



*Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Genètica i de Microbiologia*

**PREVALENÇA D'ENTEROBACTERIS AMB
SENSIBILITAT REDUÏDA A
CEFALOSPORINES DE TERCERA
GENERACIÓ AÏLLADES A L'HOSPITAL DE
LA SANTA CREU I SANT PAU ENTRE
1994 I 2004**

*Memòria realitzada per a optar al grau de
Doctora en Ciències Biològiques*

M^a del Carme Roig Mombrú

Barcelona, Juny de 2007

Beatriz MIRELIS OTERO, Professora Titular d'Universitat. Departament de Genètica i de Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona, i **Elisenda MIRÓ CARDONA** Doctora en Ciències Biològiques.

CERTIFIQUEN:

Que, la present tesi doctoral que porta per títol "**Prevalença d'Enterobacteris amb sensibilitat reduïda a cefalosporines de tercera generació aïllades a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau entre 1994 i 2004**" i que presenta Na M^a del Carme Roig Mombrú per a optar al grau de Doctora en Ciències Biològiques, ha estat elaborada sota la nostra direcció i compleix els requisits necessaris per a la seva tramitació i posterior defensa davant del tribunal corresponent.

Per tant, per tal que així consti, i per als efectes oportuns, signem aquest certificat a Barcelona, 27 de Març de 2007.



Dra. B. Mirelis Otero



Dra. E. Miró Cardona

Feina feta no fa destorb

Il·lustració de la coberta

Pavelló de la Mercé

Dibuixat per en Joan Alonso Roig

Barcelona, 2005

A en José Luis,
sense la teua paciència
no ho hauria aconseguit

Als meus fills, Joan i Laura,
per les hores que us he robat

Als meus pares,
sense vosaltres no seria qui sóc

Al meu germà Narcís,
per ensenyar-me a lluitar i vèncer

Als meus avis,
allà on esteu

AGRAÏMENTS

Per fi aquesta Tesi veu la llum i, ara, em trobo davant d'aquella plana en que vols dir moltes coses i no vols oblidar ningú.

Si miro enrera em sembla que va ser ahir quan vaig arribar per primer cop al Servei de Microbiologia de l'Hospital de Sant Pau però, d'això, ja en fa 21 anys. Qui ho diria! Durant aquestes dues dècades he conegut moltes persones, algunes ja han marxat i d'altres encara formen part del meu dia a dia i amb les quals, força vegades, hi comparteixo moltes més coses que, única i exclusivament, la feina diària. Per aquest fet, reconec que en aquesta Tesi Doctoral, hi ha molta gent a la qual dec un agraïment per tot el que m'han ajudat, directa o indirectament, en l'aïllament d'aquestes soques que han estat motiu d'estudi. Per tant, a tots els meus companys, moltes gràcies.

Hi ha certes persones que no voldria deixar d'anomenar pel que han significat per a que aquest treball fos una realitat.

En primer lloc, la Dra. Mirelis, la Bea, una de les meves directores i qui em va introduir en el món dels antimicrobians i els mecanismes de resistència dels bacteris; ella m'ha ensenyat a llegir una placa d'antibiograma com si d'un llibre és tractés. "Pero sobretudo, Bea, gracias por ser mi amiga en todos y cada uno de los momentos difíciles que he pasado y por ayudarme a conseguir finalizar este proyecto con tus conocimientos y gran profesionalidad".

La Dra. Miró, l'Eli, la meva altra directora de Tesi que sempre que li havia de consultar o ensenyar alguna cosa del treball ens telefonàvem per a veure qui pujava o baixava la tan estimada "muntayeta del prefabricat". Gràcies per tot l'esforç que has fet i totes les hores que has dedicat a aquelles llistes inacabables de números, patrons de resistència i soques però, sobretot, gràcies pel teu bon humor.

El Dr. Guillem Prats, el meu veritable mestre en la Microbiologia, el creador de tota una escola i amb el qui vaig viure moments importants del Laboratori. Moltes gràcies per la confiança que va dipositar tantes vegades en mi.

El Dr. Pere Coll, per haver-me donat l'oportunitat de desenvolupar aquest treball.

El Ferran Navarro que ha resultat ser, més que un adjunt, un veritable amic, tot i que alguna vegada hàgim pogut tenir punts de vista diferents. Gràcies pel teu recolzament i ajuda i per intentar trobar sempre la millor solució.

Hi ha tres persones que no voldria deixar de mencionar per l'amistat que ens uneix, per tot el que hem compartit i perquè sempre han estat al meu costat; en primer lloc, l'Alba, la meva companya de te, gràcies per les teves fructíferes i ràpides consultes en el SirScan per a poder elaborar les llarguíssimes llistes de dades, gràcies per la teva rialla que ho omple tot i perquè m'has empès dia rera dia a arribar al final. La Lina, la meva amiga colombiana, amb qui he viscut moments molt "salseros" i que no ha escatimat mai el temps per ajudar-me en els problemes informàtics del document. "Nunca te lo agradeceré bastante". I la Pili, l'altra "salsera", que tot i que l'he coneguda més darrerament sé que, quan torni al seu Mèxic natal, no la podré oblidar mai. Amb ella he compartit estones d'amoïnament i preocupació, ella amb la seva Tesina i jo amb la meva Tesi. "Pero no te apures, Pili, lo conseguiremos y luego será un bonito recuerdo".

No em vull oblidar en aquestes ratlles la Rosa i la Lluïsa, les meves companyes de secció, per permetre'm anar a consultar a l'Eli entre PCR i PCR. Ni en Ferran Sànchez, per la seva ajuda quan em quedava colapsada amb l'ordinador o quan, amablement, em portava els articles que jo sabia que només ell em podia aconseguir. I, com no, la Cristina Díez, que sempre ha intentat ajudar-me a "moderar i suavitzar" el meu estil gràfic sabedora, com és ella, que m'agraden els colors vius.

Finalment voldria deixar les darreres línees per a dirigir-me a la meva família perquè probablement són ells els que han sofert més directament els efectes de l'elaboració d'aquesta Tesi Doctoral.

Gràcies, papes, per l'esforç que heu fet en tot moment, mai m'heu fallat i durant la redacció d'aquesta Tesi, tampoc. Sempre i en qualsevol situació hem estat una pinya i, ara, no podia ser d'una altra manera. Gràcies pels vostres consells en els efectes visuals però, principalment, us estic agraïda per tot el que m'heu ensenyat i per ser com sou.

Al meu germà, Narcís, tu m'has ensenyat a lluitar i no donar-me per vençuda. Ets un exemple per a mi. Gràcies per estimar-me tant.

Als meus avis, allà on estigueu sé que estareu molt contents i orgullosos de la meva Tesi. Com vosté deia, iaia, "feina feta no fa destorb".

Joan, Laura, sense vosaltres mai hauria sabut el que significa ser mare, sou el regal més marevellós! Durant aquest dos anys i mig que ha durat la gestació d'aquest treball sé que us he pres moltes hores, més de les que hagués volgut!, però vosaltres ho heu suportat pacientment i, per això, us dono les gràcies! Ja veus Joan, qui havia de dir que el teu treball escolar arribaria a ser la portada de la meva Tesi i, quin goig que fa, gràcies fill!

Les meves darreres paraules d'agraïment són per en José Luís, espòs i amic. Quanta paciència has hagut de tenir! però no has defallit mai, al contrari, sempre em deies "queda poc". Gràcies per estar al meu costat quan m'han fallat les forces i per donar-me l'alè necessari per arribar al final. Espero que junts poguem compartir moltes més coses.

I ara sí, Laura, ja s'ha acabat i ja ho podem anar a celebrar!, com tu em vas dir un dia quan em vas veure per enèsima vegada davant l'ordinador!

Barcelona, 1 d'Abril de 2007

ÍNDEX

| | |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓ | 3 |
| 1.1. Família <i>Enterobacteriaceae</i> | 4 |
| 1.2. Antibiótics β -lactàmics | 10 |
| 1.2.1. Origen dels β -lactàmics | 10 |
| 1.2.2. Estructura i classificació dels β -lactàmics | 12 |
| 1.2.2.1. Penicil·lines | 13 |
| 1.2.2.2. Cefalosporines | 15 |
| 1.2.2.3. Monobactams | 15 |
| 1.2.2.4. Carbapenems | 15 |
| 1.2.2.5. Inhibidors de β -lactamases | 15 |
| 1.2.3. Mecanismes d'acció dels β -lactàmics | 15 |
| 1.2.4. Espectre d'activitat | 20 |
| 1.2.5. Farmacocinètica | 22 |
| 1.3. Resistència antimicrobiana | 25 |
| 1.3.1. Resistència adquirida | 25 |
| 1.4. Mecanismes de resistència als β -lactàmics | 30 |
| 1.4.1. β -lactamases | 32 |
| 1.4.1.1. Mecanismes d'acció de les β -lactamases | 32 |
| 1.4.1.2. Classificació de les β -lactamases | 33 |
| 1.4.1.2.1. β -lactamases del grup 1 | 35 |
| 1.4.1.2.2. β -lactamases del grup 2 | 37 |
| 1.4.1.2.3. β -lactamases del grup 3 | 43 |
| 1.4.1.2.4. β -lactamases del grup 4 | 44 |
| 2. OBJECTIUS | 47 |
| 3. MATERIALS I MÈTODES | 51 |

ÍNDIX

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Soques | 51 |
| 3.2. Determinació de la sensibilitat als antibiòtics | 51 |
| 3.2.1. Tècnica de disc-difusió. Detecció de BLEA i cefamicinasa | 51 |
| 3.2.2. Determinació de la Concentració Inhibitòria Mínima (CIM) | 53 |
| 3.2.2.1. Tècnica de microdilució | 53 |
| 3.2.2.2. Mètode de l'Epsilon test (Etest) | 54 |
| 3.2.2.3. Prova de doble difusió en disc (estudi de sinèrgia) | 55 |
| 3.2.2.4. Mètodes per a la detecció de cefamicinases | 56 |
| 3.3. Determinació del punt isoelèctric de les β-lactamases | 58 |
| 3.3.1. Obtenció de l'extracte cru | 58 |
| 3.3.2. Isoelectroenfoc | 59 |
| 3.4. Tècnica de PCR | 63 |
| 3.5. Seqüenciació amb terminadors marcats | 67 |
| | |
| 4. RESULTATS | 75 |
| 4.1. Evolució de la resistència als antimicrobians en enterobacteris aïllats en el decenni 1994-2004 | 75 |
| 4.2. Prevalença d'enterobacteris amb β-lactamases d'espectre ampliat i cefamicinases plasmídiques | 82 |
| 4.2.1. β-lactamases d'espectre ampliat | 82 |
| 4.2.2. Cefamicinases | 89 |
| 4.3. Trets clínics de les soques amb β-lactamases d'espectre ampliat o cefamicinasa | 90 |
| 4.4. Resistències associades dels antibiòtics no β-lactàmics a la producció de β-lactamases d'espectre ampliat o cefamicinasa | 92 |
| 4.4.1. Soques que expressaven β-lactamases d'espectre ampliat | 92 |
| 4.4.2. Soques que expressaven cefamicinases | 94 |

ÍNDEX

| | |
|-----------------------|-----|
| 5. DISCUSSIÓ | 99 |
| 6. CONCLUSIONS | 115 |
| BIBLIOGRAFIA | 121 |

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

Els avenços de la medicina en els països desenvolupats han aconseguit eradicar alguns microorganismes patògens primaris com són el bacil diftèric, el tetànic o el virus de la verola; malgrat això, s'ha incrementat la incidència de les infeccions causades per microorganismes oportunistes amb un paper destacat de les espècies de la família *Enterobacteriaceae*.¹

La introducció dels antimicrobians en la terapèutica clínica fa més de 60 anys, també fou un pas clau per al control de les infeccions bacterianes. Tanmateix, amb un promig de dos anys després de la introducció dels antimicrobians en clínica, els bacteris han anat esdevenint resistents. Aquest fet no només és preocupant perquè disminueix les perspectives de curació, sinó perquè segueix una línia ascendent que no sembla voler aturar-se. Aquests valors de resistència no només incrementen ràpidament sinó que també hi ha un fenomen d'expansió arreu. Existeixen diferents mecanismes moleculars que confereixen resistència als bacteris. Darrerament s'ha observat que aquests mecanismes estan inclosos en elements mòbils (com plasmidis, transposons, o integrons) els quals els hi faciliten la difusió, no només entre soques de la mateixa espècie, sinó també entre espècies diferents. Per últim assenyalar que aquests elements mòbils, no només expandeixen la resistència, sinó que també capten diferents mecanismes, el que permet al bacteri esdevenir multiresistent.²

Els antibiòtics β -lactàmics constitueixen la família més utilitzada per al tractament de les infeccions causades pels enterobacteris. El descobriment de la penicil·lina per Alexander Fleming va suposar un gran canvi en l'àmbit de les malalties infeccioses però, malauradament, aviat sorgiren bacteris resistents. Paral·lelament, als anys 80, la introducció de les cefalosporines de tercera generació (C3G) i dels monobactams, ambdós efectius contra les β -lactamases prevalents (TEM, SHV) va permetre tractar les infeccions provocades per enterobacteris portadors d'aquests enzims, els quals inactiven les aminopenicil·lines, carboxipenicil·lines i, en part, a les cefalosporines de primera generació. Aviat,

emperò, els bacteris van tornar a fer palès la seva capacitat d'adaptació i supervivència amb l'aparició de les β -lactamases amb capacitat d'inactivar a les C3G i als monobactams, les **β -lactamases d'espectre ampliat (BLEA)**.

