003	1063	28,6%	41	3,9%	60,9%	1022	27,3%
2004	1081	32,1%	61	5,6%	55,7%	1020	30,7%
2005	2413	29,8%	148	6,1%	76,3%	2265	26,8%
2006	2716	33,4%	235	8,7%	82,9%	2481	28,7%
2007	2753	36,2%	239	8,7%	78,7%	2514	32,2%
2008	2004	34,9%	192	9,6%	83,8%	1812	29,7%
<b>TOTAL</b>	19513	28,4%	1030	5,3%	75,1%	18483	25,8%

*E coli*: *Escherichia coli*

Cipro R: ciprofloxacino resistente

Cipro S: ciprofloxacino sensible

Gráfica 1: Evolución en la aparición de cepas resistentes a ciprofloxacino en *E coli* y *K. pneumoniae* BLEE y no BLEE en el período de estudio.



#### 4.1.2- Evolución de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino productoras o no de BLEE:

Se observa que el número de cepas de *K pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino va aumentando durante todo el período estudiado, desde 2,1% en los primeros años hasta 5,6% al final del estudio (tabla 7).

En cepas no productoras de BLEE los porcentajes de cepas resistentes a ciprofloxacino son similares a los observados considerando todas las cepas globalmente (2,1% y 4,0% al inicio y al final del estudio respectivamente).

En cambio, en cepas productoras de BLEE, el porcentaje de las mismas resistentes a ciprofloxacino ha sido de más del 65% en el último año del estudio (tabla 7). Estos resultados los podemos ver en la gráfica nº 1.

En la tabla 7 también podemos ver que el mayor porcentaje de cepas resistentes aparece en las cepas BLEE (51,3%).

Tabla 7: Evolución en la aparición de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino BLEE y no BLEE:

AÑO	<i>Kp</i> totales n	<i>Kp</i> CiproR %	<i>Kp</i> BLEE n	<i>Kp</i> BLEE %	<i>Kp</i> BLEE CiproR %	<i>Kp</i> no BLEE n	<i>Kp</i> no BLEE CiproR %
1992	97	2,1%	0	0,0%		97	2,1%
1993	132	4,5%	0	0,0%		132	4,5%
1994	152	5,9%	0	0,0%		152	5,9%
1995	156	4,5%	2	1,3%	100,0%	154	3,2%
1996	159	1,9%	3	1,9%	0,0%	156	1,9%
1997	155	10,3%	8	5,2%	75,0%	147	6,8%
1998	181	11,6%	2	1,1%	50,0%	179	11,2%
1999	194	7,2%	5	2,6%	60,0%	189	5,8%
2000	254	3,5%	3	1,2%	33,3%	251	3,2%
2001	258	9,3%	5	1,9%	60,0%	253	8,3%
2002	304	12,5%	2	0,7%	0,0%	302	12,6%
2003	406	11,3%	5	1,2%	0,0%	401	11,5%
2004	360	7,8%	4	1,1%	0,0%	356	7,9%
2005	405	6,9%	8	2,0%	37,5%	397	6,3%
2006	536	6,2%	7	1,3%	71,4%	529	5,3%
2007	518	9,1%	15	2,9%	66,7%	503	7,4%
2008	358	5,6%	9	2,5%	66,7%	349	4,0%
<b>TOTAL</b>	<b>4618</b>	<b>7,6%</b>	<b>78</b>	<b>1,7%</b>	<b>51,3%</b>	<b>4540</b>	<b>6,8%</b>

*Kp*: *Klebsiella pneumoniae*

Cipro R: ciprofloxacino resistente

Cipro S: ciprofloxacino sensible

#### **4.2.- Evolución de la resistencia a ciprofloxacino: influencia de los criterios de eliminación de duplicados.**

4.2.1- Resistencia en *Escherichia coli*: influencia de los criterios de eliminación de duplicados:

Aplicando el criterio recomendado por CLSI (primer aislado de cada paciente), se observa que el número de cepas resistentes a ciprofloxacino en *E coli* va aumentando durante todo el período estudiado, desde menos de 15% en los primeros años hasta más de 20% al final del estudio. Estos porcentajes de cepas resistentes a ciprofloxacino son similares a los observados en cepas no productoras de BLEE (tabla 8).

En cepas productoras de BLEE, la proporción de cepas resistentes a ciprofloxacino ha sido superior, llegando a más del 60% en los últimos años del estudio (tabla 8).

En esta tabla podemos ver también como la aplicación del criterio recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>48</sup> no detecta tantas cepas resistentes a ciprofloxacino como el criterio sugerido por el grupo EARSS. Los porcentajes de cepas resistentes a ciprofloxacino según el criterio European Antimicrobial Resistance Surveillance System (criterio EARSS) sugerido por el ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS)<sup>49</sup> (el primer aislado del paciente más los aislados consecutivos distintos en la sensibilidad de ciertos antibióticos) son mayores que los detectados por el criterio del CLSI (un aislado por paciente). Así vemos, que a lo largo de la mayoría de los años los porcentajes de cepas resistentes detectados según el criterio europeo son superiores. En el año 2008 las cepas

resistentes a ciprofloxacino son del 23,8% o del 30,3% según el criterio empleado. Esta diferencia también se puede apreciar en las cepas BLEE y no BLEE.

En el total de cepas resistentes detectadas, vemos que los porcentajes son mayores según el criterio europeo, y esto también se detecta en cepas BLEE y no BLEE. Los datos se detallan en la tabla 8.

Tabla 8: Resistencia a ciprofloxacino en *Escherichia coli* productoras y no productoras de BLEE: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados:

AÑO	TOTAL		BLEE		NO BLEE	
	CLSI	EARSS	CLSI	EARSS	CLSI	EARSS
1992	13,9%	13,7%	0,0%	0,0%	13,9%	13,9%
1993	13,7%	14,1%	0,0%	0,0%	13,7%	14,1%
1994	14,0%	15,4%	0,0%	0,0%	14,0%	15,6%
1995	18,7%	19,9%	0,0%	0,0%	18,8%	19,9%
1996	16,7%	19,4%	100,0%	100,0%	16,3%	18,8%
1997	18,4%	21,0%	50,0%	50,0%	18,2%	20,9%
1998	20,3%	24,0%	0,0%	30,0%	20,5%	23,9%
1999	18,2%	23,2%	60,0%	66,7%	17,5%	22,7%
2000	20,3%	21,7%	100,0%	100,0%	20,1%	21,4%
2001	22,7%	24,7%	100,0%	100,0%	22,1%	24,1%
2002	19,5%	21,9%	46,7%	45,0%	18,9%	21,4%
2003	24,5%	26,8%	59,1%	61,8%	23,5%	25,5%
2004	27,4%	30,7%	68,6%	64,68%	25,6%	28,9%
2005	24,5%	27,9%	66,1%	67,8%	23,0%	25,9%
2006	24,7%	29,6%	68,9%	74,4%	22,7%	26,7%
2007	27,2%	31,2%	67,5%	62,7%	25,1%	29,37%
2008	23,8%	30,3%	65,3%	72,8%	21,9%	27,4%
<b>TOTAL</b>	<b>22,4%</b>	<b>25,8%</b>	<b>64,6%</b>	<b>67,0%</b>	<b>21,2%</b>	<b>24,4%</b>

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

EARSS: European Antimicrobial Resistance Surveillance System

En la tabla 9 podemos ver como el nº de aislados de *E coli* aplicando el criterio del CLSI (1 aislado/paciente) es inferior (13552) al que obtenemos si aplicamos el criterio EARSS (1 aislado/antibiograma) (16106). Esto también es cierto para el número



de cepas sensibles y resistentes (tabla 9). Así con esta diferencia de criterios encontramos que aplicando el criterio 1 aislado/antibiograma tenemos 1428 cepas sensibles más y 1126 cepas resistentes más. También observamos un aumento de 194 cepas BLEES más.

En la tabla 9 vemos como los distintos criterios temporales de selección de muestras también afectan al número de cepas detectadas o a los porcentajes de cepas resistentes o cepas BLEE.

Tabla 9: Resistencia en *Escherichia coli*: influencia de varios criterios de eliminación de duplicados.

BASE DE DATOS	CEPAS TOTALES			CEPAS BLEE			
	n	Cipro R n	Cipro R %	n	%	Cipro R n	Cipro R %
<b>Unificada</b>	19513	5548	28,4%	1030	5,3%	773	75,0%
<b>1<sup>er</sup> aislado / paciente</b>	13552	3036	22,4%	430	3,2%	260	60,5%
<b>7 Días</b>	17574	5006	28,5%	723	4,1%	498	68,9%
<b>14 Días</b>	17376	4936	28,4%	710	4,1%	487	68,6%
<b>21 Días</b>	17174	4870	28,4%	696	4,1%	479	68,8%
<b>30 Días</b>	16902	4773	28,2%	679	4,0%	467	68,8%
<b>Antibiograma</b>	16106	4162	28,4%	624	3,9%	407	65,2%

n: número de cepas

Cipro R: ciprofloxacino resistente

Cipro S: ciprofloxacino sensible

Esta situación se repite en pacientes ingresados como podemos ver en la tabla 10. Tanto el número de cepas totales como de cepas resistentes a ciprofloxacino son mayores según el criterio europeo. También el número de cepas BLEE es superior.

Tabla 10: Resistencia a ciprofloxacino en *Escherichia coli*: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados en muestras procedentes de pacientes ingresados:

PACIENTES INGRESADOS	CEPAS TOTALES			CEPAS BLEE			
	n	Cipro R n	Cipro R %	n	%	Cipro R n	Cipro R %
<b>Unificada</b>	5282	1568	29,7%	477	9,0%	393	82,4%
<b>1<sup>er</sup> aislado por paciente</b>	3104	728	23,5%	164	5,3%	108	65,9%
<b>7 Días</b>	4352	1315	30,2%	181	4,2%	123	68,0%
<b>14 Días</b>	4180	1249	29,9%	171	4,1%	115	67,3%
<b>21 Días</b>	4123	1220	29,6%	163	4,0%	112	68,7%
<b>30 Días</b>	4086	1204	29,5%	160	3,9%	109	68,1%
<b>Antibiograma</b>	4182	1089	26,0%	184	4,4%	115	62,5%

n: número de cepas  
Cipro R: ciprofloxacino resistente  
Cipro S: ciprofloxacino sensible

En pacientes no ingresados se mantiene el mismo hecho comentado anteriormente, que el criterio europeo detecta mayor número de cepas, mayor número de cepas resistentes y también mayor número de cepas BLEE (tabla 11). Vemos en las tablas 10 (pacientes ingresados) y 11 (pacientes no ingresados) como la aplicación de estos criterios afecta al porcentaje de cepas BLEE que es mayor el detectado en pacientes ingresados con respecto al de no ingresados (5,3% y 4,4% versus 2,5% y 3,7%). En este caso el porcentaje de cepas BLEE en pacientes ingresados detectado con el criterio europeo es menor que el detectado por criterios CLSI. También disminuye el porcentaje de cepas BLEE resistentes a ciprofloxacino en pacientes ingresados. No

ocurre lo mismo en pacientes no ingresados donde la resistencia aumenta en nueve puntos porcentuales.

Tabla 11. Resistencia a ciprofloxacino en *Escherichia coli*: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados en muestras procedentes de pacientes no ingresados.

PACIENTES NO INGRESADOS	CEPAS TOTALES			CEPAS BLEE			
	n	Cipro R n	Cipro R %	n	%	Cipro R n	Cipro R %
<b>Unificada</b>	14231	3980	28,0%	553	3,9%	380	68,7%
<b>1<sup>er</sup> Aislado Por Paciente</b>	10448	2308	22,1%	266	2,5%	152	57,1%
<b>7 Días</b>	13222	3691	27,9%	542	4,1%	375	69,2%
<b>14 Días</b>	13196	3687	27,9%	539	4,1%	372	69,0%
<b>21 Días</b>	13051	3650	28,0%	533	4,1%	367	68,9%
<b>30 Días</b>	12816	3569	27,8%	519	4,0%	358	69,0%
<b>Antibiograma</b>	11924	3073	25,8%	440	3,7%	292	66,4%

n: número de cepas  
Cipro R: ciprofloxacino resistente  
Cipro S: ciprofloxacino sensible

Hemos analizado los datos teniendo en cuenta también el tipo de muestra. En las tablas siguientes podemos ver como el criterio seleccionado también influye en el número de aislados, así como en el número de cepas resistentes y cepas BLEE. Se han analizado los resultados correspondientes a orina, hemocultivos, heridas, exudados, piel y otros.

Los resultados son coincidentes con los comentados hasta ahora. En todos los tipos de muestras estudiados, el criterio europeo es el que más cepas detecta, tanto globalmente como cepas resistentes y cepas BLEE. Esto lo podemos ver en las tablas 12 y 13.

Tabla 12: Resistencia a ciprofloxacino en *Escherichia coli*: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados según el tipo de muestra. Orina y Hemocultivos.

<i>E COLI</i> TOTALES	ORINA					HEMOCULTIVOS				
	n	CiproR n	CiproR %	BLEE n	BLEE %	n	CiproR n	CiproR %	BLEE n	BLEE %
<b>Unificada</b>	15164	4146	27,3%	657	4,3%	1708	<b>629</b>	36,8%	72	4,2%
<b>1<sup>er</sup> aislado por paciente</b>	11104	2490	22,4%	358	3,2%	705	159	22,6%	25	3,5%
<b>7 Días</b>	14435	4079	28,3%	652	4,5%	888	270	30,4%	53	6,0%
<b>14 Días</b>	14325	4039	28,2%	651	4,5%	873	265	30,4%	60	6,9%
<b>21 Días</b>	14159	3988	28,2%	644	4,6%	868	264	30,4%	60	6,9%
<b>30 Días</b>	13922	3908	28,1%	626	4,5%	855	258	30,2%	60	7,0%
<b>Antibiograma</b>	12994	3343	25,7%	535	4,1%	941	247	26,2%	47	5,0%

n: número de cepas  
Cipro R: ciprofloxacino resistente  
Cipro S: ciprofloxacino sensible

Tabla 13: Resistencia a ciprofloxacino en *Escherichia coli*: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados según el tipo de muestra. Heridas, exudados, piel y otros.

<i>E COLI</i> TOTALES	HERIDAS, EXUDADOS Y PIEL					OTROS				
	n	CiproR n	CiproR %	BLEE n	BLEE %	n	CiproR n	CiproR %	BLEE n	BLEE %
<b>Unificada</b>	1820	558	30,7%	122	6,7%	821	214	26,1%	31	3,8%
<b>1<sup>er</sup> Aislado Por Paciente</b>	1179	278	23,6%	49	4,2%	564	109	19,3%	21	3,7%
<b>7 Días</b>	1540	473	30,7%	108	7,0%	711	184	25,9%	26	3,7%
<b>14 Días</b>	1479	452	30,6%	99	6,7%	699	180	25,8%	25	3,6%
<b>21 Días</b>	1456	439	30,2%	94	6,5%	691	179	25,9%	25	3,6%
<b>30 Días</b>	1439	432	30,0%	93	6,5%	686	175	25,5%	24	3,5%
<b>Antibiograma</b>	1499	414	27,6%	99	6,6%	672	158	23,5%	26	3,9%

n: número de cepas  
Cipro R: ciprofloxacino resistente  
Cipro S: ciprofloxacino sensible

4.2.2- Resistencia a ciprofloxacino en *Klebsiella pneumoniae*: influencia de los criterios de eliminación de duplicados:

Considerando el primer aislado de cada paciente (criterio recomendado por CLSI)<sup>48</sup>, durante el período de estudio de 17 años la resistencia a ciprofloxacino ha ido aumentando desde el 1,3% al 9,7% de los aislados.

Al aplicar el criterio EARSS<sup>49</sup>, el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino en cepas totales se incrementa del 1,3% en 1992 al 6,5% en 2008. En la media de cepas resistentes detectadas en el periodo de estudio, vemos que los

porcentajes son mayores según el criterio europeo, y esto en el total de cepas así como en cepas BLEE y no BLEE. Los datos se detallan en la tabla 14.

En cepas BLEE el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino es mayor al considerar el criterio sugerido por ESCMID (tabla 14).

Como podemos ver en esta tabla se detectan mayor número de cepas resistentes según el criterio europeo. Las diferencias con respecto al criterio de CLSI no son tan llamativas como las vistas con las cepas de *E coli* aunque los porcentajes de cepas resistentes detectados siguen siendo mayores con el criterio europeo que con el CLSI.

Tabla 14: Resistencia a ciprofloxacino en *Klebsiella pneumoniae* productora y no productora de BLEE: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados:

AÑO	TOTAL		BLEE		NO BLEE	
	CLSI	EARSS	CLSI	EARSS	CLSI	EARSS
1992	1,3%	1,3%			1,3%	1,3%
1993	4,6%	5,4%			4,6%	5,4%
1994	4,2%	5,4%			4,2%	5,4%
1995	3,1%	3,7%	100,0%	100,0%	2,4%	2,3%
1996	1,6%	2,3%	0,0%	0,0%	1,7%	2,3%
1997	6,6%	9,8%	66,7%	71,4%	3,4%	6,4%
1998	8,5%	12,2%	50,0%	66,7%	7,8%	11,1%
1999	5,0%	6,4%	25,0%	40,0%	4,5%	5,4%
2000	2,4%	3,7%	33,3%	33,3%	1,9%	3,3%
2001	9,9%	9,9%	66,7%	50,0%	9,1%	9,2%
2002	10,5%	11,5%	0,0%	0,0%	10,5%	11,6%
2003	7,5%	8,6%	0,0%	0,0%	7,6%	8,6%
2004	6,6%	6,9%	0,0%	0,0%	6,6%	7,0%
2005	1,4%	5,1%	0,0%	50,0%	1,5%	4,5%
2006	7,6%	5,9%	100,0%	71,4%	6,1%	4,8%
2007	8,3%	9,5%	100,0%	64,3%	4,3%	7,4%
2008	9,7%	6,5%	50,0%	71,4%	6,9%	4,7%
<b>TOTAL</b>	<b>5,8%</b>	<b>6,7%</b>	<b>34,8%</b>	<b>36,4%</b>	<b>5,8%</b>	<b>5,9%</b>

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

EARSS: European Antimicrobial Resistance Surveillance System

En la tabla general de cepas aisladas según diversos criterios de eliminación de duplicados (tabla 15), podemos ver como el nº de aislados de *K pneumoniae* aplicando el criterio del CLSI (1 aislado/paciente) es inferior (2493) al que obtenemos si aplicamos el criterio europeo (3810). Esto también es cierto para el número de cepas resistentes (tabla 15). Así con esta diferencia de criterios encontramos que aplicando el criterio europeo tenemos 117 cepas resistentes más. También observamos un aumento de 32 cepas BLEES más.

Tabla 15: Resistencia en *Klebsiella pneumoniae*: influencia de varios criterios de eliminación de duplicados.

BASE DE DATOS	CEPAS TOTALES				CEPAS BLEE		
	n	CiproR n	CiproR %	n	%	CiproR n	CiproR %
<b>Unificada</b>	4618	350	7,6%	79	1,7%	40	50,6%
<b>1<sup>er</sup> Aislado Por Paciente</b>	2493	156	6,3%	35	1,4%	14	40,0%
<b>7 Días</b>	4213	311	7,4%	68	1,6%	33	48,5%
<b>14 Días</b>	4165	309	7,4%	68	1,6%	33	48,5%
<b>21 Días</b>	4130	309	7,5%	68	1,6%	33	48,5%
<b>30 Días</b>	4081	306	7,5%	66	1,6%	32	48,5%
<b>Antibiograma</b>	3810	273	7,2%	67	1,8%	35	52,2%

n: número de cepas

Cipro R: ciprofloxacino resistente

Cipro S: ciprofloxacino sensible

En la tabla 15 vemos como los distintos criterios de selección de muestras afectan al número de cepas detectadas o a los porcentajes de cepas resistentes o cepas

BLEE. Las cifras van bajando conforme ampliamos el periodo temporal incluido en el criterio.

En pacientes ingresados (tabla 16), vemos también un incremento en el número de cepas y también en el número de cepas BLEE al comparar los criterios del CLSI con los criterios del ESMID. Destaca también que los porcentajes de cepas resistentes a ciprofloxacino son mayores en pacientes ingresados con respecto a no ingresados y que el incremento en cepas resistentes a ciprofloxacino es más llamativo también en cepas BLEE. En pacientes ingresados, el criterio CLSI detecta más cepas resistentes y mayor tasa de resistencias a cipro que el criterio europeo.

Tabla 16: Resistencia a ciprofloxacino en *Klebsiella pneumoniae*: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados en muestras procedentes de pacientes ingresados:

PACIENTES INGRESADOS	CEPAS TOTALES				CEPAS BLEE			
	n	CiproR n	CiproR %	n	%	CiproR n	CiproR %	
<b>Unificada</b>	1275	91	7,1%	37	2,9%	21	56,8%	
<b>1<sup>er</sup> Aislado Por Paciente</b>	865	42	4,9%	16	1,8%	7	43,8%	
<b>7 Días</b>	1242	91	7,3%	30	2,4%	16	53,3%	
<b>14 Días</b>	1229	91	7,4%	30	2,4%	16	53,3%	
<b>21 Días</b>	1219	90	7,4%	30	2,5%	16	53,3%	
<b>30 Días</b>	1207	90	7,5%	29	2,4%	16	55,2%	
<b>Antibiograma</b>	1124	19	1,7%	33	2,9%	19	57,6%	

n: número de cepas  
Cipro R: ciprofloxacino resistente  
Cipro S: ciprofloxacino sensible



En pacientes no ingresados (tabla 17), vemos también un incremento en el número de cepas y también en el número de cepas BLEE al comparar los criterios del CLSI con los criterios del ESMID. Ocurre lo mismo en el número de cepas resistentes al comparar ambos criterios, se detectan también más cepas resistentes.

Tabla 17: Resistencia a ciprofloxacino en *Klebsiella pneumoniae*: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados en muestras procedentes de pacientes no ingresados:

PACIENTES NO INGRESADOS	CEPAS TOTALES				CEPAS BLEE		
	n	CiproR n	CiproR %	n	%	CiproR n	CiproR %
<b>Unificada</b>	3343	259	7,7%	42	1,3%	<b>19</b>	45,2%
<b>1<sup>er</sup> Aislado Por Paciente</b>	1628	114	7,0%	19	1,2%	7	36,8%
<b>7 Días</b>	2971	220	7,4%	38	1,3%	17	44,7%
<b>14 Días</b>	2936	218	7,4%	38	1,3%	17	44,7%
<b>21 Días</b>	2911	219	7,5%	38	1,3%	17	44,7%
<b>30 Días</b>	2874	216	7,5%	37	1,3%	16	43,2%
<b>Antibiograma</b>	2686	254	9,5%	34	1,3%	16	47,1%

n: número de cepas  
Cipro R: ciprofloxacino resistente  
Cipro S: ciprofloxacino sensible

Hemos analizado los datos teniendo en cuenta también el tipo de muestra. En las tablas siguientes podemos ver como el criterio seleccionado también influye en el

número de aislados, así como en el número de cepas resistentes y cepas BLEE. Se han analizado los resultados correspondientes a orina, hemocultivos, heridas, exudados, piel y otros.

Los resultados son coincidentes con los comentados hasta ahora. En todos los tipos de muestras estudiados, el criterio europeo es el que más cepas detecta, tanto globalmente como cepas resistentes y cepas BLEE. Esto lo podemos ver en las tablas 18 y 19.

Tabla 18: Resistencia a ciprofloxacino en *Klebsiella pneumoniae*: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados según el tipo de muestra. Orina y Hemocultivos.

<i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> TOTALES	ORINA					HEMOCULTIVOS				
	n	CiproR n	CiproR %	BLEE n	BLEE %	n	CiproR N	CiproR %	BLEE n	BLEE %
<b>Unificada</b>	3101	<b>236</b>	7,6%	35	1,1%	456	52	11,4%	15	3,3%
<b>1<sup>er</sup> aislado por paciente</b>	1586	100	6,3%	12	0,8%	220	19	8,6%	5	2,3%
<b>7 Días</b>	3020	226	7,5%	35	1,2%	269	31	11,5%	7	2,6%
<b>14 Días</b>	2997	225	7,5%	35	1,2%	263	31	11,8%	7	2,7%
<b>21 Días</b>	2973	225	7,6%	35	1,2%	260	31	11,9%	7	2,7%
<b>30 Días</b>	2936	223	7,6%	33	1,1%	259	30	11,6%	7	2,7%
<b>Antibiograma</b>	2696	194	7,2%	34	1,3%	257	27	10,5%	9	3,5%

n: número de cepas  
Cipro R: ciprofloxacino resistente  
Cipro S: ciprofloxacino sensible

Tabla 19: Resistencia a ciprofloxacino en *Klebsiella pneumoniae*: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados según el tipo de muestra. Orina y Hemocultivos.

<i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE TOTALES</i>	HERIDAS, EXUDADOS Y PIEL					OTROS				
	n	CiproR n	CiproR %	BLEE n	BLEE %	n	CiproR n	CiproR %	BLEE n	BLEE %
<b>Unificada</b>	577	38	6,6%	11	1,9%	489	27	5,5%	20	4,1%
<b>1<sup>er</sup> Aislado Por Paciente</b>	382	19	5,0%	4	1,0%	306	18	5,9%	14	4,6%
<b>7 Días</b>	520	33	6,3%	11	2,1%	406	22	5,4%	22	5,4%
<b>14 Días</b>	509	32	6,3%	11	2,2%	398	22	5,5%	16	4,0%
<b>21 Días</b>	502	32	6,4%	11	2,2%	397	22	5,5%	16	4,0%
<b>30 Días</b>	497	32	6,4%	11	2,2%	391	22	5,6%	16	4,1%
<b>Antibiograma</b>	476	32	6,7%	8	1,7%	385	22	5,7%	17	4,4%

n: número de cepas  
 Cipro R: ciprofloxacino resistente  
 Cipro S: ciprofloxacino sensible

#### **4.3.- Determinación de la concentración preventiva de mutantes resistentes a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* productoras y no productoras de betalactamasas de espectro extendido.**

Los resultados de CMI y concentración preventiva de mutantes (CPM) para ciprofloxacino y levofloxacino los podemos observar en la tabla 20. No se detectaron diferencias significativas entre las CMI de cepas sensibles a ciprofloxacino productoras y no productoras de BLEE, tanto para ciprofloxacino como para levofloxacino. Así mismo, no se detectaron diferencias significativas entre las CMI de cepas resistentes a ciprofloxacino productoras y no productoras de BLEE, tanto para ciprofloxacino como para levofloxacino.

Las cepas sensibles a ciprofloxacino y productoras de BLEE muestran una mayor CPM para levofloxacino ( $p < 0.001$ ) y ciprofloxacino ( $p < 0.001$ ) que las cepas no productoras de BLEE.

En la tabla 21 se muestran los datos farmacológicos publicados para las fluoroquinolonas ciprofloxacino y levofloxacino. En la tabla 22 y 23 se pueden observar la relación entre los datos microbiológicos que se han obtenido en el trabajo y estos datos farmacológicos.

Tabla 20: CMI y CPM de las cepas de *E coli* estudiadas para ciprofloxacino y levofloxacino.

