

## **2. OBJECTIUS**

---

## Objectius

---

1. Avaluar la incidència dels enterobacteris (que no expressen una  $\beta$ -lactamasa cromosòmica induïble: *E. coli*, *Shigella*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* i *S. enterica*) que presentaven sensibilitat disminuïda o resistència a les C3G i/o l'aztreonam durant els anys 1994-1996.
2. Determinar i caracteritzar les  $\beta$ -lactamases implicades en la resistència o sensibilitat disminuïda a les C3G i/o l'aztreonam.
3. Estudi de l'entorn genètic del gen codificador de la nova  $\beta$ -lactamasa CTX-M-9, descrita a partir dels objectius anteriors.
4. Avaluació de la difusió de la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-9 i el seu entorn genètic en enterobacteris aïllats els anys 1994-1999.

### **3. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

---

### **3.1. Caracterització de les $\beta$ -lactamases implicades en la disminució de la sensibilitat o resistència a les cefalosporines de tercera generació (C3G) en enterobacteris sense $\beta$ -lactamasa cromosòmica induïble (articles I, II i IV)**

En els bacteris gramnegatius la producció de  $\beta$ -lactamases continua sent el mecanisme més important implicat en la resistència als  $\beta$ -lactàmics. La necessitat de demostrar la producció de  $\beta$ -lactamases per un microorganisme aïllat en el laboratori clínic ha arribat a tenir una importància crucial en els darrers anys a causa de l'emergència de soques productores de noves  $\beta$ -lactamases i de la seva diversificació. El coneixement dels tipus d'enzims presents ha de servir de guia en l'elecció de la terapèutica que cal seguir.

Els objectius d'aquest estudi van ser d'una banda, avaluar la incidència dels enterobacteris (que no expressen una  $\beta$ -lactamasa cromosòmica induïble), aïllats en clínica amb freqüència (*E. coli*, *Shigella*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis* i *Salmonella enterica*) que presentaven sensibilitat disminuïda o resistència a les C3G i/o l'aztreonam durant els anys 1994-1996; de l'altra, caracteritzar les  $\beta$ -lactamases implicades en aquesta resistència.

Es van seleccionar per la tècnica de disc difusió 88 soques d'*E. coli* d'un total de 7.054 (1,2%), set soques de *K. pneumoniae* d'un total de 581 (1,2%) i 23 soques de *K. oxytoca* d'un total de 166 (13,8%) per presentar sensibilitat disminuïda o resistència a les C3G i/o l'aztreonam; aïllades durant el trienni 1994-1996 a l'Hospital de Sant Pau de Barcelona. La determinació de la sensibilitat per la tècnica de difusió en agar es va fer seguint les recomenacions del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)<sup>82</sup>. Seguidament, es va determinar el valor de la concentració inhibidora mínima (CIM) per la tècnica d'agar dilució (mètode quantitatiu de referència per determinar de la sensibilitat als microorganismes), seguint les recomanacions del NCCLS<sup>82</sup>.

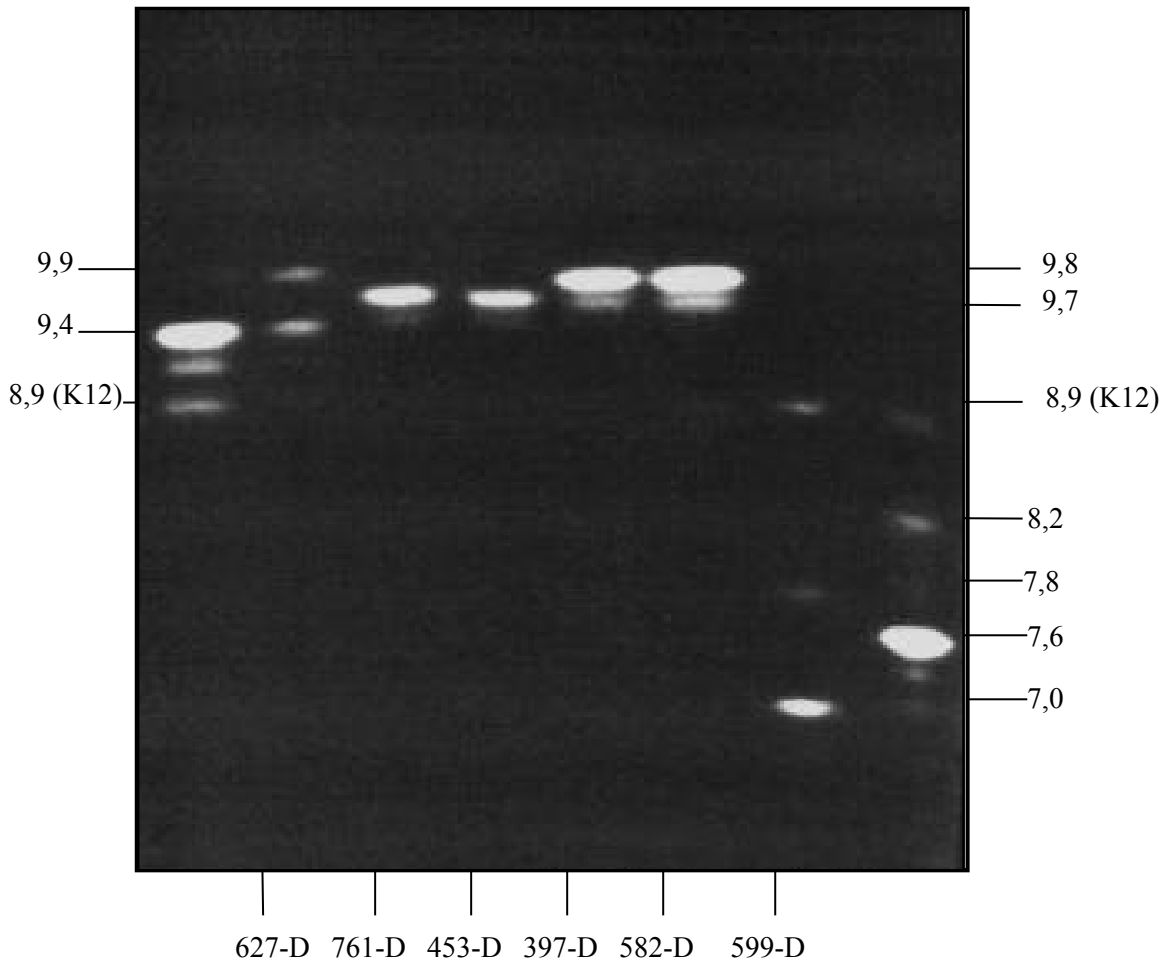
A continuació, per poder esbrinar si el patró de sensibilitat observat era degut a l'expressió de  $\beta$ -lactamases, es va realitzar la tècnica d'isoelectroenfocament (IEF), que permet determinar el punt isoelèctric d'una proteïna mitjançant electroforesi en un gel que conté un gradient de pH. La hidròlisi dels  $\beta$ -lactàmics es va determinar espectrofotomètricament seguint els paràmetres descrits en l'equació de Michaelis-Menten. La conjugació es va realitzar en medi sòlid utilitzant en cada cas els antibiòtics adequats per a la selecció dels transconjugants.

Un cop caracteritzades fenotípicament les  $\beta$ -lactamases es va procedir a l'estudi genotípic. Es van fer PCR amb els iniciadors específics per a cadascun dels tipus de gens codificadors dels diferents tipus de  $\beta$ -lactamases descrites. En els casos que es van obtenir amplicons utilitzant els iniciadors específics per a *bla*<sub>SHV</sub>, aquests es van ser digerits per l'enzim de restricció *NheI*, que permet diferenciar entre *bla*<sub>SHV-1</sub> (no presenta la diana per a aquest enzim de restricció) i *bla*<sub>SHV-2</sub> a *bla*<sub>SHV-8</sub> (si que presenten la diana), atès que moltes tenen el mateix pI. En els casos que es va creure convenient es va procedir a la seqüenciació total del fragment amplificat seguint el mètode descrit per Sanger, utilitzant fluorocroms marcats<sup>120</sup>.