El que va semblar una troballa científica interessant ha esdevingut una realitat de gran importància mèdica.

1.1 Família *Enterobacteriaceae*

La família *Enterobacteriaceae*^{1, 3-5} (Figura 1) és el grup més gran i heterogeni de bacils gramnegatius amb importància clínica. En l'actualitat, s'han descrit més de 40 gèneres i diversos grups no nominats (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi):

| | | | | |
|--------------------------------|---------------------|------------------------|--------------------|-----------------------|
| <i>Alterococcus</i> | <i>Citrobacter</i> | <i>Kluyvera</i> | <i>Pragia</i> | <i>Tatumella</i> |
| <i>Aranicola</i> | <i>Dickeya</i> | <i>Leclercia</i> | <i>Proteus</i> | <i>Thorsellia</i> |
| <i>Arsenophonus</i> | <i>Edwardsiella</i> | <i>Leminorella</i> | <i>Providencia</i> | <i>Tiedjeia</i> |
| <i>Averyella</i> | <i>Enterobacter</i> | <i>Moellerella</i> | <i>Rahnella</i> | <i>Trabulsiella</i> |
| <i>Brenneria</i> | <i>Erwinia</i> | <i>Morganella</i> | <i>Raoulella</i> | <i>Wigglesworthia</i> |
| <i>Buchnera</i> | <i>Escherichia</i> | <i>Obesumbacterium</i> | <i>Salmonella</i> | <i>Xenorhabdus</i> |
| <i>Budvicia</i> | <i>Ewingella</i> | <i>Pantoea</i> | <i>Samsonia</i> | <i>Yersinia</i> |
| <i>Buttiauxella</i> | <i>Grimontella</i> | <i>Pectobacterium</i> | <i>Serratia</i> | <i>Yokenella</i> |
| <i>Candidatus Phlomobacter</i> | <i>Hafnia</i> | <i>Photorhabdus</i> | <i>Shigella</i> | |
| <i>Cedecea</i> | <i>Klebsiella</i> | <i>Plesiomonas</i> | <i>Sodalis</i> | |
| Enterobacteris no classificats | | | | |

Aquests gèneres s'han classificat atenent a les seves propietats bioquímiques, estructura antigènica i segons tècniques d'hibridació i seqüenciació dels àcids nuclèics. Malgrat la complexitat d'aquesta família, menys de 20 espècies són les responsables de més del 95% de les infeccions³ (Taula 1).

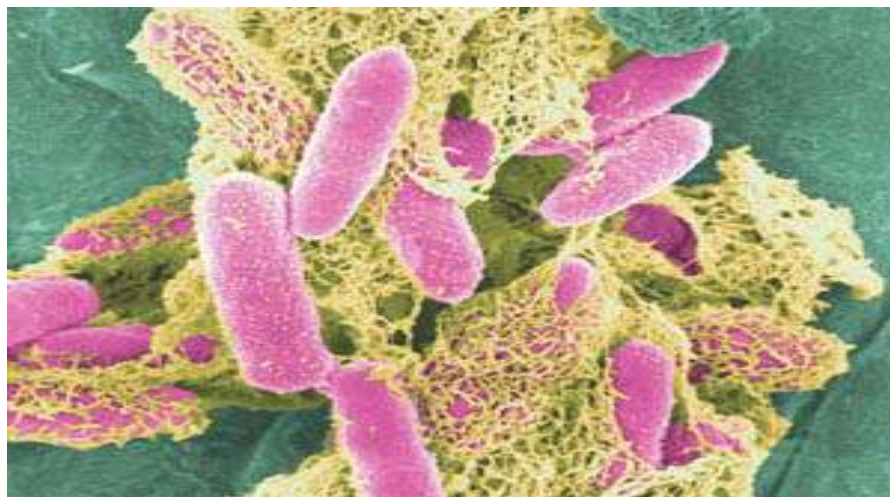


Figura 1. *Escherichia coli* (<http://www.lbl.gov/Publications/Currents/Archive/Mar-05-2004.html>)

La família *Enterobacteriaceae* està formada per microorganismes ubiquus, que es troben de forma universal en el sòl, l'aigua i la vegetació i que formen part de la flora intestinal normal de molts animals, inclosos els humans (d'aquí el nom d'enterobacteri que prové del grec “*enterikos*” que significa “intestí”). Algunes espècies es troben adaptades estrictament a l'home com *Salmonella* serovar Typhi i les sigel·les.

Taula 1. Enterobacteris freqüents amb significació clínica

| Patògens primaris |
|-----------------------------------------------------------------------------|
| <i>Salmonella enterica</i> (serovars gastroentèrics, serovar Typhi) |
| <i>Shigella</i> (<i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i>) |
| <i>Yersinia</i> (<i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>) |
| <i>Escherichia coli</i> (serovars enteropatògens) |
| Patògens oportunistes |
| <i>Escherichia coli</i> |
| <i>Klebsiella</i> (<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>) |
| <i>Enterobacter</i> (<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i>) |
| <i>Citrobacter</i> (<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i>) |
| <i>Proteus</i> (<i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>) |
| <i>Morganella morganii</i> |
| <i>Serratia</i> (<i>S. marcescens</i>) |

La família inclou, també, espècies comensals i patògenes per a les plantes i els animals. Pel que fa a l'home, existeixen espècies patògenes primàries, com ara les salmonel·les (causants d'enteritis especialment els serotips de *Salmonella enterica* spp. *enterica* o de febres tifiques i paratífiques com els serotips Typhi i Paratyphi A, B i C), les sigel·les, algunes espècies del gènere *Yersinia*, que actuen per mecanisme invasor i algunes soques d' *Escherichia coli* que causen gastroenteritis per diferents mecanismes (invasius, toxigènics i d'altres) i espècies comensals estables o transitòries del tub digestiu que poden produir infeccions oportunistes.¹

Els membres d'aquesta família tenen una mida entre 0,3-1 x 1-6 µm. Les espècies mòbils presenten flagels de localització perifèrica i no formen espores. Algunes espècies (p. ex., les del gènere *Klebsiella*) són típicament capsulades. Tots els membres són aerobis i anaerobis facultatius, amb un creixement visible després de 18-24 hores d'incubació en medis usuals. Els enterobacteris tenen requeriments nutricionals simples (sovint poden créixer amb una única font d'energia orgànica), fermenten la glucosa, redueixen els nitrats a nitrits, són oxidasa negativa i catalasa positiva. L'absència d'activitat citocrom oxidasa és una característica important perquè permet distingir els enterobacteris de molts altres bacils gramnegatius fermentadors i no fermentadors. Pel que fa a les característiques genotípiques, cal destacar que aquesta família té un contingut de G + C entre 39-59%.¹

Que els enterobacteris creixin bé en els medis usuals fa que el seu aïllament en els productes patològics no plantegi problemes excepte quan, en aquests productes, existeix una flora mixta molt abundant o s'intenta aïllar una espècie enteropatògena d'entre les nombroses espècies bacterianes de la femta. Per a l'aïllament d'enterobacteris de productes patològics amb flora mixta, és útil emprar medis selectius que permetin el creixement de tots els enterobacteris inhibint el creixement d'altres bacteris.

La majoria dels medis selectius per enterobacteris, que incorporen substàncies com el citrat sòdic, sals biliars, desoxicolat o antibiòtics, són a la vegada

diferencials gràcies a la incorporació de sucres i indicadors adequats (p. ex., lactosa, xilosa, β -glucuronidasa, sulfid ferrós, blau de bromotimol). La introducció de substrats cromogènics o fluorogènics ha permès el disseny de nous medis diferencials encara més eficaços⁴ (Figura 2).



Figura 2. Medi selectiu diferencial cromogènic

Des del punt de vista estructural les parets de les cèl·lules gramnegatives, i per tant la dels components de la família *Enterobacteriaceae*, són complexes (Figura 3).^{6,7} Presenten una paret formada per dues capes externes a la membrana citoplasmàtica: una fina capa de peptidoglicà i per fora de la capa de peptidoglicà la **membrana externa**, que és característica dels bacteris gramnegatius. La zona compresa entre la membrana citoplasmàtica i la membrana externa s'anomena **espai periplasmàtic**. En aquest espai hi trobem diversos enzims hidrolítics per a la degradació i metabolització de macromolècules (p. ex., fosfatases, proteases, β -lactamases) i components dels sistemes de transport de sucres i proteïnes de fixació que faciliten la captació de metabòlits i altres compostos.

La membrana externa manté l'estructura bacteriana, ofereix protecció en front condicions ambientals adverses i constitueix una barrera osmòtica impermeable a molècules no lipofíliques, carregades i de gran tamany. Aquesta membrana presenta

proteïnes transmembrana, anomenades **porines**,^{1,6,7} que permeten la difusió de molècules hidrofíliques amb un tamany inferior a 700 Da (metabòlits i antibiòtics), fosfolípids (en la cara interna) i lipopolisacàrids (LPS, en la zona externa). Els LPS presenten, estructuralment, tres zones:

- La més interna, lípid A que constitueix la endotoxina, component important en la virulència dels bacteris gramnegatius.
- Zona mitja, formada per un nombre limitat de sucres (5 a 7).
- Zona externa, formada per una llarga cadena de sucres (polisacàrid) amb capacitat immunogènica.

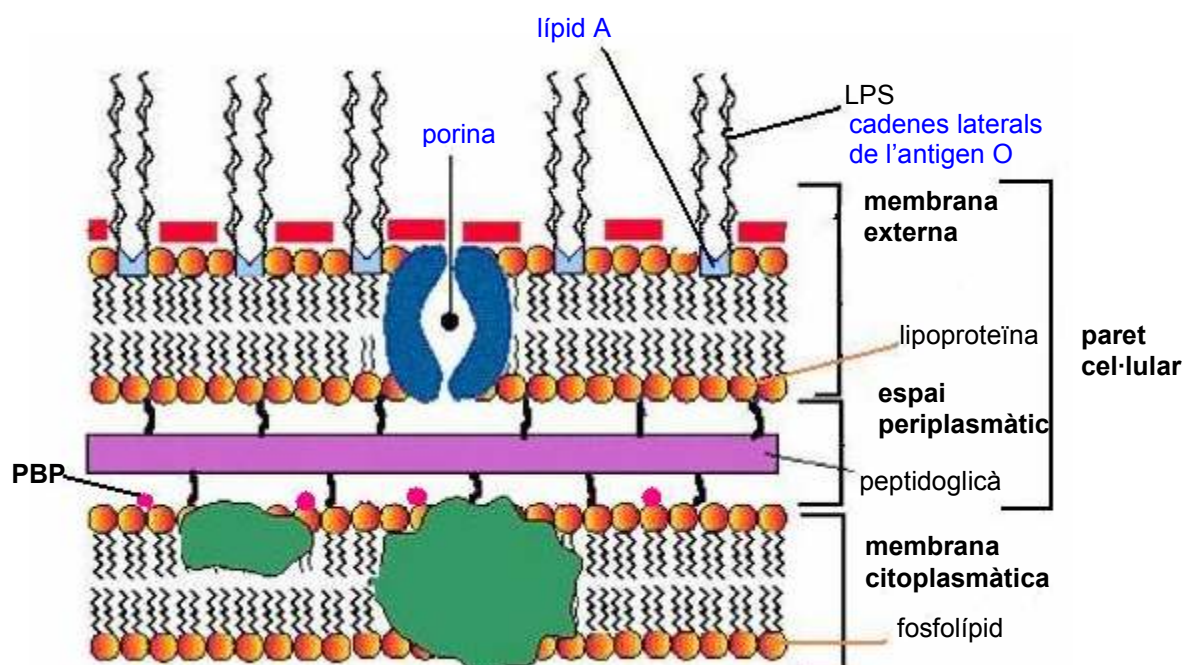


Figura 3. Paret cel·lular dels bacteris gramnegatius i principals estructures antigèniques. ([http://biology.kenyon.edu/Microbial Biorealm/bacteria/proteobacteria/gramnegative/gramnegative.html](http://biology.kenyon.edu/Microbial%20Realm/bacteria/proteobacteria/gramnegative/gramnegative.html))

Els bacteris contenen nombroses macromolècules que tenen capacitat immunogènica (antígens). De tots els antígens dels enterobacteris, els antígens O, H i K són els que tenen més interès per a la seva tipificació.¹ L'antigen O es troba en la porció externa polisacàrida del LPS de la paret dels enterobacteris permetent definir diversos serogrupos dins de cada espècie.

Els flagels de les soques mòbils estan formats per subunitats protèiques (flagelina), altament antigèniques, que constitueixen l'antigen H, permetent subdividir els serogrupos en serotips.

Algunes espècies produeixen quantitats variables de polisacàrid capsular immunogènic, que constitueix, quan hi és present, l'antigen K.