CEPAS	CIPROFLOXACINO				LEVOFLOXACINO			
	Cipro S		Cipro R		Cipro S		Cipro R	
	No BLEE (n=25)	BLEE (n=21)	No BLEE (n=14)	BLEE (n=39)	No BLEE (n=25)	BLEE (n=21)	No BLEE (n=14)	BLEE (n=39)
<b>CMI<sub>50</sub></b>	0.125	0.25	16	32	0.03	0.25	8	16
<b>CMI<sub>90</sub></b>	1	1	64	64	1	1	16	32
<b>rango</b>	0.015-2	0.006-2	4-64	4-64	0.015-1	0.015-2	0.25-64	2-64
<b>CPM<sub>50</sub></b>	0.2	2	50	50	0.1	2	45	35
<b>CPM<sub>90</sub></b>	3	8	100	100	1.5	10	100	100
<b>rango</b>	0.025-8	0.025-8	14-100	18-100	0.025-1.5	0.025-14	6-100	6-100
<b>CPM<sub>50</sub>/CMI<sub>50</sub></b>	1,60	8,00	3,13	1,56	3,33	8,00	5,63	2,19
<b>CPM<sub>90</sub>/CMI<sub>90</sub></b>	3,00	8,00	1,56	1,56	1,50	10,00	6,25	3,13

n: número de cepas

Cipro R: ciprofloxacino resistente

Cipro S: ciprofloxacino sensible

CMI<sub>50</sub>: concentración mínima inhibitoria para el 50% de las cepas

CMI<sub>90</sub>: concentración mínima inhibitoria para el 90% de las cepas

CPM<sub>50</sub>: concentración preventiva de mutantes para el 50% de las cepas

CPM<sub>90</sub>: concentración preventiva de mutantes para el 90% de las cepas

Tabla 21: Datos farmacológicos de las fluoroquinolonas estudiadas.

	<b>Ciprofloxacino</b>	<b>levofloxacino</b>
<b>Cmax<sup>a</sup></b> <b>dosis única oral</b>	1.5-2.46 <sup>59,60</sup>	2.8- 9.4 <sup>67</sup>
<b>Cmax</b> <b>pacientes críticos</b>	2.6- 6.68 <sup>61,62</sup>	1.9- 8.2 <sup>68,69</sup>
<b>Cmax</b> <b>dosis múltiples</b>	3.61-4.2 <sup>63,64</sup>	8.6- 11.8 <sup>70</sup>
<b>AUC<sup>b</sup></b> <b>Dosis única oral</b>	5,75- 12 <sup>60,65</sup>	43.6- 108 <sup>67,71</sup>
<b>AUC</b> <b>pacientes críticos</b>	24.7-28.9 <sup>61</sup>	66.1 <sup>72</sup>
<b>AUC</b> <b>Dosis múltiples</b>	12.13-29.1 <sup>63,64</sup>	90.7-118 <sup>70</sup>
<b>EP<sup>c</sup></b>	1.9 <sup>65</sup>	9.9- 22.1 <sup>66</sup>
<b>MA<sup>d</sup></b>	34.9 <sup>65</sup>	28.5-105.1 <sup>66,73</sup>

a: Cmax: Concentración sérica máxima (mg/L);

b: AUC: Área total bajo la curva sérica (mg.h/L);

c: EP: Epitelio pulmonar (mg/L);

d: MA: Macrófago alveolar (mg/L).

Tabla 22: Relación entre los datos microbiológicos y farmacológicos de las cepas de *E coli* estudiadas para ciprofloxacino (CMI y CPM en mg/L).

GRUPOS	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<b>Cmax dosis única oral/CMI<sub>90</sub></b>	12-19.68	3-4.92	0.01-0.02	3-4.92	3-4.92	0.01-0.02	25-41	3-4.92	0.01-0.02
<b>Cmax pacientes críticos/CMI<sub>90</sub></b>	20.8-53.44	5.2-13.36	0.02-0.05	5.2-13.36	5.2-13.36	0.02-0.05	43.3-111.3	5.2-13.36	0.02-0.05
<b>Cmax dosis múltiples/CMI<sub>90</sub></b>	28.88-33.6	7.22-8.4	0.03-0.03	7.22-8.4	7.22-8.4	0.03-0.03	60.1-70	7.22-8.4	0.03-0.03
<b>AUC dosis única oral/CMI<sub>90</sub></b>	46-96	11.5-24	0.04-0.09	11.5-24	11.5-24	0.04-0.09	95.8-200	11.5-24	0.04-0.09
<b>AUC pacientes críticos/CMI<sub>90</sub></b>	197.6-231.2	49.4-57.8	0.19-0.22	49.4-57.8	49.4-57.8	0.19-0.22	411.6-481.6	49.4-57.8	0.19-0.22
<b>AUC dosis múltiples/CMI<sub>90</sub></b>	97.04-232.8	24.26-58.2	0.09-0.23	24.26-58.2	24.26-58.2	0.09-0.23	202.1-485	24.26-58.2	0.09-0.23
<b>EP/CMI<sub>90</sub></b>	15.2	3.8	0.01	3.8	3.8	0.01	31.6	3.8	0.01
<b>MA/CMI<sub>90</sub></b>	279.2	69.8	0.27	69.8	69.8	0.27	581.6	69.8	0.27
<b>Cmax dosis única oral/CPM<sub>90</sub></b>	30-49.2	1.5-2.46	0.015-0.024	1-1.64	0.03-0.05	0.015-0.024	1-1.64	0.03-0.05	0.01-0.02
<b>Cmax pacientes críticos/CPM<sub>90</sub></b>	52-133.6	2.6-6.68	0.026-0.066	1.73-4.45	0.05-0.15	0.026-0.06	1.73-4.45	0.05-0.15	0.02-0.06
<b>Cmax dosis múltiples/CPM<sub>90</sub></b>	72.2-84	3.61-4.2	0.036-0.042	2.41-2.8	0.08-0.09	0.036-0.042	2.41-2.8	0.08-0.09	0.03-0.04
<b>AUC dosis única oral/CPM<sub>90</sub></b>	115-240	5.75-12	0.057-0.12	3.8-8	0.12-0.26	0.057-0.12	3.8-8	0.12-0.26	0.05-0.12
<b>AUC pacientes críticos/CPM<sub>90</sub></b>	494-578	24.7-28.9	0.24-0.28	16.4-19.2	0.54-0.64	0.24-0.28	16.4-19.2	0.54-0.64	0.24-0.28
<b>AUC dosis múltiples/CPM<sub>90</sub></b>	242.6-582	12.13-29.1	0.12-0.29	8.1-19.4	0.26-0.64	0.12-0.29	8.1-19.4	0.26-0.64	0.12-0.29
<b>EP/CPM<sub>90</sub></b>	38	1.9	0.019	1.2	0.04	0.019	1.2	0.04	0.019
<b>MA/CPM<sub>90</sub></b>	698	34.9	0.34	23.2	0.77	0.34	23.2	0.77	0.34

CMI<sub>50</sub>: concentración mínima inhibitoria para el 50% de las cepas; CMI<sub>90</sub>: concentración mínima inhibitoria para el 90% de las cepas; CPM<sub>50</sub>: concentración preventiva de mutantes para el 50% de las cepas; CPM<sub>90</sub>: concentración preventiva de mutantes para el 90% de las cepas.

a: Cmax: Concentración sérica máxima (mg/L); b: AUC: Área total bajo la curva sérica (mg.h/L); c: EP: Epitelio pulmonar (mg/L); d: MA: Macrófago alveolar (mg/L).

A: *E coli* sensibles a quinolonas no BLEE; B: *E coli* resistentes a nalidíxico no BLEE; C: *E coli* resistente a ciprofloxacino no BLEE; D: *E coli* sensibles a quinolonas y BLEE (cefotaximasas); E: *E coli* resistentes a nalidíxico y BLEE (cefotaximasas); F: *E coli* resistentes a ciprofloxacino y BLEE

(cefotaximasas); G: *E coli* sensibles a quinolonas y BLEE (resistentes in vitro a cefotaxima y ceftazidima); H: *E coli* resistentes a nalidíxico y BLEE (resistentes in vitro a cefotaxima y ceftazidima)  
I: *E coli* resistentes a ciprofloxacino y BLEE (resistentes in vitro a cefotaxima y ceftazidima)





Tabla 23: Datos microbiológicos y farmacológicos de las cepas de *E coli* estudiadas para levofloxacino (CMI y CPM en mg/L).

GRUPOS	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<b>Cmax dosis única oral/CMI<sub>90</sub></b>	93.3-313.3	5.6-18.8	0.08-0.29	5.6-18.8	0.17-0.59	0.08-0.29	46.6-156.6	0.35-1.17	0.08-0.29
<b>Cmax pacientes críticos/CMI<sub>90</sub></b>	63.3-273.3	3.8-16.4	0.06-0.26	3.8-16.4	0.12-0.51	0.06-0.26	31.6-136.6	0.24-1.02	0.06-0.26
<b>Cmax dosis múltiples/CMI<sub>90</sub></b>	286.6-393.3	17.2-23.6	0.27-0.37	17.2-23.6	0.54-0.74	0.27-0.37	143.3-196.6	1.07-1.47	0.27-0.37
<b>AUC dosis única oral/CMI<sub>90</sub></b>	1453.3-3600	87.2-216	1.36-3.37	87.2-216	2.73-6.75	1.36-3.37	726-1800	5.45-13.5	1.36-3.37
<b>AUC pacientes críticos/CMI<sub>90</sub></b>	2203.3	132.2	2.06	132.2	4.13	2.06	1101.6	8.26	2.06
<b>AUC dosis múltiples/CMI<sub>90</sub></b>	3023.3-3933.3	181.4-236	2.83-3.68	181.4-236	5.67-7.37	2.83-3.68	1511.6-1966.6	11.34-14.75	2.83-3.68
<b>EP/CMI<sub>90</sub></b>	330-736.6	19.8-44.2	0.31-0.69	19.8-44.2	0.62-1.38	0.31-0.69	165-368.3	1.24-2.76	0.31-0.69
<b>MA/CMI<sub>90</sub></b>	950-3503.3	57-210.2	0.89-3.28	57-210.2	1.78-6.56	0.89-3.28	475-1751.6	3.56-13.14	0.89-3.28
<b>Cmax dosis única oral/CPM<sub>90</sub></b>	28-94	1.86-6.26	0.028-0.094	1.8-6.2	0.09-0.31	0.028-0.094	1.4-4.7	0.08-0.268	0.031-0.104
<b>Cmax pacientes críticos/CPM<sub>90</sub></b>	19-82	1.26-5.46	0.019-0.082	1.2-5.4	0.06-0.27	0.019-0.082	0.95-4.1	0.054-0.234	0.021-0.091
<b>Cmax dosis múltiples/CPM<sub>90</sub></b>	86-118	5.73-7.86	0.086-0.118	5.7-7.8	0.28-0.39	0.086-0.118	4.3-5.9	0.245-0.337	0.095-0.131
<b>AUC dosis única oral/CPM<sub>90</sub></b>	436-1080	29.06-72	0.436-1.08	29.1-72	1.45-3.6	0.436-1.08	21.8-54	1.245-3.085	0.484-1.2
<b>AUC pacientes críticos/CPM<sub>90</sub></b>	661	44.06	0.661	44.1	2.20	0.661	33.1	1.888	0.734
<b>AUC dosis múltiples/CPM<sub>90</sub></b>	907-1180	60.46-78.66	0.907-1.18	60.4-78.6	3.02-3.93	0.907-1.18	45.3-59	2.59-3.37	1.007-1.311
<b>EP/CPM<sub>90</sub></b>	99-221	6.6-14.73	0.099-0.221	6.6-14.7	0.33-0.73	0.099-0.221	4.95-11.1	0.282-0.631	0.11-0.245
<b>MA/CPM<sub>90</sub></b>	285-1051	19-70.06	0.285-1.05	19-70.1	0.95-3.50	0.285-1.051	14.25-52.5	0.814-3.002	0.316-1.167

CMI<sub>50</sub>: concentración mínima inhibitoria para el 50% de las cepas; CMI<sub>90</sub>: concentración mínima inhibitoria para el 90% de las cepas; CPM<sub>50</sub>: concentración preventiva de mutantes para el 50% de las cepas; CPM<sub>90</sub>: concentración preventiva de mutantes para el 90% de las cepas.

a: Cmax: Concentración sérica máxima (mg/L); b: AUC: Área total bajo la curva sérica (mg.h/L); c: EP: Epitelio pulmonar (mg/L); d: MA: Macrófago alveolar (mg/L).

A: *E coli* sensibles a quinolonas no BLEE; B: *E coli* resistentes a nalidíxico no BLEE; C: *E coli* resistente a ciprofloxacino no BLEE; D: *E coli* sensibles a quinolonas y BLEE (cefotaximasas); E: *E coli* resistentes a nalidíxico y BLEE (cefotaximasas); F: *E coli* resistentes a ciprofloxacino y BLEE (cefotaximasas); G: *E coli* sensibles a quinolonas y BLEE (resistentes in vitro a cefotaxima y ceftazidima); H: *E coli* resistentes a nalidíxico y BLEE (resistentes in vitro a cefotaxima y ceftazidima)  
I: *E coli* resistentes a ciprofloxacino y BLEE (resistentes in vitro a cefotaxima y ceftazidima)



#### 4.4.- Generación in vitro de mutantes tras exposición a fluoroquinolonas. Relación con la presencia de betalactamasas de espectro extendido.

En el modelo de generación in vitro de mutantes tras exposición a fluoroquinolonas, hemos observado una disminución de la sensibilidad en las cepas de *E coli* y *K pneumoniae* productoras y no productoras de BLEE. Las CMI de los mutantes generados las podemos ver en la tabla 24.

Tabla 24: CMI en  $\mu\text{g/ml}$  de las cepas estudiadas productoras y no productoras de betalactamasas de espectro extendido

DIA		0	5	10	15	20	25
<i>E COLI</i>	BLEE CTX-M-14	0.054	0,053	0,089	0,162	0,188	0.252
	NO BLEE	0.020	0,035	0,037	0,045	0,050	0.058
<i>K P</i>	BLEE CTX-M-9	0,627	5.97	6,658	11,917	18,167	19.94
	NO BLEE	0,039	0.299	0,344	5,646	9,170	11.74

##### 4.4.1- Generación in vitro de mutantes de *Escherichia coli*

La exposición a los tres antibióticos (ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino) provocó leves disminuciones de la sensibilidad antibiótica de los mutantes (ninguno superó una CMI de 1  $\mu\text{g/ml}$ ). En todos los casos los mutantes generados presentaban una disminución de la sensibilidad antibiótica a todas las fluoroquinolonas (tabla 25).

Tabla 25: Disminución de la sensibilidad a las quinolonas en cepas de *Escherichia coli*.

<i>E coli</i>	Antibiótico	CMI inicial (µg/ml)	CMI mutantes* (µg/ml)
no BLEE	Ciprofloxacino	0.015	0.047
	Levofloxacino	0.03	0.094
	Moxifloxacino	0.016	0.032
BLEE CTX-M-14	Ciprofloxacino	0.05	0.125
	Levofloxacino	0.064	0.250
	Moxifloxacino	0.047	0.380

\*Media de la CMI de los mutantes día 25

El tiempo necesario para desarrollar esta disminución en la sensibilidad dependió de la quinolona y su concentración de exposición así como de la presencia de BLEE. Así vemos que la cepa productora de BLEE genera mutantes más rápidamente (10 días de media) que la no productora (15 días de media) (tabla 26).

Al comparar la capacidad de generación de mutantes de las diferentes fluoroquinolonas, se observa que levofloxacino es la fluoroquinolona que genera mutantes más rápidamente (7,5 días de media versus 12.5 días para ciprofloxacino y 17.5 días para moxifloxacino) (tabla 26).

Tabla 26: Tiempo de aparición de los mutantes de *Escherichia coli* con sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas en días.

<i>E coli</i>	Ciprofloxacino	Levofloxacino	Moxifloxacino	Media
no BLEE	20	10	15	15
BLEE CTX-M-14	5	5	20	10
Media	12.5	7.5	17.5	

Si analizamos los datos en función de la concentración de antibiótico de exposición utilizada en la generación de mutantes, se observa que sólo las concentraciones más bajas de fármacos generan mutantes (10 y 15 días de media para la cepa productora y no productora de BLEE respectivamente para la concentración de 0.015 µg/ml). El resto de concentraciones de fármacos no generan mutantes para ninguno de los fármacos (tabla 27).

Tabla 27: Aparición de los mutantes de *Escherichia coli*, expresado en días según la concentración de fluoroquinolona de exposición.

<i>E coli</i>	0.015 (µgr/ml)	0.125 (µgr/ml)	1 (µgr/ml)
no BLEE	15	No mutantes	No mutantes
BLEE CTX-M-14	10	No mutantes	No mutantes

4.4.2- Generación in vitro de mutantes de *Klebsiella pneumoniae*

En todos los casos, los mutantes generados presentaban una disminución de la sensibilidad antibiótica a todas las fluoroquinolonas (tabla 28).

Tabla 28: Disminución de la sensibilidad a las quinolonas en cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

<i>K pneumoniae</i>	Antibiótico	CMI inicial (µg/ml)	CMI mutantes* (µg/ml)
<b>no BLEE</b>	Ciprofloxacino	0.023	0.43
	Levofloxacino	0.047	0.45
	Moxifloxacino	0.047	0.36
<b>BLEE CTX-M-9</b>	Ciprofloxacino	0.38	32
	Levofloxacino	0.5	1.16
	Moxifloxacino	1	26.66

\*Media de la CMI de los mutantes día 25

El tiempo necesario para desarrollar esta disminución en la sensibilidad dependió de la quinolona y su concentración de exposición así como de la presencia de BLEE. La cepa productora de BLEE genera mutantes más rápidamente (13,3 días de media) que la no productora (14,4 días de media) (tabla 29).

Al comparar la capacidad de generación de mutantes de las diferentes fluoroquinolonas, se observa que ciprofloxacino es la fluoroquinolona que genera mutantes más rápidamente (12,5 días de media versus 15 días para levofloxacino y 14,2 días para moxifloxacino) (tabla 29).

Tabla 29: Tiempo de aparición de los mutantes de *Klebsiella pneumoniae*, expresado en días, con sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas.

<i>K pneumoniae</i>	Ciprofloxacino	Levofloxacino	Moxifloxacino	Media
<b>no BLEE</b>	13.3	16.6	13.3	14.4
<b>BLEE CTX-M-9</b>	11.6	13.3	15	13.3
<b>Media</b>	12.5	14.9	14.2	

Si analizamos los datos en función de la concentración de antibiótico utilizada en la generación de mutantes, se observa que las concentraciones más elevadas de fármacos generan mutantes más rápidamente (5,8 días de media para la concentración de 1 µg/ml frente a 15 para la concentración 0.125 µg/ml y 20,8 días de media para la concentración 0.015 µg/ml (tabla 30).

Tabla 30: Aparición de los mutantes de *Klebsiella pneumoniae*, expresado en días, según la concentración de fluoroquinolona de exposición.

<i>K pneumoniae</i>	0.015 (µgr/ml)	0.125 (µgr/ml)	1 (µgr/ml)	Media
<b>no BLEE</b>	23.3	13.3	6.6	14.4
<b>BLEE CTX-M-9</b>	18.3	16.6	5	13.3
<b>Media</b>	20.8	14.9	5.8	

#### 4.5.-Caracterización genética de las cepas de *Escherichia coli*.

##### 4.5.1.-Detección de mutaciones en el gen *gyrA* de *E coli*.

Respecto al análisis genético de los mutantes, tanto la cepa productora de BLEE como la no productora generan mutantes con una mutación única en el aminoácido 87 (ácido aspártico cambia a glicina). Esta mutación se presenta con los tres antibióticos, ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino (figura 10). La mutación apareció antes en las cepas BLEE que en las no BLEE (10 días versus 15 días) y con la fluoroquinolona levofloxacino (7,5 días) antes que con ciprofloxacino (12,5 días) y moxifloxacino (17,5 días). Se observaron mutaciones con la concentración de fluoroquinolona de exposición de 0.015  $\mu$ gr/ml, con el resto de concentraciones subinhibitorias no se observaron mutaciones.

Figura 10: Detección de mutaciones en *gyrA* de *Escherichia coli*

```

g aactcacctt ccagatccca ccagcgggag gcgacggctt caaatttagc gatctcttcg tggctacgt tatggttac
cggcgatttt tcggcattca ttggcacttc tactccgtaa ttggcaagac aaacgagtat atcaggcatt ggatgtgaat
aagcgtata ggtttacctc aaactgcgcg gctgtgttat aattgcgac ctttgaatcc gggatacagt agagggatag
ggttagatg agcgaccttg cgagagaaat tacaccggtc aacattgagg aagagctgaa gagctcctat ctggattatg
cgatgtcggg cattgttggc cgtgcgctgc cagatgtccg agatggcctg aagccggtac accgtcgcgt actttacgcc
atgaacgtac taggcaatga ctggaacaaa gcctataaaa aatctgcccg tgcggttggg gacgtaatcg
gtaaatacca tccccatggt gac83tcggcgg tctat87gacac gattgtccgc atggcgcagc cattctcgt
gcgttatatg ctggtagacg gtcagggtaa cttcggttct atcgacggcg actctgcggc ggcaatgcgt tatacggaaa
tccgtctggc gaaaattgcc catgaactga tggccgatct cgaaaaagag acggtcgatt tcggtgataa ctatgacggc
acggaaaaaa ttccggacgt catgccaacc aaaattccta acctgctggt gaacggttct tccggtatcg ccgtaggtat
ggcaaccaac atcccggcg acaacctgac ggaagtcac aacggttgc tggcgtatat tgatgatgaa
gacatcagca ttgaagggt gatggaacac atcccggggc cggactccc gacggcggca atcattaacg
gtcgtcgcgg tattgaagaa gcttaccgta ccggtcgcgg c aaggtgat atccgcgctc

```



#### 4.5.2.-Detección de mutaciones en el gen *parC* de *E coli*.

No se han detectado mutaciones en *parC* de *E coli* en cepas productoras ni en cepas no productoras de BLEE.

#### 4.6.- Caracterización genética de las cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

##### 4.6.1- Detección de mutaciones en el gen *gyrA* de *K pneumoniae*

Tras exposición a las tres fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino), se han detectado las siguientes mutaciones: ser83 --> Leu83 y Asp87 --> Asn87 que se han observado juntas en las mismas cepas y con los tres antibióticos.

Las mutaciones se observaron antes en cepas productoras de BLEE (13,3 días) que en cepas no BLEE (14,4 días). Ciprofloxacino ha sido la fluoroquinolona con la que antes se ha visto la mutación (12,5 días) frente a levofloxacino (14,9 días) y moxifloxacino (14,2 días). Se observaron mutaciones con las tres concentraciones subinhibitorias de exposición, aunque la concentración de 1 µgr/ml ha sido la que presentó mutantes más precozmente (5,8 días frente a 14,9 y 20,8 días).

##### 4.6.2- Detección de mutaciones en el gen *parC* de *K pneumoniae*.

No se han detectado mutaciones en *parC* de *K pneumoniae*, ni en cepas productoras ni en cepas no productoras de BLEE.

#### 4.7.- Análisis de microarrays en cepas de *Escherichia coli* con la plataforma GENECHIP® de AFFYMETRIX®

Se han analizado los resultados de expresión génica obtenidos a partir de 18 muestras de RNA procedentes de cultivos de *E coli*. Las características de las muestras analizadas se detallan en la tabla 30 (reproducción de la tabla 5).

El chip utilizado fue el E\_coli\_2 (Affymetrix) que interroga 10208 secuencias.

Tabla 31: Descripción de las muestras utilizadas en el análisis.

<i>E coli</i>	BLEE	(+)/(-)	MUESTRAS
Cipro R	SI	(+)	08SE1960, 08SE1711, 08SE921
		(-)	08SE1958, 08SE1709, 08SE930
	NO	(+)	08SE1954, 08SE1705, 08SE932
		(-)	08SE1952, 08SE1703, 08SE932
Cipro S	SI	(-)	08SE1956, 08SE1708, 08SE925
	NO	(-)	08SE1950, 08SE1702, 08SE927

**BLEE** betalactamasas de espectro extendido

(+) cepa expuesta a antibióticos

(-) cepa no expuesta a antibióticos.

Cipro R: ciprofloxacino resistente

Cipro S: ciprofloxacino sensible

Al aplicar herramientas estadísticas se obtienen listas de sondas que presentan diferencias entre las muestras comparadas (con un valor de significación p, que por defecto es seleccionado como 0.05).

Los datos de los GeneChips fueron filtrados para eliminar las secuencias control (96) y aquellas secuencias con señal de hibridación cercana al fondo (background). El número de secuencias que pasaron dicho filtro (secuencias seleccionadas) fue de 5662.

De esta lista de 5662 secuencias se filtró para eliminar aquellas sondas que no presentasen ningún cambio de expresión en todas las muestras. El valor utilizado como límite de cambio de expresión entre condiciones permite eliminar secuencias que no varían en la comparación entre cualquier muestra del experimento y por lo tanto no son informativas. Este filtrado dio lugar a un listado de 4400 secuencias que forman la lista de trabajo.

#### 4.7.1- Análisis estadístico.

Para la identificación de cambios en la expresión estadísticamente significativos entre los grupos de muestras se realizó un modelo de regresión lineal teniendo en cuenta diversos factores:

$$Y_i = R/S + P/NP + (+/-) + R/S * P/NP * (+/-) + \epsilon$$

Donde:  $Y_i$  es la intensidad Y para cada secuencia i, “ $R/S$ ” se refiere al efecto de ser sensible o resistente, “ $P/NP$ ” al hecho de ser productor o no de BLEES, (+/-) al hecho de estar expuesto a no antibiótico, “ $R/S * P/NP * (+/-)$ ” a la interacción de todos los factores y “ $\epsilon$ ” el error no medible que reúne la parte no predicha del resto de variables.

De esta manera, se pueden obtener las secuencias diferencialmente expresadas debido a cada uno de los factores estudiados.

#### 4.7.2- Comparaciones hechas entre las condiciones estudiadas.

El objetivo de este análisis es obtener secuencias diferencialmente expresadas entre las condiciones estudiadas. Para el cálculo de la tasa de cambio de expresión entre

las distintas condiciones, se selecciona como condición basal o línea base la condición que se encuentre en segundo lugar en la comparación.

Las comparaciones que se realizaron en el experimento fueron las siguientes:

1. Cepas resistentes y no BLEE no expuestas a antibiótico versus cepas sensibles y no BLEE no expuestas a antibiótico.
2. Cepas sensibles y BLEE no expuestas a antibiótico versus cepas sensibles y no BLEE no expuestas a antibiótico.
3. Cepas resistentes y no BLEE expuestas a antibiótico versus cepas resistentes y no BLEE no expuestas a antibiótico.
4. Cepas resistentes y BLEE no expuestas a antibiótico versus cepas resistentes y no BLEE no expuestas a antibiótico.
5. Cepas resistentes y BLEE expuestas a antibiótico versus cepas resistentes y BLEE no expuestas a antibiótico.
6. Cepas resistentes y BLEE expuestas a antibiótico versus cepas resistentes y no BLEE expuestas a antibiótico.

El interés del presente experimento es identificar las diferencias de expresión debidas a los diversos factores contemplados. Los resultados del análisis estadístico se resumen en la tabla 32. En esta tabla también aparecen las secuencias que pueden aparecer significativas por azar, es decir, ser falsos positivos (error de tipo I).

Tabla 32. Secuencias diferencialmente expresadas entre las condiciones estudiadas: resultados resumidos del análisis estadístico:

Nº	Comparación	Secuencias significativas	Falsos positivos
<b>1</b>	RNP(-) vs SNP(-)	183	220
<b>2</b>	SP(-) vs SNP(-)	316	220
<b>3</b>	RNP(+) vs RNP(-)	3	220
<b>4</b>	RP(-) vs RNP(-)	37	220
<b>5</b>	RP(+) vs RP(-)	9	220
<b>6</b>	RP(+) vs RNP(+)	41	220

RNP cepa resistente no productora de BLEE

SNP cepa sensible no productora de BLEE

SP cepa sensible productora de BLEE

RP cepa resistente productora de BLEE

(+) exposición a antibióticos

(-) no exposición a antibióticos.

Como se ha podido comprobar en la tabla resumen y teniendo en cuenta todas las comparaciones, hay un total de 589 secuencias que muestran cambios estadísticamente significativos de una condición con respecto a la condición base especificada en segundo lugar.