La comparació epidemiològica de les soques es va fer mitjançant biotipificació, serotipificació o estudi dels fragments de restricció (RFLP) per la tècnica del camp pulsatiu (PFGE).

Es van realitzar unes tècniques o altres atenent cada cas concret.

Els resultats que es van obtenir mostraven que en les 88 soques d'*E. coli* el mecanisme enzimàtic implicat en la disminució de la sensibilitat o resistència a les C3G i/o l'aztreonam era la hiperproducció de la  $\beta$ -lactamasa cromosòmica AmpC (48 soques, 54,5%) (figura 13), seguida de la hiperproducció de la  $\beta$ -lactamasa plasmídica SHV-1 (28 soques, 31,8%), la producció de BLEA (10 soques, 11,4%) i, finalment, l'expressió d'oxacil·linases (dues soques, 2,3%). En les 48 soques hiperproductores de la  $\beta$ -lactamasa cromosòmica AmpC es va observar una gran variabilitat de pI, comprès entre 8,9 i 9,9. Les 28 soques hiperproductores de SHV-1 no mostraven relació clonal entre elles. I, finalment, de les deu soques que expressaven BLEA es va observar una destacable varietat, ja que dues soques eren productores de TEM-12; dues soques, productores de SHV-2 i les restants sis soques eren productores d'una nova BLEA pertanyent a la família de les CTX-M, la CTX-M-9, de la qual parlarem més endavant.



**Figura 13.** Gel d'isoelectroenfocament dels extractes enzimàtics d'algunes soques d'*E. coli* hiperproductores de la  $\beta$ -lactamasa cromosòmica AmpC, on s'observa una gran varietat de pI compresos entre 8,9 i 9,9. Com a sòca control de pI es va utilitzar *E. coli* K12, que expressa una  $\beta$ -lactamasa de pI 8,9. A la part inferior del gel s'indica el nom de les soques i a les parts laterals s'indica el valor de pI determinat mitjançant el càlcul de regressió.

En les set soques de *K. pneumoniae* que presentaven un fenotip de sensibilitat disminuïda o resistència a les C3G i/o l'aztreonam, es va observar que aquest patró de sensibilitat era degut principalment a la hiperproducció de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 (6 soques, 85,7%), seguida de la producció en una sòca de la BLEA SHV-2 (14,3%). Les soques de *K. pneumoniae*, per raó que tenen en el cromosoma el gen codificador de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1, es fa difícil en aquest cas poder dir si es tracta d'una hiperproducció de  $\beta$ -lactamasa SHV-1 plasmídica o cromosòmica, tot i que es van realitzar experiments de conjugació en les sis soques i es van obtenir transconjugants

que expressaven dita  $\beta$ -lactamasa. El patró de sensibilitat en aquests transconjugants era el característic de la producció de l'enzim SHV-1. Aquest fet, però, no resol el problema de si la hiperproducció del gen es troba en l'àmbit cromosòmic o en l'àmbit plasmídic en aquest darrer es podria tractar d'un plasmidi multicòpia. Cal fer estudis posteriors per poder elucidar aquest fet.

En les 23 soques de *K. oxytoca* que presentaven un fenotip de sensibilitat disminuïda o resistència a les C3G i/o l'aztreonam es va observar que era degut a la hiperproducció de la  $\beta$ -lactamasa cromosòmica K1, de la qual cal destacar els seus dos subgrups (OXY-1: 34,8% i OXY-2: 65,2%).

Resumint els resultats obtinguts podem dir que el mecanisme més freqüent implicat en la sensibilitat disminuïda o la resistència a les C3G i/o l'aztreonam en els enterobacteris sense  $\beta$ -lactamasa cromosòmica induïble, aïllats a l'Hospital de Sant Pau durant el període 1994-1996, és la hiperproducció de la  $\beta$ -lactamasa cromosòmica en les soques d'*E. coli*, *K. oxytoca* i, possiblement, en *K. pneumoniae* seguida per la hiperproducció de la  $\beta$ -lactamasa plasmídica SHV-1 en *E. coli*.

L'ús extensiu de les cefalosporines, particularment en les unitats de cures intensives, pot haver jugat un paper important en el desenvolupament i la dispersió de les BLEA<sup>78, 113</sup>. La majoria de les BLEA trobades en *Enterobacteriaceae*, majoritàriament en espècies de *K. pneumoniae* i *E. coli*<sup>45, 99</sup>, pertanyen a la classe A d'Ambler i tenen codificació plasmídica. Els enzims més freqüentment trobats deriven de TEM i SHV, encara que darrerament s'han detectat BLEA no relacionades amb les anteriors que pertanyen a la família CTX-M.

La incidència de BLEA ha estat molt seguida. Són molt nombroses les publicacions que descriuen brots epidèmics i/o noves  $\beta$ -lactamases. És per això que quan s'intenta avaluar la incidència de BLEA en un país concret o relacionar i/o comparar incidències entre diversos estudis, els resultats poden ser molt diversos en funció dels hospitals inclosos i/o exclosos en l'estudi, si s'hi inclouen brots epidèmics puntuals o no, etc. Malgrat tot, sembla que hi ha una tendència generalitzada cap a un increment de les soques productores de BLEA a escala mundial.

Entre tots els estudis cal destacar el realitzat a França, on s'observa que s'havia produït un increment del nombre de BLEA, que era de l'1,5%, 0,9% i 3,2% en els anys 1990, 1991 i 1998, respectivament<sup>30</sup>. Un altre estudi realitzat en un hospital del Japó entre 1990 i 1996 en soques de *K. pneumoniae* i *E. coli* resistents a la cefotaxima, va mostrar que la incidència de BLEA en les soques d'*E. coli* i *K. pneumoniae* el 1990 era de 0,4% i 0,6%; i l'any 1996, de l'1,7% i 7,2%, respectivament<sup>61</sup>. Així mateix, un estudi realitzat a Brooklyn l'any 1997 va mostrar que la incidència de BLEA era d'un 44% en *K. pneumoniae*, 4,7% en *E. coli* i 9,5% en *Proteus mirabilis*<sup>122</sup>. Així doncs, es pot observar que la incidència de BLEA és molt variable i depèn de la regió geogràfica i del període estudiat. En un estudi multicèntric realitzat a Espanya durant 1991 i 1995, es va mostrar que la incidència d'enterobacteris resistents a la cefotaxima fins i tot va créixer, ja que va passar del 3,6% el 1991 al 2,5% el 1995<sup>27</sup>.

D'altra banda, un estudi realitzat per Bush<sup>17</sup> entre el 1995 i el 2000, va mostrar un notable increment en relació amb el nombre de  $\beta$ -lactamases diferents. Es va detectar un increment significatiu, principalment  $\beta$ -lactamases de la classe 1 (classificació Bush-Jacoby-Medeiros) passant d'un nombre estimat de 32 a 51 i de la classe 2be (BLEA) de 36 a 119; es va observar que les BLEA són les que han incrementat en un major nombre.

Tenint en compte els valors d'incidència de BLEA descrits anteriorment, podem dir, doncs, que la incidència de BLEA observada en el nostre hospital durant el trienni estudiat es manté baixa, sent del 0,14% en soques d'*E. coli*, 0,17% en *K. pneumoniae* i no s'han detectat en altres enterobacteris. Aquesta incidència ha estat seguida en el nostre hospital del 1997 al 2000<sup>1,115</sup>, i s'ha observat un lleuger increment. Concretament, s'ha passat a un 0,46% en *E. coli* i 1,07% en *K. pneumoniae*. En aquest cas i a diferència del trienni anterior estudiat, s'ha observat una soca de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis portadora d'una BLEA compatible amb la CTX-M-9<sup>126</sup>; també s'han detectat deu soques que expressaven la cefamicinasa CMY-2. Concretament aquest enzim s'ha trobat en set soques d'*E. coli*, en una soca de *Salmonella enterica* serovar Mikawasima, en una soca de *K. pneumoniae* i en una soca de *Proteus mirabilis*<sup>83</sup>.