En els bacteris és molt freqüent la presència de plasmidis, transposons i profags els quals poden codificar factors que comportin modificacions estructurals (expressió de nous antígens), metabòliques (utilització de nous substrats), patogèniques (toxines) o en la sensibilitat als antibiòtics (codificació d'enzims que inactiven els antibiòtics).⁴

Els enterobacteris són primàriament sensibles a la majoria de grups d'antibiòtics i quimioteràpics, incloent-hi les penicil·lines d'ampli espectre, cefalosporines, aminoglicòsids, tetraciclins, cloramfenicol, colistina, quinolones, cotrimoxazole i nitrofurans. Existeixen resistències naturals d'un gènere o una espècie a alguns antibiòtics i d'altres d'adquirides per mutació o per adquisició de nou material genètic, seguides de selecció. El fet que els enterobacteris es trobin normalment en el tub digestiu de l'home i dels animals fa que estiguin sota la pressió selectiva de qualsevol tractament antibiòtic, dins la qual persisteixen les soques que han esdevingut resistents. Aquesta selecció de soques resistents també és molt important en els animals, als quals se'ls administrava^{1,8,9} a les granges, antimicrobians barrejats amb els aliments com a promotors del creixement. La utilització dels antimicrobians en producció animal ha suposat un gran avenç en la reducció dels problemes infecciosos dels animals que a la vegada reverteix en una reducció del risc de transmissió d'infeccions als consumidors i, per tant, un augment en la seguretat de la cadena alimentària. Tanmateix, l'ús dels antimicrobians porta implícita l'aparició de resistències les quals poden passar després a l'home. Per tal de minimitzar el risc d'aparició de resistències i controlar-ne la seva disseminació va entrar en vigor el Reglament de la CE, nº 1831/2003, pel qual es prohibeix l'ús

d'additius antibiòtics promotors del creixement diferents dels coccidiostàtics i histomonostats.¹⁰

El tipus i freqüència de les resistències adquirides varia entre països, ciutats i hospitals. Depèn de diferents factors com el tipus de clona present, de la política d'antibiòtics emprada i de les normes de prevenció.

El tractament d'elecció en la majoria de les infeccions produïdes pels enterobacteris són els antibiòtics β -lactàmics.

1.2 Antibiòtics β -lactàmics

La presència d'un anell β -lactàmic defineix químicament aquesta família d'antibiòtics,¹¹⁻¹³ així com les seves característiques més importants: mecanisme d'acció (inhibició de la síntesi de la paret cel·lular), principal mecanisme de resistència (β -lactamases) i escassa toxicitat directa (actuen sobre el peptidoglicà de la paret cel·lular, estructura que no existeix en la cèl·lula eucariota). Des que fa quasi més de 60 anys que es van introduir en clínica s'han emprat en multitud d'infeccions amb notable èxit i són, sens dubte, els antimicrobians més prescrits tant en atenció primària com en l'àmbit hospitalari.

1.2.1 Origen dels β -lactàmics

La història dels β -lactàmics^{14, 15} comença l'any 1928 quan Alexander Fleming, 1881-1955, (Figura 4) va descobrir, a partir d'una soca de *Penicillium notatum*, la penicil·lina G. L'australià Howard W. Florey (1898-1968) inicia, l'any 1939, l'estudi sobre l'estructura, propietats i forma d'obtenció del compost. No és, emperò, fins l'any 1941 que s'aconsegueix suficient quantitat de penicil·lina pel tractament de malalts, administrant-se, per primera vegada, en un pacient amb sèpsia estafilocòcica i estreptocòcica. A partir d'aquell moment es va sintetitzar penicil·lina

en grans quantitats substituint el cultiu del fong inicial per l'espècie *Penicillium chrysogenum*, que produïa molta més penicil·lina que l'original.

Les primeres penicil·lines semisintètiques van aparèixer el 1959 quan uns científics anglesos van aïllar el nucli de la penicil·lina (àcid 6-aminopenicil·lànic) que no presentava activitat antimicrobiana però que es va convertir en el punt de partida per a la síntesi de noves penicil·lines mitjançant l'addició de diferents cadenes laterals acil·lades, com les aminopenicil·lines, acilureidopenicil·lines i carboxipenicil·lines.

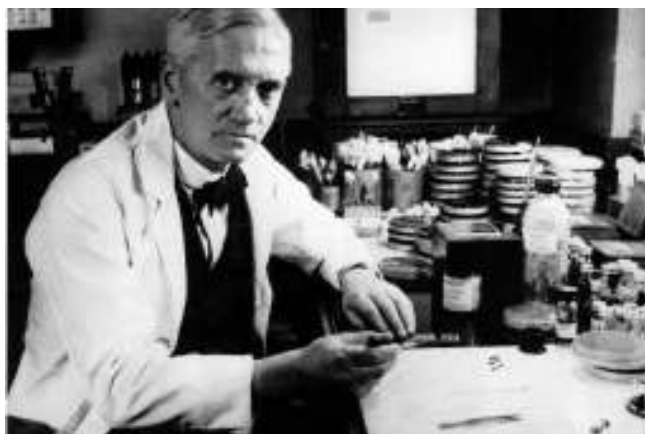


Figura 4. Alexander Fleming el 1952 a l'Institut Wright Fleming de Londres (<http://www.time.com/time/time100/scientist/profile/fleming.html>)

El 1945 es va aïllar, a partir d'una soca de *Cephalosporium acremonium* (actualment *Acremonium chrysogenum*) una substància que anomenaren **cefalosporina C**¹⁶ i que va despertar interès per tenir activitat en front bacteris grampositius i gramnegatius presentant, a més, resistència a la penicil·linasa dels estafilococs i *Bacillus cereus*. Aquesta cefalosporina ha estat la precursora de totes les cefalosporines actuals. El 1962 va aparèixer la primera cefalosporina semisintètica, la cefalotina, i a partir d'aquell moment han anat apareixent un gran nombre de cefalosporines assolint el seu màxim esplendor amb l'aparició, a finals dels anys 70, de les cefalosporines de 3^a generació (C3G) i, posteriorment, les cefalosporines de 4^a generació (C4G).

A finals dels anys 60, es van descobrir altres derivats β -lactàmics, els carbapenems,¹⁷ derivats de la tienamicina, substància aïllada de *Streptomyces cattleya* i que eren potents inhibidors de les β -lactamases descrites fins aleshores. El primer derivat que es va emprar va ser l'imipenem.

A principi de la dècada dels 80 van sorgir els monobactams, β -lactàmics obtinguts de bacteris en lloc d'actinomicetals, concretament de *Chromobacterium violaceum* (d'on s'obtingué l'aztreonam), *Gluconobacter* i *Acinetobacter*.¹⁷

A partir de cultius de *Streptomyces clavuligerus* es va obtenir, el 1977, l'àcid clavulànic, potent inhibidor de les β -lactamases estafilocòciques i de la majoria de β -lactamases de bacteris gramnegatius, però que no presenta activitat antibacteriana.¹⁸ Per qüestions d'estabilitat s'empra associat, majoritàriament, a amoxicil·lina. Altres inhibidors de β -lactamases descrits posteriorment són el sulbactam (que s'associa a ampicil·lina) i el tazobactam (que s'associa a piperacil·lina).

1.2.2 Estructura i classificació dels β -lactàmics

La família es defineix químicament per la presència en la seva estructura de l'**anell β -lactàmic**^{11,12} (Figura 5), indispensable per a l'actuació d'aquests antimicrobians. La naturalesa dels radicals essencials que s'uneixen a l'anell β -lactàmic defineix els diferents grups o classes d'antibiòtics (Taula 2):

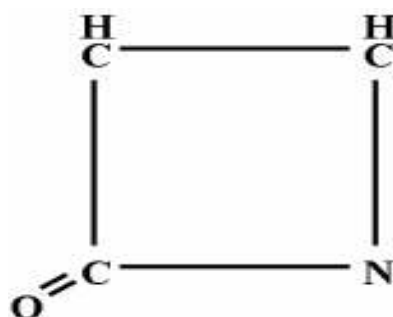


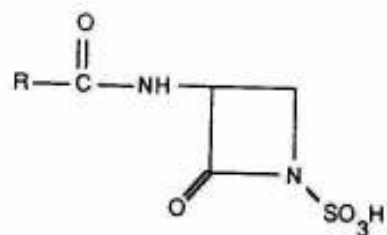
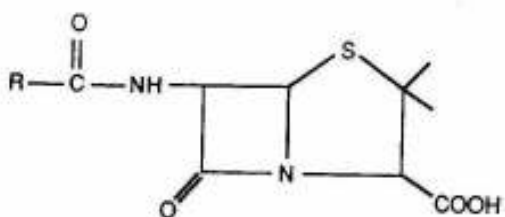
Figura 5. Anell β -lactàmic

Taula 2. Principals antibiòtics β -lactàmics (iv: intravenós, im: intramuscular, o: oral)

| Classe | Grup | β -lactàmic |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Penicil·lines | Penicil·lines naturals | Penicil·lina G ^{im,iv} , Penicil·lina V ^o |
| | Aminopenicil·lines | Ampicil·lina ^{iv, o} , Amoxicil·lina ^o |
| | Ureidopenicil·lines | Azlocil·lina ^{im,iv} , Mezlocil·lina ^{im,iv} , Piperacil·lina ^{iv} |
| | Carboxipenicil·lines | Carbenicil·lina ^{im,iv} , Ticarcil·lina ^{im,iv} |
| | Penicil·lines resistents a penicil·linases | Meticil·lina ^{im,iv} , Oxacil·lina ^{iv,o} , Cloxacil·lina ^o , Dicloxacil·lina ^o |
| Inhibidors de β -lactamases | Àcid clavulànic | Ticarcil·lina–àc. clavulànic ^{iv} , Amoxicil·lina–àc. clavulànic ^{iv,o} |
| | Sulbactam | Ampicil·lina-sulbactam ^{iv,o} |
| | Tazobactam | Piperacil·lina-tazobactam ^{iv} |
| Cefalosporines | Cefalosporines 1 ^a generació | Cefazolina ^{im,iv} , Cefalotina ^{iv} , Cefradina ^{im,iv, o} , Cefalexina ^o , Cefradoxilo ^o |
| | Cefalosporines 2 ^a generació | Cefamandol ^{im,iv} , Cefuroxima ^{im,iv} , Cefaclor ^o , Cefuroxima axetil ^o |
| | Cefalosporines 3 ^a generació | Cefoperazona ^{im^{iv}} , Cefotaxima ^{im,iv} , Ceftazidima ^{im,iv} , Ceftriaxona ^{im,iv} , Cefibuteno ^o , Cefixima ^o , Cefpodoxima ^o , Cefdinir ^o |
| | Cefalosporines 4 ^a generació | Cefepime ^{im,iv} , Cefpiroma ^{im,iv} |
| | Cefamicines | Cefoxitina ^{im,iv} , Cefmetazole, Cefotetan ^{im,iv} , |
| | Oxacefems | Moxalactam ^{im,iv} |
| | Carbacefems | Loracarbef ^o |
| Monobactams | Aztreonam ^{im,iv} | |
| Carbapenems | Imipenem ^{iv} , Meropenem ^{iv} , Ertapenem ^{iv} | |

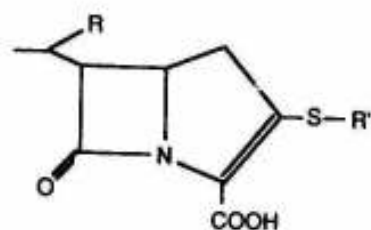
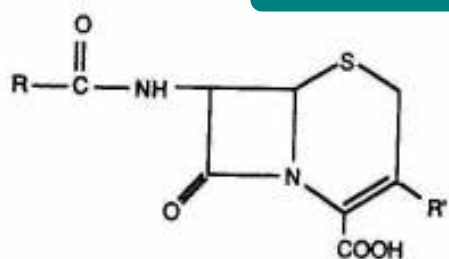
1.2.2.1 Penicil·lines: antibiòtics naturals i semisintètics, bicíclics que contenen un anell β -lactàmic i un anell de tiazolidina formant l'àcid 6-aminopenicil·lànic (6-APA: condensació d'una molècula de cisteïna amb una de valina). A més presenten una cadena lateral en posició 6 de l'anell β -lactàmic que varia d'unes penicil·lines a les altres i que és la que defineix les seves característiques farmacocinètiques, espectre, activitat i resistència a les β -lactamases (Figura 6).

Penicil·lins



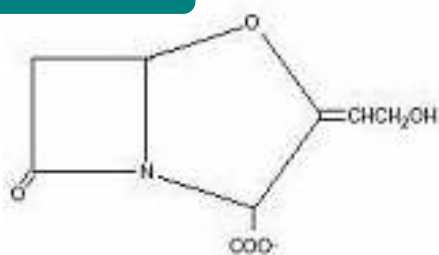
Monobactams

Cefalosporines

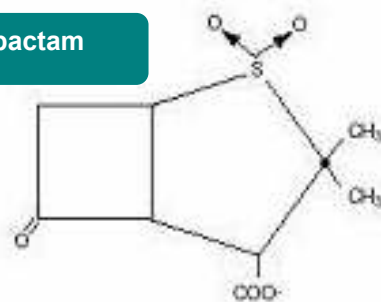


Carbapenems

Àc. clavulànic



Tazobactam



Sulbactam

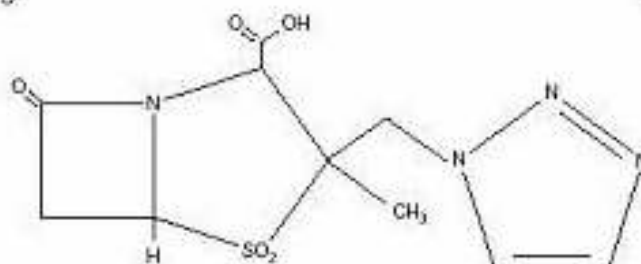


Figura 6. Estructura química dels β -lactàmics i dels inhibidors de les β -lactamases

1.2.2.2 Cefalosporines: són derivats semisintètics de la cefalosporina C. Es classifiquen en generacions atenent al desenvolupament històric i l'espectre antimicrobià.