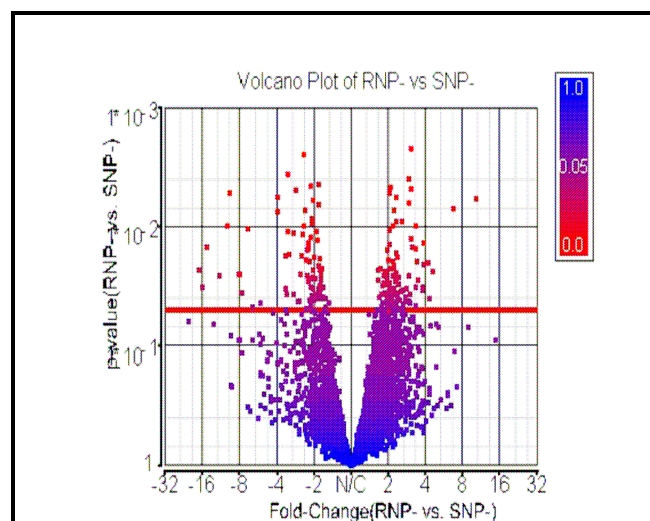
Cada una de estas secuencias va acompañada en la base de datos original con el nombre del gen, la hipotética función en la que puede participar y el código para su acceso en el Gene Bank. Las sondas consideradas significativas en las distintas comparaciones las podemos ver en el Apéndice 1.

En el archivo se muestra el p-value asociado a cada secuencia tras el test estadístico utilizando el software Partek. Cuanto menor sea el valor de p, más significativa es la diferencia de expresión entre las condiciones a efectos estadísticos.

Esto se hace observando los valores de Fold Change (FC) o valor del cambio de expresión de cada secuencia relativa a la línea de base considerada, que será la que se encuentre en segundo lugar en la comparación. A mayor valor absoluto de FC (con signo negativo para las secuencias reprimidas y positivo para las sobreexpresadas) mayor será la tasa de cambio.

A continuación mostramos el “Volcano plot” de la comparación 1 RNP(-) vs SNP(-) (figura 11), es un gráfico que muestra de una manera rápida y fácil la significación y la tasa de cambio asociada a cada sonda. En el eje X se representa la tasa de cambio entre los dos grupos comparados y muestra el impacto biológico del cambio. En el eje Y se representa el p valor asociado a cada sonda y nos informa acerca de la evidencia estadística del cambio. La línea roja horizontal muestra el umbral a partir del cual las sondas son significativas. Cada uno de los puntos del gráfico representa una de las sondas de la lista de trabajo.

Figura 11: “Volcano plot” de la comparación 1 RNP(-) vs SNP(-)



#### 4.7.3-Análisis de resultados

En la tabla 32 podemos ver las secuencias diferencialmente expresadas entre las condiciones estudiadas de forma resumida. Lo que aportan estas seis comparaciones:

- Comparación nº1 genes implicados en la resistencia a ciprofloxacino en cepas no productoras de BLEE: se han detectado 183 genes que modifican estadísticamente su actividad para lograr la resistencia de la bacteria al antibiótico.
- Comparación nº2 genes asociados a la producción de BLEE en cepas S a ciprofloxacino: se han detectado 316 genes que modifican estadísticamente su actividad cuando la cepa es productora de BLEE.
- Comparación nº3 genes implicados en la respuesta a ciprofloxacino en cepas no BLEE en cultivo con este antibiótico: cuando una cepa no BLEE y resistente a ciprofloxacino se pone en contacto con un cultivo que contiene este antibiótico hay 3 genes que modifican estadísticamente su expresión. Estos genes los podemos ver en la tabla 29 así como su posible función y en las otras comparaciones en las que aparecen.
- Comparación nº4 genes implicados en la resistencia a ciprofloxacino en cepas BLEE y no BLEE: al comparar los genes que modifican su expresión en cepas resistentes a ciprofloxacino según sea o no BLEE detectamos la sobreexpresión de 37 genes.
- Comparación nº5 respuesta a ciprofloxacino en BLEE: cuando una cepa BLEE y resistente a ciprofloxacino se pone en contacto con un cultivo que contiene ciprofloxacino hay 9 genes que modifican estadísticamente su expresión. Estos

genes los podemos ver en la tabla 30 así como su posible función y en las otras comparaciones en las que aparecen.

- Comparación n°6 genes que se expresan en cepas BLEE al entrar en contacto con ciprofloxacino: al poner en contacto con ciprofloxacino una cepa BLEE y otra no BLEE ambas resistentes a este antibiótico observamos que modifican su actividad 41 genes.

A continuación detallamos las siguientes comparaciones: número 3 (tabla 33), la número 4 (tabla 34), la número 5 (tabla 35) y la número 6 (tabla 36). En estas tablas se señalan las sondas o genes significativos (los que presentaron cambios de expresión estadísticamente significativos mediante un modelo de regresión lineal).

Tabla 33: Comparación número 3: cepas resistentes a ciprofloxacino y no productoras de BLEE expuestas a antibiótico versus no expuestas a antibiótico.

GEN	P	FUNCION	Presente en la comparación n°
	0,0234536	Nitrito reductasa	1
<b>trxC</b>	0,0352343	hypothetical protein	1y 4
<b>grxA</b>	0,0395339	hypothetical protein	1y 2

p nivel de significación estadística



Tabla 34: Comparación número 4: cepas resistentes a ciprofloxacino y productoras de BLEE no expuestas a antibiótico versus cepas resistentes a ciprofloxacino y no productoras de BLEE no expuestas a antibiótico.

GEN	P	FUNCION	Presente en la comparación n°
<b>c1416</b>	0,00127148	hypothetical protein	4 y 6
---	0,00189409	---	
<b>c1417</b>	0,00345586	hypothetical protein	4 y 6
<b>rzoD</b>	0,00428501	endopeptidase	1, 4 y 6
<b>hisI</b>	0,0087701	phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase/phosphoribosyl-ATP pyrophosphatas	4 y 6
<b>c4650</b>	0,0127742	hypothetical protein	4 y 6
---	0,0137304	---	
---	0,0142601	---	
<b>ydbA</b>	0,022253	transposase	1, 2, 4 y 6
---	0,0224826	---	
<b>ydfR</b>	0,0231004	hypothetical protein	4 y 6
<b>fepA</b>	0,0238712	outer membrane receptor FepA	4 y 6
<b>rzpD</b>	0,0238747	endopeptidase	1, 4 y 6
<b>c0275</b>	0,0239659	hypothetical protein	4
<b>yfcl</b>	0,0261829	hypothetical protein	4
---	0,0278119	---	
<b>yfbB</b>	0,0278713	acyl-CoA thioester hydrolase	1,2,4
<b>c3603</b>	0,0296276	hypothetical protein	4 y 6
<b>trxC</b>	0,0305139	thioredoxin 2	1,4
<b>c3602</b>	0,032127	hypothetical protein	4
---	0,032404	---	
<b>c3159</b>	0,0330764	putative tail component of prophage	4
<b>c3925</b>	0,0335589	hypothetical protein	1,2,4
---	0,0353071	---	
<b>c1526</b>	0,0365853	hypothetical protein	4
<b>ampG</b>	0,0372134	muropeptide transporter	1,2,4
<b>c1425</b>	0,0379342	hypothetical protein	4 y 6
<b>yfhP</b>	0,0400823	DNA-binding transcriptional regulator	4
<b>c5447</b>	0,0426842	hypothetical protein	4 y 6
<b>c1414</b>	0,0432558	hypothetical protein	4
<b>ydaF</b>	0,0434319	hypothetical protein	4
<b>c2757</b>	0,0461599	hypothetical protein	4
<b>fimB</b>	0,046396	tyrosine recombinase	4
<b>ralR</b>	0,0481605	restriction alleviation and modification protein	4
<b>yiiE</b>	0,0487102	hypothetical protein	1,4
<b>recT</b>	0,0490091	recombination and repair protein RecT	4
<b>moeA</b>	0,0492791	molybdopterin biosynthesis protein	1,2,4

p nivel de significación estadística

Tabla 35: Comparación número 5: cepas resistentes a ciprofloxacino y productoras de BLEE expuestas a antibiótico versus no expuestas a antibiótico.

GEN	P	FUNCION	Presente en la comparación n°
<b>hybA</b>	0,0199584	Hydrogenase 2 protein (forma parte del complejo respiratorio)	6
<b>thil</b>	0,0315384	Proteína que cataliza el último paso de la síntesis de tiamina	6
<b>yfbs</b>	0,0340763	Transportador de membrana	2
<b>ffs</b>	0,0360675	Función desconocida	
<b>infA</b>	0,0394134	Antiterminador de la transcripción de RNA.	
<b>Nrfc</b>	0,0397636	Nitrito reductasa	3
<b>ogt</b>	0,0434021	Metil transferasa (repara lesiones por alquilos en el DNA)	
<b>smpB</b>	0,0464896	Marca proteínas mal sintetizadas para su degradación.	
<b>narX</b>	0,046541	Histidina quinasa (sensor para medir la relación nitrato/nitrito)	

p nivel de significación estadística

Tabla 36: Comparación número 6: cepas resistentes a ciprofloxacino y productoras de BLEE expuestas a antibiótico versus cepas resistentes a ciprofloxacino y no productoras de BLEE expuestas a antibiótico.

GEN	P	FUNCION	Presente en la comparación n°
<b>c5447</b>	0,00148192	hypothetical protein	4,6
<b>c1416</b>	0,00155949	hypothetical protein	4,6
<b>hisI</b>	0,00251452	bifunctional phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase/phosphoribosyl-ATP pyrophosphatas	4,6
<b>c1417</b>	0,00394551	hypothetical protein	4,6
<b>treR</b>	0,00491079	DNA-binding transcriptional repressor	6
<b>fepA</b>	0,00492181	outer membrane receptor FepA	4,6
---	0,00640786	---	
<b>yrbI</b>	0,00742008	3-deoxy-D-manno-octulosonate phosphatase /// 3-deoxy-D-manno-octulos 8-phosphate	6
<b>c5447</b>	0,00781102	hypothetical protein	4,6
---	0,00873306	---	
<b>ECs2447</b>	0,00966202	nucleotide excision repair endonuclease	6
<b>thiI</b>	0,0102769	sulfurtransferase required for thiamine and 4-thiouridine biosynthesis	5,6
<b>hybA</b>	0,0103349	hydrogenase 2 protein HybA	5,6
<b>c3668</b>	0,0133586	hypothetical protein	6
<b>baeR</b>	0,0154064	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with BaeS ///	6
<b>rzoD</b>	0,0160246	putative endopeptidase	1,4,6
<b>exoO</b>	0,0161179	hypothetical protein /// putative exonuclease	6
<b>renD</b>	0,0164991	Ren protein /// pseudo	6
<b>insK</b>	0,0180297	IS150 conserved protein InsB	6
<b>c2785</b>	0,0213828	hypothetical protein	6
<b>ybjR</b>	0,02165	predicted amidase and lipoprotein	6
<b>ydbA</b>	0,0240552	transposase insI	1,2,4,6
<b>ydjI</b>	0,0243205	putative aldolase /// hypothetical protein	6
<b>c5416</b>	0,0291674	hypothetical protein	6
---	0,0330734	---	
<b>yjhH</b>	0,0338811	KpLE2 phage-like element; predicted lyase/synthase	2,6
<b>gpmA</b>	0,0346733	phosphoglyceromutase	6
<b>hisF</b>	0,039217	imidazole glycerol phosphate synthase	6
---	0,039319	---	
<b>c3603</b>	0,0396994	hypothetical protein	4,6
<b>cobS</b>	0,03988	cobalamin synthase	6
---	0,0439904	---	
<b>yhhY</b>	0,0440643	predicted acetyltransferase	6
<b>ydfR</b>	0,0444738	hypothetical protein	4,6
<b>yfbV</b>	0,0445554	hypothetical protein prote	6
<b>c1425</b>	0,0446418	hypothetical protein	4,6
<b>rzpD</b>	0,0447432	endopeptidase	1,4,6
<b>rfaP</b>	0,0458495	lipopolysaccharide core biosynthesis protein	1,2,6
<b>arnT</b>	0,0473623	4-amino-4-deoxy-L-arabinose transferase	6
---	0,0480384	---	
<b>hisD</b>	0,0486747	histidinol dehydrogenase	6

p nivel de significación estadística

## 5.- DISCUSIÓN



Las infecciones por enterobacterias tienen una gran importancia clínica, tanto en el ámbito hospitalario como en atención primaria; se asocian a diferentes procesos, muchos de ellos graves y en muchas ocasiones es necesaria la administración empírica de antibióticos. Este proceso debe basarse en las guías de práctica clínica, la situación clínica de cada paciente y la epidemiología bacteriana local, ya que hay grandes diferencias en las tasas de resistencias de los diferentes patógenos en función de la zona geográfica y las características de cada paciente. Por tanto, es muy importante conocer la situación de las resistencias antibióticas en cada medio para poder adoptar las pautas de actuación adecuadas en cada caso.

La aparición de aislados clínicos de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido ha supuesto un importante cambio en el manejo clínico de las infecciones graves asociadas a estos patógenos, ya que este tipo de enzimas inactiva a todos los fármacos betalactámicos excepto a los carbapenems, lo que limita de forma muy importante el arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de estos casos. Las fluoroquinolonas podrían ser una muy buena alternativa terapéutica pero se ha comprobado repetidamente que las cepas productoras de estas enzimas son frecuentemente resistentes además a estos compuestos.

Por tanto, una de las labores más importantes de los microbiólogos clínicos es aportar datos sobre la situación local de la resistencia antibiótica para mejorar los tratamientos empíricos que se utilizan en cada medio, sin embargo, este proceso es complejo y sujeto a variaciones metodológicas. Así, al analizar los datos de sensibilidad de un patógeno se observa que un mismo paciente puede tener muchos aislados en días y localizaciones diferentes y esta multiplicidad puede alterar los resultados globales de la epidemiología local. Para solucionar este problema, Clinical and Laboratory

Standards Institute (CLSI) recomendó que se tuviera en cuenta sólo el primer aislado de cada paciente<sup>48</sup>, pero este criterio no toma en cuenta la posible aparición de cepas resistentes que se produce durante el tratamiento, ya sea por selección de mutantes o por sobreinfección por microorganismos resistentes provenientes del entorno.

En nuestro estudio, hemos analizado la evolución de la resistencia a fluoroquinolonas, empleando diferentes criterios de eliminación de duplicados<sup>48,49</sup>, en las dos especies de enterobacterias más frecuentemente implicadas en patología humana para conocer su evolución y las diferencias que presentan las cepas productoras y no productoras de betalactamasas de espectro extendido.

Hemos observado que el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino en *E. coli* va aumentando a lo largo del periodo de estudio de 17 años desde 13,9% en el año 1992 (primer año de estudio) hasta 23,8% al final del estudio (año 2008) según criterios CLSI<sup>48</sup>. Otros autores observaron el mismo fenómeno<sup>74,75</sup>, en cambio otros detectaron una disminución en el número de cepas resistentes a ciprofloxacino<sup>76</sup>. Este porcentaje es más elevado en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido que en cepas no productoras; considerando la media de nuestro periodo de estudio, vemos que el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino en cepas BLEE es mucho mayor que en no BLEE (64,6% versus 21,2% respectivamente).

El incremento de las tasas de resistencia a fluoroquinolonas ha sido descrito por numerosos autores y se ha encontrado una estrecha relación entre el incremento en la resistencia a estos antibióticos y el consumo de los mismos<sup>77</sup>.

En cuanto a los factores de riesgo relacionados con la aparición de cepas de *E. coli* resistentes a ciprofloxacino, se ha descrito que el uso de fluoroquinolonas en los 6 meses previos, la duración del tratamiento previo con ciprofloxacino o con

levofloxacin y la duración de la hospitalización previa al ingreso en UCI se ha asociado a este fenómeno<sup>78,79</sup>. En un estudio español<sup>80</sup> se comunicó que tanto las cepas *E coli* resistentes a ciprofloxacino como las productoras de betalactamasas de espectro extendido fueron más frecuentes en pacientes mayores de 60 años con importantes diferencias interregionales. En otro estudio se ha visto mayor frecuencia de cepas resistentes a ciprofloxacino en pacientes varones, más frecuentemente en pacientes ancianos, en infecciones nosocomiales y señala el esputo como el tipo de muestra donde es más frecuente este tipo de infecciones<sup>81</sup>.

También en *K pneumoniae* el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino va aumentando a lo largo del periodo de estudio de 17 años desde 1,3% hasta 9,7% al final del estudio según criterios CLSI. La tasa de resistencia a ciprofloxacino es más elevada en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido que en cepas no productoras. Considerando la media de nuestro periodo de estudio, vemos que el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino en aislados productores de BLEE es mucho mayor que en cepas no BLEE (34,8% versus 5,8%), como ya han comunicado otros autores<sup>82</sup>. También otras publicaciones han comunicado que las resistencias a otros antibióticos son más frecuentes en cepas productoras de BLEE<sup>18,83</sup>.

En otros estudios se ha visto que el porcentaje de cepas BLEE aisladas ha sido significativamente mayor en cepas de *E coli* resistentes a ciprofloxacino. En este mismo trabajo no se han observado diferencias significativas con respecto a *K pneumoniae*<sup>39</sup>.

Como señalan otros autores, este incremento en cepas productoras de BLEE puede estar en relación con el consumo de antibióticos<sup>83</sup> ya que una disminución en el mismo reduce la aparición de cepas *E coli* y *K pneumoniae* productoras de BLEE<sup>84</sup>; aunque en otras publicaciones se ha visto que a pesar de controlar el consumo de

cefalosporinas y betalactámicos se ha producido un incremento en el número de cepas BLEE<sup>75</sup>. Respecto al consumo de antibióticos y el desarrollo de resistencias a los mismos, algunas publicaciones han demostrado la asociación significativa entre consumo de amoxicilina y resistencia a fluoroquinolonas o el consumo de fluoroquinolonas y la resistencia a ampicilina<sup>85</sup>. En cuanto a la relación entre el consumo de fluoroquinolonas y la resistencia a las mismas los resultados son contradictorios, lo que refleja la complejidad de este fenómeno<sup>85,86,87,88</sup>.

Nuestras tasas de resistencia a ciprofloxacino son menores que las descritas por el estudio europeo (EARSS) para nuestro país realizado en 2008<sup>89</sup>. El porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino es inferior tanto en *E coli* (23,8% versus 32,5%) como en *K pneumoniae* (9,7% versus 14,9%).

Como se observa en la figura 12, en el caso de *E coli* nos encontramos en una tasa de resistencia a fluoroquinolonas similar a la de países como Francia, Alemania o Inglaterra. En el caso de *K pneumoniae* (figura 13) nuestra tasa de resistencia es semejante a la de países como Inglaterra, Suecia o Bélgica.



Figura nº 12: Cepas de *Escherichia coli* resistentes a fluoroquinolonas año 2008<sup>89</sup>.

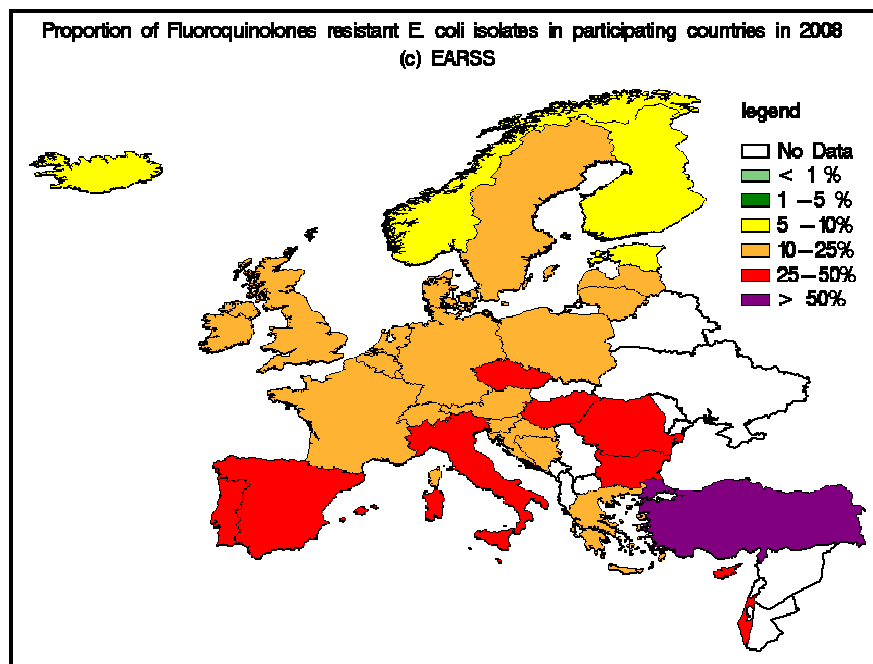
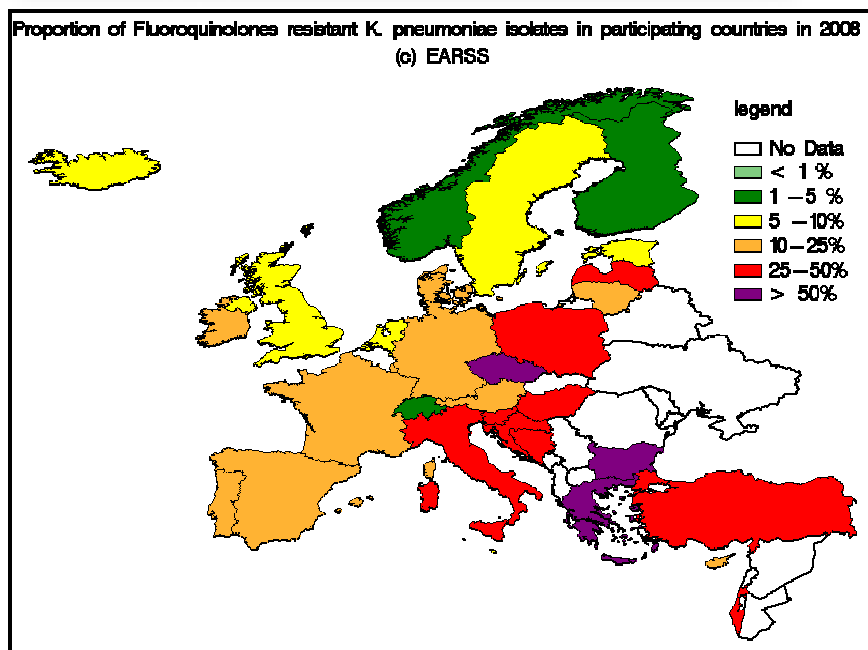


Figura nº 13: Cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a fluoroquinolonas año 2008<sup>89</sup>.



En comparación con los resultados de aislados clínicos resistentes a ciprofloxacino en la Comunidad Valenciana<sup>90</sup> referentes al año 2008, nuestros datos de resistencia a ciprofloxacino son también inferiores a éstos (23,8% versus 30,16% en cepas de *E coli* y 9,7% versus 12,46% en cepas de *K pneumoniae*).

Aunque los porcentajes ofrecidos por las distintas publicaciones no sean coincidentes entre sí, sí existe una tendencia en todos ellos y es la disminución en la sensibilidad a fluoroquinolonas en *E coli* y *K pneumoniae*

En cuanto a la aparición de cepas BLEE hemos detectado también un aumento en el número de cepas productoras de BLEE tanto en *E coli* como en *K pneumoniae* en el periodo estudiado. Así hemos pasado de 0,3% cepas de *E coli* productoras de BLEE en 1992 a 9,6% en 2008, año final del estudio. Este porcentaje de cepas productoras de BLEE supera el estimado por otros autores para nuestro país<sup>91,92</sup>. No ocurre así en el caso de *K pneumoniae*, hemos pasado de 0% de cepas BLEE a 2,5% en el año 2008, mientras que otras publicaciones señalan porcentajes mayores para *K pneumoniae* productora de BLEE<sup>6,93</sup>. Este incremento en el número de cepas BLEE también ha sido comunicado en otros trabajos con porcentajes de cepas BLEE similares a los nuestros o superiores<sup>75,82,84,94,95,96,97</sup> así como en el estudio europeo EARSS<sup>89</sup>; sin embargo, en algunos ámbitos se ha descrito una disminución en el número de cepas *K pneumoniae* productoras de BLEE<sup>97</sup>.

Se han realizado numerosas investigaciones que tratan de explicar este incremento en el número de cepas BLEE y se han señalado numerosos factores de riesgo en relación con la aparición de cepas de *E coli* productoras de BLEE como el tratamiento previo con cefalosporinas de 3º generación<sup>98</sup>, diabetes mellitus, el

tratamiento previo con fluoroquinolonas, ITU recurrentes, ingreso previo y pacientes ancianos<sup>20,44</sup>.

También en infecciones adquiridas en la comunidad se han señalado diferentes factores de riesgo asociados a la adquisición de infecciones por bacterias productoras de BLEE como la hospitalización previa en los últimos meses, el tratamiento antibiótico en los tres últimos meses o tratamiento intravenoso, paciente mayor de 60 años, diabetes, paciente varón, infección por *K pneumoniae*, uso previo de cefalosporinas de 2<sup>a</sup> o 3<sup>a</sup> generación, uso previo de quinolonas y uso previo de penicilina<sup>21,99</sup>.

Así mismo se señaló el catéter urinario, procedimientos invasivos en las 72 horas previas y un aumento en el número de antibióticos administrados en los últimos 30 días como factores de riesgo independientes en la adquisición de infecciones por *K pneumoniae* productora de BLEE<sup>100</sup>. La exposición previa a cefalosporinas de 3<sup>a</sup> generación fue un factor independiente de riesgo para la adquisición de *K pneumoniae* productora de BLEE<sup>101,102</sup>. Otros trabajos señalan el incremento en cepas BLEE a pesar de la disminución en el consumo de cefalosporinas y betalactámicos<sup>75</sup>.

En el caso de bacteriemias por *K pneumoniae* productora de BLEE se señalaron factores de riesgo como la terapia antibiótica, la edad del paciente y duración de la estancia hospitalaria. En el caso de *K pneumoniae* no productora de BLEE, la ITU previa y la duración de la estancia hospitalaria fueron factores independientes de riesgo. En este mismo estudio se señaló casi el doble de fallos en el tratamiento de cepas BLEE y una mortalidad mucho mayor con respecto a cepas no productoras de BLEE<sup>103</sup>.

Otros factores implicados en la adquisición de infecciones por *E coli* productora de BLEE fueron el género femenino, la utilización de sonda nasogástrica y tratamiento

antibiótico previo. En este estudio las infecciones quirúrgicas y las ITU fueron las más frecuentes<sup>104</sup>.

En este sentido los porcentajes de cepas productoras de BLEE en el estudio europeo<sup>89</sup> en el año 2008 fue del 9,0% para *E coli* y 11,9% para *K pneumoniae*. Nuestras cifras son similares en el caso de *E coli* pero es muy inferior en el caso de *K pneumoniae* (9,6% y 2,5% respectivamente en el año 2008 en nuestro estudio). Nuestras tasas de *K pneumoniae* productoras de BLEE son semejantes a la de países como Inglaterra. Los datos se detallan en las figuras 14 y 15.

Figura nº 14: Cepas de *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de 3ª generación año 2008<sup>89</sup>.