Els resultats obtinguts mostren que tot i el lleuger increment observat en la incidència de BLEA, és necessària una ràpida i correcta detecció de les BLEA per



poder establir un tractament adequat i mesures d'aïllament per evitar la dispersió d'aquestes soques.

### 3.2. Caracterització d'una nova $\beta$ -lactamasa d'espectre ampliat (article III)

De les 88 soques d'*E. coli* seleccionades en l'estudi anterior per la tècnica de difusió per presentar sensibilitat disminuïda o resistència a les C3G i/o l'aztreonam, sis soques es caracteritzaven per mostrar resistència a les penicil·lines, cefalosporines (excepte la cefoxitina i la ceftazidima) i a l'aztreonam. Mostraven el fenotip de sinèrgia entre l'àcid clavulànic i la cefotaxima, característic de les BLEA i es va detectar activitat enfront de la cefotaxima mitjançant estudis d'hidròlisi de substrat, però no es va detectar enfront de la ceftazidima ni l'aztreonam. L'estudi del pI per l'IEF va mostrar en totes les soques dos enzims diferents, un amb pI de 5,4 i l'altre al voltant de 8,0; l'enzim amb pI 8,0 va demostrar activitat en el revelat amb ceftriaxona. Es va seleccionar una d'aquestes soques (785-D) per dur a terme posteriors estudis que permetessin caracteritzar dita  $\beta$ -lactamasa. En aquesta soca es va realitzar la PCR utilitzant iniciadors específics per a *bla*<sub>TEM</sub> i va resultar positiva, la qual cosa indicà que la  $\beta$ -lactamasa amb pI 5,4 era compatible amb una TEM-1. D'altra banda, per determinar la  $\beta$ -lactamasa de pI 8,0 es van realitzar PCR amb iniciadors específics per a *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> i *bla*<sub>CTX-M</sub> (aquesta darrera parella d'iniciadors amplificava, entre altres, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, que codificava una  $\beta$ -lactamasa compatible amb el pI obtingut), això no obstant, totes les PCR van ser negatives. Aquests fets ens indicaren que la  $\beta$ -lactamasa de pI 8,0 podria tractar-se d'una nova  $\beta$ -lactamasa d'espectre ampliat. Amb la finalitat de caracteritzar aquest nou enzim es va realitzar la conjugació de la soca 785-D per realitzar estudis de clonació, subclonació i seqüenciació.

Es van obtenir transconjugants d'aquesta soca que únicament expressaven la  $\beta$ -lactamasa de pI 8,0. A partir d'un d'aquests transconjugants, anomenat MSP492, es va obtenir el DNA total utilitzant el procediment de la lisi alcalina. Amb l'objectiu de clonar el gen codificador d'aquesta  $\beta$ -lactamasa es va sotmetre el DNA a digestions parcials amb l'enzim de restricció *Sau3AI*, utilitzant la concentració de l'enzim que permetia obtenir fragments de DNA entre 1 i 4 kb (mida

dels gens codificadors de les  $\beta$ -lactamases descrites). A continuació es van purificar i lligar els fragments de DNA en el plasmidi pK184<sup>59</sup> i es va transformar en cèl·lules d'*E. coli* (DH5<sup>+</sup>) mitjançant electroporació<sup>125</sup>. De les soques transformants obtingudes (MSP493, MSP502 i MSP503, que contenien fragments clonats de 2, 3 i 4 kb respectivament), es va extreure el seu DNA plasmídic utilitzant el mètode de la lisi alcalina i es va seqüenciar el fragment clonat. La seqüenciació del DNA es va fer seguint el mètode descrit per Sanger utilitzant fluorocroms marcats<sup>120</sup>. L'anàlisi computacional de la seqüència nucleotídica obtinguda va mostrar que es tractava d'una nova  $\beta$ -lactamasa pertanyent a la família CTX-M. En la bibliografia s'ha descrit<sup>13, 41</sup> que aquesta família de  $\beta$ -lactamases es caracteritza per mostrar una major activitat enfront de la cefotaxima respecte de la ceftazidima i l'aztreonam, com també que presenten una major sensibilitat enfront del tazobactam, seguit per l'àcid clavulànic i, finalment, són molt menys sensibles a l'acció del sulbactam. Així doncs, es van realitzar estudis cinètics tant en la soca MSP492 com en la MSP493, i es van obtenir uns resultats semblants als descrits per a la família de les CTX-M.

Per tant, a partir dels resultats obtinguts dels estudis tant fenotípics com genotípics, es va demostrar que es tractava d'una nova  $\beta$ -lactamasa d'espectre ampliat derivada de la família CTX-M, a la qual vam anomenar CTX-M-9.

L'alineament de la seqüència aminoacídica va mostrar que aquesta nova  $\beta$ -lactamasa també presentava tant els dominis característics de les  $\beta$ -lactamases de la classe A (<sup>70</sup>SXXK<sup>73</sup>, <sup>130</sup>SDN<sup>132</sup>, E<sup>166</sup> i <sup>234</sup>KTG<sup>236</sup>) així com els aminoàcids característics de la família CTX-M, que han estat descrits com a implicats en la seva activitat catalítica característica (Cys-69, Phe-160, Arg-205, Ser-237, Gly-232, Asp-240, Pro-167 i Arg-276). La numeració utilitzada és la proposada per Ambler i col.<sup>2</sup>

Les  $\beta$ -lactamases de la classe A comparteixen els segments conservats essencials per a la seva acció, però mostren un baix grau d'identitat aminoacídica. La comparació de les seqüències aminoacídiques dels enzims del tipus CTX-M amb les altres  $\beta$ -lactamases de la classe A és inferior al 40%. Les  $\beta$ -lactamases del tipus CTX-M mostren el seu major grau d'homologia amb la  $\beta$ -lactamasa cromosòmica de *K. ascorbata* (entre un 69,9% i un 100%), seguida per *K. cryocrescens* (del 69,9% al 85,9%), *K. oxytoca* (del 62,6% al 74,2%), *Serratia fonticola* (del 63,3% al 75,3%), *Rahnella aquatilis* (del 60,2% al 73,2%), *Citrobacter sedlakii* (del 62,6% al

72,9%), *Citrobacter koseri* (del 60,2% al 69,4%) i *Proteus vulgaris* (del 51,9% al 63,9%) i (taula 4; figura 14). Possiblement, les  $\beta$ -lactamases del tipus CTX-M deriven de les  $\beta$ -lactamases cromosòmiques, sent les més probables les descrites en *K. ascorbata* i en *K. cryocrescens*. Concretament, s'ha descrit que la  $\beta$ -lactamasa KLUA-2 de *K. ascorbata* (GenBank CAB63259) és un 100% idèntica a la  $\beta$ -lactamasa plasmídica CTX-M-5<sup>13</sup> i la  $\beta$ -lactamasa KLUC-1 de *K. cryocrescens* té un 85,9% d'homologia amb la  $\beta$ -lactamasa plasmídica CTX-M-1.

A la figura 14 es mostra l'arbre filogenètic de totes les  $\beta$ -lactamases pertanyents a la família CTX-M, descrites fins a l'actualitat. La comparació de les seqüències aminoacídiques dels enzims s'ha realitzat seguint el mètode Clustal i el programa DNASTar. En aquest arbre filogenètic s'observa que aquestes  $\beta$ -lactamases es poden agrupar en quatre grups. El primer grup, el del tipus CTX-M-1, inclou la CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-11, CTX-M-12, CTX-M-15, UOE-1 i la  $\beta$ -lactamasa cromosòmica de *K. cryocrescens*, KLUC-1 (les quals presenten una homologia entre un 78,4% i un 99,7%). El segon grup, del tipus CTX-M-2, inclou la CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, Toho-1 i les  $\beta$ -lactamases cromosòmiques de *K. ascorbata* KLUA-1 i KLUA-2 (presenten una homologia entre un 96,6% i un 100%). El tercer grup, tipus CTX-M-8, inclou únicament la CTX-M-8. I el darrer grup, tipus CTX-M-9 o Toho-2, inclou la CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19 i Toho-2 (presenten una homologia entre un 86,5% i un 99,7%). L'homologia entre aquests grups és força baixa (entre un 68,5% i un 85,2%), la qual cosa suggereix, tal com ja havien proposat anteriorment Bonnet i col.<sup>10</sup>, que aquestes distàncies evolutives entre tots quatre tipus de CTX-M són suficientment grans per suggerir que aquests quatre tipus de CTX-M es van separar molt aviat a partir d'una proteïna desconeguda o bé que s'han originat recentment a partir de diferents proteïnes com podria ser per exemple el grup CTX-M-1, que es podria haver originat a partir de la  $\beta$ -lactamasa cromosòmica de *K. cryocrescens* KLUC-1<sup>31</sup>, i el grup de les CTX-M-2, de les  $\beta$ -lactamases cromosòmiques de *K. ascorbata* KLUA-1 o KLUA-2. Bonnet i col.<sup>10</sup>, van observar que enzims molt pròximament relacionats com són els del tipus CTX-M-1 i els del tipus CTX-M-2 s'havien detectat en àrees geogràfiques molt concretes on possiblement havien anat divergint per mutacions puntuals. Contràriament,