A més, s'inclouen altres grups de compostos químicament diferents com: les cefamicines, els carbacefems i els oxacefems. L'estructura bàsica està constituïda pel nucli cefem que consisteix en la fusió d'un anell β -lactàmic i un anell dihidrotiazínic (Figura 6). Les diferències en l'espectre d'activitat i propietats farmacològiques dels membres d'aquest grup resulten de les substitucions de les cadenes laterals situades en les posicions 3 i 7. Les **cefamicines** comparteixen el mateix nucli però presenten un radical metoxi ($\text{CH}_3\text{O}-$) en posició 7. En els **carbacefems** l'àtom de sofre de l'anell dihidrotiazínic és substituït per un carboni d'un grup metilè (CH_2) i l'àtom de sulfur és substituït per un oxigen en els **oxacefems**.

1.2.2.3 Monobactams: són compostos monocíclics derivats de l'àcid-3-aminomonobactàmic (3-AMA), on el nitrogen de l'anell β -lactàmic es troba unit a un radical sulfònic que activa el nucli.

1.2.2.4 Carbapenems: es diferencien de les penicil·lines perquè presenten un àtom de carboni (CH_2) en substitució d'un àtom de sofre en posició 1.

1.2.2.5 Inhibidors de β -lactamases: emprats en clínica tenim l'àcid clavulànic, el sulbactam i el tazobactam.¹⁹ En l'àcid clavulànic l'àtom de sofre de l'anell tiazòlic és substituït per un oxigen i en el sulbactam i el tazobactam hi ha una oxidació del sofre en l'anell β -lactàmic.

1.2.3 Mecanisme d'acció dels β -lactàmics

Els antibiòtics β -lactàmics són agents bactericides que inhibeixen la síntesi del peptidoglicà, principal component estructural de la paret bacteriana, en la seva

última etapa; és per això que la seva acció bactericida succeeix només quan les cèl·lules es troben en fase de multiplicació.

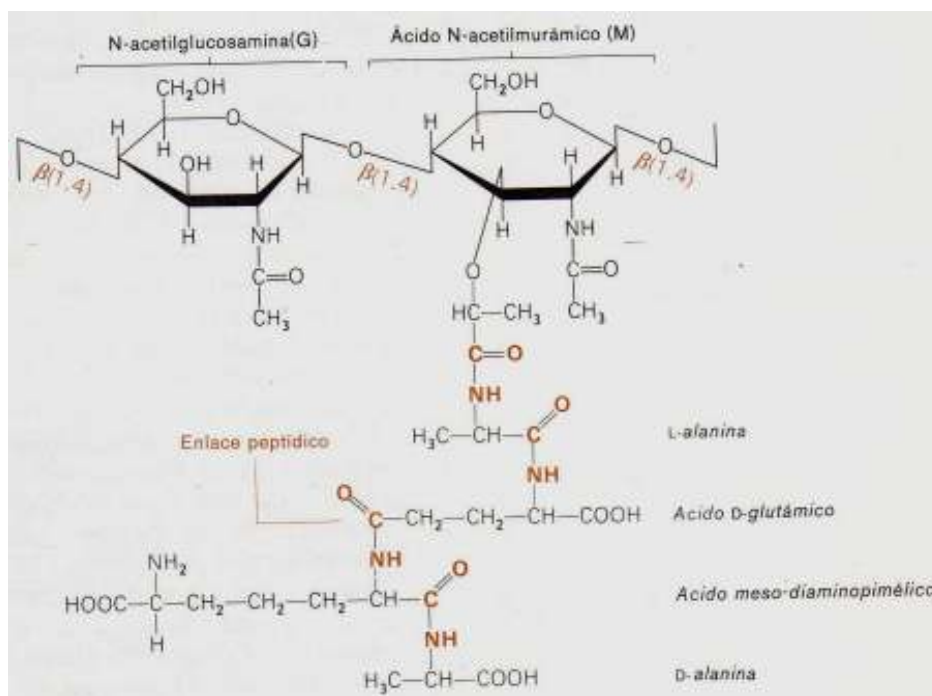


Figura 7. Composició d'una de les unitats repetitives de l'estructura glucopeptídica de la paret cel·lular. La composició que es mostra és la que es forma en *E. coli* i en la majoria dels altres bacteris gramnegatius. (Figura extreta de "Biología de los microorganismos" 2ª Ed. 1978, Thomas D. Brock, Cap.2: La célula procariota)

El peptidoglicà està constituït per cadenes llargues i paral·leles d'oligosacàrids que alternen residus d'àcid N-acetilglucosamina (GlcNAc) amb residus d'àcid N-acetilmuràmic (MurNAc), ambdós units per enllaços β(1-4). A cada unitat de MurNAc s'hi troba unida la cadena lateral d'un tetrapèptid constituït per L-alanina, D-alanina, àcid D-glutàmic i, o bé, lisina, o bé, àcid diaminopimèlic (DAP). Les cadenes paral·leles d'oligosacàrids es troben unides transversalment per cadenes polipeptídiques curtes diferents segons l'espècie.²⁰ En els bacteris gramnegatius la connexió transversal es produeix per un enllaç directe del grup amino (-NH₂) del DAP amb el grup carboxil (C=O) de la D-alanina terminal; mentre que en grampositius l'entrecreuament es produeix per un pont peptídic i la classe i el número d'aminoàcids que s'enllacen varia d'un microorganisme a un altre²¹ (Figura 7).

La síntesi del peptidoglicà es podria dividir en tres fases. En la primera es produeix la síntesi dels precursors de la paret en el citoplasma. En la segona, els precursors del peptidoglicà, en forma de GlcNAc-MurNAc-pentapèptid-fosfolípid, surten cap a l'exterior de la membrana citoplasmàtica mitjançant la intervenció d'un fosfolípid transportador. I en la tercera fase, que té lloc en la paret, es produeix l'ensamblatge i creixement del peptidoglicà. En aquesta darrera fase es produeix la polimerització de diverses unitats disacàrides mitjançant una reacció de **transglucosidació** en la que, mitjançant transglucosidases, s'uneix el GlcNAc-MurNAc-pentapèptid al peptidoglicà existent mitjançant enllaços $\beta(1-4)$; el polímer que es forma és una cadena lineal de peptidoglicà sense entrecreuar. Aquest polímer naixent (amb el pentapèptid) reacciona, per **transpeptidació** (Figura 8), amb un peptidoglicà acceptor. Aquesta reacció suposa la formació d'un enllaç peptídic entre el grup amino del diamino (3) del peptidoglicà acceptor i el grup carboxil de la D-alanina subterminal (4) del peptidoglicà naixent, alliberant-se la D-alanina terminal. No totes les cadenes de glucà tenen enllaços peptídics transversals. Les D-alanina dels pèptids no implicats en els esmentats entrecreuaments són eliminats per un enzim anomenat D-D- carboxipeptidasa.

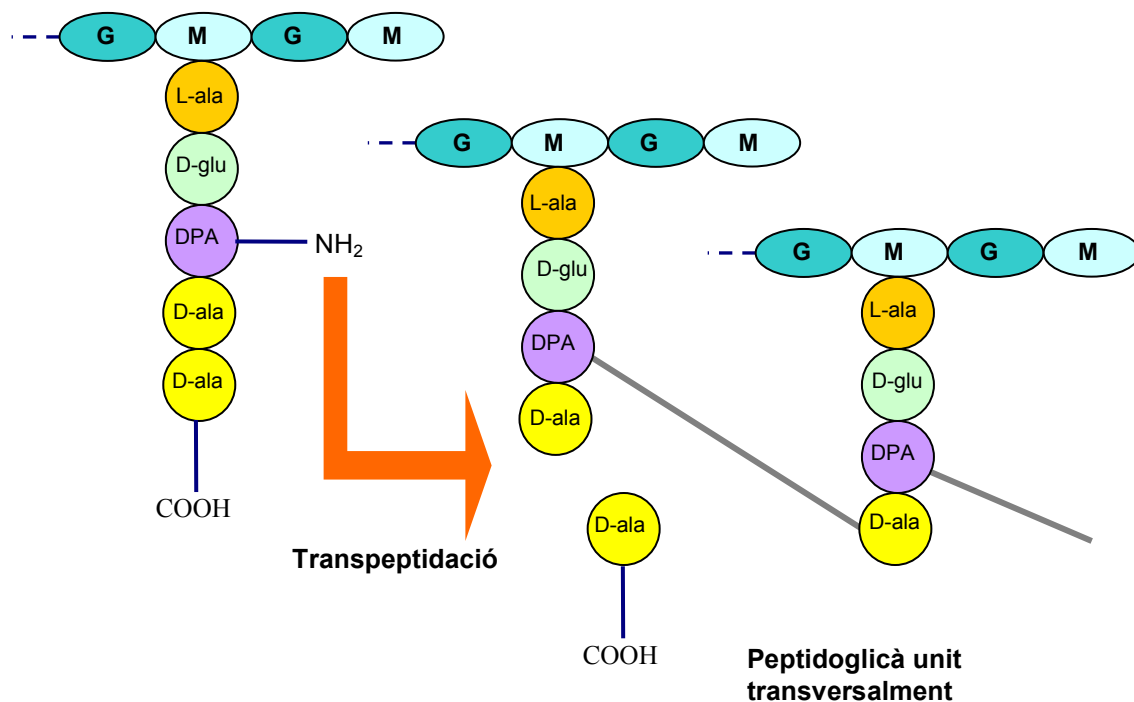


Figura 8. Reacció de transpeptidació en la formació del peptidoglicà

Alguns d'aquests enzims que catalitzen les reaccions d'unió entre els diferents polímers que constitueixen el peptidoglicà són anomenats genèricament **PBP** (*Penicillin-Binding Proteins*) per la capacitat d'unir-se covalentment a l'anell β -lactàmic.²⁰ Les PBP són presents en quasi tots els bacteris però hi ha diferències entre espècies en nombre, mida, quantitat i afinitat pels β -lactàmics. *Enterobacter*, *Klebsiella* i *Salmonella* presenten un perfil de proteïnes fixadores similars als d'*E. coli* mentre que els de *Serratia* i *Proteus*, encara que mantenen certa correlació amb els d'*E. coli*, són diferents.²²

La unió entre PBP i β -lactàmics es realitza perquè els anells dels antibiòtics β -lactàmics presenten una estructura similar a la dels dos últims aminoàcids del pentapèptid, D-alanina-D-alanina, (Figura 9) la qual cosa permet que els β -lactàmics s'uneixin covalentment al lloc actiu de l'enzim, establint-se una competència que interfereix el procés normal de transpeptidació o carboxipeptidació (la transglucosidació no es veu afectada pels β -lactàmics) (Figura 10)^{12, 13} provocant la inhibició de la síntesis del peptidoglicà i, per tant, del creixement bacterià.