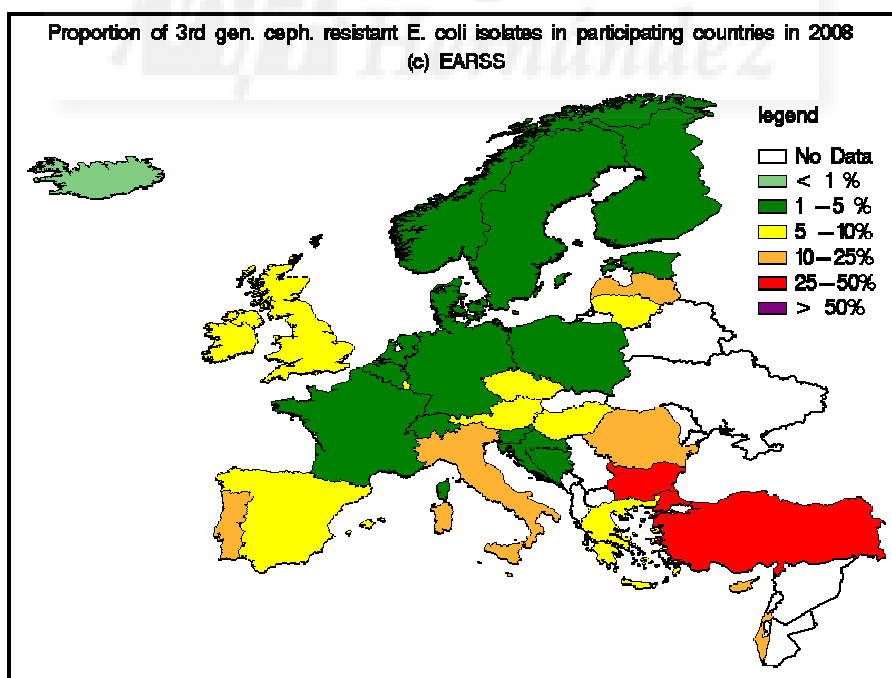
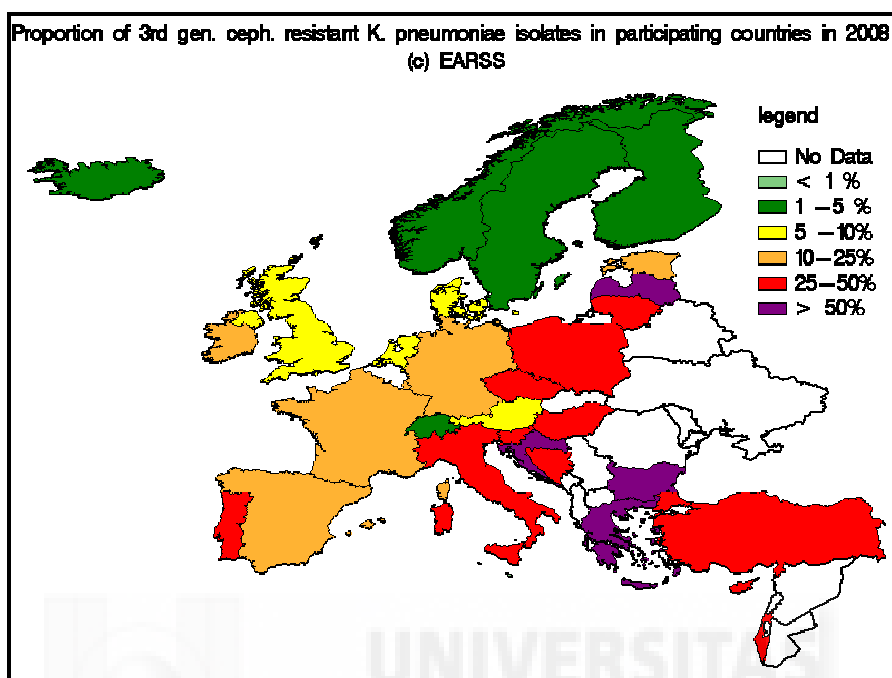


Figura nº 15: Cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de 3ª generación año 2008<sup>89</sup>.



No se conoce con exactitud la causa de estas diferencias entre las diferentes áreas geográficas, pero se ha sugerido que los plásmidos y la dispersión de genes pueden ser causas asociadas a estas diferencias<sup>105</sup>.

En el caso de los datos en la Comunidad Valenciana<sup>90</sup>, el porcentaje de cepas BLEE es también similar en el caso de *E coli* y también superior en el caso de *K pneumoniae* (9,89% y 8,13% respectivamente versus 9,6% y 2,5% en nuestro estudio).

Sin embargo, el valor de todos estos datos está muy relacionado con el criterio de eliminación de duplicados que se emplee a la hora de realizar estos estudios. Así, a pesar de que el CLSI<sup>48</sup> recomienda el análisis de resistencia empleando el primer aislado de cada paciente, las recomendaciones del grupo europeo<sup>49</sup> muestran la

posibilidad de utilizar el criterio del antibiograma como alternativa. En nuestro estudio, se observa que con éste último criterio, la tasa de resistencia a ciprofloxacino es más elevada así como el porcentaje de cepas BLEE en nuestro medio.

En *E coli*, se observa que existen diferencias al analizar los datos de resistencia a ciprofloxacino aplicando el criterio del CLSI o el criterio europeo de la variación en la sensibilidad antibiótica; así, el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino en el año 2008 pasa del 23.8% al 30.3%. Este incremento también aparece al analizar el conjunto de las cepas resistentes a ciprofloxacino aisladas durante el periodo de estudio, tanto en cepas BLEE como en no BLEE (64,6% versus 67,0% y 21,2% versus 24,4% respectivamente). Esto también se aprecia en otros estudios lo que hace cuestionarse el uso de uno u otro criterio a la hora de valorar las cepas aisladas<sup>106,107,108,109,110</sup>.

La aplicación de estos dos criterios también afecta a la prevalencia de estos microorganismos, así en *E.coli*, la aplicación del segundo criterio hace que se detecte un 18,8% más de cepas, un 37,1% más de resistencias a ciprofloxacino y 45,1 % más de cepas BLEE.

En pacientes ingresados, se observa el mismo fenómeno al aplicar los criterios del CLSI o los criterios del ESMID, aumentando el número absoluto de cepas (34,7%), la tasa de cepas productoras de BLEE (12,2%) y la tasa de resistencia a ciprofloxacino (49,5% ).

En pacientes no ingresados, se observa también un incremento en el número de cepas totales (14,1%), de cepas productoras de BLEE (65,4%) y de cepas resistentes a ciprofloxacino (33,1%).

Al analizar los datos en función del tipo de muestra, se observa que el criterio CLSI, con respecto al criterio EARSS, detecta menor número de cepas, menores porcentajes de cepas resistentes así como menor número y porcentaje de cepas BLEE. En relación con otros estudios hemos detectado un porcentaje inferior de cepas BLEE aisladas en orina<sup>111</sup> y en muestras de piel y tejidos blandos<sup>112</sup> considerando el criterio del CLSI. La tasa de resistencia a ciprofloxacino en *E coli* es más alta en muestras de piel y tejidos, lo que coincide con los datos de la Comunidad Valenciana (RedMIVA).

También en *K pneumoniae*, el criterio que considera la variación de la sensibilidad antibiótica, incrementa la tasa de resistencia a ciprofloxacino, tanto en cepas BLEE (34,8% versus 36,4%) como no BLEE (5,8% versus 5,9%)

También se modifica los datos de prevalencia en el caso de *K pneumoniae*, así, aumenta un 52,8% el número de cepas detectadas, un 75% las cepas resistentes a ciprofloxacino y un 94,1% más de cepas BLEE al aplicar el criterio que considera la variación de la sensibilidad antibiótica.

En pacientes ingresados, se observa el mismo fenómeno al aplicar los criterios del CLSI o los criterios del ESMID, aumentando el número absoluto de cepas (29,9%) y las tasas de cepas productoras de BLEE (del 1,8% al 2,9%). No ocurre lo mismo con la tasa de resistencia a ciprofloxacino (4,9% versus 1,7% respectivamente).

En pacientes no ingresados, se observa también un incremento en el número de cepas totales (64,9%), de cepas productoras de BLEE (78,9%) y de cepas resistentes a ciprofloxacino (122%).

En cuanto a la asociación con el tipo de muestra, los resultados son coincidentes con los comentados hasta ahora, el criterio europeo es el que más cepas detecta, tanto

globalmente como cepas resistentes y cepas BLEE, lo que coincide con lo publicado previamente<sup>111,112</sup>.

En cuanto al tipo de muestra, *E coli* muestra el mayor porcentaje de cepas productoras de BLEE en lesiones de piel y tejidos blandos (4,2%); otros autores señalan que la orina y los exudados de heridas son las muestras donde más frecuentemente se aísla este tipo de cepas<sup>92</sup>.

Tanto en *E coli* como en *K pneumoniae* el porcentaje de cepas productoras de BLEE es mayor en pacientes ingresados (5,3% y 1,8% respectivamente) que en pacientes no ingresados (5,2% y 1,2% respectivamente considerando un aislado por paciente), aunque nuestros datos muestran la gran importancia de las cepas BLEE en el ámbito extrahospitalario. Según RedMIVA, la tasa de resistencia a ciprofloxacino es mayor en pacientes ingresados tanto para *E coli* como para *K pneumoniae* y son superiores a las descritas en nuestro medio.

Nuestro estudio muestra que la complejidad del proceso así como que la metodología empleada en la eliminación de duplicados puede alterar el análisis de los datos de sensibilidad de un patógeno y puede modificar el número de aislados; esto influye en los resultados globales de resistencia antibiótica en cada ámbito de estudio. Es evidente que hay que emplear un criterio de eliminación de duplicados en el estudio de la resistencia antibiótica pero no está claro cual es el método más adecuado.

Por una parte, la selección del primer aislado del paciente, es un criterio muy objetivo y muy fácil de aplicar, pero no tiene en cuenta la evolución del proceso infeccioso a lo largo del tiempo, ya que frecuentemente se producen modificaciones de sensibilidad de las bacterias asociadas a procesos de larga duración, ya sea por



sobreinfección por bacterias más resistentes a los antibióticos que está recibiendo el paciente o por mutación de las mismas a causa de la presión antibiótica, sobre todo en casos de mal uso de estos fármacos (bajas dosis) o infecciones de larga duración en lugares donde el antibiótico no alcanza las concentraciones idóneas. Esta limitación puede llegar a ser clave en algunas patologías y microorganismos.

Por otra parte, la aplicación del criterio que tiene en cuenta la variación de la sensibilidad antibiótica a algunos fármacos tiene la importante limitación metodológica de estar sujeto a errores en el estudio fenotípico de la sensibilidad a estos compuestos, asociados a la utilización de diferentes inóculos, estabilidad de los compuestos utilizados en estos estudios, etc. Este fenómeno limita su utilización salvo que se incluyan controles de calidad para asegurar que los cambios detectados fenotípicamente se relacionan realmente con variaciones en la sensibilidad antibiótica de las bacterias estudiadas. Probablemente, en un futuro próximo, cuando se estandaricen pruebas genéticas rápidas para detectar las alteraciones genéticas más importantes asociadas a las variaciones de la sensibilidad antibiótica, este criterio pueda ser empleado con más seguridad al poder comprobar de forma inequívoca estas variaciones.

También la introducción de técnicas genéticas rápidas que permitan estudiar el perfil genético bacteriano que permitan diferenciar entre sobreinfección por una cepa diferente o mutación de la misma bacteria, ayude a aclarar este fenómeno.

Entre ambas metodologías genéticas se podrá tener la certeza de si un paciente está siendo colonizado por bacterias de la misma especie pero con diferente patrón de sensibilidad antibiótica y podrá valorarse la sustitución del criterio avalado por CLSI.

Según lo expuesto hasta ahora, es importante que los datos sobre la situación local de resistencia a antibióticos sea lo más ajustada a la realidad para así poder mejorar los tratamientos empíricos utilizados en cada medio, ya que las quinolonas son uno de los antibióticos más empleados para el tratamiento de infecciones por *Escherichia coli* tanto en humanos como en animales<sup>9</sup>.

Sin embargo la resistencia a estos antibióticos ha ido aumentando en los últimos años y especialmente es elevada en cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)<sup>8,113</sup> y hay gran interés en el desarrollo de técnicas microbiológicas que puedan ayudar a controlar este fenómeno como la determinación de la concentración preventiva de mutantes (CPM) ya que se ha descrito como un parámetro útil para caracterizar las subpoblaciones más resistentes a los antibióticos<sup>50</sup>. Estas subpoblaciones más resistentes pueden estar asociadas a fracasos en el tratamiento y a generación de resistencia durante el mismo<sup>51</sup>.

Hemos aplicado este parámetro para comparar la actividad de dos fluoroquinolonas frente a aislados clínicos de *Escherichia coli* responsables de infecciones del tracto urinario y bacteriemias en nuestro medio.

Nuestro estudio muestra que el valor de este parámetro es más elevado en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido por lo que ayuda a explicar la mayor tasa de resistencia a fluoroquinolonas en este grupo de cepas por la existencia de subpoblaciones de microorganismos más resistentes a las fluoroquinolonas.

No se conocen por completo los mecanismos genéticos que explican este fenómeno, aunque se han implicado plásmidos u otras estructuras genéticas transmisibles que codifican resistencia a varios antibióticos o también sistemas o

bombas de expulsión activa que pueden eliminar a varios antibióticos que pertenezcan a diferentes familias<sup>114</sup>. La relación existente entre el tipo de BLEE y la resistencia a fluoroquinolonas no se conoce todavía, aunque nuestro estudio muestra que hay subpoblaciones que son más resistentes a fluoroquinolonas en microorganismos resistentes a cefotaxima y ceftazidima.

La relación de los datos microbiológicos de nuestro trabajo con los parámetros farmacológicos de las fluoroquinolonas estudiadas aporta información útil a la hora de predecir la eficacia de un tratamiento y a la hora de controlar la aparición de cepas resistentes durante el mismo<sup>115,116</sup>. Para fluoroquinolonas y bacterias gram negativas se postula que cocientes  $AUC/CIM > 100-125$ <sup>117</sup> aseguran la eficacia del tratamiento, aunque otros autores aumentan este cociente a 250-500<sup>118</sup>. En cuanto a la prevención de la aparición de resistencia, se recomienda que el cociente  $AUC/CIM$  sea superior a 100<sup>115</sup> o el cociente  $AUC/CPM$  sea superior a 22<sup>116</sup>.

En nuestro estudio se observa que levofloxacino muestra cocientes  $AUC/CIM$  superiores a 100 frente a todas las cepas sensibles a quinolonas y frente a las resistentes a nalidíxico y no productoras de BLEE. Esto ocurre también en sensibles a quinolonas y productoras de BLEE. En cambio, ciprofloxacino sólo presenta cocientes mayores de 100 en los grupos sensibles a quinolonas productores y no productores de BLEE. Esto indica que la utilización de levofloxacino es más segura, en cuanto a la generación de resistencias, que el uso de ciprofloxacino, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la generación de mutantes in vitro.

Al analizar el cociente  $AUC/CPM$ , se observa que sólo las cepas sensibles a quinolonas y no productoras de BLEE presentan cocientes  $AUC/CPM > 22$  para ciprofloxacino. Para levofloxacino, todas las cepas sensibles a quinolonas no

productoras y productoras de BLEE y las cepas resistentes a nalidíxico y no productoras de BLEE, presentan cocientes AUC/CPM mayores de 22. Estos datos también confirman lo anteriormente señalado.

Nuestro estudio confirma que las cepas productoras de BLEE, incluso aquellas que son sensibles a fluoroquinolonas según los métodos clásicos, tienen subpoblaciones que son resistentes a estos compuestos y que pueden por tanto ser seleccionadas fácilmente durante el tratamiento<sup>119</sup>. Por lo tanto, el tratamiento con fluoroquinolonas debería usarse con precaución.

Nuestros datos ayudan a explicar los fallos terapéuticos informados<sup>120</sup>, y sugieren que es necesario emplear metodologías en los laboratorios clínicos que permitan detectar estas subpoblaciones, ya que los métodos clásicos no son efectivos y tratamientos antibióticos iniciales inadecuados junto con la resistencia a fluoroquinolonas, son factores de riesgo de mortalidad en estas infecciones<sup>121,122</sup>.

Sin embargo, este fenómeno es complejo, ya que además de la variación de los parámetros farmacológicos de los antibióticos en función del tipo de enfermos, dosis utilizada y lugar de la infección, hay que tener en cuenta parámetros del microorganismo, como la disminución de virulencia que sufren las bacterias resistentes a fluoroquinolonas<sup>123</sup> y la existencia de genes de resistencia a antibióticos no expresados<sup>124</sup>.

En general, nuestro trabajo señala que aunque el estudio fenotípico clásico muestre que la bacteria es sensible, existe riesgo de selección de resistencia si no se alcanzan las concentraciones adecuadas en el lugar de la infección para lograr que las poblaciones más resistentes, que inicialmente son minoritarias, puedan seleccionarse y ocupar el nicho ecológico dejado por la población mayoritaria sensible que desaparece

por la acción del antibiótico. Debe hacerse un estudio profundo sobre los niveles de antibiótico que se alcanzan en cada localización y en cada tipo de paciente, ya que los valores que habitualmente se emplean muchas veces no reflejan la situación de cada paciente concreto en aspectos como la absorción del antibiótico a nivel gastrointestinal, el grado de eliminación del mismo a nivel renal o hepático, el porcentaje de grasa corporal del individuo, el lugar anatómico de la infección, etc. La utilización de programas informáticos que analicen todas estas variables junto a los parámetros bacterianos (tanto fenotípicos como genotípicos) pueden ayudar en el futuro a seleccionar el antibiótico más idóneo en cada circunstancia concreta, siguiendo la tendencia actualmente extendida de la medicina individualizada

Los mecanismos moleculares asociados a la resistencia a fluoroquinolonas son múltiples y aún no bien conocidos; se conoce que las mutaciones en el gen *gyrA* es el mecanismo más importante en el proceso aunque también están implicados otros fenómenos, como las alteraciones de otros genes de la girasa, de la permeabilidad de la membrana bacteriana y la activación de bombas de expulsión activa<sup>125</sup>.

Estos sistemas que utiliza la bacteria para poder sobrevivir en presencia de antibiótico activan o reprimen diversos sistemas metabólicos de la misma y estos fenómenos son muy poco conocidos en la actualidad. Además, hay diferencias entre las tasas de resistencia a fluoroquinolonas en cepas productoras y no productoras de BLEE y tampoco se conocen los fenómenos moleculares asociados a este hecho. Esta falta de conocimiento se debe en parte a la gran complejidad del genoma bacteriano, compuesto por varios miles de genes y a la dificultad que había hasta hace poco tiempo para estudiar grandes cantidades de genes de forma simultánea mediante sistemas de expresión génica basados en la reacción en cadena de la polimerasa. La aparición de los

microarrays de expresión génica ha aportado una herramienta muy potente al estudio de estos fenómenos, ya que permite estudiar de forma simultánea la expresión de todos los genes de un microorganismo.

Con objeto de aportar datos que ayuden a entender estos fenómenos, utilizando estas nuevas tecnologías, hemos diseñado varios modelos de exposición a fluoroquinolonas in vitro. Coincidiendo con la literatura, nuestro modelo de generación de mutantes sólo detecta la presencia de mutaciones en el gen *gyrA* tanto en *Escherichia coli* como en *Klebsiella pneumoniae* al analizar los genes de la girasa, ya que son los genes más frecuentemente implicados en este proceso y una de las primeras herramientas que utiliza la bacteria para sobrevivir en presencia del antibiótico.

La mutación detectada en *E coli* es la que más frecuentemente se ha descrito en la literatura, una mutación única en el aminoácido 87 (aspartato es sustituido por glicina). En el caso de *K pneumoniae*, las mutaciones obtenidas han sido diferentes en las diferentes situaciones de nuestro modelo experimental, aunque también coinciden con las mutaciones descritas en la literatura con más frecuencia (en el aminoácido 83 hay un cambio de serina por leucina y en el 87 cambia aspartato por asparragina). En ninguno de los dos casos estudiados hemos encontrado diferencias entre las cepas productoras y no productoras de BLEE en relación con el tipo de mutaciones generadas por las bacterias<sup>39</sup>.

En cambio, el estudio fenotípico realizado en nuestro modelo experimental ha mostrado diferencias importantes entre cepas productoras y no productoras de BLEE; así, los mutantes generados tras la exposición repetida al fluoroquinolonas presentan disminuciones de sensibilidad más rápidamente en cepas productoras de BLEE.

Por otra parte, también hemos observado que la exposición a ciprofloxacino provoca más rápidamente que los mutantes generados presenten disminuciones de la sensibilidad a las fluoroquinolonas.

Previamente se ha comunicado que el uso de fluoroquinolonas se ha asociado al incremento de la resistencia bacteriana y cambios en el uso de determinados fármacos en una institución se han asociado a este fenómeno; así, mediante un análisis de series interrumpidas en el tiempo, se ha observado que la introducción de levofloxacino en un hospital y su posterior sustitución por gatifloxacino provocó cambios estadísticamente significativos en la sensibilidad antibiótica de *E coli*<sup>126</sup>; por otra parte, también se ha comunicado que hay diferencias entre los diferentes fármacos de la familia de las fluoroquinolonas en la asociación entre la prescripción de los mismos en los 6 meses previos y la aparición de cepas resistentes a ciprofloxacino<sup>78</sup>.

Al comparar la diferente capacidad de generar mutantes resistentes entre las diferentes fluoroquinolonas y coincidiendo con nuestros datos, se observa que en un medio de cultivo con ácido nalidíxico, el número de mutantes que aparecen disminuye al incrementarse la concentración del fármaco. El estudio de otras cuatro fluoroquinolonas muestra que las que presentan un grupo metoxi en C-8 (moxifloxacino) generan mutantes con más dificultad; este fenómeno está asociado a la mayor capacidad letal de las mismas<sup>127</sup>.

Otro factor a tener en cuenta es el tiempo de contacto entre la bacteria y el antibiótico, ya que en un estudio realizado en una Unidad de Cuidados intensivos se ha demostrado que la duración del tratamiento con fluoroquinolonas es un factor de riesgo asociado con la aparición de microorganismos resistentes; así el tratamiento previo con

ciprofloxacino presenta un riesgo relativo de 1.15 por día mientras que para levofloxacino es de 1.39 por día<sup>79</sup> lo que no coincide con nuestros resultados, que muestran que la exposición a ciprofloxacino genera mutantes con sensibilidad disminuida más fácilmente que la exposición a levofloxacino.

Por tanto, nuestro modelo experimental pretende aportar datos que ayuden a explicar la mayor resistencia a fluoroquinolonas descrita en cepas productoras de BLEE, tratando de simular situaciones que pueden producirse tras la administración de tratamientos incorrectos, falta de adherencia al tratamiento o utilización de fluoroquinolonas en veterinaria a dosis bajas.

Nuestro trabajo aporta datos que ayudan o complementan estudios previos que señalan que hay asociación entre el consumo previo de fluoroquinolonas u otros antibióticos y el aislamiento de cepas productoras de BLEE<sup>82,94</sup>. También ayudan a explicar la relación entre la producción de BLEE y la mayor proporción de cepas resistentes a fluoroquinolonas<sup>128</sup> y el incremento de cepas resistentes a fluoroquinolonas asociado al consumo de cefalosporinas de espectro extendido y no asociado al consumo de otros antibióticos<sup>98</sup>.

Aunque en nuestro estudio no se ha caracterizado molecularmente el tipo de BLEE presente en cada cepa, se ha comunicado que algunos tipos se asocian más a resistencia a fluoroquinolonas, así, las bacterias que presentan los enzimas CTX-M9 y SHV presentan más de un 70% de resistencias a fluoroquinolonas<sup>113</sup>.

Se ha comunicado que se está incrementando el porcentaje de portadores fecales de cepas productoras de BLEE con corresponsencia a fluoroquinolonas<sup>129</sup>, por lo que, probablemente en ese medio, es donde se produce la generación de mutantes resistentes



por contacto de las bacterias con concentraciones subinhibitorias de antibióticos, como resultado de interacciones complejas entre el genoma bacteriano y la presión selectiva de los nichos ecológicos<sup>130</sup>. Sin embargo, este fenómeno es difícil de controlar, ya que se ha comunicado que a pesar del incremento de tasas de resistencia antibiótica que genera la utilización de levofloxacino como profilaxis de la neutropenia, su utilización tiene un impacto beneficioso en cuanto a mortalidad y a morbilidad en estos pacientes<sup>131</sup>.

En muchos nichos ecológicos, como por ejemplo en la flora humana de mucosas o del tracto intestinal se produce una continua evolución mediante la selección natural de las poblaciones bacterianas a causa de la continua selección de mutaciones adaptativas al medio; aunque este fenómeno se conoce desde hace mucho tiempo, recientemente se ha comunicado que la tasa de mutaciones que genera mutaciones beneficiosas es del orden de  $10^{(-5)}$  por genoma por generación, lo que es 1000 veces superior a lo que previamente se ha estimado, lo que está muy relacionado con la mayor capacidad bacteriana de adquirir resistencia antibiótica<sup>132</sup>.

Por tanto, el fenómeno de la resistencia antibiótica en este tipo de bacterias en relación con las fluoroquinolonas es muy complejo y no está totalmente caracterizado, ya que un estudio casos control realizado para detectar los factores de riesgo de generación de cepas multirresistentes en *K. pneumoniae* no muestra que el consumo previo de antibióticos sea un factor de riesgo y señala la importancia de la transmisión horizontal de cepas previamente resistentes<sup>38</sup>. La aplicación de nuevas herramientas estadísticas puede ayudar a conocer mejor este fenómeno, así, se ha comunicado mediante un estudio realizado mediante la metodología del análisis de series temporales (modelos ARIMA) y modelos de regresión dinámica que un incremento de la frecuencia

de resistencia a ciprofloxacino (6.2 a 10.1%) ( $p < 0.001$ ) asociada al incremento del consumo de antibióticos; así, un incremento en el uso de una dosis día definida (DDD)/1000 pacientes-día de ciprofloxacino, ofloxacino o norfloxacino induce incrementos de 0.73%, 0.82% y 0.63% en las tasas de resistencia a ciprofloxacino en *E coli* ( $p < 0.01$ ), con un retardo temporal de entre 4, 4 y 5 meses<sup>133</sup>.

Otro estudio evalúa este fenómeno en pacientes ingresados y no ingresados y concluye que el incremento del consumo de fluoroquinolonas detectado en ambos grupos de pacientes a lo largo del periodo de tiempo estudiado se asocia a incremento de la resistencia ( $p < 0.01$ ) tanto en el hospital (de 2 al 9%) como en la comunidad (del 1 al 10%); señala que el desarrollo de la resistencia en *E coli* a fluoroquinolonas se asocia significativamente con su utilización en el hospital ( $r = 0.944$ ,  $p = 0.005$ ) y en la comunidad ( $r = 0.859$ ,  $p = 0.029$ )<sup>134</sup>.

Un estudio europeo, realizado en 21 países en el ámbito hospitalario por European Surveillance of Antimicrobial Consumption and the European Antimicrobial Resistance Surveillance System sugiere que la variación en el consumo entre los diferentes países coincide con las tasas de resistencia en cada país; este estudio ecológico apoya por tanto la aplicación de estrategias de intervención para reducir el consumo antibiótico en Europa<sup>83</sup>. También hay resultados que reflejan lo contrario, así, en pacientes no hospitalizados no se encontró asociación entre el consumo de fluoroquinolonas y las tasas de resistencia a estos fármacos<sup>85</sup>.

Cuando se han aplicado sistemas del control del uso de fluoroquinolonas en la comunidad se ha observado que ha tenido un impacto importante en las tasas de resistencia en los aislados asociados a infecciones urinarias; una disminución

significativa del consumo (de 1827 DDD por mes ha logrado una disminución significativa de la resistencia (del 12% al 9%). Esta disminución revirtió cuando el consumo de fluoroquinolonas volvió a aumentar. Una media de disminución de la resistencia en 1.16% se observó por cada descenso de consumo de 1000 DDD<sup>87</sup>.

Aunque se espera que sigan aumentando las tasas de resistencia a los antibióticos, no se conoce el tiempo en que sucederá el fenómeno y qué grado alcanzará; estudios realizados en aislados hospitalarios de *E coli* resistentes fluoroquinolonas y el consumo antibiótico hospitalario han encontrado asociación tanto en USA como en Europa.

Un estudio matemático sugiere que en países muy consumidores de fluoroquinolonas, las tasas de resistencia serán en 2013 del 45% (95% CI: 38%, 53%) frente a tasas del 33% (95% CI: 25%, 41%) en los países en los que se consume menos este grupo de fármacos<sup>88</sup>.

La asociación entre la resistencia cromosómica a fluoroquinolonas y la producción de BLEE asociada a la presencia de plásmidos no se ha explicado completamente a nivel genético y para aportar más datos que ayuden a explicar este fenómeno, hemos diseñado nuestro modelo experimental que pretende caracterizar la expresión génica de todos los genes conocidos en *E coli* en diferentes grupos de cepas y en diferentes situaciones (cultivo en medio con y sin ciprofloxacino).