CTX-M-2 i Toho-1, enzims classificats dintre del mateix tipus (tipus CTX-M-2) havien estat detectats en àrees geogràfiques molt distants (Japó i Amèrica del Sud). És per això que aquests autors van proposar que l'expansió de la família CTX-M podia haver estat deguda a la dispersió i mutació dels gens codificadors de dites  $\beta$ -lactamases, sense descartar la possibilitat d'esdeveniments genètics independents.

A la taula 4 es mostra l'homologia de les seqüències aminoacídiques de les  $\beta$ -lactamases pertanyents a aquesta família.

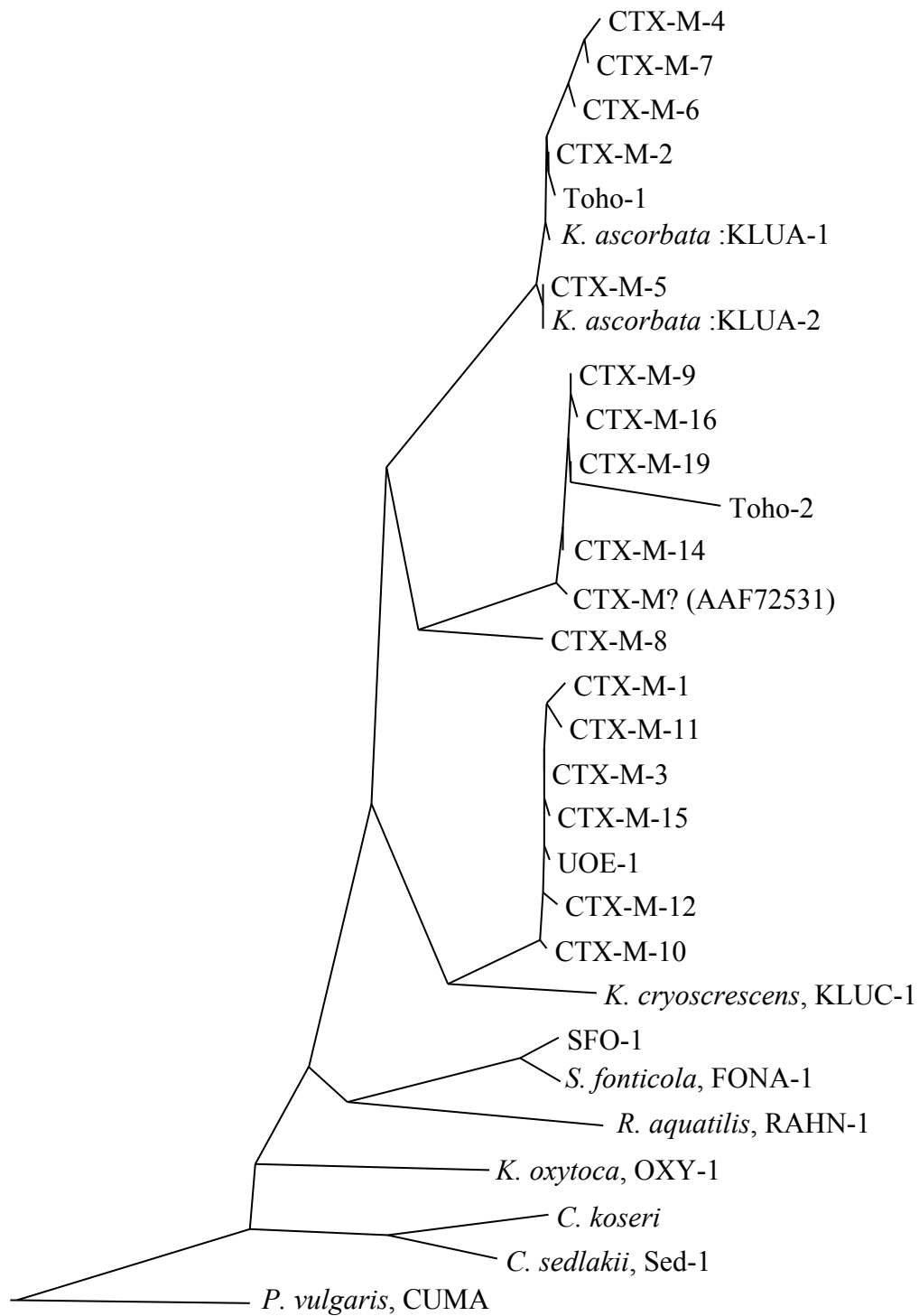
Tot i que la família de les CTX-M han estat descrites fa uns dotze anys, els estudis sobre la seva incidència han mostrat que s'ha produït un ràpid increment tant pel que fa a la seva dispersió com a la seva diversificació. Actualment, han estat descrits més de 20 tipus d'enzims diferents pertanyents a la família CTX-M, anomenats CTX-M, Toho o UOE. La primera  $\beta$ -lactamasa pertanyent a aquesta família, la CTX-M-1, es va detectar el 1989 i el 1999 es va descriure la CTX-M-19. Cal destacar la seva àmplia difusió: CTX-M-1 (Alemanya), MEN-1 (Itàlia), CTX-M-2 (Argentina i França), CTX-M-3 (Polònia i França), CTX-M-4 (Rússia), CTX-M-5 (Letònia), CTX-M-6 (Grècia), CTX-M-7 (Grècia), CTX-M-8 (Brasil), CTX-M-9 (Espanya i Xina), CTX-M-10 (Espanya), CTX-M-11 (Japó), CTX-M-12 (Kenya), CTX-M-14 (França, Corea, Xina i Japó), CTX-M-15 (Índia), CTX-M-16 (Brasil), CTX-M-? (Xina), Toho-1 (Japó), Toho-2 (Japó) i UOE-1 (Japó). Se cita entre parèntesis el primer país on s'ha detectat cadascun d'aquests enzims. La CTX-M-13 és un 100% idèntica a la CTX-M-9; la CTX-M-18, UOE-2 i Toho-3 són totes idèntiques entre si i amb la CTX-M-14 i, finalment, la CTX-M-? (nombre d'accés AAF72531) també anomenada CTX-M-15 només presenta un 79,4% d'identitat amb la CTX-M-15.

La presència de les  $\beta$ -lactamases de la família CTX-M ha estat documentada en diverses espècies de la família *Enterobacteriaceae* i en àrees molt distants, sent totes de codificació plasmídica.

Concretament, al nostre hospital s'ha realitzat, tal com s'ha comentat prèviament, un treball de detecció i caracterització de les BLEA en enterobacteris durant el trienni 1997 i 2000, la qual cosa demostra que s'havia produït un lleuger increment en la incidència de la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-9, passant del 0,08% en soques d'*E. coli* aïllades durant el període 1994-1996 a 0,38% en soques d'*E. coli* aïllades del 1997 al 2000<sup>1, 115</sup>. En un estudi realitzat durant deu anys a l'*Hospital Ramón y*

*Cajal de Madrid*, en soques d'*E. coli* portadores de BLEA es va observar que un 50% d'aquestes eren productores de  $\beta$ -lactamases de la família CTX-M<sup>88</sup>. A l'Argentina, la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-2 es troba àmpliament distribuïda i és la BLEA més freqüentment trobada en soques de *K. pneumoniae* (69% de totes les BLEA detectades)<sup>38</sup> igual que en *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella* i *Providencia*<sup>93</sup>. També s'han descrit brots causats en soques de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium<sup>13</sup> i *Vibrio cholerae* E1 Tor<sup>37</sup> productores de CTX-M. Al Japó la BLEA predominant és la TOHO-1<sup>147</sup> i al Taiwan, la CTX-M-3<sup>148</sup>.