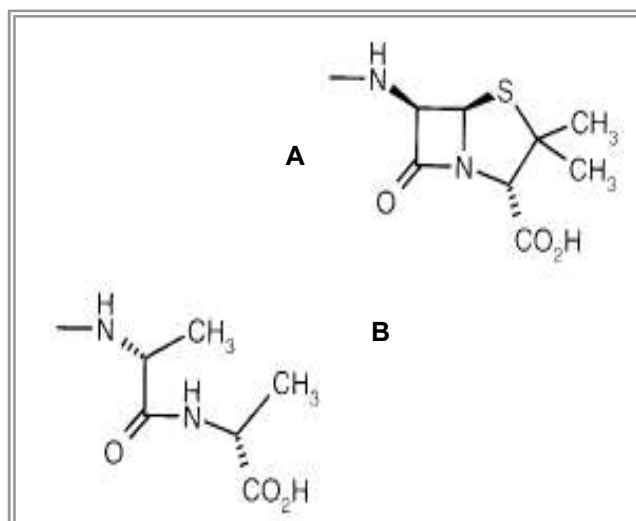


Figura 9. Semblança estructural entre la molècula base de les penicil·lines (A) i la D-alanina-D-alanina (B)

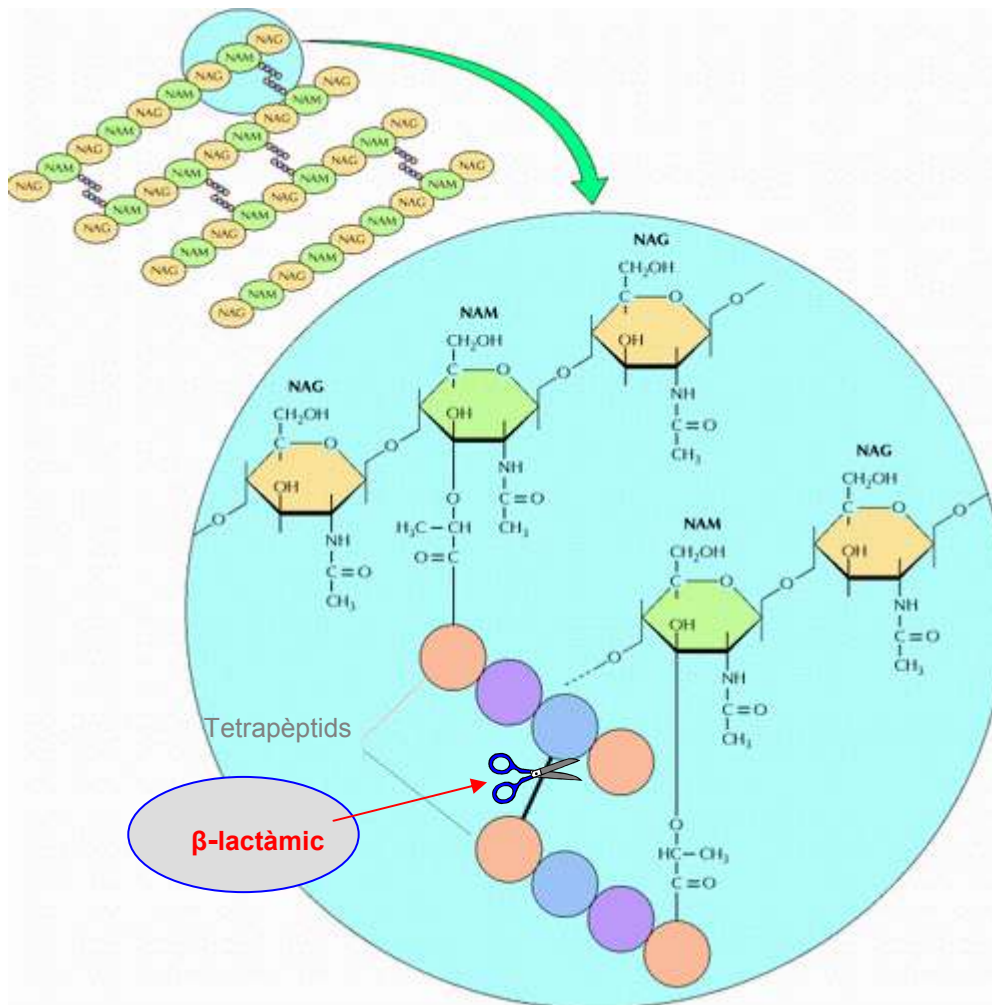


Figura 10. Actuació dels β -lactàmics (www.biologia.ar/bacterias/micro4.htm)

Això es correspon amb l'efecte bacteriostàtic de l'antibiòtic. Per l'acumulació de precursors del peptidoglicà durant la inhibició de determinats estadis del seu cicle de síntesi i ensamblatge, es produeix l'activació de les autolisines de la cèl·lula (amidases i glucosidases), per la pèrdua dels àcids lipoteicoics (potents inhibidors del sistema autolític) que degraden el peptidoglicà provocant, finalment, la lisi cel·lular per entrada massiva d'aigua a la cèl·lula²³ (Figura 11).

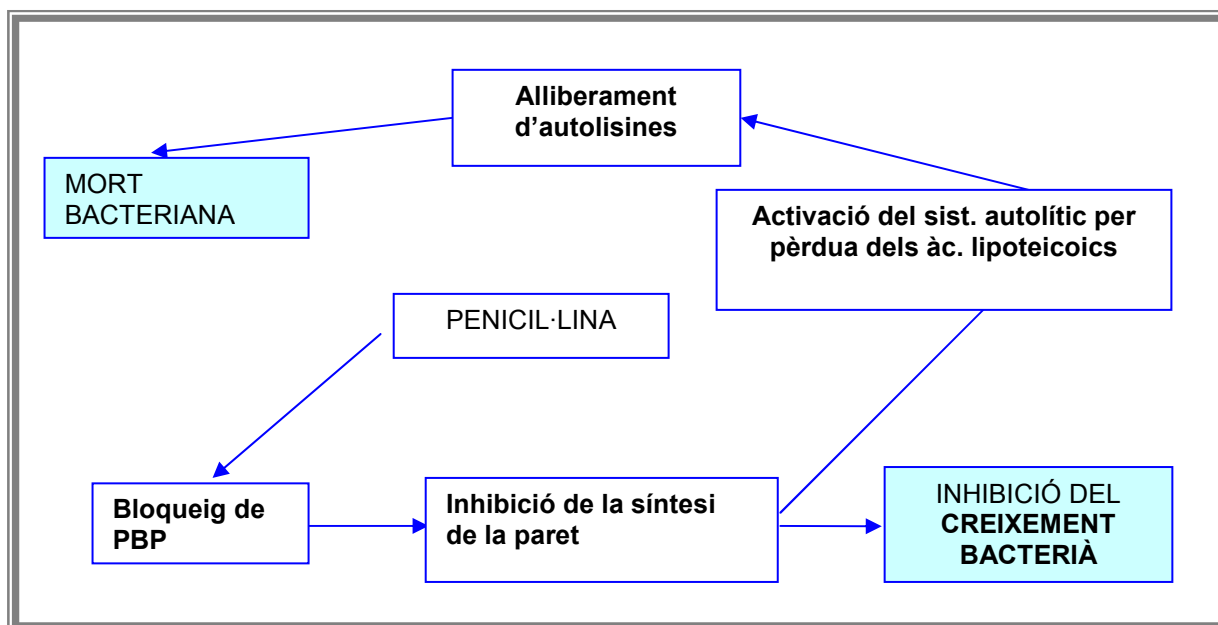


Figura 11. Cicle inhibitori i lític de les penicil·lines sobre els bacteris

1.2.4 Espectre d'activitat

L'espectre dels β -lactàmics inclou bacteris gramnegatius, grampositius i espiroquetes. No són actius en front els bacteris intracel·lulars com *Chlamydia* o *Rickettsia*, els micoplasmes (per no tenir paret cel·lular) o els micobacteris.^{12, 18}

Les **penicil·lines naturals** (Bencilpenicil·lina o Penicil·lina G). Són molt actives enfront a estreptococs β -hemolítics (*Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*), pneumococ, encara que a l'actualitat existeix un elevat percentatge de soques resistents, meningococ, soques de gonococ no productores de β -lactamasa i el bacil diftèric. Tenen activitat en front cocs grampositius i negatius i bacils grampositius, tant facultatius com anaerobis, així com en front espiroquetes i alguns bacils anaerobis (*Clostridium*, *Prevotella*, *Fusobacterium*). No són actives en front els enterococs, els enterobacteris i *Pseudomonas*.

Les **aminopenicil·lines** són actives enfront la majoria dels bacteris sensibles a penicil·lina i incrementen l'espectre a alguns bacils gramnegatius com *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* i *Shigella*. Són més actives que les penicil·lines en front els enterococs, *Listeria monocytogenes* i *Haemophilus*. Les **carboxipenicil·lines** i **ureidopenicil·lines** es caracteritzen per la seva activitat davant *Pseudomonas aeruginosa* i alguns enterobacteris resistents a aminopenicil·lines. Les **penicil·lines semisintètiques resistents a penicil·linases** són actives en front els estafilococs, constituint els antimicrobians d'elecció en el tractament d'infeccions produïdes per estafilococs sensibles productors de penicil·linasa.

Els **inhibidors de β -lactamases** presenten escassa activitat antibacteriana intrínseca i s'utilitzen en combinació amb penicil·lines (amoxicil·lina-àcid clavulànic, ampil·lina-sulbactam, ticarcil·lina-àcid clavulànic i piperacil·lina-tazobactam) per a restaurar l'activitat inicial del β -lactàmic en organismes que s'han fet resistents per producció de β -lactamases.

Les **cefalosporines de primera generació** presenten molt bona activitat en front cocs grampositius, incloent-hi els estafilococs productors de β -lactamases, essent les cefalosporines que presenten major activitat antiestafilocòcica, enfront estreptococs i diversos bacils gramnegatius com *E.coli*, *Klebsiella* i *Proteus*. Les successives generacions, en general, han anat perdent part d'aquesta activitat en benefici d'una major activitat en front els bacils gramnegatius.

Les **cefalosporines de segona generació** constitueixen un grup heterogeni. Els components d'aquest grup mostren espectres d'activitat variable. Presenten una millora de la seva activitat en front els bacils gramnegatius com *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* i alguns enterobacteris; per contra, en general, l'activitat sobre cocs grampositius és menor que las de primera generació. Les **cefamicines**, íntimament relacionades amb les cefalosporines, són actives en front d'alguns enterobacteris per ser més estables a la hidròlisi per β -lactamases i mostren una gran activitat en front alguns bacteris anaerobis.

Les **cefalosporines de tercera generació**, com la cefotaxima i la ceftriaxona, són molt actives en front dels estreptococs incloent-hi el pneumococ, neissèries i hemòfils, també presenten excel·lent activitat en front enterobacteris i algunes, com ara la ceftazidima i la cefoperazona, enfront de *P. aeruginosa* i d'altres bacils gramnegatius aerobis per la seva estabilitat davant les β -lactamases i la capacitat per travessar l'embolcall.

Les **cefalosporines de quarta generació** mostren activitat davant els enterobacteris i *P. aeruginosa*. També són actives contra els estreptococs i estafilococs, però en aquests darrers l'activitat és inferior a la de les cefalosporines de primera generació.

Totes les cefalosporines són inactives davant els enterococs, *L. monocytogenes* i estafilococs resistents a la meticil·lina.

L'espectre de l'aztreonam, únic **monobactam** amb ús clínic, es limita a bacteris gramnegatius aerobis incloent els enterobacteris.

Finalment, els **carbapenems** són els β -lactàmics de més ampli espectre d'activitat. Són actius en front enterobacteris productors i no productors de β -lactamases, *P. aeruginosa* i altres bacils gramnegatius aerobis com *Acinetobacter*, hemòfils productors i no productors de β -lactamasa, estafilococs, estreptococs, pneumococs, enterococs i bacteris anaerobis. No presenten activitat en front estafilococs resistents a meticil·lina, *Enterococcus faecium*, *Stenotrophomonas maltophilia* i són poc actius en front *Clostridium difficile*.

1.2.5 Farmacocinètica

Les propietats farmacocinètiques dels β -lactàmics, que varia segons els compostos, es resumeixen a la Taula 3. Les substàncies naturals s'absorbeixen molt

poc o gens per via digestiva mentre que l'absorció dels derivats sintètics o semisintètics millora ostensiblement. Amb l'administració intravenosa, els β -lactàmics, aconseguixen ràpidament concentracions plasmàtiques elevades.^{12, 18}

Presenten una bona distribució corporal, amb valors sèrics i tisulars adequats, incloent bilis i líquid sinovial. La penetració als ulls, cervell, líquid cefalorraquidi (LCR) i pròstata és pobre en absència d'inflamació; quan existeix inflamació del LCR la penetració a través de la barrera hematoencefàlica augmenta fins el 10-30%, essent especialment elevada per a la cloxacil·lina i les cefalosporines de tercera i quarta generació. La penetració intracel·lular és escassa per tractar-se de substàncies poc lipofíliques.

La majoria de β -lactàmics no pateixen processos metabòlics, mantenint-se en forma activa fins a la seva eliminació per via renal. En alguns preparats, com cefoperazona i ceftriaxona, predomina l'excreció biliar.

Els β -lactàmics són antibiòtics d'activitat bactericida lenta, relativament independent de la concentració plasmàtica assolida, sempre i quan aquesta concentració, excedeixi la concentració inhibidòria mínima (CIM) del microorganisme. L'activitat bactericida i probablement l'eficàcia clínica es relacionen millor amb el temps durant el qual aquesta concentració excedeix la CIM ($T > CIM$).

Pel que fa a l'efecte postantibiòtic (EPA) dels β -lactàmics, és a dir l'acció residual de l'antibiòtic sobre el bacteri després de disminuir les concentracions terapèutiques en la sang i els teixits per sota de la CIM, és de curta durada, amb l'excepció dels carbapenems, que presenten un EPA apreciable tant sobre bacteris grampositius com sobre gramnegatius.