Nuestros datos confirman que la interacción entre las enterobacterias y las fluoroquinolonas es un fenómeno muy complejo y que están implicados un gran número de genes y por tanto muchos mecanismos celulares. Además, la comparación de la respuesta bacteriana a la interacción con la fluoroquinolona es diferente en función de si la bacteria es productora o no productora de BLEE, ya que hemos encontrado un grupo

de 41 genes que sólo se expresan en las cepas productoras de BLEE; incluso al analizar las cepas productoras de BLEE observamos que el contacto con el antibiótico pone en marcha la expresión de 9 genes.

Existen pocos datos en la literatura sobre estos fenómenos moleculares, así, se ha descrito que la presencia de plásmidos que codifican sistemas toxina-antitoxina y la existencia de toxinas que se unen a la DNA girasa pueden ser fenómenos implicados. La presencia de plásmidos que codifiquen estas toxinas pueden predisponer a la resistencia a fluoroquinolonas<sup>135</sup>; también se ha descrito, aplicando el modelo Fisher-Muller en *E coli*, que la transferencia de información genética a través de plásmidos, como sucede en las cepas productoras de BLEE se asocia a una mayor capacidad de adaptación bacteriana, lo que puede estar asociado a la capacidad de adaptarse a la presencia de fluoroquinolonas<sup>136</sup>.

Otro estudio de expresión génica realizado en *K pneumoniae* con microarrays muestra que hay 19 genes sobre expresados en las cepas resistentes respecto a las sensibles y que un gen relacionado con el sistema de transporte ABC (*ycjV*) se sobre expresa intensamente por lo que se sugiere la implicación de los sistemas de expulsión activa. Aproximadamente la mitad de los genes sobre expresados codifican para proteínas ribosomales o proteínas asociadas al metabolismo tRNA. Respecto a los 33 genes reprimidos casi la tercera parte regulan el metabolismo del nitrógeno, probablemente asociados a la alteración del fitness de las cepas resistentes<sup>137</sup>.

Por otra parte, otro estudio muestra que las cepas de *E coli* productoras de BLEE muestran frecuentemente una mutación en el gen *parE*, asociada a la resistencia a las fluoroquinolonas<sup>138</sup>, aunque este hecho no se ha confirmado en nuestro estudio. Otra

publicación señala que las cepas hipermutantes son más frecuentemente halladas en los aislados de *E coli* productoras de BLEE<sup>139</sup>.

La complejidad de los mecanismos asociados a la resistencia a fluoroquinolonas ya ha sido señalada; así, se indica que los mecanismos conocidos hasta ahora se encuentran en 50-70% de los aislamientos con concentración mínima inhibitoria elevada pero que hay muchos aislados en los que no se puede explicar el incremento de su CMI con los mecanismos conocidos hasta ahora<sup>140</sup>.

La aplicación de herramientas informáticas puede ayudar a aportar datos que ayuden a conocer mejor este fenómeno; así, MicrobesOnline (<http://www.microbesonline.org>) ha aparecido como una herramienta muy potente en el análisis y comparación de las funciones de los genes ya que en su base de datos se incluyen más de 1000 genomas completos y miles de microarrays de expresión génica de diferentes organismos; incluso ayuda a identificar genes coreguladores ya que MicrobesOnline puede buscar genes en base a sus perfiles de expresión y proporciona herramientas para identificar sistemas reguladores y comprobar si están conservados en cada bacteria<sup>141</sup>.

Por tanto, nuestro trabajo señala la necesidad de emplear dosis suficientemente elevadas de fluoroquinolonas para prevenir la selección de mutantes, confirmando algunos datos, previamente comunicados, como el que señala que la utilización de ciprofloxacino a dosis de 750 mg, dos veces al día, es la única dosificación de este fármaco que previene la selección de cepas con mutaciones en el gen de la girasa en *E coli*<sup>142</sup>.

Por tanto, creemos que nuestro trabajo aporta datos que pueden contribuir a conocer este importante fenómeno a nivel de metabolismo bacteriano y señala la

necesidad de utilizar las fluoroquinolonas a dosis suficientemente elevadas, sobre todo de ciprofloxacino, para alcanzar niveles tisulares adecuados en el lugar de la infección y prevenir la aparición de cepas resistentes a estos compuestos, sobre todo si hay sospecha clínica de infección por una cepa productora de BLEE.

Este trabajo pretende aportar datos que ayuden a explicar la mayor resistencia a fluoroquinolonas descrita en cepas productoras de BLEE, tratando de simular situaciones que pueden producirse tras la administración de tratamientos incorrectos, falta de adherencia al tratamiento o utilización de fluoroquinolonas en veterinaria a dosis bajas. Hemos observado que, aunque aparecen mutantes con sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas en las cepas estudiadas, este fenómeno se produce con más rapidez en cepas productoras de BLEE, sobre todo si están expuestas a ciprofloxacino. Sin embargo, nuestros datos muestran que es un fenómeno muy complejo y aún muy poco conocido en el que están implicados muchos grupos de sistemas bacterianos asociados a diferentes funciones complementarias. El conocimiento profundo de estos sistemas en el futuro pasa por una confirmación de la implicación de los mismos a través de estudios clínicos más amplios que evalúen cepas de diferentes localizaciones y diferentes patrones de resistencia tanto fenotípicos como genotípicos. Una vez caracterizados y seleccionados los genes que muestran más implicación en estos procesos, deben estudiarse sus funciones concretas mediante análisis de su expresión en diferentes situaciones o silenciamiento de los mismos en modelos in vitro. El diseño de fármacos que puedan interactuar con alguno de estos genes puede constituir en el futuro, un método complementario para mejorar la actividad de las fluoroquinolonas frente a estas bacterias y prevenir la selección de

mutantes resistentes con objeto de controlar el incremento de resistencia que se está detectando actualmente en nuestro medio y a nivel global.



## **6.- CONCLUSIONES**





1. Se ha demostrado una disminución en las tasas de sensibilidad a fluoroquinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el período estudiado (Objetivo 1).
2. La disminución de sensibilidad a fluoroquinolonas es mayor en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (Objetivo 1).
3. La introducción de un criterio de eliminación de duplicados es obligatorio a la hora de conocer la verdadera evolución de la sensibilidad de estos microorganismos a fluoroquinolonas (Objetivo 1).
4. El criterio de eliminación de duplicados recomendado por CLSI (primer aislado de cada paciente) infravalora el incremento de resistencia a fluoroquinolonas respecto al que considera la variación de la sensibilidad antibiótica de los aislados clínicos (Objetivo 1).
5. El criterio recomendado por CLSI también infravalora la prevalencia de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido en nuestro medio (Objetivo 1).
6. Los valores de la concentración preventiva de mutantes para las fluoroquinolonas estudiadas son superiores en cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido respecto a las no productoras de estas enzimas (Objetivo 2).
7. La exposición repetida de aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* a concentraciones bajas de las tres fluoroquinolonas estudiadas en un modelo in vitro genera mutantes con sensibilidad disminuida a las mismas tanto en cepas productoras de BLEE como en no productoras (Objetivo 3).

8. El fenómeno de la disminución de sensibilidad a las fluoroquinolonas que se observa tras la exposición repetida a las mismas en el modelo in vitro se produce con más rapidez en cepas productoras de BLEE (Objetivo 3).
9. La exposición a ciprofloxacino genera mutantes con disminución de la sensibilidad más rápidamente que levofloxacino y moxifloxacino (Objetivo 3).
10. La exposición repetida a las tres fluoroquinolonas estudiadas provocó la aparición de la misma mutación en *gyrA* en *Escherichia coli* (Asp87---Gly87) y esta mutación no se asoció con la presencia de BLEE (Objetivo 3).
11. En *Klebsiella pneumoniae* se generaron mutaciones diferentes (Ser83---Leu83 y Asp87---Asn87) pero tampoco se asociaron a la producción de BLEE (Objetivo 3).
12. La aplicación de microarrays muestra que la resistencia a fluoroquinolonas en estos dos microorganismos es un fenómeno muy complejo en el que están involucrados cientos de genes (Objetivo 4).
13. La comparación entre la expresión génica de *Escherichia coli* productora y no productora de betalactamasas de espectro extendido en relación con la resistencia a fluoroquinolonas muestra diferencias en los genes que se expresan, lo que sugiere la existencia de diferentes mecanismos de interacción de los dos grupos de cepas con estos compuestos (Objetivo 4).

## **7.- BIBLIOGRAFÍA**



1. Donnenberg MS. *Enterobacteriaceae*. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editores. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 6ª edición en castellano. Madrid. Elsevier, 2006: 2567-2586. Vol 2.
2. Farmer III JJ. *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington. ASM Press, 2003: 636-653. Vol 1.
3. Bop GA, Brenner FW, Fielos PI, Wells JG, and Strockbine NA. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington. ASM Press, 2003: 654-671. Vol 1.
4. Abbott SL. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington. ASM Press, 2003: 684-700. Vol 1.
5. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clinical Microbiology Reviews. 2005;18 (4):657-686.
6. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14 (4): 933-951.
7. Bush K and Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(3):969-976.
8. Yagüe A, Cebrián L, Rodríguez JC, Gonzalo-Jiménez N, Royo G, Campillo P et al. Cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido: origen, características e incidencia en el sur de la provincia de

- Alicante en el periodo 1999-2003. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23 (2): 76-79.
9. Webber M; Piddock LJ. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet Res.* 2001;32: 275-284.
  10. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases.* 2001;7(2): 337-441.
  11. Garau J, Xercavins M, Rodriguez-Carballeira M, Gómez-Vera JR, Coll I, Vidal D et al. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(11):2736-2741.
  12. Hooper DC. Mechanism of quinolone resistance. *Drug Resist Updat* 1999;2:38-55.
  13. Rodríguez-Martínez, JM. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23(1): 25-31.
  14. Gobernado M, Salavert M, Santos M, Cantón E y Romá E. Quinolonas. En: García Rodríguez JA, García Sánchez JE, Gobernado M, Picazo JJ, Prieto J, editores. *Antimicrobianos en Medicina.* 2ª ed. SEQ. Barcelona. Prous Science SA, 2006:271-299.
  15. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Med.* 2006;119 (6A): S20-S28.
  16. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control.* 2004;32(8):470-85.
  17. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H et al. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia:

- implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med* 2004;140:26-32.
18. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(1):52-59.
19. Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases: importance of community isolates with blaCTX-M genes. *Clin Infect Dis*.2004;38(12):1736-41.
20. Rodríguez Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ et al. Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):1089-94.
21. Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W et al. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004 ;23(3):163-167.
22. Lautenbach E, Strom BL, Biker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001;33(8):1288-94.
23. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase-producing in *Klebsiella pneumoniae* causing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2000;30(3):473-78.

24. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006;6:629-40.
25. Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: Overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. *BMJ* 1998;317(7165):1029-30.
26. Alós J. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21(5):261-68.
27. Soto SM, Ruíz J, Mendoza MC, Vila J. In vitro fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: analysis of mechanisms involved in resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2003;22(5):537-40.
28. Nikaido H, Thanassi DG. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(7):1393-99.
29. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. Molecular cloning and characterisation of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993;175(19):6299-13.
30. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797-99.
31. Martínez-Martínez L, Pascual A, García I, Tran J, Jacoby GA. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(4):1037-39.
32. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(7):2242-48.

33. Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martínez-Martínez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(1):71-76.
34. Rodríguez-Martínez, JM, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003;52(4):703-06. Epub 2003 Sep1.
35. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(8):5638-42. Epub 2002 Apr9.
36. Xiong Z, Zhu D, Wang F, Zhang Y, Okamoto R, Inoue M. Investigation of extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44(2):195-200.
37. DiPersio JR, Deshpande LM, Biedenbach DJ, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Evolution and dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2003). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51(1):1-7.
38. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Fishmann NO, Bilker WB et al. Risk factors for increasing multidrug resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Clin Infect Dis* 2005;40(9):1317-24.
39. Wong-Beringer A. Therapeutic challenges associated with extended-spectrum, beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacotherapy* 2001;21(5):583-92.



40. Nathisuwan S, Burgess DS, Lewis II JS. Extended-spectrum beta-lactamases: epidemiology, detection, and treatment. *Pharmacotherapy* 2001;21(8):920-28.
41. Kang CI, Kim SH, Kim DM, Park WB, Lee KD, Kim HB et al. Risk Factors for Ciprofloxacin Resistance in Bloodstream Infections Due to Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 2004;10(1):71-76.
42. Tolun V, Küçükbasmaci O, Törümküney-Akbulut D, Catal C, Ang-Kücüker M, Ang O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(1):72-75.
43. Ozden M, Kalkan A, Demirdag K, Kilic SS, Ozdarendeli A. Ciprofloxacin and co-trimoxazole resistance and extended spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;21(5):492-93.
44. Cormican M, Morris D, Corbett-Feeney G, Flynn J. Extended spectrum beta-lactamase production and fluorquinolone resistance in pathogens associated with community acquired urinary tract infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;32(4):317-19.
45. Miller MB, Tang YW. Basic Concepts of Microarrays and potencial applications in Clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(4):611-33.
46. Doménech-Sánchez A, Vila J. Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(1):46-54.

47. Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG. The Affymetrix GeneChip platform: an overview. *Methods Enzymol.* 2006;410:3-28.
48. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility test data. Approved guideline M39-A. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
49. Cornaglia G, Hryniewicz W, Jarlier V, Kahlmeter G, Mittermayer H, Stratchounski L et al, ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance. European recommendations for antimicrobial resistance surveillance. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(4):349–83.
50. Zhao X, and Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolones studies. *Clin Infect Dis* 2001;33 (Suppl 3):S147-S156.
51. Dong Y, Zhao X, Domagala J, Drlica K. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Saphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(7):1756-58.
52. Blondeau JM, Zhao X, Hansen G and Drlica K. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45 (2):433-38.
53. Noguera O, Rodríguez JC, López JM, Ruiz M, Royo G. Determinación de la concentración preventiva de mutantes resistentes a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* productoras y no productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Rev Esp Quimioter.* 2009;22(1):30-33.

54. Sirvent E, Ruiz M, Rodríguez JC, Royo G. Estudio de la actividad comparada de varias fluoroquinolonas frente a *Pseudomonas aeruginosa* mediante la determinación de la concentración preventiva de mutantes. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006; 24(10):603-07
55. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th International supplement. CLSI document M100-S15. Wayne, PA: CLSI; 2005.
56. Rodriguez JC, Llinares F, Royo G. In vitro development of resistance to three quinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Chemotherapy* 2001; 47(1):39-42.
57. Noguera O, Rodríguez JC, Cremades R, Ruiz M, Royo G. Generación in vitro de mutantes de *Klebsiella pneumoniae* tras exposición a fluoroquinolonas. Relación con la presencia de betalactamasas de espectro extendido. *Rev Esp Quimioter* 2008;21(3):180-83.
58. Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolones resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(10): 3222-32.
59. Wagenlehner FM, Wydra S, Onda H, Kinzig-Schippers M, Sörgel F, Naber KG. Concentrations in plasma, urinary excretion, and bactericidal activity of linezolid (600 milligrams) versus those of ciprofloxacin (500 milligrams) in healthy volunteers receiving a single oral dose. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(12): 3789-94.
60. Lubasch A, Keller I, Borner K, Koeppe P, Lode H. Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin,

- trovafloxacin, and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(10): 2600-03.
61. Debon R, Breilh D, Boselli E, Saux MC, Duflo F, Chassard D et al. Pharmacokinetic parameters of ciprofloxacin (500 mg/5 ml) oral suspension in critically ill patients with severe bacterial pneumonia: a comparison of two dosages. *J Chemother.* 2002;14(12):175-80.
62. Lipman J, Scribante J, Gous AG, Hon H, Tshukutsoane S. Pharmacokinetic profiles of high-dose intravenous ciprofloxacin in severe sepsis. *The Baragwanath Ciprofloxacin Study Group. Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(9):2235-39.
63. Owens RC Jr, Patel KB, Banevicius MA, Quintiliani R, Nightingale CH, Nicolau DP. Oral bioavailability and pharmacokinetics of ciprofloxacin in patients with AIDS. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(7):1508-11.
64. Garrelts JC, Jost G, Kowalsky SF, Krol GJ, Lettieri JT. Ciprofloxacin pharmacokinetics in burn patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(5):1153-56.
65. Shah A, Liu MC, Vaughan D, Heller AH. Oral bioequivalence of three ciprofloxacin formulations following single-dose administration: 500 mg tablet compared with 500 mg/10 ml or 500 mg/5 ml suspension and the effect of food on the absorption of ciprofloxacin oral suspension. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43 Suppl A:49-54.
66. Gotfried MH, Danziger LH, Rodvold KA. Steady-state plasma and intrapulmonary concentrations of levofloxacin and ciprofloxacin in healthy adult subjects. *Chest.* 2001;119(4):1114-22.

67. Fish DN, Chow AT. The clinical pharmacokinetics of levofloxacin. *Clin Pharmacokinetic*. 1997;32(2):101-19.
68. Traunmüller F, Thalhammer-Scherrer R, Locker GJ, Losert H, Schmid R, Staudinger T et al. Single-dose pharmacokinetics of levofloxacin during continuous veno-venous haemofiltration in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47(2):229-31.
69. Hansen E, Bucher M, Jakob W, Lemberger P, Kees F. Pharmacokinetics of levofloxacin during continuous veno-venous hemofiltration. *Intensive Care Med*. 2001;27(2):371-75.
70. Chien SC, Wong FA, Fowler CL, Callery-D'Amico SV, Williams RR, Nayak R et al. Double-blind evaluation of the safety and pharmacokinetics of multiple oral once-daily 750-milligram and 1-gram doses of levofloxacin in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(4):885-88.
71. Geerdes-Fenge HF, Wiedersich A, Wagner S, Lehr KH, Koeppe P, Lode H. Levofloxacin pharmacokinetics and serum bactericidal activities against five enterobacterial species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(12):3478-80.
72. Rebeck JA, Fish DN, Abraham E. Pharmacokinetics of intravenous and oral levofloxacin in critically ill adults in a medical intensive care unit. *Pharmacotherapy*. 2002;22(10):1216-25.
73. Capitano B, Mattoes HM, Shore E, O'Brien A, Braman S, Sutherland C, et al. Steady-state intrapulmonary concentrations of moxifloxacin, levofloxacin, and azithromycin in older adults. *Chest*. 2004; 125(3):965-73.

74. Friedland I, Stinson L, Ikaiddi M, Harm S, Woods GL. Resistance in *Enterobacteriaceae*: results of a multicenter surveillance study 1995-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24(8):607-12.
75. Oteo J, Lazaro E, de Abajo FJ, Baquero F, Campos J; Spanish members of EARSS Surveillance System. Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(4):546-53.
76. Junquera S, Loza E, Baquero F. Changes in the antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from nosocomial versus community acquired urinary tract infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23(4):197-201.
77. Cizman M. The use and resistance to antibiotics in the community. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;21(4):297-307.
78. Gagliotti C, Nobile L, Moro ML, Emilia-Romagna Antibiotic Resistance Study Group. Emergence of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolates from out patient urine samples. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(3):328-31.
79. Levin PD, Fowler RA, Guest C, Sibbald WJ, Kiss A, Simor AE. Risk factors associated with resistance to ciprofloxacin in clinical bacterial isolates from intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28(3):331-36. Epub 2007 Feb 20.
80. Andreu A, Planells I; Grupo Cooperativo Español para el Estudio de la Sensibilidad Antimicrobiana de los Patógenos Urinarios. Etiology of community-acquired lower urinary infections and antimicrobial resistance of *Escherichia coli*: a national surveillance study. *Med Clin (Barc).* 2008;130(13):481-86.

81. Boyd LB, Atmar RL, Randall GL, Hamill RJ, Steffen D, Zechiedrich L. Increased fluoroquinolone resistance with time in *Escherichia coli* from >17,000 patients at a large county hospital as a function of culture site, age, sex, and location. *BMC Infect Dis.* 2008;15:8-4.
82. Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs.* 2003;63(4):353-65.
83. van de Sande-Bruinsma N, Grundmann H, Verloo D, Tiemersma E, Monen J, Goossens H et al; European Antimicrobial Resistance Surveillance System Group; European Surveillance of Antimicrobial Consumption Project Group. Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(11):1722-30.
84. Lan CK, Hsueh PR, Wong WW, Fung CP, Lau YT, Yeung JY et al. Association of antibiotic utilization measures and reduced incidence of infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Microbiol Immunol Infect.* 2003;36(3):182-86.
85. Bergman M, Nyberg ST, Huovinen P, Paakkari P, Hakanen AJ; Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. Association between antimicrobial consumption and resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(3):912-17. Epub 2008 Dec 22.
86. Yagci D, Yoruk F, Azap A, Memikoglu O. Prevalence and risk factors for selection of quinolone-resistant *Escherichia coli* strains in fecal flora of patients receiving quinolone therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(3):1287-89. Epub 2008 Dec 8.

87. Gottesman BS, Carmeli Y, Shitrit P, Chowders M. Impact of quinolone restriction on resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from urine by culture in a community setting. *Clin Infect Dis*. 2009;49(6):869-75.
88. Durham LK, Ge M, Cuccia AJ, Quinn JP. Modeling antibiotic resistance to project future rates: quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(3):353-56. Epub Jan 30.
89. [www.rivm.nl/earss/result](http://www.rivm.nl/earss/result)
90. [www.sp.san.gva.es/DgspPortal/docs/inf\\_redmiva](http://www.sp.san.gva.es/DgspPortal/docs/inf_redmiva)
91. Jones ME, Karlowsky JA, Draghi DC, Thornsberry C, Sahm DF, Nathwani D. Epidemiology and antibiotic susceptibility of bacteria causing skin and soft tissue infections in the USA and Europe: a guide to appropriate antimicrobial therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22(4):406-19.
92. Angel Díaz M, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A; Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(9):503-10. Epub 2009 Mar 28.
93. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis*. 2001;32 Suppl 2:S94-S103.
94. Hernandez JR, Pascual A, Canton R, Martínez-Martínez L; Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria. GEIH. Extended-spectrum beta-lactamase-producing



- Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;21(2):77-82.
95. Jones RN, Pfaller MA; MYSTIC Study Group (Europe). Antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* with resistance phenotypes consistent with an extended-spectrum beta-lactamase in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Jul;9(7):708-12.
96. Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ, Johnson JL, Dowzicky MJ, Wu DH et al. Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24(2):119-24.
97. Romero L, Lopez L, Rodriguez-Baño J, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(8):625-31.
98. Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. *Intensive Care Med.* 2002;28(12):1718-23. Epub 2002 Oct 17.
99. Calbo E, Romani V, Xercavins M, Gómez L, Vidal CG, Quintana S et al. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(4):780-83. Epub 2006 Feb 21.

100. Kang CI, Kim SH, Kim DM, Park WB, Lee KD, Kim HB et al. Risk factors for and clinical outcomes of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(10):860-67.
101. Lee SO, Lee ES, Park SY, Kim SY, Seo YH, Cho YK. Reduced use of third-generation cephalosporins decreases the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(10):832-37.
102. Linkin DR, Fishman NO, Patel JB, Merrill JD, Lautenbach E. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(9):781-83.
103. Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M, Citton R, Montuori E, Leone F et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(2):498-504.
104. Peña C, Gudiol C, Tubau F, Saballs M, Pujol M, Domínguez MA et al. Risk-factors for acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among hospitalised patients. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(3):279-84.
105. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 S1:144-53.

106. Sundqvist M, Kahlmeter G. Effect of excluding duplicate isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in a 14 year consecutive database. J Antimicrob Chemother. 2007;59(5):913-18. Epub 2007 Mar 1.
107. Li F, Ayers TL, Park SY, DeWolfe Miller F, MacFadden R, Nakata M et al. Isolate removal methods and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* surveillance. Emerg Infect Dis. 2005;11(10):1552-57.
108. Cebrián L, Rodríguez JC, Escribano I, Cascales E, López-Lozano JM, Royo G. Influence of various criteria for elimination of duplicates when calculating the prevalence and antibiotic susceptibility of microorganisms associated with urinary infections. Int J Antimicrob Agents 2005;25(2):173-76.
109. Horvat RT, Klutman NE, Lacy MK, Grauer D, Wilson M. Effect of duplicate isolates of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on antibiogram data. J Clin Microbiol. 2003;41(10):4611-16.
110. Westh H, Zinn CS, Rosdahl VT. An international multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from 15 hospitals in 14 countries. Microb Drug Resist 2004;10(2):169-76.
111. Gordon KA, Jones RN; SENTRY Participant Groups (Europe, Latin America, North America). Susceptibility patterns of orally administered antimicrobials among urinary tract infection pathogens from hospitalized patients in North America: comparison report to Europe and Latin America. Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000). Diagn Microbiol Infect Dis. 2003;45(4):295-301.
112. Rennie RP, Jones RN, Mutnick AH; SENTRY Program Study Group (North America). Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of pathogens

- isolated from skin and soft tissue infections: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 2000). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;45(4):287-93.
113. Sorlózano A, Gutiérrez J, de Dios Luna J, Oteo J, Liébana J, Soto MJ et al. High presence of extended-spectrum beta-lactamases and resistance to quinolones in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Microbiol Res.* 2007;162(4):347-54. Epub 2006 Mar 27.
114. Szczepanowski R, Krahn I, Linke B, Goesmann A, Pühler A, Schlüter A. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology* 2004;150(Pt11):3613-30.
115. Thomas JK, Forrest A, Bhavnani SM, Hyatt JM, Cheng A, Ballow CH et al. Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(3):521-27.
116. Olofsson SK, Marcusson LL, Komp Lindgren P, Hughes D, Cars O. Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an in vitro kinetic model: relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(6):1116-21. Epub 2006 Apr 19.
117. Wright DH, Brown GH, Peterson ML, Rotschafer JC. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(5): 669-83.

118. Forrest A, Nix DE, Ballow CH, Goss TF, Birmingham MC, Schentag JJ. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(5):1073-81.
119. Marcusson LL, Olofsson SK, Komp Lindgren P, Cars O, Hughes D. Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin for urinary tract infection isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(6):938-43. Epub 2005 Apr 28.
120. Endimiani A, Luzzaro F, Perilli M, Lombardi G, Coli A, Tamborini A et al. Bacteremia due to *Klebsiella pneumoniae* isolates producing the TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase: treatment outcome of patients receiving imipenem or ciprofloxacin. *Clin Infect Dis* 2004;38(2):243-51.
121. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. Impact of inadequate initial antimicrobial therapy on mortality in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: variability by site of infection. *Arch Intern Med.* 2005;165(12):1375-80.
122. Lautenbach E, Metlay JP, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Association between fluoroquinolone resistance and mortality in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections: the role of inadequate empirical antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 2005;41(7):923-29. Epub 2005 Aug 24.
123. Soto SM, Jimenez de Anta MT, Vila J. Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or -independent pathways, respectively. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(2):649-53.

124. Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(9):3003-10.
125. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25(5):358-73.
126. Bosso JA, Mauldin PD. Using interrupted time series analysis to assess associations of fluoroquinolone formulary changes with susceptibility of gram-negative pathogens and isolation rates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(6):2106-12.
127. Malik M, Hoatam G, Chavda K, Kerns RJ, Drlica K. Novel approach for comparing the abilities of quinolones to restrict the emergence of resistant mutants during quinolone exposure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):149-56. Epub 2009 Oct 5.
128. Oteo J, Campos J, Baquero F and Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2001). *J Antimicrob Chemother.* 2002;50(6):945-52.
129. Valverde A, Coque TM, Sanchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol* 2004;42(10):4769-75.

130. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis* 2005;11(1):54-61.
131. Reuter S, Kern WV, Sigge A, Döhner H, Marre K, Kern P et al. Impact of fluoroquinolone prophylaxis on reduced infection-related mortality among patients with neutropenia and hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* 2005;40(8):1087-93. Epub 2005 Mar 11.
132. Perfeito L, Fernandes L, Mota C, Gordo I. Adaptive mutations in bacteria: high rate and small effects. *Science*. 2007;317(5839):813-15.
133. Mahamat A, Lavigne JP, Fabbro-Peray P, Kinowski JM, Daurès JP, Sotto A. Evolution of fluoroquinolone resistance among *Escherichia coli* urinary tract isolates from a French university hospital: application of the dynamic regression model. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(4):301-306.
134. Urbánek K, Kolár M, Strojil J, Koukalová D, Cekanová L, Hejnar P. Utilization of fluoroquinolones and *Escherichia coli* resistance in urinary tract infection: inpatients and outpatients. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2005;14(10):741-45.
135. Ellington MJ, Woodford N. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure? *J Antimicrob Chemother* 2006;57(6):1026-29. Epub 2006 Apr 3.
136. Cooper TF. Recombination Speeds Adaptation by Reducing Competition between Beneficial Mutations in Populations of *Escherichia coli*. *PLoS Biol*. 2007;5(9):e225 [Epub ahead of print]

137. Karisik E, Ellington MJ, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Development of high-level ceftazidime resistance via single-base substitutions of blaCTX-M-3 in hyper-mutable *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(8):803-806.
138. Sorlozano A, Gutiérrez J, Jiménez A, de Dios Luna J, Martínez JL. Contribution of a New Mutation in parE to Quinolone Resistance in Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45(8):2740-42.
139. Baquero MR, Galán JC, del Carmen Turrientes M, Canton R, Coque TM, Martínez JL et al. Increased mutation frequencies in *Escherichia coli* isolates harboring extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(11):4754-56.
140. Morgan-Linnell SK, Becnel Boyd L, Steffen D, Zechiedrich L. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):235-41. Epub 2008 Oct 6.
141. Dehal PS, Joachimiak MP, Price MN, Bates JT, Baumohl JK, Chivian D et al. MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Database issue):D396-400. Epub 2009 Nov 11.
142. Olofsson SK, Marcusson LL, Strömbäck A, Hughes D, Cars O. Dose-related selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(4):795-801. Epub 2007 Jul 16.



## 8.- APÉNDICES



**APÉNDICE 1.- SONDAS CONSIDERADAS SIGNIFICATIVAS EN LAS DISTINTAS COMPARACIONES.**

**Comparación nº1: RNP(-) vs SNP(-)**

Probeset ID	Gene Title	Gene Symbol	p-value(RNP-SNP-)	vs.	Fold-Change(RNP-vs. SNP-)
1766638_s_at	rRNA large subunit methyltransferase /// 23S rRNA m(3)Psi1915 pseudouridine meth	ECs0674 /// rlmH /// ybeA	0,00220406		3,06193
1760994_at	hypothetical protein	c1591	0,00247103		-2,44611
1763489_s_at	putative capsid protein of prophage /// putative capsid protein of prophage ///	c1451 /// c1575 /// ECs1110 /// ECs2730 /// Z2136 /// Z2359	0,00363397		-3,29131
1765648_s_at	regulator protein FrmR /// regulator protein that represses frmRAB operon /// re	ECs0412 /// frmR /// yaiN	0,00394394		2,9159
1765541_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein /// hypothet	ECs0436 /// yaiI /// yaiI /// Z0483	0,00441305		-1,84182
1763264_s_at	putative cytochrome oxidase /// putative cytochrome oxidase /// hypothetical pro	ECs3282 /// yfeH /// yfeH /// yfeH	0,00450635		-2,14214
1762714_s_at	molybdopterin biosynthesis protein MoeA /// molybdopterin biosynthesis protein	moeA /// moeA	0,00463189		2,10314
1768134_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted acyltransferase with	ECs5109 /// yjdJ /// yjdJ	0,00476108		3,0445
1765908_at	hypothetical protein	c4420	0,00491086		-2,79473
1768364_s_at	GTP-binding protein Era ///	era /// era	0,00519964		2,04713

	membrane-associated, 16S rRNA-binding GTPase			
1763083_s_at	transposase insl /// KpLE2 phage-like element; IS30 transposase /// IS30 transpo	insl /// insl /// tra8_2 /// tra8_3 /// ydbA /// Z1133 /// Z1572	0,00520608	-9,58155
1761004_at	hypothetical protein	c0943	0,00561523	-3,97925
1759362_s_at	hypothetical protein	c3925	0,00571564	2,32244
1765329_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein /// Qin p	ECs1760 /// ECs2285 /// ydfD /// ydfD /// Z2038 /// Z6079	0,00588913	10,3729
1766385_s_at	DNA-binding transcriptional repressor UxuR /// DNA-binding transcriptional repre	ECs5283 /// uxuR /// uxuR	0,00602983	-2,03911
1767319_s_at	acridine efflux pump /// acriflavin resistance protein B /// multidrug efflux sy	acrB /// acrB /// acrB /// ECs0515	0,00630728	2,96387
1764886_s_at	putative Rz endopeptidase from lambdoid prophage DLP12 /// putative endopeptidas	c1563 /// ECs1623 /// ECs1624 /// rzoD /// rzoR /// rzpD /// rzpR /// Z1877	0,00649805	-1,82225
1763715_s_at	predicted protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein	bcsF /// ECs4417 /// yhjT	0,00703793	6,82652
1763304_s_at	putative transferase /// putative transferase	ECs3984 /// yqjG	0,00725924	2,23464
1761394_s_at	putative capsid assembly protein of prophage /// putative capsid assembly protei	c1448 /// c1572 /// ECs1108 /// ECs2732 /// Z2134 /// Z2361	0,00734322	-2,38504
1762445_at	ornithine carbamoyltransferase subunit F	argI	0,00746397	-3,93277
1760949_s_at	putative replication protein P of bacteriophage /// replication protein P /// ph	c1550 /// ECs1612 /// ECs2986 /// Z1451 /// Z1869 /// Z3355	0,00856396	-2,09815
1763203_s_at	---	---	0,00910698	2,33467

1760890_s_at	conserved protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypothetical	arnD /// ECs3144 /// yfbH /// Z3514	0,00911657	2,58472
1768883_at	ShIA/HecA/FhaA exofamily protein	c0345	0,0093113	-2,10992
1766287_s_at	hypothetical protein /// C4-type zinc finger TraR	ECs0805 /// ECs1170	0,00982633	-9,86423
1765050_s_at	potassium transporter peripheral membrane component /// NAD-binding component of	trkA /// trkA	0,00987624	3,33811
1763444_s_at	lipoprotein transporter ATP-binding subunit /// outer membrane-specific lipoprot	loID /// loID	0,00995764	2,16704
1761837_s_at	putative minor tail protein /// putative minor tail protein /// putative tail co	ECs1112 /// ECs2728 /// Z2138 /// Z2357	0,0100229	-2,44672
1767173_s_at	hypothetical protein /// Outer membrane porin protein nmpC precursor /// pseudo	c2347 /// nmpC /// nmpC	0,0104842	-6,87416
1766122_s_at	---	---	0,0108214	2,0517
1765122_at	hypothetical protein	c1524	0,010945	-3,29816
1760597_s_at	ribosomal-protein-S5-alanine N-acetyltransferase /// ribosomal-protein-S5-alanin	ECs1444 /// rimJ	0,0110799	-1,91848
1764149_s_at	putative protease /// predicted protease, membrane anchored /// putative proteas	ECs0552 /// qmcA /// ybbK /// ybbK	0,0114452	-2,97473
1764684_at	hypothetical protein	c3273	0,011702	-2,47454
1765973_s_at	putative tail component of prophage /// putative tail fiber component K of proph	c1588 /// c3156 /// ECs0840 /// ECs1646 /// Z0978	0,0124941	-2,14687
1766197_s_at	membrane-bound lytic murein transglycosylase D /// predicted	mltD /// mltD	0,0126166	3,07765

	membrane-bound lyti			
1762647_at	hypothetical protein	yiiE	0,0130029	-1,86589
1761224_at	multidrug efflux protein	emrE	0,0136885	-2,22857
1765645_at	lucC protein	iucC	0,0139478	3,91222
1763160_s_at	RNA polymerase factor sigma-54 /// RNA polymerase factor sigma-54 /// RNA polyme	ECs4081 /// rpoN /// rpoN	0,0142087	2,05871
1764728_s_at	---	---	0,0150157	3,17029
1761797_at	hypothetical protein	c5477	0,0150967	-14,6723
1766772_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted epimerase, with NAD(	c2543 /// ECs2818 /// yeeZ /// Z3178	0,0152479	-2,21386
1766796_s_at	menaquinone-specific isochorismate synthase /// menaquinone-specific isochorisma	ECs3153 /// menF /// menF	0,0154707	3,38413
1762242_s_at	---	---	0,0157595	1,94163
1767113_at	partial tonB-like membrane protein encoded within prophage	c1565	0,0158457	-2,26129
1766320_s_at	putative hydrogenase 2 b cytochrome subunit /// putative hydrogenase 2 b cytochr	ECs3880 /// hybB /// hybB	0,016893	2,32016
1759607_at	putative head-tail joining protein of prophage	c1577	0,0173978	-3,23717
1765824_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein	c1248 /// c5384	0,0176547	-2,50891
1760965_s_at	heat shock protein HtpX /// heat shock protein HtpX /// predicted endopeptidase	ECs2539 /// htpX /// htpX	0,0178555	-3,40827
1768844_s_at	alcohol dehydrogenase /// ethanol-active dehydrogenase/acetaldehyde-	adhP /// adhP /// ECs2082	0,0183812	2,39457

	active reduc			
1769019_s_at	chaperone protein DnaJ /// chaperone Hsp40, co-chaperone with DnaK /// chaperone	dnaJ /// dnaJ /// ECs0015	0,0184237	-2,02037
1766064_at	hypothetical protein	c4521	0,0186387	-1,79372
1767911_s_at	methionine sulfoxide reductase B /// methionine sulfoxide reductase B /// methio	ECs2487 /// msrB /// yeaA	0,0190438	-2,33914
1767524_s_at	hypothetical protein /// conserved inner membrane protein /// hypothetical prote	ECs5239 /// lptG /// yjjQ	0,0192042	2,00489
1766075_s_at	glutaredoxin 1 /// glutaredoxin 1, redox coenzyme for ribonucleotide reductase (	grxA /// grxA	0,0195534	-2,1653
1762810_s_at	electron transport complex RxsE subunit /// predicted inner membrane NADH-quinon	ECs2341 /// rsxE /// ydgQ	0,0196151	2,20586
1767568_s_at	predicted inner membrane protein /// hypothetical protein /// hypothetical prote	bcsG /// ECs4418 /// yhjU	0,0197517	3,44404
1762886_s_at	disulfide isomerase/thiol-disulfide oxidase /// periplasmic disulfide isomerase/	dsbG /// dsbG	0,020326	4,26991
1765864_s_at	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase /// hypoxanthine-guanine phosphor	ECs0129 /// hpt /// hpt	0,0208441	3,88991
1761771_s_at	L,D-carboxypeptidase A	ldcA	0,0213891	2,25205
1764273_at	putative lactate dehydrogenase	c5039	0,0215883	-1,85154
1761305_s_at	penicillin-binding protein 2 /// penicillin-binding protein 2 /// transpeptidase	ECs0673 /// mrdA /// mrdA	0,0226662	2,10362
1759428_s_at	periplasmic thioredoxin of cytochrome c-type biogenesis ///	ccmG /// dsbE /// dsbE /// ECs3084	0,0227709	1,73975

	disulfide oxidoreduc			
1767731_s_at	translation initiation factor IF-2 /// fused protein chain initiation factor 2,	infB /// infB	0,0227834	2,21075
1761565_s_at	glutathione synthetase /// glutathione synthetase	ECs3823 /// gshB	0,0228841	-1,73989
1763473_s_at	alpha-ketoglutarate transporter /// alpha-ketoglutarate transporter	ECs3454 /// kgtP	0,0230177	1,66389
1759695_at	sulfur carrier protein ThiS	thiS	0,0230552	-1,7874
1767952_at	hypothetical protein	yjgK	0,0230837	-17,1774
1760466_at	adhesin	yfaL	0,0233025	-2,0456
1759749_s_at	hypothetical protein /// predicted hydrolase /// hypothetical protein	ECs0982 /// ycaC /// ycaC	0,0240545	4,56666
1760140_s_at	4-alpha-L-fucosyltransferase /// 4-alpha-L-fucosyltransferase /// TDP-Fuc4NAc:li	c4714 /// ECs4726 /// rffT /// Z5304	0,0242499	1,87993
1761413_s_at	hypothetical protein /// protease 2 /// protease 2 /// protease II	c2255 /// ECs2555 /// ptrB /// ptrB	0,0245891	2,31864
1767711_s_at	transcriptional regulator Cbl /// DNA-binding transcriptional activator of cyste	cbl /// cbl	0,0246943	1,97002
1765846_s_at	arginine repressor /// DNA-binding transcriptional dual regulator, L-arginine-bi	argR /// argR /// ECs4110	0,0250741	-2,58593
1769133_at	hypothetical protein	c5346	0,0255847	-8,05114
1765694_s_at	esterase YpfH /// esterase YpfH /// predicted hydrolase	ECs3335 /// ypfH /// ypfH	0,0256733	-1,76605
1761352_s_at	hypothetical protein /// sulfate transporter subunit /// sulfate transporter sub	c4868 /// ECs4842 /// sbp	0,0260974	-2,27629
1761031_s_at	lysyl-tRNA synthetase /// lysine	lysS /// lysS	0,0261634	2,94634

	tRNA synthetase, constitutive			
1764940_at	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	nrdD	0,0261964	-11,5431
1767946_s_at	sensor protein BasS/PmrB /// sensory histidine kinase in two-component regulator	basS /// basS /// ECs5094	0,0262565	1,85737
1767401_at	PhnA protein	phnA	0,0264173	2,1992
1766997_s_at	transcriptional regulator PhoU /// transcriptional regulator PhoU /// negative r	ECs4660 /// phoU /// phoU	0,0266301	2,41679
1764725_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein /// hypothet	ECs0952 /// ybjQ /// ybjQ /// Z1099	0,0268078	-2,04789
1766474_at	hypothetical protein	c1567	0,0273545	-2,14799
1765273_s_at	ribonuclease HII /// ribonuclease HII, degrades RNA of DNA-RNA hybrids	rnhB /// rnhB	0,0275076	2,27302
1765036_s_at	hypothetical protein /// DNA-binding protein, hemimethylated /// hypothetical pr	ECs1050 /// hspQ /// yccV	0,0277343	-2,01635
1769031_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs2496 /// yeaK /// yeaK	0,0277511	2,33913
1765679_s_at	putative tail fiber component M of prophage /// putative minor tail protein ///	c1461 /// ECs1115 /// ECs2165 /// Z2141 /// Z2353	0,0277954	-1,94369
1763059_s_at	hypothetical protein /// toxic polypeptide, small /// hypothetical protein	c4351 /// ldrD /// Z4955	0,0278965	1,94873
1766924_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved inner membrane prote	ECs3050 /// yeiH /// yeiH	0,0282552	-1,75209
1766070_s_at	putative radC-like protein yeeS	c0273 /// c1282 ///	0,0284277	1,64357



	/// putative radC-like protein yeeS /// putative	c2529 /// c3671 /// c4573 /// c5152 /// ECs1403 /// ECs2803 /// yeeS /// Z1217 /// Z1657		
1769100_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs5108 /// yjdl /// yjdl	0,0286917	3,50805
1763447_s_at	NADH dehydrogenase subunit M /// NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subuni	nuoM /// nuoM	0,0292337	2,27204
1764923_s_at	hypothetical protein /// predicted protein /// hypothetical protein	dsrB /// dsrB /// ECs2691	0,0293954	-2,22653
1761096_s_at	ADP-L-glycero-D- mannoheptose-6-epimerase /// ADP-L-glycero-D- mannoheptose-6-epim	rfaD /// rfaD	0,0298915	2,05866
1765440_s_at	muropeptide transporter	ampG	0,0299657	1,84592
1761526_s_at	acyl-CoA thioester hydrolase YfbB /// acyl-CoA thioester hydrolase YfbB /// pred	ECs3151 /// yfbB /// yfbB	0,0300678	1,93345
1761950_s_at	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta /// phenylalanine tRNA synthetase, bet	pheT /// pheT	0,0303731	2,44714
1761552_s_at	dTDP-glucose 4,6-dehydratase /// dTDP-glucose 4,6- dehydratase	ECs4721 /// rffG	0,0304524	1,95823
1764799_s_at	putative structural protein /// putative structural protein /// hypothetical pro	ECs5324 /// yjjP /// yjjP /// yjjP	0,0307992	1,96293
1762830_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved	ECs3551 /// yqaA /// yqaA /// Z3990	0,0308978	1,96559

	inner membrane prote			
1760813_s_at	hypothetical protein /// conserved protein /// hypothetical protein	ECs2574 /// yebC /// yebC	0,0312473	1,80888
1765167_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs4853 /// yiiU /// zapB	0,0313171	-1,78419
1767503_s_at	GTP-binding protein /// GTP-binding protein /// GTP-binding protein	ECs4793 /// typA /// yihK	0,0321554	3,78364
1762684_at	hypothetical protein	c5476	0,0322179	-15,8586
1762688_s_at	hypothetical protein	c0550	0,0322443	2,05553
1767138_s_at	putative sulfatase /// putative sulfatase /// putative sulfatase yidJ /// predic	ECs4619 /// yidJ /// yidJ /// yidJ	0,0322448	-1,69934
1762209_s_at	---	---	0,0326839	-2,13341
1765995_s_at	electron transport complex protein RnfC /// electron transport complex protein R	c2021 /// ECs2338 /// rsxC /// Z2636	0,0328281	3,31517
1760175_at	putative transcriptional activator	ECs1588	0,032829	-1,7244
1760674_s_at	gap repair protein /// DNA repair protein RecO	recO /// recO	0,0333343	2,83868
1768107_s_at	nitrite reductase (NAD(P)H) subunit /// nitrite reductase (NAD(P)H) subunit ///	ECs4216 /// nirB /// nirB /// nirB	0,0333498	-3,44501
1764390_s_at	hypothetical protein	c4090	0,0333974	2,24476
1763686_at	3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	fabG	0,0334296	-1,85295
1761964_s_at	thioredoxin 2 /// thioredoxin 2	ECs3448 /// trxC	0,0334972	-2,05295
1762331_s_at	aminoglycoside/multidrug efflux system /// aminoglycoside/multidrug efflux syste	acrD /// ECs3332	0,0334978	2,21463

1765516_s_at	putative GTPase HflX /// putative GTPase HflX /// predicted GTPase	ECs5149 /// hflX /// hflX	0,0337558	-1,76312
1767192_s_at	L-serine dehydratase /// L-serine dehydratase (deaminase), L-SD2 /// L-serine de	ECs3657 /// sdaB /// sdaB /// sdaB	0,0341393	2,66194
1765890_at	predicted alcohol dehydrogenase, Zn-dependent and NAD(P)-binding	yjgB	0,0342285	3,77394
1764363_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs2578 /// yecE /// yecE	0,035156	2,05124
1767311_s_at	apolipoprotein N-acyltransferase	Int	0,0354556	2,55766
1763307_s_at	electron transport complex protein RnfD /// predicted inner membrane oxidoreduct	rnfD /// rsxD	0,0361508	2,3192
1768874_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted hydrolase /// hypoth	c1801 /// ECs1909 /// ycjY /// Z2442	0,036326	1,8849
1761898_s_at	DNA polymerase III subunit delta /// DNA polymerase III, delta subunit	holA /// holA	0,036714	2,23484
1765734_s_at	predicted DNA-binding transcriptional regulator /// putative transcriptional reg	nemR /// ydhM	0,0367703	-7,64829
1767853_at	chorismate synthase	aroC	0,0368577	-2,93888
1761688_s_at	putative tripeptide transporter permease /// predicted transporter	tppB /// tppB	0,0368836	2,97796
1764010_s_at	RfaP /// lipopolysaccharide core biosynthesis protein rfaP /// putative LPS bios	ECs4505 /// rfaP /// waaP	0,0369221	2,34412
1768590_s_at	---	---	0,0371649	-1,78432

1768748_s_at	hypothetical protein /// universal stress protein; broad regulatory function? //	ECs4367 /// uspA /// uspA /// uspA	0,0374806	-1,94194
1768043_s_at	phosphoribosylglycinamide formyltransferase /// phosphoribosylglycinamide formyl	purN /// purN	0,037513	1,7578
1763091_s_at	nitrite reductase small subunit /// nitrite reductase, NAD(P)H-binding, small su	nirD /// nirD	0,0376406	-3,34731
1768412_s_at	lipid kinase /// lipid kinase /// phosphatidylglycerol kinase, metal-dependent /	ECs2892 /// yegS /// yegS /// Z3252	0,0377425	1,89011
1765901_s_at	RNA-binding protein Hfq /// HF-I, host factor for RNA phage Q beta replication	hfq /// hfq	0,038546	-1,91193
1769158_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein	ECs3989 /// yhaL /// yhaL	0,0385904	-1,80007
1768541_s_at	---	---	0,0386147	2,13075
1760272_s_at	D-mannonate oxidoreductase /// D-mannonate oxidoreductase, NAD-binding /// manno	ECs5282 /// uxuB /// uxuB /// uxuB	0,0386758	-2,09558
1763410_s_at	flagellar capping protein	fliD	0,0389712	-1,68425
1762885_at	hypothetical protein	c4811	0,0392099	1,67107
1768030_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs5195 /// ytfK /// ytfK	0,0397412	2,02409
1767988_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs0441 /// yaiE /// yaiE	0,0398693	2,39934
1768212_s_at	ADP-heptose:LPS heptosyl transferase I /// ADP-	ECs4499 /// rfaC	0,0398755	2,77202

	heptose:LPS transferase	heptosyl			
1769210_s_at	hypothetical protein		c2207	0,040076	-1,61822
1766943_s_at	putative dehydrogenase	glutamate	c0018	0,0400798	-2,10301
1759136_s_at	transcriptional regulator kdgR /// putative regulator /// predicted DNA-binding		c2236 /// ECs2537 /// kdgR /// Z2874	0,0404357	-1,88258
1761243_s_at	stationary phase inducible protein CsiE /// stationary phase inducible protein /		csiE /// csiE /// ECs3401	0,0409008	2,10043
1759883_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein /// hypothet		c2235 /// ECs5463 /// yobH /// Z2873	0,0410579	2,05634
1766203_s_at	DNA-binding transcriptional regulator CueR /// putative transcriptional regulato		ECs0545 /// ybbI	0,041062	4,30719
1763883_s_at	part of gsp divergon involved in type II protein secretion /// chromosome replic		gspB /// pinO	0,0411042	-1,77881
1767081_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein		ECs2024 /// ydcA /// ydcA	0,0412415	-2,2016
1759721_s_at	hypothetical protein /// conserved inner membrane protein /// hypothetical prote		ECs2530 /// yobD /// yobD /// Z2863	0,0412577	2,41325
1761192_at	Peyer's patch-specific virulence factor GipA		gipA	0,0416231	-2,01861
1766990_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein /// hypothet		ECs2486 /// yeaC /// yeaC /// Z2816	0,0417244	-2,07171
1760083_s_at	ABC transporter ATP-binding protein /// putative ABC		c3509 /// ECs3802 /// Z4270	0,0418067	1,97037

	transporter ATP-binding sub			
1768755_s_at	aspartate kinase III /// aspartate kinase III /// aspartokinase III	ECs5007 /// lysC /// lysC	0,0422348	2,49908
1764455_s_at	putative glucarate dehydratase /// (D)-glucarate dehydratase 1 /// putative gluc	ECs3647 /// gudD /// ygcX /// ygcX	0,0429456	-2,63144
1763031_s_at	leucyl-tRNA synthetase	leuS	0,0430007	2,14741
1764409_s_at	inorganic pyrophosphatase /// inorganic pyrophosphatase	ECs5204 /// ppa	0,0430377	2,95884
1763921_s_at	putative transcriptional regulator LYSR-type /// putative transcriptional regula	ECs2817 /// yeeY /// yeeY /// yeeY	0,0431982	-2,69501
1760820_s_at	16S rRNA m(5)C1407 methyltransferase, SAM-dependent /// rRNA (cytosine-C(5)-)-me	rsmF /// yebU	0,0433731	2,7451
1760444_s_at	---	---	0,0436577	-2,12598
1766527_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein /// hypothet	ECs2695 /// yodC /// yodC /// Z3048	0,0441504	1,91412
1768428_s_at	glutamate/aspartate transport system permease /// glutamate/aspartate transport	ECs0693 /// gltJ /// gltJ /// gltJ	0,0443696	3,01627
1764477_at	ATP-dependent DNA helicase Rep	rep	0,0444077	-1,53279
1763066_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein /// hypothet	ECs2430 /// ydiZ /// ydiZ /// Z2753	0,0445315	1,79383
1761337_s_at	hypothetical protein	c4081	0,0446504	2,27509
1766160_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypot	c1532 /// ECs0806 /// ECs1171 /// ECs3005 /// Z0949 /// Z1433 /// Z3369	0,0446765	-5,46155

1760380_s_at	twin-arginine protein translocation system subunit TatC /// TatABCE protein tran	ECs4768 /// tatC /// tatC /// yigU	0,0455542	2,32214
1767578_s_at	putative ATP-binding protein of peptide transport system /// putative ATP-bindin	ECs1867 /// sapF /// sapF /// sapF	0,0455627	1,96387
1764663_s_at	hypothetical protein	c2949	0,0456409	2,63643
1768833_s_at	hypothetical protein	c4086	0,0463438	3,32363
1762067_at	magnesium-transporting ATPase MgtA	mgtA	0,0466744	-2,12202
1764230_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs1735 /// ychJ /// ychJ	0,0476554	2,22801
1768483_at	gluconate-6-phosphate dehydrogenase, decarboxylating	gnd	0,047718	-6,29624
1768330_s_at	hypothetical protein	c2114	0,0480384	1,76778
1767356_s_at	cation transport regulator /// cation transport protein chaC /// regulatory prot	chaC /// chaC /// chaC /// ECs1723	0,0480587	-1,60261
1766463_s_at	thiol:disulfide interchange protein precursor /// fused thiol:disulfide intercha	dipZ /// dsbD	0,0485215	2,03055
1764567_s_at	hydroperoxidase II /// hydroperoxidase HPII(III) (catalase)	katE /// katE	0,0488141	2,34344
1763882_at	peptidase PmbA	pmbA	0,0492883	-2,31738
1766326_s_at	potassium transporter /// potassium transporter	ECs4777 /// trkH	0,0494883	2,47564
1763876_s_at	---	---	0,049796	-1,63336

Comparación nº2: SP(-) vs SNP(-)

Probeset ID	Gene Title	Gene Symbol	p-value(SP- vs. SNP- )	Fold-Change(SP- vs. SNP-)
1766385_s_at	DNA-binding transcriptional repressor UxuR /// DNA-binding transcriptional repre	ECs5283 /// uxuR /// uxuR	0,00038784	-2,87404
1767923_s_at	hypothetical protein	c3988	0,0007182	-3,33311
1759980_s_at	aminoalkylphosphonic acid N-acetyltransferase /// predicted acyltransferase with	ECs5076 /// phnO /// phnO	0,00092323	3,68505
1768364_s_at	GTP-binding protein Era /// membrane-associated, 16S rRNA-binding GTPase	era /// era	0,0010351	2,4859
1765908_at	hypothetical protein	c4420	0,00120801	-3,55023
1767064_s_at	altronate oxidoreductase /// altronate oxidoreductase /// altronate oxidoreducta	ECs2128 /// uxaB /// uxaB	0,00170154	-3,77957
1764567_s_at	hydroperoxidase II /// hydroperoxidase HPII(III) (catalase)	katE /// katE	0,00188797	4,76173
1763984_s_at	hypothetical protein /// transposase insG /// KpLE2 phage-like element; IS4 pred	c1257 /// c3703 /// insG	0,00193979	20,0672
1763239_at	hypothetical protein	c4838	0,00226487	-15,6274
1760985_s_at	tRNA-dihydrouridine synthase A /// tRNA-dihydrouridine synthase A /// tRNA-dihyd	dusA /// ECs5031 /// yjbN	0,0023011	2,74573
1759312_at	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	c1220	0,00236691	3,17927
1763839_at	Lipid A-core, surface polymer ligase	waaL	0,00238291	9,17192
1764742_s_at	rod shape-determining protein	ECs4122 /// mreC ///	0,00254029	2,21608