És important, doncs, fer el seguiment en la detecció d'aquestes  $\beta$ -lactamases per poder arribar a conèixer millor els factors implicats en la seva ràpida difusió i diversificació, com també per poder esbrinar el seu origen.



**Figura 14.** Arbre filogenètic de les  $\beta$ -lactamases de la família CTX-M descrites fins a l'actualitat utilitzant el mètode Clustal del programa DNASTar. S'hi mostren els enzims plasmídics del tipus CTX-M, així com els enzims de codificació cromosòmica relacionats.

## Resultats i discussió

**Taula 4.** Percentatge de similitudat en les seqüències aminoacídiques de les  $\beta$ -lactamases de la família CTX-M descrites fins a l'actualitat.

1	CTX-M-1	1
2	CTX-M-2	79,7   2
3	CTX-M-3	98,6   80,8   3
4	CTX-M-4	77,0   97,3   78,0   4
5	CTX-M-5	80,1   98,6   81,1   96,6   5
6	CTX-M-6	78,4   97,9   79,4   97,6   97,3   6
7	CTX-M-7	77,7   97,3   78,7   98,6   97,3   98,3   7
8	CTX-M-8	80,1   83,8   81,4   81,4   83,2   82,8   82,1   8
9	CTX-M-9 <sup>a</sup>	78,7   79,7   79,7   77,7   80,4   78,7   78,4   84,9   9
10	CTX-M-10	97,9   80,8   99,3   78,0   81,1   79,4   78,7   81,4   79,7   10
11	CTX-M-11	97,9   80,1   98,9   77,3   80,5   78,7   78,0   80,5   79,8   98,2   11
12	CTX-M-12	97,6   80,8   99,0   78,0   80,4   78,7   78,0   81,1   79,4   98,3   97,9   12
13	CTX-M-14 <sup>b</sup>	79,0   80,1   80,1   78,0   80,8   79,0   78,7   85,2   99,7   80,1   80,1   79,7   13
14	CTX-M-15	98,3   80,4   99,7   77,7   80,8   79,0   78,4   81,1   79,4   99,0   98,6   98,6   79,7   14
15	CTX-M-16	78,4   79,4   79,4   77,3   80,1   78,4   78,0   84,5   99,7   79,4   79,0   99,3   79,0   15
16	CTX-M-2 <sup>c</sup>	78,7   79,7   79,7   77,7   80,4   78,7   78,4   84,2   98,6   79,7   79,8   79,4   99,0   79,4   98,3   16
17	CTX-M-19	78,7   79,7   79,7   77,7   80,4   78,7   78,4   84,9   99,3   79,7   79,8   79,4   99,7   79,4   99,0   98,6   17
18	Toho-1	79,4   99,7   80,4   96,9   98,3   97,6   96,9   83,5   79,4   80,4   79,8   80,4   79,7   80,1   79,0   79,4   79,4   79,4   18
19	Toho-2	69,2   69,9   70,2   67,8   70,6   68,9   68,5   73,7   87,2   70,2   69,5   69,9   87,5   69,9   86,9   86,5   87,2   69,6   19
20	UOE-1	98,3   80,4   99,7   77,7   80,8   79,0   78,4   81,1   79,4   99,0   98,6   98,6   79,7   99,3   79,7   79,4   79,4   80,1   69,9   20
21	SFO-1	74,6   74,2   73,9   71,8   74,6   73,5   72,5   71,1   71,8   73,5   72,3   73,2   72,2   73,5   71,5   71,8   71,8   74,2   62,6   73,5   21
22	<i>K. ascorbata</i> , KLU-A-1	79,7   99,3   80,8   96,6   98,6   97,9   97,3   83,8   79,7   80,8   80,1   80,1   80,4   79,4   79,7   79,7   99,0   69,9   80,4   74,2   22
23	<i>K. ascorbata</i> KLU-A-2	80,1   98,6   81,1   96,6   100   97,3   83,2   80,4   81,1   80,5   80,4   80,8   80,8   80,1   80,4   80,4   98,3   70,6   80,8   74,6   98,6   23
24	<i>K. cytoscescens</i> , KLUC-1	84,9   77,0   85,6   74,2   77,3   75,6   74,9   75,9   79,4   85,9   84,8   85,2   79,7   85,9   79,7   79,4   79,4   76,6   69,9   85,9   72,5   77,0   77,3   24
25	<i>R. aquatilis</i> , RAHN-1	71,5   73,2   72,2   70,8   73,2   72,5   71,5   71,1   68,4   71,8   71,6   71,5   68,7   71,8   68,0   68,4   68,4   72,9   60,2   71,8   75,9   73,2   73,2   69,8   25
26	<i>S. fonticola</i>	73,5   74,2   72,9   72,2   75,3   73,5   72,9   71,8   72,5   72,5   71,3   72,2   72,9   72,5   72,2   72,5   72,5   74,2   63,3   72,5   95,3   74,2   75,3   71,5   74,9   26
27	<i>K. oxytoca</i> , OXY-1	72,5   74,2   72,5   72,5   73,9   73,5   73,2   73,2   71,8   72,5   71,6   72,5   72,2   72,2   71,5   71,8   71,8   73,9   62,6   72,2   72,9   74,2   73,9   72,2   68,0   72,2   27
28	<i>C. koseri</i>	68,4   69,4   68,4   66,7   68,7   67,7   66,7   70,1   68,4   68,4   67,0   68,7   68,7   68,0   68,0   68,4   68,4   69,4   60,2   68,0   68,7   68,7   7,01   65,3   69,4   70,4   28
29	<i>P. vulgaris</i>	62,9   63,9   62,5   61,5   63,9   62,2   62,2   61,9   59,8   62,5   62,4   62,9   60,1   62,2   59,5   60,1   59,8   63,9   51,9   62,2   65,1   63,2   63,9   65,1   59,7   65,4   64,9   63,6   29
30	<i>C. sedlakii</i> , Ssd-1	69,8   72,9   70,4   70,1   72,2   71,8   70,8   72,2   71,1   70,4   69,5   70,1   71,5   70,1   70,8   71,1   71,1   72,9   62,6   70,1   70,5   72,9   72,2   71,1   67,5   70,5   73,2   83,7   63,1

a, també anomenada CTX-M-13; b, també anomenada CTX-M-18, UOE-2 o Toho-3; c, també anomenada CTX-M-15.

### 3.3. Estudi de l'entorn genètic del gen codificador de la $\beta$ -lactamasa CTX-M-9 (article V)

#### 3.3.1. Caracterització de l'entorn genètic de *bla*<sub>CTX-M-9</sub>

Les  $\beta$ -lactamases de la família de les CTX-M han estat documentades en un gran nombre d'espècies bacterianes, en àrees geogràfiques molt distants. Aquest fet, juntament amb la gran variabilitat d'aquests enzims, independentment de mutacions puntuals o esdeveniments genètics que puguin afavorir aquesta variabilitat, suggereix la presència d'elements genètics que en facilitin la mobilització, com són ara els plasmidis. La majoria dels enzims del tipus CTX-M tenen codificació plasmídica, en plasmidis autotransferibles. Per exemple, s'ha observat que *bla*<sub>CTX-M-9</sub> i *bla*<sub>CTX-M-16</sub> (gens amb una única diferència nucleotídica) igual que *bla*<sub>CTX-M-8</sub> i *bla*<sub>CTX-M-3</sub> (els enzims dels quals pertanyen a dos grups filogenètics diferents) es troben localitzats en diferents plasmidis. De la mateixa manera, CTX-M-14 ha estat detectat en diferents plasmidis<sup>90</sup>. Aquest fet suggereix que els gens codificadors dels enzims del tipus CTX-M es troben associats a elements mòbils, dintre d'un plasmidi, que pot afavorir la transferència gènica. D'altra banda, *bla*<sub>CTX-M-18</sub> (també anomenat *bla*<sub>CTX-M-14</sub>) i *bla*<sub>CTX-M-19</sub> han estat localitzats en plasmidis autotransferibles idèntics en aïllats d'enterobacteris pertanyents al mateix pacient, la qual cosa ens indica la selecció *in vivo* de la CTX-M-19<sup>101</sup>. Això no obstant, ambdós gens han estat detectats en el cromosoma bacterià i això indicaria una transposició d'aquests gens<sup>101</sup>. També s'ha descrit el gen codificador de la Toho-1-like de localització cromosòmica, i en aquest cas presenta múltiples còpies del gen en el cromosoma<sup>147</sup>.