Taula 3. Propietats farmacocinètiques dels β -lactàmics

| Antibiòtic | Dosi | Semivida (h) | Unió a proteïnes (%) | Excreció urinària (%) | Excreció biliar |
|--------------------------------------------|-----------|--------------|----------------------|-----------------------|-----------------|
| Penicil·lines naturals | | | | | |
| Bencilpenicil·lina | 2 mU | 0,5 | 50-60 | 70 | Sí |
| Penicil·lina procaina | 300.000 U | | | | |
| Penicil·lina benzatina | 1,2 mU | | | | |
| Penicil·lines isoxazòliques | | | | | |
| Cloxacil·lina oral | 500 mg | 0,5 | 95 | 80 | Sí |
| Aminopenicil·lines | | | | | |
| Ampicil·lina IV | 1 g | 1-1,3 | 20 | 70 | Sí |
| Amoxicil·lina oral | 1 g | 1-1,3 | 20 | 70 | Sí |
| Cefalosporines de primera generació | | | | | |
| Cefazolina | 1 g | 1,8 | 80 | 95 | Sí |
| Cefalosporines de segona generació | | | | | |
| Cefuroxima oral | 0,5 g | 1,4 | 40 | 90 | Sí |
| Cefoxitina | 1 g | 0,8 | 70-85 | Sí | |
| Cefonicid | 2 g | 4,5 | 98 | 95 | Sí |
| Cefalosporines de tercera generació | | | | | |
| Cefotaxima | 1 g | 1 | 40 | 80 | Sí |
| Ceftazidima | 1 g | 1,8 | 20 | 85 | Sí |
| Ceftriaxona | 1 g | 1 | 90 | 50 | Sí (notable) |
| Cefalosporines de quarta generació | | | | | |
| Cefepime | 2 g | 2 | <20 | 85 | No |
| Carbapenems | | | | | |
| Imipenem | 1 g | 1 | 10 | 75 | Sí |
| Meropenem | 1 g | 1 | <20 | 70 | Sí |
| Monobactams | | | | | |
| Aztreonam | 1 g | 1,7 | 60 | 70 | Sí |

1.3 Resistència antimicrobiana

L'ús dels antibiòtics per al tractament de les malalties infeccioses ha estat lligat, inevitablement, a l'aparició de fenotips de resistència als antimicrobians.^{24, 25}

La resistència als antimicrobians pot ser **intrínseca** (o natural): resistència que de forma natural presenta un determinat microorganisme a un antimicrobià (p. ex., resistència a glicopèptids en enterobacteris, resistència a aminoglicòsids en bacteris anaerobis). Aquests mecanismes depenen de funcions codificades en el cromosoma bacterià.

La resistència és **adquirida** quan en una espècie que és naturalment sensible a un antimicrobià apareixen soques resistents al mateix antimicrobià.

1.3.1 Resistència adquirida

L'adquisició de resistència²⁵⁻²⁹ és el resultat de processos bioquímics que venen codificats per gens bacterians i que pot ser originada per:

- **Mutació dels gens bacterians**: el propi microorganisme origina errors en la seva replicació; en aquest cas la difusió d'aquesta resistència en el món bacterià serà vertical (transmissió de cèl·lula mare a cèl·lula filla).
- **Adquisició de gens de resistència**: la resistència pot ésser difosa d'una cèl·lula a una altra (de la mateixa espècie o no), contribuint a la difusió horitzontal de la resistència als antimicrobians. Els mecanismes bacterians per a l'adquisició de material genètic són (Figura 12):
 - a. **Transformació** (Griffith, 1928): és l'absorció per part de la cèl·lula de DNA lliure en el medi, principalment de doble cadena que un cop dins serà monocatenari, i podrà ser incorporat en el cromosoma bacterià.

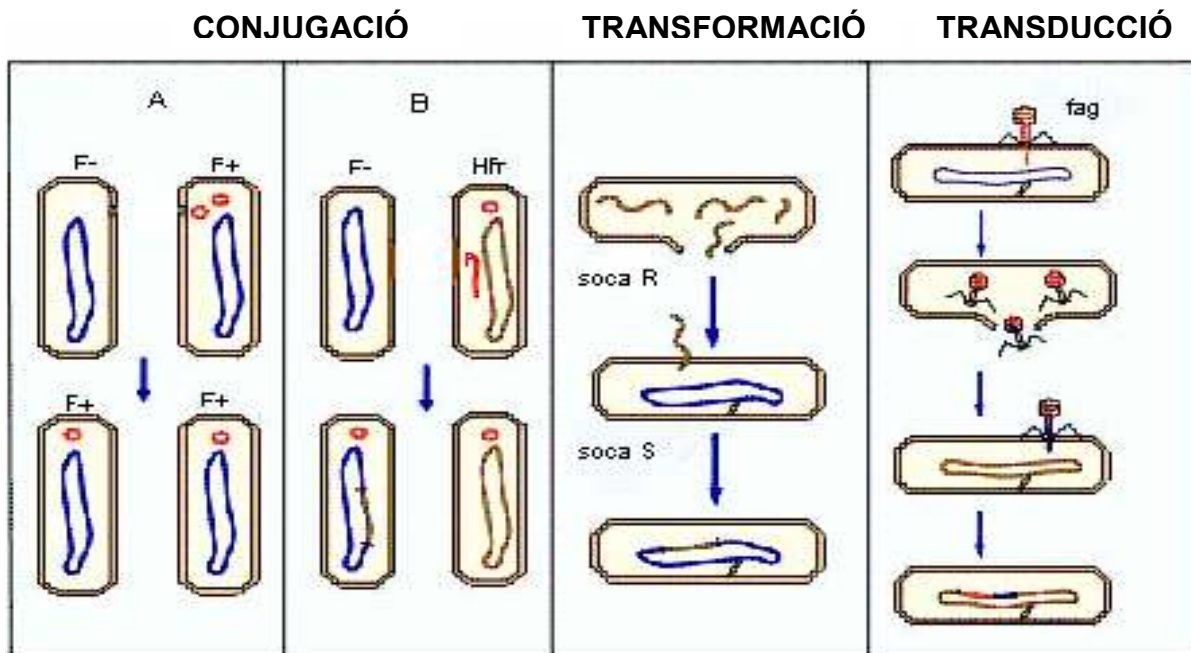


Figura 12. Mecanismes de transferència genètica. **A:** conjugació d'un bacteri F^+ (donador) amb un F^- (receptor), el plasmidi passa al receptor prèvia replicació; **B:** el factor F integrat en el cromosoma es replica passivament amb el cromosoma bacterià, quan s'inicia la conjugació l'aparell de replicació del factor F s'activa d'alguna manera i una de les cadenes de DNA del F (extrem 5') es veu arrossegada. La cadena transferida està ara unida covalentment al cromosoma bacterià i, per tant, una cadena d'aquest cromosoma és "aspirada" cap a la sòca F^- . Generalment, el cromosoma que entra en la sòca receptora es trenca en un punt intermig durant la transferència, de manera que part del DNA de la cèl·lula donadora queda inclòs en el cromosoma de la cèl·lula receptora. Quan els cromosomes de les cèl·lules donadora i receptora porten marcadors genètics diferents, freqüentment les cèl·lules resultants són recombinants. És per aquesta raó que les cèl·lules capaces de donar material cromosòmic a cèl·lules receptores se les ha anomenat Hfr (alta freqüència de recombinació).

(http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2BCH/B5_MICRO_INM/T51_MICROBIOLOGIA/INDICE.htm).

- b. Transducció:** el DNA és transferit per partícules víriques, els bacteriòfags.
- c. Conjugació:** potser el mecanisme més emprat per a l'intercanvi genètic en bacils gramnegatius; és el procés de transferència de gens entre dues cèl·lules que estan en contacte. Aquest tipus de transferència de gens és possible gràcies a un tipus especial de plasmidi, el **factor sexual** anomenat **F**.³⁰ Els plasmidis són molècules circulars de DNA de doble cadena superenrotllades negativament. No codifiquen funcions essencials per a la cèl·lula i la seva mida és força variable. Les soques receptores s'anomenen convencionalment F^- i les soques donadores s'anomenen F^+ i **Hfr** (*High*

frecuency conjugation) si el factor F està integrat en el cromosoma (Figura 12).

A més d'aquests tres mecanismes de difusió horitzontal de la resistència existeixen elements mòbils o transposables els quals es caracteritzen per ser seqüències de DNA amb capacitat pròpia per a moure's d'una regió a una altra dins del genoma sense necessitat d'homologia amb la seqüència receptora. Requereixen d'una proteïna específica per a la transposició: la **transposasa** (TnpA: enzim que reconeix específicament els extrems dels elements transposables promovent la seva mobilització cap a una altra diana). D'entre aquests elements cal destacar:^{26, 27}

- **Seqüències d'inserció** (IS): són els elements transposables més petits (entre 760 i 2500 pb) i es caracteritzen per tenir un gen que codifica per a una transposasa flanquejat per seqüències repetides i invertides (IR). S'han descrit en eubacteris i arqueobacteris. També són freqüents en els genomes dels bacteriòfags i plasmidis (Figura 13).



Figura 13. Seqüències d'inserció

- **Transposons** (Tn): fragments de DNA mòbils que, a diferència de les IS, porten gens addicionals (freqüentment loci de resistència als antibiòtics), a més dels necessaris per a la seva mobilització. Els transposons depenen de la replicació del seu hoste, ja que ells són incapaços de replicar-se autònomament. S'han descrit els **transposons compostos** o **de classe 1** (Figura 14) formats per dues IS iguals o molt similars flanquejant un fragment de DNA. Per a que es dugui a terme la transposició només cal que una de les IS codifiqui per a una transposasa activa (TnpA). En els **transposons no**

compostos o **de classe 2** no hi ha IS en els extrems sinó que directament trobem les repeticions invertides. I, un tipus de transposons que, a diferència dels descrits anteriorment, posseeixen no sols la capacitat de mobilitzar-se, sinó que també són capaços de conjuguar: són els **transposons conjugatius**. Es troben més freqüentment en bacteris grampositius (estreptococs i enterococs). La majoria dels transposons conjugatius descrits porten gens de resistència a la tetraciclina, la kanamicina, el cloramfenicol o l'eritromicina.²⁶

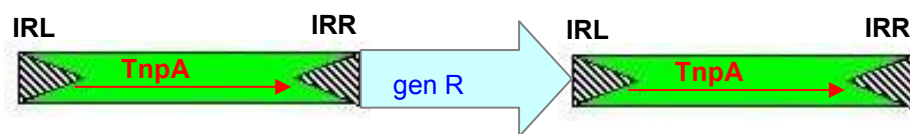


Figura 14. Esquema d'un transposó compost

- **Illes genòmiques:** *pool* flexible de gens que es caracteritzen per codificar funcions no essencials per a la cèl·lula però que li confereixen avantatges enfront condicions particulars. Les illes genòmiques transporten *clusters* de gens amb funcions específiques que són incorporats al nou DNA en bloc. Se n'han trobat en el cromosoma bacterià i també en plasmidis.²⁷

Cal mencionar unes altres estructures, sense capacitat de transposició “*per se*”, i que juguen un paper molt important en la captació i mobilització gènica: els **integrons** (In).²⁷ Els integrons s'han disseminat entre moltes espècies de microorganismes. Estan formats per tres elements necessaris per a la captura i expressió de gens exògens: un gen que codifica una integrasa (*intI*), un punt de recombinació específic (*attI*) en el que s'insereixen els **gens caset** i un promotor (P_{ant}) per a l'expressió dels gens caset adjacents (Figura 15). Els gens caset consisteixen en gens únics sense promotor i amb un punt de recombinació (*attC*), circulars, no replicatius i, freqüentment, de resistència. L'integró pot integrar el gen caset mitjançant la recombinació entre els llocs específic *attI* i *attC* (Figura 15).

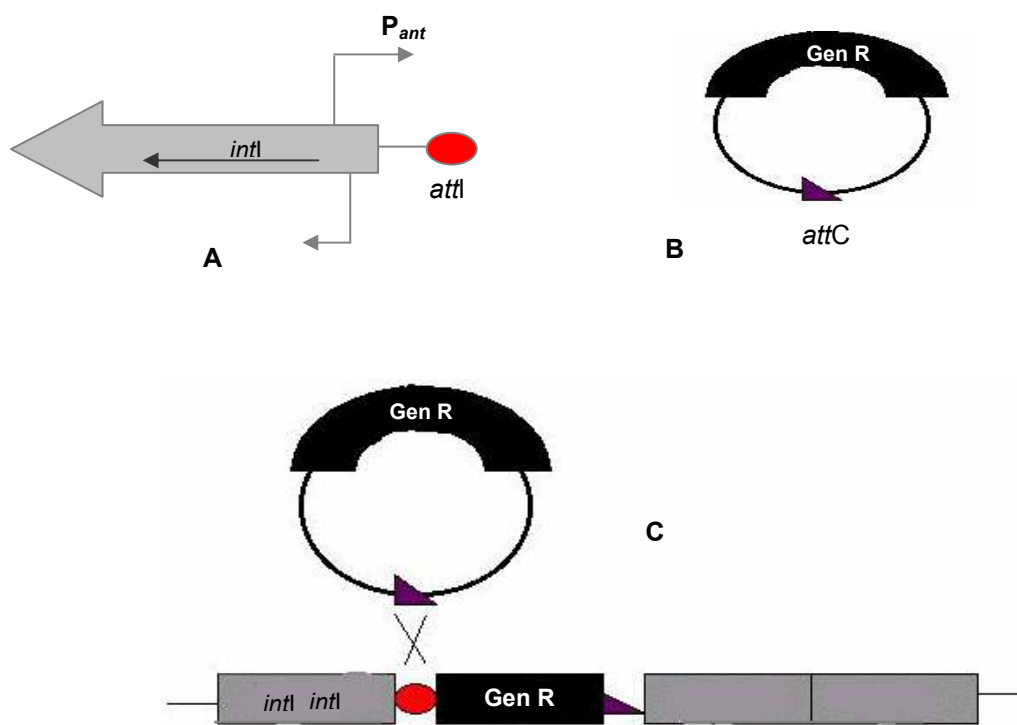


Figura 15. Integració de gens en una regio variable. **A:** Integró, **B:** Gen casset, **C:** Integració del gen casset a l'integró

Així, doncs, existeixen elements genètics amb capacitat d'incorporar gens de resistència, els integrons, els quals poden estar formant part d'altres elements mòbils com els transposons, que facilitaran el seu moviment d'una part del genoma a una altra o a un plasmidi (Figura 16).