	MreC /// rod shape-determining protein MreC /// ce	mreC		
1760740_at	hypothetical protein	c4837	0,00255393	-23,1144
1766363_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// putative transport protein Yhb	ECs4063 /// yhbE /// yhbE /// yhbE	0,00310002	4,27257
1762688_s_at	hypothetical protein	c0550	0,00322532	3,01028
1765252_at	lucB protein	iucB	0,00343435	-3,7092
1762242_s_at	---	---	0,00357729	2,35884
1768822_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein	ECs0884 /// ybiM	0,00382685	2,91459
1763264_s_at	putative cytochrome oxidase /// putative cytochrome oxidase /// hypothetical pro	ECs3282 /// yfeH /// yfeH /// yfeH	0,00404671	-2,17049
1759403_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein	c0348 /// c1209	0,00409816	3,91515
1765541_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein /// hypothet	ECs0436 /// yail /// yail /// Z0483	0,00410163	-1,85503
1762935_s_at	putative sulfate transporter YchM /// putative sulfate transporter YchM /// pred	ECs1711 /// ychM /// ychM	0,00413833	3,3991
1760728_s_at	glucuronate isomerase /// uronate isomerase /// glucuronate isomerase	ECs3974 /// uxaC /// uxaC	0,00414044	-3,87102
1759721_s_at	hypothetical protein /// conserved inner membrane protein /// hypothetical prote	ECs2530 /// yobD /// yobD /// Z2863	0,00420926	3,93758
1759362_s_at	hypothetical protein	c3925	0,00444662	2,40547
1765516_s_at	putative GTPase HfIX /// putative GTPase HfIX /// predicted GTPase	ECs5149 /// hfIX /// hfIX	0,00451722	-2,2967

1761526_s_at	acyl-CoA thioester hydrolase YfbB /// acyl-CoA thioester hydrolase YfbB /// pred	ECs3151 /// yfbB /// yfbB	0,00452384	2,56291
1767220_at	lipopolysaccharide 1,2-glucosyltransferase	rfaJ	0,00463928	14,7317
1760813_s_at	hypothetical protein /// conserved protein /// hypothetical protein	ECs2574 /// yebC /// yebC	0,00467393	2,33741
1761096_s_at	ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase /// ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epim	rfaD /// rfaD	0,00469608	2,78204
1760326_s_at	GTPase involved in cell partitioning and DNA repair /// GTPase ObgE	obgE /// obgE	0,00481497	2,1065
1760994_at	hypothetical protein	c1591	0,00487201	-2,2369
1761352_s_at	hypothetical protein /// sulfate transporter subunit /// sulfate transporter sub	c4868 /// ECs4842 /// sbp	0,00505968	-3,0569
1768662_s_at	murein transglycosylase C /// membrane-bound lytic murein transglycosylase C	mltC /// mltC	0,00507527	1,93197
1764477_at	ATP-dependent DNA helicase Rep	rep	0,00533425	-1,91809
1760138_s_at	heme exporter subunit /// heme exporter protein C /// heme exporter protein C	ccmC /// ccmC /// ECs3088	0,00534528	2,54968
1765297_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted peptidase	ECs2516 /// yeaZ /// yeaZ	0,00543042	2,50675
1768168_at	putative lipase	c4836	0,0055796	-5,29844
1761004_at	hypothetical protein	c0943	0,00566628	-3,97105
1762714_s_at	molybdopterin biosynthesis protein MoeA /// molybdopterin biosynthesis protein	moeA /// moeA	0,00579678	2,04765

1766638_s_at	rRNA large subunit methyltransferase /// 23S rRNA m(3)Psi1915 pseudouridine meth	ECs0674 /// rlmH /// ybeA	0,00588079	2,6122
1766049_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs0669 /// ybeD /// ybeD	0,00620917	-3,20576
1763489_s_at	putative capsid protein of prophage /// putative capsid protein of prophage ///	c1451 /// c1575 /// ECs1110 /// ECs2730 /// Z2136 /// Z2359	0,00652314	-2,95517
1764710_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs4158 /// yhdN /// yhdN	0,00672213	-2,92729
1764372_s_at	---	---	0,0068057	-2,29331
1760166_s_at	hypothetical protein	c4088	0,00687508	2,86631
1763733_s_at	D-ribose pyranase /// D-ribose pyranase /// predicted cytoplasmic sugar-binding	ECs4690 /// rbsD /// rbsD	0,00694818	6,04767
1764010_s_at	RfaP /// lipopolysaccharide core biosynthesis protein rfaP /// putative LPS bios	ECs4505 /// rfaP /// waaP	0,00723941	3,25401
1759695_at	sulfur carrier protein ThiS	thiS	0,0078248	-2,04201
1759452_at	hypothetical protein	c2498	0,0078504	-1,79173
1763084_at	putative response regulator	c3565	0,00807348	11,1465
1767081_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein	ECs2024 /// ydcA /// ydcA	0,00812709	-3,00552
1764390_s_at	hypothetical protein	c4090	0,00815663	2,91958
1767535_at	hypothetical protein	c1269	0,0082361	3,86852
1766220_at	ferric iron reductase involved in ferric hydroximate transport	fhuF	0,00893749	-4,69234
1765790_s_at	putative integrase encoded by prophage CP-933K; partial	Z0946	0,00922222	4,61876

1764762_s_at	mannose-specific PTS system protein IID /// mannose-specific PTS system protein	ECs2529 /// manZ /// manZ	0,00926107	3,35929
1766142_at	hypothetical protein	c1204	0,00936998	4,4328
1762297_at	putative beta1,3-glucosyltransferase	waaV	0,00961932	5,60965
1763403_s_at	ribose ABC transporter permease protein /// D-ribose transporter subunit	rbsC /// rbsC	0,00965944	2,2082
1768684_s_at	PTS system, mannose-specific IIAB component /// PTS system, mannose-specific IIA	ECs2527 /// manX /// manX	0,00975792	3,31274
1765279_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein	ECs2031 /// ydcH /// ydcH	0,0100881	3,19991
1759428_s_at	periplasmic thioredoxin of cytochrome c-type biogenesis /// disulfide oxidoreduc	ccmG /// dsbE /// dsbE /// ECs3084	0,0101348	1,91273
1761378_at	UDP-N-acetylmuramate:L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase	yjfG	0,0104305	-4,7377
1768412_s_at	lipid kinase /// lipid kinase /// phosphatidylglycerol kinase, metal-dependent /	ECs2892 /// yegS /// yegS /// Z3252	0,0105248	2,29266
1767578_s_at	putative ATP-binding protein of peptide transport system /// putative ATP-binding	ECs1867 /// sapF /// sapF /// sapF	0,0105806	2,51048
1762431_at	pseudo	ykfC	0,0107807	-3,99803
1766796_s_at	menaquinone-specific isochorismate synthase /// menaquinone-specific isochorisma	ECs3153 /// menF /// menF	0,0109787	3,67231
1765358_s_at	hypothetical protein ///	ECs4264 /// rtcB ///	0,0110138	1,99841

	hypothetical protein /// protein rtcB /// conserved pro	rtcB /// rtcB		
1766527_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein /// hypothet	ECs2695 /// yodC /// yodC /// Z3048	0,0112001	2,38543
1767319_s_at	acridine efflux pump /// acriflavin resistance protein B /// multidrug efflux sy	acrB /// acrB /// acrB /// ECs0515	0,011334	2,66484
1759102_s_at	RNase III /// ribonuclease III	rnc /// rnc	0,0117061	2,23494
1766286_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs4008 /// yhaV /// yhaV	0,0119601	-6,8478
1760597_s_at	ribosomal-protein-S5-alanine N- acetyltransferase /// ribosomal- protein-S5-alanin	ECs1444 /// rimJ	0,0120064	-1,90013
1766913_s_at	pyruvate kinase /// pyruvate kinase /// pyruvate kinase I	ECs2383 /// pykF /// pykF	0,0120369	3,13075
1759180_x_at	putative outer membrane protein /// putative Lom-like outer membrane protein of	ECs1991 /// Z3310	0,012073	-1,97046
1768043_s_at	phosphoribosylglycinamide formyltransferase /// phosphoribosylglycinamide formyl	purN /// purN	0,0122035	2,04275
1761819_s_at	heat shock protein 90 /// heat shock protein 90 /// molecular chaperone HSP90 fa	ECs0526 /// htpG /// htpG	0,0122703	-1,88239
1760646_s_at	50S ribosomal subunit protein L21 /// 50S ribosomal protein L21	rplU /// rplU	0,0123073	2,0043
1763069_s_at	mannose-specific PTS enzyme IIC /// PTS enzyme IIC, mannose- specific /// PTS sys	ECs2528 /// manY /// manY /// manY	0,0123113	2,94186
1766075_s_at	glutaredoxin 1 /// glutaredoxin 1, redox coenzyme for	grxA /// grxA	0,0123587	-2,32828

	ribonucleotide reductase (			
1762830_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved inner membrane prote	ECs3551 /// yqaA /// yqaA /// Z3990	0,0125423	2,25627
1763444_s_at	lipoprotein transporter ATP- binding subunit /// outer membrane-specific lipoprot	lolD /// lolD	0,0126498	2,09599
1768183_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein /// hypothet	ECs2535 /// yebO /// yebO /// Z2871	0,0128383	-1,75398
1768391_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted methyltransferase	ECs0508 /// ybaZ /// ybaZ	0,0128589	-2,40312
1762212_at	lipopolysaccharide 1,3- galactosyltransferase	rfal	0,0131965	5,39166
1761339_s_at	nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase /// nucleoside triphosphate pypho	ECs0103 /// mutT /// mutT	0,0132725	1,73401
1764726_s_at	nickel transporter permease NikC /// nickel transporter subunit	nikC /// nikC	0,0133722	1,9378
1765050_s_at	potassium transporter peripheral membrane component /// NAD- binding component of	trkA /// trkA	0,013413	3,12382
1761163_s_at	protein assembly complex, lipoprotein component /// outer membrane protein assem	bamB /// ECs3374 /// yfgL /// Z3775	0,0134188	2,31784
1760445_at	---	---	0,0135885	-2,48401
1762285_s_at	hypothetical protein /// unknown protein encoded by ISEc8	ECs3868 /// Z4338	0,0139769	-6,94764
1765645_at	lucC protein	iucC	0,0141055	-3,90075
1766441_s_at	50S ribosomal protein L27 /// 50S ribosomal subunit protein L27	rpmA /// rpmA	0,0141631	1,85381

1768660_s_at	30S ribosomal protein S9 /// 30S ribosomal subunit protein S9	rpsl /// rpsl	0,0141874	2,65601
1762885_at	hypothetical protein	c4811	0,014411	1,89038
		c0138 /// c0354 /// c1263 /// c1520 /// c1552 /// c3596 /// c5168 /// c5177 /// c5214 /// ECs1089 /// ECs1209 /// ECs1381 /// ECs1665 /// ECs1690 /// ECs1919 /// ECs2220 /// ECs2477 /// ECs2637 /// ECs2744 /// ECs2794 /// ECs2933 /// ECs2958 /// ECs3132 /// ECs3490 /// ECs3863 /// ECs4024 /// ECs5243 /// Z1199 /// Z1222 /// Z1639 /// Z1661 /// Z1933 /// Z1958 /// Z2074 /// Z2110 /// Z2375 /// Z2429 /// Z2804 /// Z2982 /// Z3093 /// Z3161 /// Z3299 /// Z3922 /// Z4335 /// Z4502 /// Z5879		
1763421_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypot	Z3299 /// Z3922 /// Z4335 /// Z4502 /// Z5879	0,0144603	-5,33578
	low-affinity phosphate transport /// low-affinity phosphate transport /// inorga	ECs4365 /// pitA /// pitA /// pitA	0,0149467	2,81867
1766374_s_at	thiamine monophosphate kinase	ECs0470 /// thiL ///	0,0149593	-2,70567

	/// thiamine monophosphate kinase /// thiamin-mono	thiL		
1769045_s_at	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase /// bifu	menD /// menD	0,0151295	2,02175
1761648_at	lipopolysaccharide core biosynthesis protein	rfaY	0,0154272	10,6847
1764651_at	hypothetical protein	ECs4536	0,0158179	-2,09468
1763777_s_at	iron-enterobactin transporter membrane protein /// iron-enterobactin transporter	ECs0629 /// fepD /// fepD	0,0159734	-1,87499
1764086_s_at	lipopolysaccharide transport periplasmic protein LptA /// periplasmic LPS-bindin	ECs4079 /// lptA /// yhbN	0,0160097	2,04226
1768530_s_at	lipid transporter ATP-binding/permease protein /// lipid transporter ATP-binding	ECs0997 /// msbA /// msbA	0,0165465	2,26856
1761604_s_at	methylglyoxal synthase	mgsA	0,017097	-1,93694
1765438_s_at	hypothetical protein	c3470	0,0171549	3,53111
1760281_s_at	---	---	0,017273	2,52806
1765864_s_at	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase /// hypoxanthine-guanine phosphor	ECs0129 /// hpt /// hpt	0,0173746	4,09478
1761544_s_at	exoribonuclease II /// exoribonuclease II /// ribonuclease II	ECs1859 /// rnb /// rnb	0,0174504	2,76522
1761327_s_at	hypothetical protein /// macrolide transporter ATP-binding /permease protein ///	c1016 /// ECs0965 /// macB /// macB /// ybjZ	0,0177958	-3,59502
1762723_s_at	---	---	0,0180367	1,82683
1759871_at	UDP-galactose:(galactosyl) LPS alpha1,2-galactosyltransferase	waaW	0,0181017	6,42623



1761351_at	Outer membrane porin protein nmpC precursor	c2348	0,0182756	2,73977
1767503_s_at	GTP-binding protein /// GTP-binding protein /// GTP-binding protein	ECs4793 /// typA /// yihK	0,0185812	4,4713
1762437_s_at	cytidylate kinase	cmk	0,0188447	2,74774
1765585_s_at	quinone oxidoreductase, NADPH-dependent /// quinone oxidoreductase, NADPH-depend	ECs5033 /// qor /// qorA	0,0189032	2,36644
1762942_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein	c3609 /// ECs1359	0,0190602	-2,92347
1761174_s_at	putative integrase encoded by prophage CP-933K; partial	Z0946	0,0191611	4,3605
1768748_s_at	hypothetical protein /// universal stress protein; broad regulatory function? //	ECs4367 /// uspA /// uspA /// uspA	0,0192811	-2,15656
1760965_s_at	heat shock protein HtpX /// heat shock protein HtpX /// predicted endopeptidase	ECs2539 /// htpX /// htpX	0,019364	-3,3408
1761493_s_at	NAD-dependent DNA ligase LigA /// DNA ligase, NAD(+)-dependent	ligA /// ligA	0,0193842	2,42072
1760870_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein	c1152 /// ECs5411	0,0194446	1,87544
1765263_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted lipid carrier protei	ECs4038 /// yhbT /// yhbT	0,0195551	-1,83007
1765944_at	shiF protein	shiF	0,019574	-2,77484
1760272_s_at	D-mannonate oxidoreductase /// D-mannonate oxidoreductase, NAD-binding /// manno	ECs5282 /// uxuB /// uxuB /// uxuB	0,0196437	-2,36289
1769064_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs1445 /// yceH /// yceH	0,0198571	-2,02025

1766834_s_at	aspartyl-tRNA synthetase	aspS	0,0198755	2,98081
1761322_s_at	gamma-glutamyl phosphate reductase /// gamma-glutamylphosphate reductase	proA /// proA	0,0199203	2,42572
1761337_s_at	hypothetical protein	c4081	0,0201924	2,67579
1764923_s_at	hypothetical protein /// predicted protein /// hypothetical protein	dsrB /// dsrB /// ECs2691	0,0204993	-2,37529
1762255_s_at	50S ribosomal protein L18 /// 50S ribosomal subunit protein L18	rpIR /// rpIR	0,0207969	1,9058
1765945_s_at	preprotein translocase subunit SecE /// preprotein translocase membrane subunit	secE /// secE	0,020908	2,30508
1768397_s_at	30S ribosomal protein S17 /// 30S ribosomal subunit protein S17	rpsQ /// rpsQ	0,0211285	2,64686
1763154_s_at	uridine kinase /// uridine kinase /// uridine/cytidine kinase	ECs2873 /// udk /// udk	0,021292	1,97129
1760535_s_at	ferredoxin-type protein essential for electron transfer from ubiquinol to peripl	napG /// napG	0,0213944	2,69865
1761394_s_at	putative capsid assembly protein of prophage /// putative capsid assembly protei	c1448 /// c1572 /// ECs1108 /// ECs2732 /// Z2134 /// Z2361	0,0215041	-2,03339
1768229_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted phosphopantetheinyl	ECs4649 /// yieE /// yieE	0,0215148	-1,96928
1763083_s_at	transposase insI /// KpLE2 phage-like element; IS30 transposase /// IS30 transpo	insI /// insI /// tra8_2 /// tra8_3 /// ydbA /// Z1133 /// Z1572	0,0216602	-5,69302
1763715_s_at	predicted protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein	bcsF /// ECs4417 /// yhjT	0,021756	4,72646
1762741_s_at	trehalose-6-phosphate phosphatase /// trehalose-6-phosphate phosphatase /// treh	ECs2605 /// otsB /// otsB	0,0218375	4,28759

1768060_s_at	putative acylphosphatase	c1106	0,021931	1,69046
1762203_s_at	N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase II /// N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase II	amiB /// ECs5145	0,0220276	2,64979
1763287_s_at	putative oxidoreductase /// putative oxidoreductase /// predicted oxidoreductase	ECs2008 /// ydbC /// ydbC	0,022034	1,79044
1760674_s_at	gap repair protein /// DNA repair protein RecO	recO /// recO	0,0221747	3,13185
1761856_s_at	30S ribosomal protein S19 /// 30S ribosomal subunit protein S19	rpsS /// rpsS	0,0222982	3,26857
1761571_s_at	quinol dehydrogenase membrane component /// ferredoxin-type protein essential fo	napH /// napH	0,0223091	2,62391
1760186_s_at	putative ATP-binding component of a transport system /// fused predicted transpo	ECs0897 /// ybiT /// ybiT /// ybiT	0,0223228	2,0196
1762548_s_at	adenine phosphoribosyltransferase /// adenine phosphoribosyltransferase	apt /// ECs0522	0,0223587	1,91938
1762075_s_at	50S ribosomal protein L29 /// 50S ribosomal subunit protein L29	rpmC /// rpmC	0,0224246	2,29706
1764839_s_at	cytochrome c-type biogenesis protein /// cytochrome c-type biogenesis protein cc	ccmF /// ccmF /// ccmF /// ECs3085	0,022611	1,92142
1759213_s_at	hypothetical protein	c2225	0,0228012	2,04948
1764786_s_at	endonuclease III /// endonuclease III /// DNA glycosylase and apyrimidinic (AP)	ECs2342 /// nth /// nth	0,0228806	2,8145
1760065_s_at	---	---	0,0230677	-7,6526
1764204_s_at	zinc-responsive transcriptional regulator /// DNA-binding	zntR /// zntR	0,0234584	-3,44019

	transcriptional activa			
1768018_s_at	hypothetical protein	c4078	0,0235656	2,5932
1759523_at	hypothetical protein	yjjU	0,0235662	1,7128
1761402_s_at	transcription antitermination protein NusG /// transcription termination factor	nusG /// nusG	0,0235673	2,02769
1768230_s_at	hypothetical protein	c4084	0,0238062	2,21778
1765116_s_at	putative protease La-like protein /// putative ATP-dependent protease /// predic	c1091 /// ECs1039 /// ycbZ /// Z1305	0,0239055	2,24584
1768775_s_at	D-ribose transporter subunit RbsB /// D-ribose transporter subunit RbsB /// D-ri	ECs4693 /// rbsB /// rbsB	0,0240121	2,15536
1766483_s_at	bifunctional enterobactin receptor/adhesin protein /// bifunctional enterobactin	c3610 /// ECs1360 /// Z1178 /// Z1617	0,0243955	-2,93359
1760820_s_at	16S rRNA m(5)C1407 methyltransferase, SAM-dependent /// rRNA (cytosine-C(5)-)-me	rsmF /// yebU	0,0249382	3,15196
1766516_at	MchB protein	mchB	0,0250956	2,69456
1766384_at	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	murB	0,0256175	4,49522
1762448_s_at	---	---	0,025692	-2,74124
1766817_s_at	cytochrome c biogenesis protein CcmA /// heme exporter subunit /// cytochrome c	ccmA /// ccmA /// ECs3090	0,0258593	1,7092
1764439_s_at	L-threonine aldolase /// L-allo-threonine aldolase, PLP-dependent /// L-threonin	ECs0956 /// ltaE /// ybjU	0,0260149	3,23988
1765053_at	hypothetical protein	c4435	0,0260283	2,57622

1759109_s_at	elongation factor P /// predicted elongation factor /// elongation factor P	ECs3063 /// yeiP /// yeiP	0,0260577	3,1067
1759494_s_at	predicted protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein	bhsA /// ECs1490 /// ycfR	0,0260771	-3,5356
1766650_s_at	sulfate transporter subunit /// sulfate transporter subunit	ECs4842 /// sbp	0,0261103	-2,17949
1766104_s_at	holo-(acyl carrier protein) synthase 2 /// holo-(acyl carrier protein) synthase	acpT /// ECs4342 /// yhhU /// Z4867	0,0261453	2,54421
1766423_s_at	nucleoid occlusion protein /// division inhibitor	slmA /// slmA	0,0262146	1,73642
1761513_s_at	hypothetical protein	c1103	0,0263318	1,60238
1764728_s_at	---	---	0,0263379	2,79476
1760140_s_at	4-alpha-L-fucosyltransferase /// 4-alpha-L-fucosyltransferase /// TDP-Fuc4NAc:li	c4714 /// ECs4726 /// rffT /// Z5304	0,0265982	1,8565
1761206_s_at	cytochrome c-type protein NapC /// cytochrome c-type protein NapC /// nitrate re	ECs3091 /// napC /// napC	0,0269055	2,55425
1765136_s_at	RNA-binding protein YhbY /// RNA-binding protein YhbY /// predicted RNA-binding	ECs4059 /// yhbY /// yhbY	0,0273588	4,15335
1767946_s_at	sensor protein BasS/PmrB /// sensory histidine kinase in two-component regulator	basS /// basS /// ECs5094	0,0276248	1,84462
1762409_s_at	UDP-N-acetylmuramate:L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase ///	ECs5210 /// mpl /// yjfG	0,0276772	3,17956
1761565_s_at	glutathione synthetase /// glutathione synthetase	ECs3823 /// gshB	0,0283829	-1,69638
1761771_s_at	L,D-carboxypeptidase A	ldcA	0,0290109	2,1384

1763031_s_at	leucyl-tRNA synthetase	leuS	0,0294566	2,30653
1766160_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypot	c1532 /// ECs0806 /// ECs1171 /// ECs3005 /// Z0949 /// Z1433 /// Z3369	0,0295964	-6,50365
1761552_s_at	dTDP-glucose 4,6-dehydratase /// dTDP-glucose 4,6-dehydratase	ECs4721 /// rffG	0,0299506	1,96319
1763776_s_at	mannonate dehydratase /// mannonate dehydratase /// mannonate hydrolase	ECs5281 /// uxuA /// uxuA	0,0301134	-2,59664
1763129_s_at	---	---	0,0302756	2,60841
1760050_s_at	Gam /// putative host-nuclease inhibitor protein Gam of bacteriophage BP-933W ///	ECs1176 /// gamW /// gamW /// Z3365	0,0302893	-3,97955
1769192_s_at	putative scaffolding protein in the formation of a murein- synthesizing holoenzym	ECs2491 /// mipA /// yeaF /// yeaF	0,0303058	2,35986
1766889_at	hypothetical protein	c3274	0,030345	7,32438
1765926_s_at	citrate lyase alpha chain /// citrate lyase, citrate-ACP transferase (alpha) sub	citF /// citF /// ECs0654	0,0303453	3,98527
1766322_at	---	---	0,0304394	1,66409
1766877_s_at	exodeoxyribonuclease X /// exodeoxyribonuclease X /// DNA exonuclease X /// exod	c2254 /// ECs2554 /// exoX /// Z2894	0,0309833	2,0254
1762585_at	2'-phosphotransferase	kptA	0,0311977	-3,51609
1760971_s_at	D-ribose transporter ATP binding protein /// D-ribose transporter ATP binding pr	ECs4691 /// rbsA /// rbsA	0,0312489	1,9869
1759352_s_at	50S ribosomal subunit protein L16 /// 50S ribosomal protein L16	rpIP /// rpIP	0,0317948	2,10031
1768511_s_at	cytoplasmic asparaginase I ///	ansA /// ansA	0,0320097	2,67087

	cytoplasmic L-asparaginase I			
1762289_at	---	---	0,0321033	-10,2003
1763230_s_at	hypothetical protein	c2839	0,0322498	3,39032
1761154_s_at	putative exonuclease encoded by prophage /// exonuclease /// exonuclease /// exo	c1534 /// ECs0809 /// ECs1174 /// ECs3002 /// exoD /// exoW /// Z0951 /// Z3367	0,0323465	-2,98772
1760534_s_at	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase /// UDP-N-acetyl glucosamine-2-epimerase ///	ECs4719 /// rffE /// wecB	0,0324914	2,65268
1767545_at	hypothetical protein	c5455	0,0327446	5,08725
1767731_s_at	translation initiation factor IF-2 /// fused protein chain initiation factor 2,	infB /// infB	0,0328819	2,0782
1760443_s_at	23S rRNA pseudouridylate synthase C /// 23S rRNA pseudouridylate synthase ///	ECs1464 /// rluC /// rluC /// yceC	0,0329276	2,26806
1767356_s_at	cation transport regulator /// cation transport protein chaC /// regulatory prot	chaC /// chaC /// chaC /// ECs1723	0,0329751	-1,67693
1762606_s_at	heme exporter protein C /// Heme exporter protein D /// cytochrome c biogenesis	ccmD /// ccmD /// ccmD /// ECs3087	0,0332707	2,06657
1765138_s_at	arginine decarboxylase /// arginine decarboxylase /// biosynthetic arginine deca	ECs3814 /// speA /// speA	0,0333958	2,18694
1763160_s_at	RNA polymerase factor sigma-54 /// RNA polymerase factor sigma-54 /// RNA polyme	ECs4081 /// rpoN /// rpoN	0,0333995	1,82792
1762891_s_at	ammonium transporter /// ammonium transporter	amtB /// ECs0505	0,0334099	1,37386
1765899_s_at	anaerobic dimethyl sulfoxide reductase subunit A /// anaerobic	dmsA /// dmsA /// dmsA /// ECs0979	0,0334816	1,62821

	dimethyl sulfoxid			
1759701_s_at	ABC transporter ATPase component /// fused predicted transporter subunits of ABC	ECs1033 /// uup /// uup	0,0336818	1,87246
1767680_at	ncRNA	gcvB	0,0338185	2,26636
1760270_s_at	assembly protein for periplasmic nitrate reductase /// assembly protein for peri	ECs3096 /// napD	0,0339614	2,31418
1764537_s_at	phosphoribosylaminoimidazole synthetase /// phosphoribosylaminoimidazole synthet	ECs3361 /// purM	0,034018	2,02789
1764375_at	hypothetical protein	c4754	0,0340806	3,88805
1761262_s_at	putative transport protein /// putative transport protein /// hypothetical prote	ECs3176 /// yfbS /// yfbS /// yfbS	0,0342405	-1,69633
1767041_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted DNase	ECs0868 /// ybhP /// ybhP	0,0343152	2,68211
1764141_s_at	rod shape-determining protein MreC /// rod shape-determining protein MreC /// ce	ECs4122 /// mreC /// mreC	0,034561	2,68343
1767807_s_at	50S ribosomal protein L32 /// 50S ribosomal subunit protein L32	rpmF /// rpmF	0,0346165	2,53587
1761910_s_at	hypothetical protein /// putative ATP-binding component of a transport system //	c2728 /// ECs3081 /// yejO /// yejO	0,0351336	-2,35399
1763066_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein /// hypothet	ECs2430 /// ydiZ /// ydiZ /// Z2753	0,0351543	1,85693
1764306_s_at	ribonuclease P /// protein C5 component of RNase P	rnpA /// rnpA	0,0352264	4,58719
1764579_s_at	Wzx protein /// O-antigen	wzxE /// wzxE	0,0354603	2,17015



	translocase			
1760019_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein	c1714 /// ECs5426	0,0356974	3,01495
1769070_s_at	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase /// 1-deoxyxylulose-5- phosphate synthase	dxs /// dxs	0,0360681	2,3663
1764661_at	hypothetical protein	c3767	0,0362321	-3,80006
1768777_at	hypothetical protein	c3276	0,0362511	2,67966
1766576_s_at	galactokinase /// galactokinase	ECs0785 /// galK	0,0362623	1,65504
1762726_s_at	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA /// tRNA (5- methylaminomethyl-2- thiouridylate	mnmA /// mnmA	0,0364654	1,94949
1764900_s_at	putative sulfatase /// putative sulfatase /// hypothetical protein /// predicted	ECs3080 /// yejM /// yejM /// yejM	0,036726	2,09726
1762158_s_at	putative proline-specific permease /// predicted cryptic proline transporter	proY /// proY	0,0367437	1,68741
1763638_s_at	50S ribosomal protein L20 /// 50S ribosomal subunit protein L20	rpIT /// rplT	0,037003	1,72226
1761031_s_at	lysyl-tRNA synthetase /// lysine tRNA synthetase, constitutive	lysS /// lysS	0,0372901	2,70887
1765273_s_at	ribonuclease HII /// ribonuclease HII, degrades RNA of DNA-RNA hybrids	rnhB /// rnhB	0,0375419	2,14773
1759496_s_at	hypothetical protein /// predicted acyltransferase with acyl-CoA N- acyltransfera	ECs4037 /// yhbS /// yhbS /// yhbS	0,0379989	-2,37946
1767524_s_at	hypothetical protein /// conserved inner membrane protein /// hypothetical prote	ECs5239 /// lptG /// yjqQ	0,0381893	1,81762