En general, la resistència mediada per plasmidis és incrementada pels transposons i integrons, que són sistemes genètics de mobilització de gens.

Així doncs, el nostre interès es va centrar a estudiar l'entorn genètic de *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. Amb aquest propòsit es va utilitzar la soca MSP502, soca transformant que conté un fragment clonat de 3 kb que inclou el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. La seqüenciació d'aquest fragment de DNA en posició 5' respecte a *bla*<sub>CTX-M-9</sub> i la seva posterior anàlisi computacional va mostrar un 100% d'homologia amb un fragment de l'*orf513*



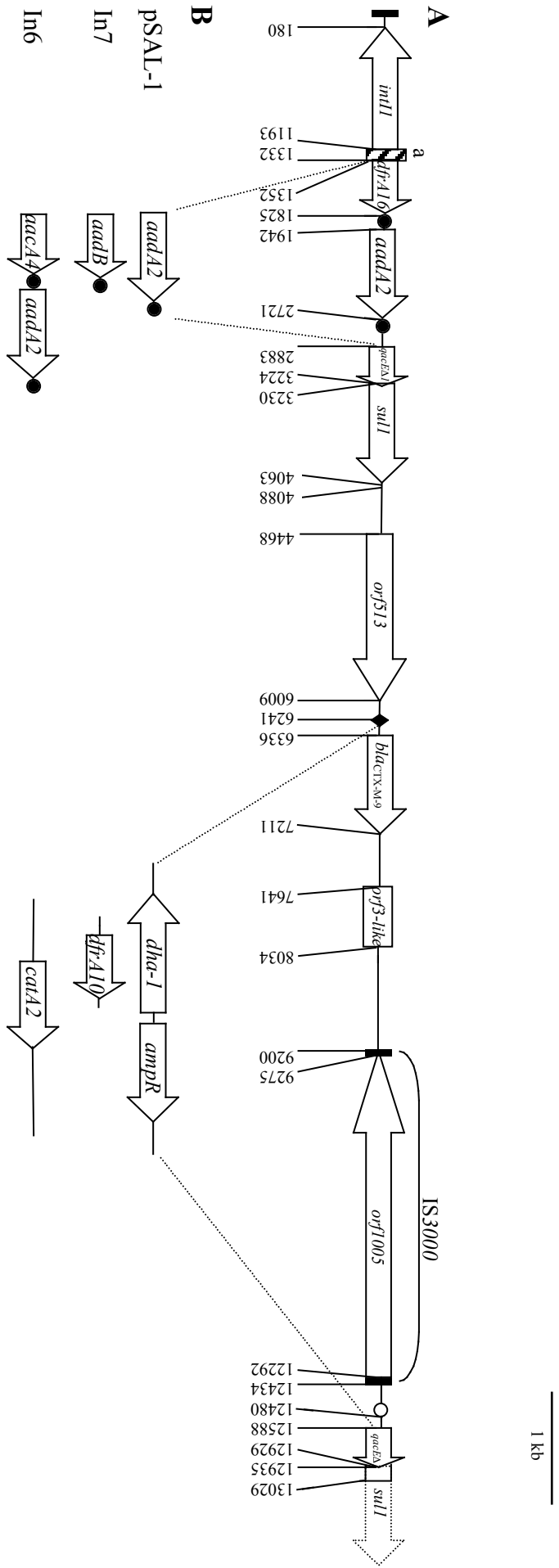
(anteriorment anomenat *orf341*, però posteriorment revisat i actualment coincideix al 100% amb l'*orf513* que s'ha descrit en l'integró caracteritzat en aquest treball). L'*orf314* havia estat descrit formant part dels integrons compostos In6, In7 i l'integró present en el plasmidi pSAL-1. Aquest *orf* es caracteritzava per presentar els primers 320 aminoàcids idèntics als descrits en l'*orf513*, no obstant això, la delecció d'una G respecte de l'*orf513* en la posició 960 comportava un canvi de pauta de lectura que li conferia la formació prematura d'un codó *stop* que donaria lloc a un *orf* més petit, que passaria de tenir 513 a 314 aminoàcids. El fet de trobar l'*orf513*, ens va suggerir la possibilitat que *bla*<sub>CTX-M-9</sub> pogués formar part d'un integró compost. Per tal de demostrar aquesta hipòtesi, es van fer diverses PCR utilitzant el plasmidi pMSP071 (plasmidi conjugatiu que contenia *bla*<sub>CTX-M-9</sub>) i iniciadors específics de regions internes d'In7 i de *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. Els amplicons obtinguts es van clonar en el vector pGEM-T i es van seqüenciar els fragments clonats. Els resultats obtinguts van mostrar que *bla*<sub>CTX-M-9</sub> es trobava formant part d'un nou integró compost de la classe 1, que es va anomenar In60. Aquest nou integró es caracteritza per presentar les seqüències conservades dels integrons de la classe 1 (5'-CS i 3'-CS) entre les quals hi ha dos gens casset: *dfrA16* (codifica la dihidrofolat-reductasa) i *aadA2* (codifica l'aminoglicòsid-adenililtransferasa). A continuació de l'*orf513* hi ha una regió descrita per Valentine i col.<sup>139</sup>, com una regió preferencial o punt calent de recombinació. Seguidament hi ha *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. Tant la seqüència de *bla*<sub>CTX-M-9</sub> com una regió de 394 pb del seu extrem 3', presenten una elevada homologia amb els gens cromosòmics *bla*<sub>KLUA-1</sub> i l'*orf3* de *K. ascorbata* (nombre d'accés AF272538), 81% i 78%, respectivament. La regió que mostra alt grau d'identitat amb l'*orf3* descrit en *K. ascorbata* té una inserció en els primers 13 nucleòtids que li confereix l'aparició d'un codó *stop*. Posteriorment a aquesta regió, es descriu una nova IS, anomenada IS3000, caracteritzada per contenir a cada extrem unes repeticions invertides imperfectes de 83 pb i el gen codificador d'una transposasa de 3.015 pb (*orf1005*) disposat en direcció invertida. La seqüència aminoacídica deduïda d'aquesta transposasa presenta un 28% d'homologia amb la transposasa Tn5501 descrita a *Pseudomonas putida*<sup>64</sup> (nombre d'accés Y09450). L'estudi computacional de la seva seqüència aminoacídica va permetre localitzar el motiu conservat DD(35)-E característic de la família de les transposases<sup>54</sup> (figura 15).