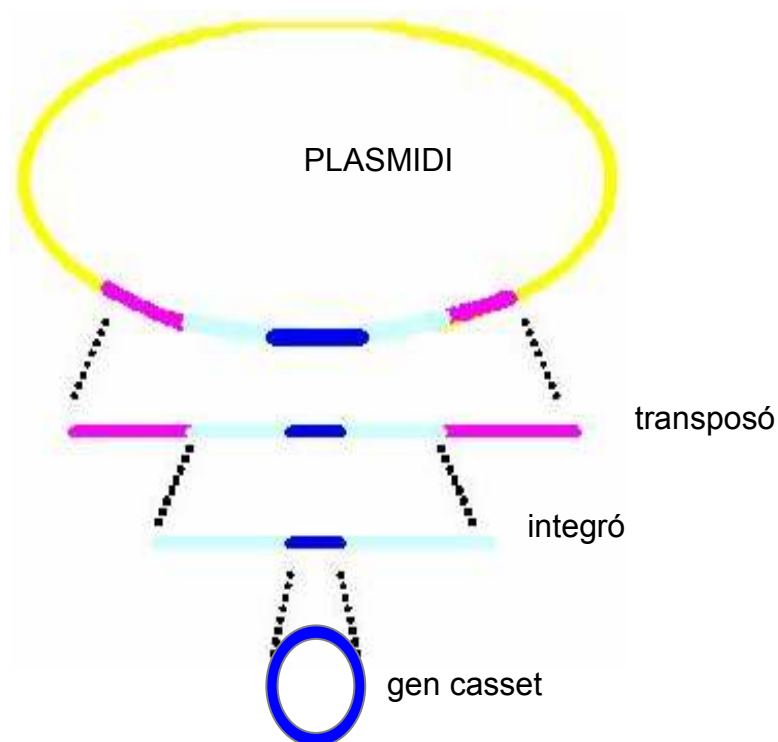


Figura 16. Elements mòbils

1.4 Mecanismes de resistència als β -lactàmics

Com en d'altres famílies d'antimicrobians,^{12,24,25,28,31} són diversos els mecanismes de resistència que han desenvolupat els bacteris per fer front als β -lactàmics. Aquests mecanismes poden presentar-se sols, però cada vegada més pren més força la hipòtesi que són diversos els mecanismes implicats en una mateixa resistència. Aquests mecanismes poden ser (Figura 17):

- **Alteracions de la permeabilitat:** els β -lactàmics són majoritàriament molècules hidrofíliques que necessiten un canal protèic (porina) per a travessar la membrana externa. Han estat moltes les descripcions d'alteracions en la permeabilitat cel·lular en enterobacteris.^{32,33}
- **Sistemes d'expulsió activa:**³⁴ consistent en bombes, depenents d'energia, que bombegen l'antimicrobià cap a l'exterior i que poden ser específiques de substrat i, per tant, confereixen resistència a un únic antimicrobià (p. ex.: les bombes que expulsen tetraciclina, que pertanyen a la família MFS, *Major Facilitor Superfamily*). Normalment aquestes es troben codificades per gens que viatgen en transposons integrats en plasmidis conjugatius.³⁵ També s'han descrit bombes inespecífiques de substrat (MDR, *Multi-Drug Resistance*) que poden conferir resistència a diferents components antibacterians no relacionats estructuralment. Normalment es troben codificades per gens que formen part del cromosoma bacterià.³⁵ Aquests sistemes, que confereixen resistència de baix nivell, es troben tant en bacteris grampositius com en gramnegatius. Han estat ben estudiats en *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* i, encara que confereixen principalment resistència a quinolones, també afecten la sensibilitat d'altres famílies d'antimicrobians com els β -lactàmics.^{36,37}
- **Producció d'enzims:** anomenats **β -lactamases**. Constitueix el principal mecanisme de resistència als β -lactàmics (veure apartat 1.4.1).

- **Alteracions gèniques en les PBP:** de manera que disminueix l'afinitat de la diana per l'antibiòtic. Aquest mecanisme de resistència és més freqüent en bacteris grampositius com *S. aureus* resistent a meticil·lina,³⁸ *Streptococcus pneumoniae*,³⁹ o *Enterococcus*,⁴⁰ però també s'han descrit puntualment en gramnegatius com *H. Influenzae*,⁴¹ neissèries⁴² o *P. mirabilis*.⁴³

Els tres primers mecanismes tenen major rellevància en els bacteris gramnegatius, essent la resistència enzimàtica el principal mecanisme en aquests microorganismes; la modificació de les PBP, és important en grampositius i, amb l'excepció del gènere *Staphylococcus*, són rares les espècies bacterianes grampositives que produeixen β -lactamases.

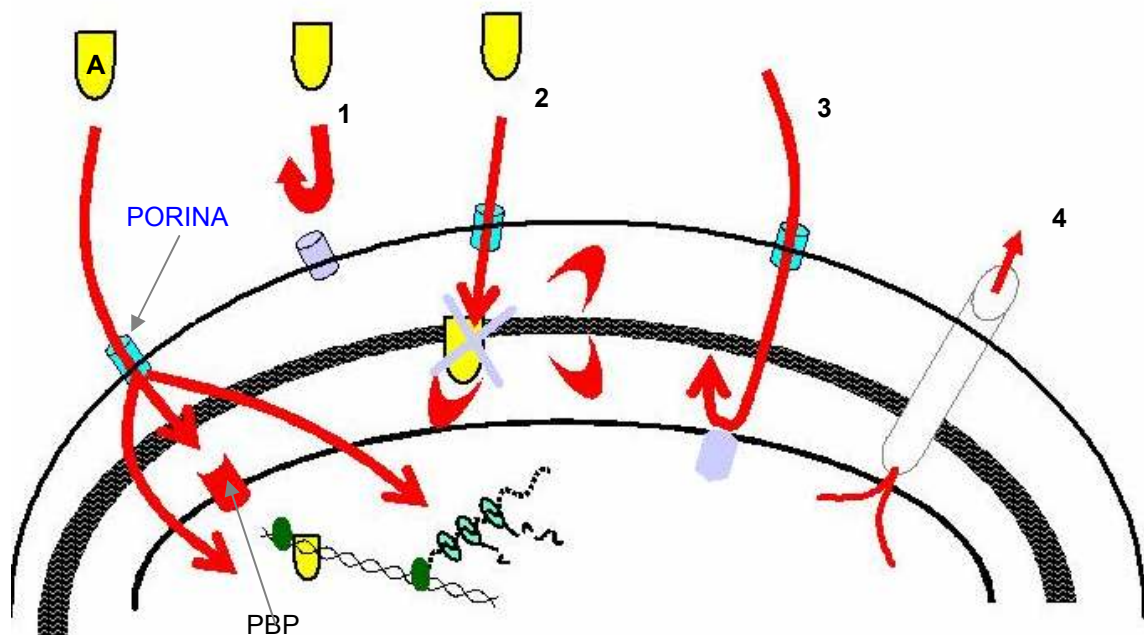


Figura 17. Mecanismes de resistència als antibiòtics β -lactàmics. El mecanisme d'acció dels β -lactàmics segueix el procés indicat a **A**, l'antibiòtic travessa la membrana externa a través d'una porina i passa a l'espai periplasmàtic fins que troba la diana (PBP) a la membrana interna. Els punts del 1 a 4, indiquen els mecanismes de resistència als β -lactàmics: **1**, disminució de la permeabilitat; **2**, producció de β -lactamases; **3**, modificació de la PBP i **4**, sistemes d'expulsió activa.

1.4.1 β -lactamases

En els enterobacteris, el mecanisme de resistència bacteriana als de β -lactàmics majoritari és la producció de β -lactamases^{26,44} encara que s'hi poden trobar associats altres mecanismes com ara la permeabilitat o el bombeig. Actualment s'han descrit més de 340 enzims (www.lahey.org/studies/). Les β -lactamases possiblement deriven de diferents PBP, amb les quals guarden homologia seqüencial i estructural. Podria ser que la funció original d'aquests enzims fos la de participar en la biosíntesi de la paret o que haguessin evolucionat per a defensar el bacteri dels microorganismes que produeixen antibiòtics β -lactàmics de forma natural.

Els gens que les codifiquen poden trobar-se en el cromosoma, plasmidis o transposons i poden produir-se de manera constitutiva o induïble. En els microorganismes gramnegatius són excretades a l'espai periplasmàtic mentre que en els grampositius són excretades al medi extern. S'han descrit, encara que en no gaire casos, enzims associats a la membrana (*Bacillus licheniformis*, *B. cereus*, *Bacteroides vulgatus*, *M. catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis* i *S. aureus*).⁴⁴

1.4.1.1 Mecanisme d'acció de les β -lactamases

Les β -lactamases reaccionen de manera no covalent amb l'anell β -lactàmic formant un complex acil-enzim el qual pateix una ràpida hidròlisi en presència de mol·lècules d'aigua, alliberant-se l'enzim actiu i l'antibiòtic inactiu^{44,45} (Figura 18). Existeixen dos tipus de β -lactamases:

- **β -lactamases amb residu de serina en el centre actiu**: constitueixen la majoria d'enzims i la unió acil-enzim és covalent.
- **Metal·lo- β -lactamases** (MBL): requereixen d'un catió divalent, el zinc, per a la seva activitat, essent la unió β -lactamasa- β -lactàmic no covalent.

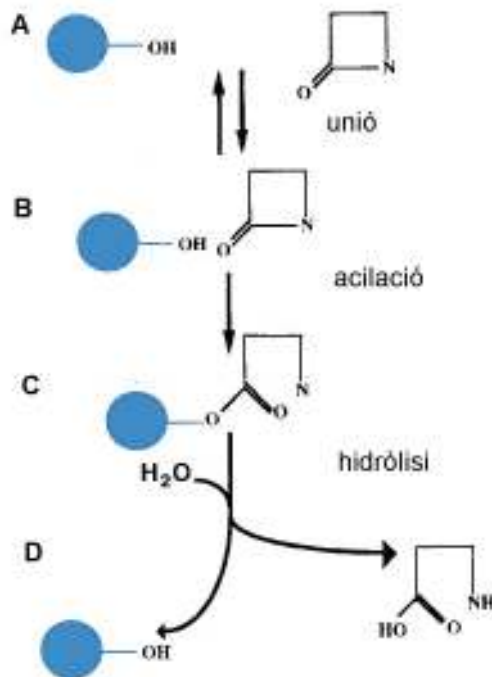


Figura 18. Mecanisme d'acció de les β -lactamases. **A**, l'enzim s'associa de forma reversible a l'antibiòtic i forma un complex no covalent. **B**, l'anell β -lactàmic és reconegut per un grup hidroxil lliure de la cadena del residu de serina del lloc actiu de l'enzim, amb la qual cosa es produeix un enllaç acil-éster. **C**, hidròlisi de l'enllaç éster, en què s'allibera l'enzim actiu i l'antibiòtic inactiu. **D**, aquest mecanisme té lloc en les β -lactamases de la classe A, C i D però no les de la classe B, les quals requereixen ions zinc per a reconèixer l'anell β -lactàmic.

1.4.1.2 Classificació de les β -lactamases

D'ençà la seva aparició, són múltiples les classificacions de β -lactamases que han sorgit. En l'actualitat se n'usen dues:⁴⁴⁻⁴⁶

- La d'**Ambller**: agrupa els enzims atenent la seva homologia protèica (similitud aminoacídica) en quatre classes: A, B, C, i D; tots són enzims amb residu actiu de serina excepte els del grup B que són metal·lo- β -lactamases.
- La de **Bush-Medeiros-Jacoby**: agrupa els enzims atenent les seves similituts funcionals (afinitat pel substract i perfil d'inhibició). Distingeix quatre grups principals i múltiples subgrups (1, 2, 2a, 2b, 3, etc.). Aquesta classificació és la que té més rellevància per al microbiòleg per al diagnòstic en el laboratori per considerar els inhibidors i els β -lactàmics amb importància clínica.

Ambdues classificacions estan correlacionades (Taula 4).