1764240_s_at	transaldolase A /// transaldolase A	ECs3326 /// talA	0,0384437	3,01874
1762832_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted phosphotransferase/k	ECs2431 /// yniA /// yniA /// Z2754	0,0384845	1,84043
1765694_s_at	esterase YpfH /// esterase YpfH /// predicted hydrolase	ECs3335 /// ypfH /// ypfH	0,0385789	-1,67885
1762810_s_at	electron transport complex RsxE subunit /// predicted inner membrane NADH-quinon	ECs2341 /// rsxE /// ydgQ	0,0386243	1,97522
1764666_at	KpLE2 phage-like element; predicted lyase/synthase	yjhH	0,0390137	-1,84259
1768672_s_at	putative ligase /// putative ligase /// hypothetical protein /// conserved prote	ECs0535 /// ybaP /// ybaP /// ybaP	0,0390139	-1,55106
1767604_s_at	hypothetical protein /// periplasmic protein /// hypothetical protein /// hypoth	c4265 /// dcrB /// ECs4321 /// Z4846	0,0390319	-1,76859
1766027_s_at	lambdoid prophage DLP12 lysis protein S /// putative holin protein /// putative	c1433 /// ECs1212 /// ECs2969 /// Z1468 /// Z3340	0,0394022	-2,26508
1768844_s_at	alcohol dehydrogenase /// ethanol-active dehydrogenase/acetalddehyde-active reduc	adhP /// adhP /// ECs2082	0,0394509	2,091
1767674_s_at	DNA-binding protein Fis /// global DNA-binding transcriptional dual regulator	fis /// fis	0,039589	3,56255
1760341_s_at	---	---	0,0401955	-1,98128
1761536_x_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein	ECs1408 /// Z1225 /// Z1663	0,0403207	-1,80777
1761685_s_at	hypothetical protein ///	ECs3274 /// yfeC ///	0,0403361	-1,80002

	hypothetical protein /// predicted DNA-binding transcri	yfeC		
1765151_s_at	30S ribosomal protein S5 /// 30S ribosomal subunit protein S5	rpsE /// rpsE	0,0403448	1,97484
1765806_s_at	naphthoate synthase /// naphthoate synthase /// dihydroxynaphthoic acid syntheta	ECs3150 /// menB /// menB	0,040544	2,80036
1763420_at	SitC protein	sitC	0,0405784	-2,33069
1765440_s_at	muropeptide transporter	ampG	0,0406236	1,76945
1764775_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein	ECs3815 /// yqgB /// yqgB	0,0406778	2,56364
1762706_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved inner membrane prote	ECs1852 /// yciS /// yciS	0,0407209	-2,70562
1765613_s_at	nitrogen regulation protein NR(II) /// sensory histidine kinase in two-component	glnL /// glnL	0,0408716	1,83801
1764558_s_at	hypothetical protein	Z4773	0,0409988	-2,24815
1759783_s_at	hypothetical protein /// unknown in putative ISEc8 /// unknown in putative ISEc8	ECs1393 /// Z1208 /// Z1648	0,0413081	-3,93188
1766277_s_at	tRNA pseudouridine synthase D /// tRNA(Glu) U13 pseudouridine synthase	truD /// truD	0,0415984	1,70051
1760226_s_at	hypothetical protein /// putative transport protein /// predicted inner membrane	c3427 /// ECs3689 /// ygdQ /// Z4150	0,0418766	2,37184
1760241_s_at	30S ribosomal subunit protein S6 /// 30S ribosomal protein S6	rpsF /// rpsF	0,0419222	2,13671
1763034_s_at	GMP synthase /// GMP synthetase (glutamine aminotransferase)	guaA /// guaA	0,0419928	3,177

1768278_s_at	putative exonuclease encoded by prophage /// exonuclease /// exonuclease /// exo	c1534 /// ECs0809 /// ECs1174 /// ECs3002 /// exoW /// Z0951 /// Z3367	0,0423988	-2,62174
1763242_s_at	paraquat-inducible protein B /// paraquat-inducible protein B	ECs1035 /// pqiB	0,0424557	1,78367
1760128_s_at	exodeoxyribonuclease VII small subunit /// exonuclease VII small subunit /// exo	ECs0476 /// xseB /// xseB	0,0425813	1,68732
1765803_at	hypothetical protein	c3634	0,0426592	-2,65202
1763499_s_at	nitrate reductase 1 beta subunit /// nitrate reductase 1, beta subunit /// respi	ECs1730 /// narH /// narH /// narH	0,0426852	-2,39146
1760748_s_at	putative transcriptional regulator /// predicted transcriptional regulator /// p	ECs5116 /// yjdC /// yjdC	0,042714	1,91518
1763033_s_at	---	---	0,0428291	1,42217
1759226_s_at	putative ABC transporter ATP-binding protein YhbG /// predicted transporter subu	ECs4080 /// lptB /// yhbG	0,0428561	2,0543
1765901_s_at	RNA-binding protein Hfq /// HF-I, host factor for RNA phage Q beta replication	hfq /// hfq	0,0428575	-1,88044
1767568_s_at	predicted inner membrane protein /// hypothetical protein /// hypothetical prote	bcsG /// ECs4418 /// yhjU	0,042884	2,82517
1763647_s_at	DNA repair protein RadA /// predicted repair protein /// DNA repair protein RadA	ECs5347 /// radA /// sms	0,0430859	1,6954
1763475_at	SitB protein	sitB	0,0432568	-3,54652
1764794_s_at	50S ribosomal protein L15 /// 50S ribosomal subunit protein L15	rplO /// rplO	0,0435934	1,96451
1763932_at	ncRNA	psrD	0,0437298	2,86981

1766726_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted zinc-dependent pepti	ECs4407 /// yhjJ /// yhjJ	0,043891	1,75967
1767852_s_at	elongation factor P /// elongation factor P /// Elongation factor EF-P	ECs5128 /// efp /// efp	0,0439827	2,5174
1761439_x_at	hypothetical protein	c1533	0,044493	-1,997
1763508_s_at	endonuclease IV /// endonuclease IV /// endonuclease IV with intrinsic 3'-5' exo	ECs3051 /// nfo /// nfo	0,0445299	2,30611
1759898_s_at	component of RuvABC resolvasome, endonuclease /// Holliday junction resolvase	ruvC /// ruvC	0,0447162	2,07408
1765561_s_at	50S ribosomal protein L9 /// 50S ribosomal subunit protein L9	rplI /// rplI	0,0452318	1,90892
1762912_s_at	---	---	0,0452474	2,34185
1761898_s_at	DNA polymerase III subunit delta /// DNA polymerase III, delta subunit	holA /// holA	0,0452885	2,14651
1761001_at	conserved inner membrane protein	yjeO	0,0454068	-2,12496
1768833_s_at	hypothetical protein	c4086	0,0454661	3,34309
1766028_s_at	putative DNA packaging protein of prophage /// putative DNA packaging protein of	c1446 /// c1570 /// ECs2734 /// ECs5406 /// Z2132 /// Z2363	0,0454908	-2,80243
1763445_s_at	biofilm-dependent modulation protein /// biofilm-dependent modulation protein //	bdm /// c1914 /// ECs2085 /// Z2229	0,0455255	2,12959
1762699_at	misc_RNA /// ncRNA	micF /// micF	0,0456947	1,68367
1764052_at	hypothetical protein	c3618	0,0457355	-1,91581
1766064_at	hypothetical protein	c4521	0,0457649	-1,61137
1762149_s_at	ABC transporter permease /// predicted transporter subunit:	yehY /// yehY	0,0459802	3,33693

	membrant o			
1764805_s_at	aquaporin Z /// aquaporin /// aquaporin Z	aqpZ /// aqpZ /// ECs0961	0,0463168	2,16283
1767177_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein	c5447 /// ECs5328	0,0465267	-1,76447
1762468_s_at	ATP-dependent RNA helicase RhIE /// ATP-dependent RNA helicase RhIE /// RNA heli	ECs0875 /// rhIE /// rhIE	0,0465979	2,89827
1759925_s_at	phosphomannomutase /// phosphomannomutase /// phosphomannomutase /// phosphomann	cpsG /// ECs2835 /// ECs2853 /// manB	0,0466606	-1,7973
1764284_at	---	---	0,0466619	-9,23721
1768494_s_at	peptide chain release factor 2 /// RF-2 /// peptide chain release factor RF-2	prfB /// prfB /// prfB	0,0468769	2,401
1763146_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted protein	ECs1672 /// ycgK /// ycgK	0,0469269	-1,84816
1763447_s_at	NADH dehydrogenase subunit M /// NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subuni	nuoM /// nuoM	0,0469907	2,08057
1762160_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// predicted outer membrane prote	ECs4140 /// yhdV /// yhdV	0,0474875	-1,85713
1764149_s_at	putative protease /// predicted protease, membrane anchored /// putative proteas	ECs0552 /// qmcA /// ybbK /// ybbK	0,0478223	-2,22775
1766065_s_at	citrate lyase synthetase (citrate (pro-3S)-lyase ligase /// [citrate [pro-3S]-ly	citC /// citC /// citC /// ECs0657	0,0479688	1,9127
1764684_at	hypothetical protein	c3273	0,0482012	1,9486

1767162_s_at	L-serine dehydratase 1 /// L-serine deaminase /// L-serine dehydratase 3 /// put	c3870 /// ECs3992 /// tdcG /// Z4464	0,0482374	-2,03117
1762824_s_at	transcriptional activator FlhD /// transcriptional activator FlhD /// DNA-bindin	ECs2602 /// flhD /// flhD	0,0486648	2,57497
1760008_s_at	ribosome modulation factor /// ribosome modulation factor	ECs1037 /// rmf	0,0486764	-1,96793
1763723_s_at	glutamate-1-semialdehyde aminotransferase /// glutamate-1-semialdehyde aminotran	ECs0158 /// hemL /// hemL	0,0487897	-1,65223
1759856_at	hypothetical protein	c1596	0,0490635	-3,39251
1766775_at	putative head-tail adaptor	ECs1593	0,0492445	-1,7711
1766320_s_at	putative hydrogenase 2 b cytochrome subunit /// putative hydrogenase 2 b cytochr	ECs3880 /// hybB /// hybB	0,0493912	1,93623
1767438_at	hypothetical protein	c1522	0,049487	-5,1009
1769031_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved protein	ECs2496 /// yeaK /// yeaK	0,0494888	2,09579
1760544_s_at	acetylase for 30S ribosomal subunit protein S18 /// ribosomal-protein-alanine N-	rimI /// rimI	0,0496632	1,8917

Comparación nº 3: RNP(+) vs RNP(-)

Probeset ID	Gene Title	Gene Symbol	p-value(RNP + vs. RNP-)	Fold-Change(RNP + vs. RNP-)
1765634_s_at	NrfC /// formate-dependent nitrite reductase; Fe-S centers /// NrfC protein ///	ECs5054 /// nrfC /// nrfC /// nrfC	0,0234536	1,99157
1761964_s_at	thioredoxin 2 /// thioredoxin 2	ECs3448 /// trxC	0,0352343	2,03566
1766075_s_at	glutaredoxin 1 /// glutaredoxin 1, redox coenzyme for ribonucleotide reductase (	grxA /// grxA	0,0395339	1,93585



Comparación nº4: RP(-) vs RNP(-)

Probeset ID	Gene Title	Gene Symbol	p-value(RP- vs. RNP-)	Fold-Change(RP- vs. RNP-)
1759484_at	hypothetical protein	c1416	0,00127148	7,12795
1759859_s_at	---	---	0,00189409	-8,87184
1759945_at	hypothetical protein	c1417	0,00345586	12,086
1764886_s_at	putative Rz endopeptidase from lambdoid prophage DLP12 /// putative endopeptidas	c1563 /// ECs1623 /// ECs1624 /// rzoD /// rzoR /// rzpD /// rzpR /// Z1877	0,00428501	1,90106
1766790_at	bifunctional phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase/phosphoribosyl-ATP pyrophosphatas	hisI	0,0087701	8,40682
1767450_s_at	hypothetical protein	c4650	0,0127742	-1,83461
1766482_at	---	---	0,0137304	5,25422
1765935_s_at	---	---	0,0142601	-81,6879
1763083_s_at	transposase insI /// KpLE2 phage-like element; IS30 transposase /// IS30 transpo	insI /// insI /// tra8_2 /// tra8_3 /// ydbA /// Z1133 /// Z1572	0,022253	5,63729
1765947_s_at	---	---	0,0224826	-6,47501
1762513_at	hypothetical protein	ydfR	0,0231004	12,9595
1763612_at	outer membrane receptor FepA	fepA	0,0238712	-1,55592
1764391_s_at	putative Rz endopeptidase from lambdoid prophage DLP12 /// putative endopeptidas	c1563 /// ECs1215 /// ECs1623 /// rzpD /// Z1473 /// Z1877	0,0238747	2,94297
1761888_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypot	c0275 /// c1280 /// c2527 /// c3669 /// c4571 /// c5155 /// ECs1402 /// ECs2802 /// Z1216 /// Z1656	0,0239659	-1,75518
1763000_s_at	hypothetical protein /// pseudo	yfcl /// yjiP	0,0261829	3,13472

1764201_s_at	---	---	0,0278119	-1,87174
1761526_s_at	acyl-CoA thioester hydrolase YfbB /// acyl-CoA thioester hydrolase YfbB /// pred	ECs3151 /// yfbB /// yfbB	0,0278713	-1,95542
1763240_s_at	hypothetical protein	c3603	0,0296276	3,60958
1761964_s_at	thioredoxin 2 /// thioredoxin 2	ECs3448 /// trxC	0,0305139	2,08517
1763460_at	hypothetical protein	c3602	0,032127	3,43766
1762118_s_at	---	---	0,032404	1,71034
1760442_s_at	putative tail component of prophage /// minor tail protein	c3159 /// ECs1644	0,0330764	2,17978
1759362_s_at	hypothetical protein	c3925	0,0335589	-1,81839
1763033_s_at	---	---	0,0353071	1,44632
1766992_at	hypothetical protein	c1526	0,0365853	1,72297
1765440_s_at	muropeptide transporter	ampG	0,0372134	-1,79123
1763557_x_at	hypothetical protein	c1425	0,0379342	2,4993
1764175_s_at	DNA-binding transcriptional regulator IscR /// DNA-binding transcriptional repre	ECs3397 /// iscR /// yfhP /// Z3798	0,0400823	-2,01496
1760003_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein	c5447 /// c5448 /// ECs5328	0,0426842	-3,3383
1759684_at	hypothetical protein	c1414	0,0432558	3,23144
1764042_s_at	hypothetical protein /// Rac prophage; predicted protein	ECs1939 /// ydaF	0,0434319	2,1179
1766378_s_at	hypothetical protein	c2757	0,0461599	-2,08347
1769163_s_at	tyrosine recombinase /// tyrosine recombinase /// tyrosine recombinase/inversion	ECs5271 /// fimB /// fimB	0,046396	-1,66484
1763692_s_at	restriction alleviation and modification protein /// Rac prophage; restriction a	lar /// ralR	0,0481605	2,06142
1762647_at	hypothetical protein	yiiE	0,0487102	1,59542

1769087_s_at	recombination and repair protein RecT /// Rac prophage; recombination and repair	recT /// recT	0,0490091	1,84403
1762714_s_at	molybdopterin biosynthesis protein MoeA /// molybdopterin biosynthesis protein	moeA /// moeA	0,0492791	-1,59036



**Comparación n°5: RP(+) vs RP(-):**

Probeset ID	Gene Title	Gene Symbol	p-value(RP+ vs. RP-)	Fold-Change(RP+ vs. RP-)
1767124_s_at	hydrogenase 2 protein HybA /// hydrogenase 2 protein HybA /// hydrogenase 2 4Fe-	ECs3881 /// hybA /// hybA	0,0199584	1,66898
1768961_s_at	sulfurtransferase required for thiamine and 4-thiouridine biosynthesis /// thiam	thil /// yajK	0,0315384	-1,73743
1761262_s_at	putative transport protein /// putative transport protein /// hypothetical prote	ECs3176 /// yfbS /// yfbS /// yfbS	0,0340763	1,69733
1763985_s_at	misc_RNA /// ncRNA	ffs /// ffs	0,0360675	2,71579
1762626_s_at	translation initiation factor IF-1	infA	0,0394134	1,68505
1765634_s_at	NrfC /// formate-dependent nitrite reductase; Fe-S centers /// NrfC protein ///	ECs5054 /// nrfC /// nrfC /// nrfC	0,0397636	1,84226
1767197_s_at	O-6-alkylguanine-DNA:cysteine-protein methyltransferase /// O-6-alkylguanine-DNA	ECs1916 /// ogt	0,0434021	-1,65047
1763773_s_at	SsrA-binding protein /// trans-translation protein	smpB /// smpB	0,0464896	1,8033
1759287_s_at	nitrate/nitrite sensor protein NarX /// sensory histidine kinase in two-componen	ECs1727 /// narX /// narX	0,046541	1,62145

Comparación nº6: RP(+) vs RNP(+):

Probeset ID	Gene Title	Gene Symbol	p-value(RP+ vs. RNP +)	Fold-Change(RP+ vs. RNP +)
1767177_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein	c5447 /// ECs5328	0,00148192	-2,89817
1759484_at	hypothetical protein	c1416	0,00155949	6,74272
1766790_at	bifunctional phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase/phosphoribosyl- ATP pyrophosphatas	hisI	0,00251452	13,54
1759945_at	hypothetical protein	c1417	0,00394551	11,4846
1762309_s_at	trehalose repressor /// DNA- binding transcriptional repressor	treR /// treR	0,00491079	1,87951
1763612_at	outer membrane receptor FepA	fepA	0,00492181	-1,80708
1766482_at	---	---	0,00640786	6,69503
1768711_s_at	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8- phosphate phosphatase /// 3- deoxy-D-manno-octulos	ECs4077 /// kdsC /// yrbI	0,00742008	1,85203
1760003_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// hypothetical protein	c5447 /// c5448 /// ECs5328	0,00781102	-5,51236
1765935_s_at	---	---	0,00873306	-123,814
1765144_s_at	nucleotide excision repair endonuclease /// nucleotide excision repair endonucle	ECs2447 /// Z2771	0,00966202	2,98663
1768961_s_at	sulfurtransferase required for thiamine and 4-thiouridine biosynthesis /// thiam	thiI /// yajK	0,0102769	-2,00028
1767124_s_at	hydrogenase 2 protein HybA /// hydrogenase 2 protein HybA /// hydrogenase 2 4Fe-	ECs3881 /// hybA /// hybA	0,0103349	1,78881
1766683_x_at	hypothetical protein	c3668	0,0133586	-2,32973

1759706_s_at	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with BaeS ///	baeR /// baeR /// ECs2887	0,0154064	2,23696
1764886_s_at	putative Rz endopeptidase from lambdoid prophage DLP12 /// putative endopeptidas	c1563 /// ECs1623 /// ECs1624 /// rzoD /// rzoR /// rzpD /// rzpR /// Z1877	0,0160246	1,6642
1765644_s_at	hypothetical protein /// putative exonuclease /// hypothetical protein /// putat	ECs1503 /// ECs1759 /// ECs2286 /// exoO /// exoP /// recE /// Z1766	0,0161179	2,76513
1766729_s_at	Ren protein /// pseudo	ECs1613 /// renD	0,0164991	-2,12807
1765436_at	IS150 conserved protein InsB	insK	0,0180297	-3,4736
1765922_s_at	hypothetical protein	c2785	0,0213828	-2,22947
1763221_s_at	predicted amidase and lipoprotein /// putative regulator /// N-acetylmuramoyl-L-	amiD /// ECs0953 /// ybjR /// Z1100	0,02165	1,99236
1763083_s_at	transposase insI /// KpLE2 phage-like element; IS30 transposase /// IS30 transpo	insI /// insI /// tra8_2 /// tra8_3 /// ydbA /// Z1133 /// Z1572	0,0240552	5,47952
1764717_s_at	putative aldolase /// hypothetical protein /// predicted aldolase /// putative a	ECs2482 /// ydjl /// ydjl /// Z2811	0,0243205	-1,76616
1767023_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein	c5416 /// ECs5296	0,0291674	-1,70481
1765947_s_at	---	---	0,0330734	-5,55795
1764666_at	KpLE2 phage-like element; predicted lyase/synthase	yjhH	0,0338811	1,88136
1759801_s_at	phosphoglyceromutase /// phosphoglyceromutase 1 /// phosphoglyceromutase	ECs0783 /// gpmA /// gpmA	0,0346733	-1,65684
1760478_s_at	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF ///	ECs2826 /// hisF /// hisF	0,039217	2,44126

	imidazole glycerol phosph			
1763477_at	---	---	0,039319	-1,76996
1763240_s_at	hypothetical protein	c3603	0,0396994	3,31565
1761590_s_at	cobalamin synthase /// cobalamin 5'-phosphate synthase	cobS /// cobS	0,03988	1,93925
1764910_s_at	---	---	0,0439904	-1,8227
1760342_at	predicted acetyltransferase	yhhY	0,0440643	1,98614
1762513_at	hypothetical protein	ydfR	0,0444738	9,0511
1767029_s_at	hypothetical protein /// hypothetical protein /// conserved inner membrane prote	ECs3179 /// yfbV /// yfbV /// Z3556	0,0445554	1,6835
1763557_x_at	hypothetical protein	c1425	0,0446418	2,41111
1764391_s_at	putative Rz endopeptidase from lambdoid prophage DLP12 /// putative endopeptidas	c1563 /// ECs1215 /// ECs1623 /// rzpD /// Z1473 /// Z1877	0,0447432	2,54292
1764010_s_at	RfaP /// lipopolysaccharide core biosynthesis protein rfaP /// putative LPS bios	ECs4505 /// rfaP /// waaP	0,0458495	-2,24288
1762877_s_at	4-amino-4-deoxy-L-arabinose transferase	arnT	0,0473623	-1,63331
1759942_at	---	---	0,0480384	11,1087
1760996_at	histidinol dehydrogenase	hisD	0,0486747	3,2438

## APÉNDICE 2.- COMUNICACIONES A CONGRESOS.

1. Relación entre la presencia de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y la sensibilidad in vitro a quinolonas: estudio mediante la determinación de la concentración preventiva de mutaciones. Noguera O, Rodriguez JC, Ruiz M, López M, Alvarez JM y Royo G. **VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Quimioterapia**. Valencia, 26-28 de mayo de 2005.
2. Disminución de la sensibilidad frente a quinolonas de *Klebsiella pneumoniae* productoras y no productoras de BLEE tras exposición a varias concentraciones de diversas quinolonas. Noguera O, Rodriguez JC, Ruiz M, López P, Loredó F, Soler L y Royo G. **XII Reunión de la Sociedad española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)**. La Coruña, 9-11 de mayo de 2007.
3. Modelo in Vitro de generación de mutantes a fluoroquinolonas en *Escherichia coli*, productoras y no productoras de BLEE. Noguera O, Belda S, Rodriguez JC, López N, Ruiz M, Cremades R, López E, Loredó F, Alvarez L, López P y Royo G. **XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)**. Sevilla, 3-5 de junio de 2009.
4. Evolución de la resistencia a ciprofloxacino en *Escherichia coli* durante 17 años: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados. Noguera O, Belda S, López N, Rodriguez JC, Moya M, Ruiz M, Moreno MT, Alvarez L,



Ferrari R, Cremades R, Viciano N, López P y Royo G. **XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)**. Sevilla, 3-5 de junio de 2009.

5. Análisis mediante microarrays de los genes implicados en la resistencia a ciprofloxacino en *Escherichia coli*: diferencia entre cepas productoras y no productoras de BLEE. Noguera O, Belda S, Rodriguez JC, Candela M, López N, Ruiz M, Alvarez L, Cremades R, Ferrari R, López E, López P y Royo G. **XIII Reunión de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)**. Sevilla, 3-5 de junio de 2009.
6. Evolución de las resistencias a ciprofloxacino en *Klebsiella pneumoniae* durante 17 años: influencia de dos criterios de eliminación de duplicados. Noguera O, Belda S, López-Riquelme N, Galiana A, Rodriguez JC, Moreno M, López D, Ruiz M, López P y Royo G. **XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)**. Barcelona, 19-22 de mayo de 2010.
7. Mutantes generados de *Klebsiella pneumoniae* productora y no productora de betalactamasas de espectro extendido tras exposición a fluoroquinolonas. Noguera O, Belda S, Cremades R, Galiana A, Rodriguez JC, Ruiz M, López P y Royo G. **XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)**. Barcelona, 19-22 de mayo de 2010.
8. Análisis mediante microarrays de los genes implicados en la interacción entre *Escherichia coli* y ciprofloxacino en cepas productoras de BLEE. Noguera O,

Belda S, López-Riquelme N, Galiana A, Rodríguez JC, Ruiz M, Paredes L, López P y Royo G. **XIV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)**. Barcelona, 19-22 de mayo de 2010.



### APÉNDICE 3.- ARTICULOS PUBLICADOS.

1. O. Noguera, J.C. Rodríguez, R. Cremades, M. Ruiz, G. Royo. Generación *in vitro* de mutantes de *Klebsiella pneumoniae* tras exposición a fluoroquinolonas. Relación con la presencia de betalactamasas de espectro extendido. **Rev Esp Quimioter** 2008; 21(3):180-183.
2. O. Noguera, J.C. Rodríguez, J.M. López, M. Ruiz, G. Royo. Determinación de la concentración preventiva de mutantes resistentes a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* productoras y no productoras de betalactamasas de espectro extendido. **Rev Esp Quimioter** 2009; 22(1):30-33.



#### **APÉNDICE 4.- ACCÉSIT A PREMIOS.**

Accésit al premio “Martín Luengo” con el póster: Relación entre la presencia de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y la sensibilidad in vitro a quinolonas: estudio mediante la determinación de la concentración preventiva de mutaciones. **VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Quimioterapia.** Valencia, 26-28 de mayo de 2005.