	<b>692</b>	<b>764</b>	<b>895</b>
<b>orf1005</b>	<i>asaDgqk</i> (71)	<i>lstDthgvn</i> (130)	<i>yvqralnrgEayhqlrr</i>
	<b>698</b>	<b>769</b>	<b>899</b>
<b>Tpase<sup>a</sup></b>	<i>gavDgqk</i> (71)	<i>itgDmhsin</i> (129)	<i>nvhrsqnriEsyhqlar</i>
	<b>689</b>	<b>765</b>	<b>895</b>
<b>Tn3</b>	<i>asaDgmr</i> (75)	<i>imtDtagas</i> (129)	<i>riltglnrgEsrhavar</i>
	<b>273</b>	<b>361</b>	<b>396</b>
<b>Tn7</b>	<i>yeiDati</i> (87)	<i>llaDrgelm</i> (34)	<i>rrfdakgivEstftrl</i>
	N2	N3	C1

**Figura 15.** Motius DDE descrits en les transposases. La figura inclou les regions DDE de la hipotètica transposasa descrita en aquest treball (*orf1005*), la Tpase<sup>a</sup> (transposasa de *Pseudomonas putida*) i les transposases de Tn3 i Tn7. El triplet amoniacídic DDE es mostra en negreta juntament amb les seqüències aminoacídiques a 5' i 3' properes. El nombre de residus entre el primer i segon residu D i entre el segon D i el residu E es mostren entre parèntesis. Les regions N2, N3 i C1 són les definides per Rezsahazy<sup>111</sup>.

Es va intentar estudiar la transposició de l' *orf1005* mitjançant la utilització de vectors suïcides<sup>127</sup> però no es va poder detectar i restaria per determinar la capacitat de transposició d'aquesta IS. Posteriorment a aquesta IS3000 hi ha una regió *attC* que conté els darrers 48 nucleòtids idèntics als descrits en el gen casset *aadA2* i seguidament hi ha la segona repetició de l'extrem 3'-CS conservat dels integrons de la classe 1, que conté els gens *qacE 1* i *sull* (vegeu la figura 16, on es mostra l'estructura de l'In60).

Tal com s'ha descrit a la bibliografia, alguns integrons de les classes 1 i 2 presenten en els seus extrems unes repeticions invertides (IR) característiques que li confereixen les propietats de transposició<sup>52</sup>. Amb l'objectiu de poder determinar si l'In60 contenia en els seus extrems aquestes repeticions, es van dissenyar uns iniciadors específics d'IR i de les regions 5' i 3' d'In60. Els resultats de les PCR van mostrar que en posició 5' a In60 hi havia una IR però aquesta no es va poder detectar en posició 3'.



**Figura 16.** Presentació esquemàtica de l'integrat In60, portador de *bla<sub>CTX-M-9</sub>* (nombre d'accés AF174129). (A) Organització de l'n60; les fletxes indiquen les pautes obertes de lectura (*orf*) i la caixa mostra una regió amb una alta homologia amb l'*orf3* de *K. ascorbata*. n, Indica l'*attC*; O, l'*attC* delectonat; a, lloc de recombinació *attI*; , regió hipotètica de recombinació i ■, repetició invertida (IR). (B) Comparació de les regions variables dels diferents integrons compostos *sulI*. Els nombres indiquen els codons d'inici i *stop* de la traducció, seguint la numeració descrita en el nombre d'accés d'In60.

Per tal de poder deduir l'origen d'aquest integró es va realitzar l'anàlisi del coeficient CAI (*coding adaptation index*) i del contingut de GC (%) dels diferents *orf* d'In60 i es va obtenir que *intI1*, *qacEΔ1*, *sull*, *orf513*, *orf1005* i *orf3-like*, presentaven un valor de CAI baix (taula 5). A més, es va observar que *intI1*, *sull*, *bla<sub>CTX-M-9</sub>* i l'*orf3-like* presentaven un valor de GC superior al 60%, quan ha estat descrit en *E. coli* que el contingut global de GC és del 51%. Aquests resultats suggereixen la possibilitat de diferents orígens per a diferents regions d'In60. L'estudi del CAI s'havia realitzat en el Tn21<sup>66</sup> i es va observar, igual que en el cas anterior, que hi havia diversitat en els orígens.

**Taula 5.** Índex del codó d'adaptació (CAI) i percentatge de GC (%) de les diferents regions d'In60.

Gen o regió	CAI	%GC
<i>intI1</i>	0,239	61
<i>qacE</i> 1	0,175	50,3
<i>sull</i>	0,207	61,7
<i>orf513</i>	0,256	55,3
<i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i>	0,305	60,5
regió <i>orf3-like</i>	0,232	60,9
<i>orf1005</i>	0,284	50,6

### 3.3.2. Comparació amb els integrons compostos

Tal com s'ha descrit en l'apartat 3.3.1, anteriorment a In60 s'havien caracteritzat tres integrons compostos: In6, In7 i l'integró que es troba en el plasmidi pSAL-1. A la regió 5'-CS de l'In60 i de l'integró present en pSAL-1 hi ha un promotor dèbil P1 i un segon promotor fort P2; aquest darrer s'ha format per la inserció de tres G entre les posicions -35 i -10 d'aquesta manera s'ha ampliat l'espai entre ambdues a 17 pb<sup>52</sup>. Els integrons In6 i In7 no presenten aquestes insercions.

Entre les regions conservades 5'-CS i 3'-CS s'observa que l'integró present en el plasmidi pSAL-1 conté el gen casset *aadA2*; In7 presenta el gen casset *aadB*; In6 conté dos gens casset (*aacA4* i *aadA2*) i, finalment, In60 conté dos gens casset (*dfrA16* i *aadA2*). Entre les dues regions 3'-CS hi ha diferències importants entre les quals destaca que In60 presenta un fragment de 6,4 kb que inclou *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, la regió *orf3-like* i la IS3000. Els altres integrons compostos presenten una regió de DNA més petita; concretament In6, In7 i l'integró present en pSAL-1 contenen el gen *cat* (en un fragment de 2,4 kb), *dfrA10* (en un fragment de 0,7 kb) i els gens *ampC* i *ampR* (continguts en un fragment de 2,5 kb), respectivament. In60 a diferència dels altres integrons compostos descrits no presenta, cap delecció en l'extrem 5' del segon 3'-CS (vegeu la figura 16).

Tot i que es fa difícil esbrinar l'evolució d'aquests integrons compostos, la presència de determinades regions o punts calents detectats, podrien haver intervingut en l'origen d'aquestes estructures. Un d'aquests punts calents és el descrit per Verdet i col.<sup>140</sup> que correspon a un punt d'inserció localitzat en posició 3' respecte a l'*orf513*. També s'han buscat regions relacionades amb el lloc de recombinació específica *attI1* en In60: GTTRRRY i la seva complementària RYYAAC (sent R = purina i Y = pirimidina), s'han detectat deu regions GTTRRRY i nou regions RYYAAC, excloent-ne aquelles regions localitzades en les regions *attI1* i *attC*. Concretament, es va observar que quatre de les regions GTTRRRY i tres RYYAAC es trobaven localitzades entre els darrers 16 nucleòtids de la primera còpia del gen *sulI* i els primers 180 nucleòtids de l'extrem 5' de l'*orf513*. Dues regions GTTRRRY han estat localitzats a 30 pb de la regió corresponent a l'*orf3-like*. Cal destacar que en aquesta regió la seqüència d'homologia amb *K. ascorbata* decreix del 70% al 30%. Els darrers quatre GTTRRRY i les quatre RYYAAC s'han trobat lluny dels altres i lluny entre si.

L'alta densitat de les regions GTTRRRY i RYYAAC entre el primer 3'-CS i l'extrem 5' de l'*orf513* suggereix que aquesta regió és un punt calent de recombinació. La recombinació on tan sols està implicat el lloc simple (és a dir, la regió GTTRRRY) ha estat detectada, encara que amb una freqüència menor. D'altra banda les regions GTTRRRY també podrien indicar regions que en el passat van ser

punts calents per a la integrasa, però que van esdevenir afuncionals a causa de mutacions, delecions i/o insercions.

### 3.3.3. L'integró In60 i la seva dispersió

Durant el període comprès entre 1994 i 1999, al nostre laboratori es van detectar 33 soques d'*E. coli* i una soca de *Salmonella enterica* serovar Virchow<sup>126</sup> portadores d'una  $\beta$ -lactamasa compatible amb CTX-M-9. La seva caracterització es va fer mitjançant la determinació del patró de sensibilitat, pI i PCR amb iniciadors específics. Es va realitzar biotipificació i serotipificació de les 33 soques d'*E. coli* portadores d'aquesta  $\beta$ -lactamasa i es va veure que aquestes soques no corresponien a un brot epidèmic, tot i que per descartar aquesta possibilitat caldria fer-ne estudis genotípics com per exemple la realització de l'electroforesi en camp pulsatiu (PFGE). Amb l'objectiu de poder esbrinar si a totes les soques *bla*<sub>CTX-M</sub> es troba en el mateix entorn genètic que el descrit anteriorment, és a dir, formant part d'In60, es van dissenyar uns iniciadors específics dels *orf* propers a *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (*orf513* i de l'*orf1005*) i de les regions més distals de *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. Els resultats de la PCR amb aquests iniciadors van mostrar que 30 de les 34 soques tenien les regions esperades de 906 pb i 2.148 pb entre *bla*<sub>CTX-M-9</sub> i *orf513* i *bla*<sub>CTX-M-9</sub> i *orf1005*, és a dir, que presentaven l'entorn descrit anteriorment per a *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. Les restants quatre soques es caracteritzaven per mostrar diferències en aquest entorn i presentaven una soca (1104-D) l'entorn descrit proper a l'*orf513* però no la regió entre *bla*<sub>CTX-M</sub> i *orf1005*, malgrat que es va detectar la IS3000 per PCR. Una segona soca (1383-D) es caracteritzava per tenir l'entorn descrit proper a l'*orf1005*, però no mostrava la regió entre *bla*<sub>CTX-M</sub> i *orf513*, tot i que es va detectar l'*orf513* per PCR. La tercera soca (743-D) presentava l'entorn descrit proper a l'*orf513* i una deleción de 1.549 pb en la regió compresa entre *bla*<sub>CTX-M-9</sub> i *orf1005*. L'altra soca (1387-D) es caracteritzava per no presentar l'entorn determinat per a *bla*<sub>CTX-M-9</sub> ni en posició 5' ni 3'.

Tot i que s'han realitzat pocs estudis on es descriu l'entorn dels gens *bla*<sub>CTX-M</sub>, darrerament Karim i col.<sup>60</sup> han caracteritzat l'entorn de *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, localitzat en plasmidis grans de diferent mida. Aquest gen presentava la seqüència d'inserció ISEcp1 en posició 5'. En aquest cas, no es va observar cap promotor en la regió a 5' respecte del codó inici de *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, però es van identificar les regions

promotores típiques –35 i –10 en l'extrem 3' de la *ISEcpI*. Aquesta IS o parts seves s'han detectat a 5' dels gens codificadors de Toho-1 (nombre d'accés D37830), Toho-2 (D89862), CTX-M-14 (AF252622 i AF311345; anomenat també UOE-2 i CTX-M-18), CTX-M-5 (AF286192) i CTX-M-1 (X92506). També s'ha identificat aquesta IS a 5' dels gens codificadors de cefalosporinases: *bla<sub>CMY-2</sub>* (X91840), *bla<sub>CMY-4</sub>* (AJ42809), *bla<sub>CMY-5</sub>* (Y17716), *bla<sub>ACC-1</sub>* (AJ270942 i AJ133121) i *bla<sub>LAT-1</sub>* (X78117). S'ha observat la presència de la IS903 a 3' de *bla<sub>CTX-M-14</sub>*<sup>90</sup>. De la mateixa manera *ISEcpI* i IS903 han estat localitzades a 5' i a 3', respectivament, de *bla<sub>CTX-M-14</sub>* (també anomenat CTX-M-18) i *bla<sub>CTX-M-19</sub>*, (comunicació personal). Aquesta IS903 és 99% idèntica a la IS903 localitzada a Tn2680. També ha estat descrita la presència d'altres seqüències d'inserció (IS) properes a gens codificadors de -lactamases i que influeixen en la seva expressió. Naas i col.<sup>80</sup> van trobar en una soca clínica de *Pseudomonas aeruginosa* el gen *bla<sub>SHV-2a</sub>*, que es caracteritzava per presentar un promotor compost, format per una regió –35 derivada de la regió invertida esquerra (IRL) d'IS26 i una regió –10 procedent del mateix promotor de *bla<sub>SHV-2a</sub>*. Un altre promotor híbrid similar es va identificar en el gen *bla<sub>TEM-6</sub>* en el qual la seqüència –35 provenia de l'element *ISI-like*, la qual cosa li conferia un nivell major d'expressió de TEM-6<sup>46</sup>. Des d'un punt de vista general, se sap que les seqüències d'inserció actuen com a promotors mòbils en l'expressió dels gens de procarotes. Les seves repeticions invertides (IR) contenen seqüències –35 que, un cop inserides de manera pròxima a seqüències –10, podrien estimular l'expressió gènica<sup>80</sup>. La *ISEcpI* podria actuar com una eina eficient de mobilització i expressió dels gens codificadors de -lactamases.

Amb l'objectiu de detectar la possible presència de la *ISEcpI* en la soca 1387-D, soca que no presentava l'entorn de In60, es van dissenyar uns iniciadors específics: *ISEcpI*<sub>up</sub>, 5'-CAAATGATCCCCTCGTC-3'; i *ISEcpI*<sub>low</sub>, 5'-TCTTGCGTTTTGATTATT-3'). La mida de l'amplicó que calia esperar era de 977 pb. Es va obtenir un resultat positiu de la PCR i per tal de determinar si aquesta *ISEcpI* es trobava propera a *bla<sub>CTX-M</sub>* es van realitzar PCR utilitzant iniciadors creuats (*ISEcpI*<sub>up</sub>-I<sub>ATGR</sub>; I<sub>ATGR</sub>-*ISEcpI*<sub>rev</sub>). El resultat obtingut va mostrar un amplicó d'1,8 kb (inclou *ISEcpI* i *bla<sub>CTX-M</sub>*) quan es van utilitzar els iniciadors *ISEcpI*<sub>up</sub>-I<sub>ATGR</sub>, la qual cosa indicava que la *ISEcpI* es trobava en posició 5' a *bla<sub>CTX-M</sub>*, de la mateixa manera que havia estat descrit a la bibliografia<sup>60</sup>. Aquesta

soca també es caracteritzava per presentar un integró de la classe 1 que contenia una regió aproximadament de 3 kb, mida superior al fragment de DNA contingut en l'integró descrit en les soques que tenien l'entorn d'In60 (1,2 kb). Es va estudiar si dintre d'aquesta regió hi havia *bla*<sub>CTX-M</sub>, però el resultat fou negatiu. Aquesta soca portadora de *ISEcp1* es va conjuguar i es va obtenir una transconjugant que, a diferència de la progenitora (soca que expressava dues  $\beta$ -lactamases 5,4 i 8,0), únicament expressava la  $\beta$ -lactamasa de pI 8,0. En aquesta soca es va fer PCR amb els iniciadors 5'-CS i 3'-CS i es va observar que l'integró no hi era, en aquest plasmidi conjugatiu. Seguidament es va fer PCR amb iniciadors creuats (*ISEcp1*up-I<sub>ATGR</sub>) i es va veure que tant *bla*<sub>CTX-M</sub> com *ISEcp1* es trobaven en el plasmidi conjugatiu. Cal fer més estudis de seqüenciació per determinar si es tracta de *bla*<sub>CTX-M-9</sub> o d'un altre gen relacionat. No obstant això, s'ha confirmat la presència d'una  $\beta$ -lactamasa compatible amb la CTX-M-9, situada en un entorn diferent del descrit, i majoritari, detectat i caracteritzat en aquest estudi per dita  $\beta$ -lactamasa.

Tot i que l'origen d'*ISEcp1* (nombre d'accés AJ242809) resta indeterminat, l'associació d'*ISEcp1* amb els gens codificadors de  $\beta$ -lactamases, les quals tenen origen en la família *Enterobacteriaceae*, podria indicar que el donador d'*ISEcp1* és una espècie bacteriana present en aquesta família.

El fet que la  $\beta$ -lactamasa compatible amb CTX-M-9 presenti un entorn genètic totalment diferent del descrit en aquest treball per les soques portadores d'una  $\beta$ -lactamasa compatible amb CTX-M-9 podrà ajudar a postular l'origen d'aquest gen així com la seva ràpida i àmplia difusió.