Taula 4. Classificació de les β -lactamases basada en les característiques moleculars. AC, àcid clavulànic; d, desconegut

| Classe molecular | Grup funcional | Perfil de substrats preferents | Inhibició | | Enzims representatius |
|------------------|----------------|---------------------------------------------|-----------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | AC | EDTA | |
| A | 2a | Penicil·lines | + | - | <u>Penicil·lines</u> de bacteris grampositius, que poden ser cromosòmiques o plasmídiques. |
| A | 2b | Penicil·lines i C1G | + | - | <u>Penicil·lines-cefalosporinases</u> . Plasmídiques: TEM-1, TEM-2, SHV-1, OHIO-1 i ROB-1. Cromosòmica: SHV-1 de <i>K. pneumoniae</i> . |
| A | 2be | Penicil·lines, C1G i C3G i monobactams | + | - | <u>Penicil·lines-cefalosporinases d'espectre ampliat</u> <u>Plasmídiques</u> : TEM-3 a TEM-29, TEM-42, TEM-43, TEM-46 a TEM-50, TEM-52 a TEM-58, TEM-60 a TEM-64, TEM-66 a TEM-72, TEM-75, TEM-79 a TEM-102, TEM-104 a TEM-132; SHV-2 a SHV-53 (excepte SHV-10); CTX-M-1 a CTX-M-33; TOHO-1, TOHO-2, UOE-1 i UOE-2, SFO-1, FEC-1, VEB-1, PER-1, PER-2, VEB-1, GES-1, IBC-1, IBC-2, TLA-1. <u>Cromosòmica</u> : K-1 de <i>K. oxytoca</i> , KLUA-1 i KLUA-2 de <i>Kluyvera ascorbata</i> , KLUC-1 de <i>K. cryocrescens</i> . i KLUG-1 de <i>K. georgiana</i> . |
| A | 2br | Penicil·lines | - | - | <u>Penicil·lines resistents als inhibidors</u> <u>Plasmídiques</u> : TEM-30 a TEM-41, TEM-44 a TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, TEM-76 a TEM-78, TEM-81 a TEM-84, TEM-103 i SHV-10. |
| A | 2c | Penicil·lines (carbenicil·lines) | + | - | <u>Penicil·lines-carbenicil·lines plasmídiques</u> : PSE-1 (CARB-2), PSE-3, PSE-4 (CARB-1), PSE-5 (CARB-7), CARB-3 a CARB-8. |
| A | 2e | Penicil·lines, C1G i cefuroxima | + | - | <u>Cefalosporinasa cromosòmica induïble</u> : de <i>Citrobacter koseri</i> i Sed-1 de <i>C. sedlakii</i> . |
| A | 2f | Penicil·lines, C1G, C2G, C3G i carbapenems | + | - | <u>Carbapenemases cromosòmiques</u> : NMC-A i IMI-1 d' <i>Enterobacter cloacae</i> , SME-1 a SME-3 de <i>Serratia marcescens</i> i L-2 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |
| B1 | 3a | Penicil·lines, cefalosporines i carbapenems | - | + | <u>Carbapenemases cromosòmiques</u> : BLAB-1 a BLAB-3 en <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> , IND-1 a IND-3 en <i>C. indologenes</i> , BCII en <i>Bacillus cereus</i> i CcrA en <i>Bacteroides fragilis</i> <u>Carbapenemases plasmídiques</u> : IMP-1 a IMP-17, VIM-1 a VIM-10, MET-1 i GES-2, KPC-1 i KPC-2, en <i>B. cereus</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> i <i>K. pneumoniae</i> |
| B2 | 3b | | - | + | <u>Carbapenemases cromosòmiques</u> : CphA i Cph2 en d' <i>Aeromonas hydrophila</i> , Sfh-1 en <i>Serratia fonticola</i> i ImiS en <i>Aeromonas sobria</i> |
| B3 | 3a | | - | + | <u>Carbapenemasa cromosòmica induïble</u> : L1, GOB i THIN-B de <i>S. maltophilia</i> , <i>C. meningosepticum</i> i <i>Janthinobacterium lividum</i> |
| B3 | 3c | | - | + | <u>Carbapenemasa cromosòmica</u> : FEZ-1 de <i>Legionella gormanii</i> . |
| C | 1 | Penicil·lines, C1G, C2G, C3G i monobactams | - | - | <u>Amp C</u> d'enterobacteris i <i>Pseudomonas</i> , tant cromosòmiques com plasmídiques: FOX-1 a FOX-5, MIR-1, MOX-1, MOX-2, LAT-1 a LAT-4, CMY 1 a CMY-13, BUT-1, BIL-1, ABA-1, ACT-1, ... |
| D | 2d | Penicil·lines (isoxazòliques) | +/- | - | <u>Penicil·lines-oxacil·lines plasmídiques</u> : OXA-1 a OXA-35 (OXA-10, OXA-23 a OXA-27 i OXA-40 amb activitat carbapenemàsica) |
| ? ^d | 4 | Penicil·lines | - | - | <u>Penicil·linasa cromosòmica o plasmídica</u> de <i>Burkholderia cepacia</i> |

a. β -lactamases del grup 1

Les β -lactamases del **grup 1**^{24,31,44,47}, segons la classificació de Bush-Jacoby-Medeiros es correspondrien amb la classe C d'Ambler; les trobem en bacils gramnegatius, hidrolitzen la majoria de β -lactàmics, incloses les cefamicines (cefexitina) excepte l'imipenem. No són inhibides per l'àcid clavulànic. Inclou tant les β -lactamases cromosòmiques induïbles d'*Enterobacter aerogenes* i *E. cloacae*, *C. freundii*, *Serratia*, *Morganella morganii* i *P. aeruginosa*, com la cromosòmica constitutiva d'*E. coli* (Amp C).

Darrerament han aparegut les anomenades **cefalosporinases plasmídiques** (anomenades en aquest treball cefamicinases) (Figura 19), amb un patró de resistència indistingible de les anteriors i amb la diferència que s'expressen constitutivament i no són induïbles (amb alguna excepció, la DHA).



Figura 19. Imatge d'un antibiograma d'una soca de *K. pneumoniae* que expressa una cefamicinasa plasmídica.

AMP, ampil·lina; PIP, piperacil·lina; CF, cefazolina; NAL, àc. nalidíxic; CXM, cefuroxima; CAZ, ceftazidima; FOX, cefexitina; CIP, ciprofloxacina; CTX, cefotaxima; AMC, amoxicil·lina-àc. clavulànic; FEP, cefepime; P/T, piperacil·lina-tazobactam; CT, colistina; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.

Aquests enzims plasmídics s'han classificat en sis grups:^{44,47}

- **grup 1** trobem les que provenen del gen cromosòmic *bla*_{AmpC} de *C. freundii* (BIL-1, CMY-2, LAT-1, LAT-2).
- **grup 2** estan relacionades amb la cefalosporinasa cromosòmica d' *E. cloacae* (MIR-1 i ACT-1).
- **grup 3** les derivades del gen *bla*_{AmpC} de *M. morganii* (DHA-1, DHA-2).
- **grup 4** estan relacionades amb l'AmpC d'*Hafnia alvei* (ACC-1).
- **grup 5** les derivades d'*Aeromona* FOX-1 i MOX-1, aquesta darrera no és inhibida per l'àcid clavulànic.
- **grup 6** les que estan relacionades amb l'AmpC de *P. aeruginosa* (CMY-1).

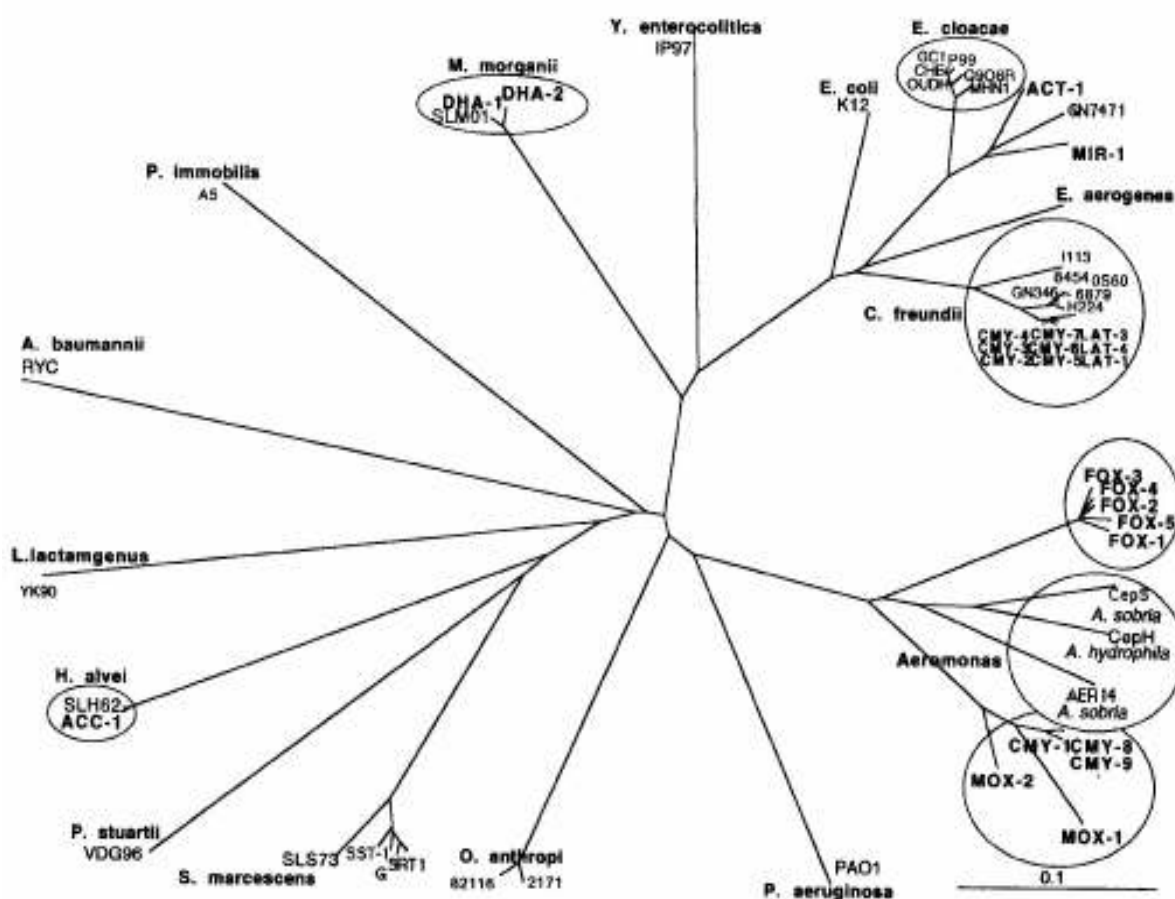


Figura 20 . Dendrograma de β -lactamases AmpC cromosòmiques i plasmídiques descrites fins el moment on s'observa la diversitat i l'estreta relació entre enzims cromosòmics i plasmídics de certs organismes (Extret de Philippon *et al.* ⁴⁷)

Les β -lactamases plasmídiques de la classe C s'han descrit arreu del món en *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *S. enterica*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *M. organii* i *K. oxytoca*. Sembla ser que la majoria d'aquestes variants derivarien de CMY-2 (Figura 20). És força preocupant que la majoria d'aquests enzims s'han descrit en *K. pneumoniae* i *E. coli*, els microorganismes aïllats amb més freqüència en infeccions nosocomials o infeccions adquirides.^{44,47}

b. β -lactamases del grup 2

El **grup 2** de la classificació de Bush-Jacoby-Medeiros és el més nombrós i heterogeni; està format per sis subgrups (2a, 2b, 2c, 2d, 2e i 2f) tots ells de la classe A d'Ambler excepte el 2d que pertany a la classe D.

Subgrup 2a hi trobem les penicil·linases de bacteris grampositius amb capacitat per a hidrolitzar la penicil·lina G però no les penicil·lines semi-sintètiques (nafcil·lina, cloxacil·lina i dicloxacil·lina) i són inhibides per l'àcid clavulànic; poden estar codificades en el cromosoma (*Bacillus*, *Clostridium butyricum*, *C. clostridiforme*) o en plasmidis (*S. aureus*, *E. faecalis*).^{44,45}

Subgrup 2b engloba la majoria de **β -lactamases d'ampli espectre** capaces d'hidrolitzar les penicil·lines (ampicil·lina i ticarcil·lina i, en menor grau, la piperacil·lina) i, si la seva expressió és elevada, poden arribar a conferir resistència a les cefalosporines de 1^a generació. Són inhibides per l'àcid clavulànic. En aquest grup destaquem les de tipus TEM (de codificació plasmídica) i SHV (plasmídica o cromosòmica) de les que se n'han trobat nombroses variants.

La primera β -lactamasa plasmídica descrita en bacils gramnegatius, TEM-1, va ser aïllada, a Grècia, a principis dels anys 60 en una soca d'*E. coli* procedent d'un hemocultiu d'un pacient anomenat Temoriera (d'aquí el seu nom).⁴⁸ És la β -lactamasa més freqüent en bacteris gramnegatius i, en l'actualitat, més d'un 90% de les soques d'*E. coli* que presenten el fenotip de resistència a ampicil·lina és per producció de TEM-1. La seva codificació plasmídica o en transposons ha facilitat la

difusió a d'altres membres de la família *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* i *Neisseria gonorrhoeae*.

Una mutació puntual en el gen codificador de TEM-1 dóna lloc a TEM-2, que és una β -lactamasa que presenta un fenotip de resistència indistingible de la TEM-1 però que se'n diferencia en el seu punt isoelèctric (5,4 per 5,6).

SHV-1 fou descrita per primera vegada l'any 1974.⁴⁹ Presenta una homologia del 64% amb la TEM-1.⁴⁴ El fenotip de resistència observat en soques que expressen aquest enzim és indistingible de les portadores de l'enzim TEM-1 o TEM-2. SHV-1 és una β -lactamasa que es troba freqüentment en *E. coli*, tenint una localització cromosòmica en *K. pneumoniae*.

Subgrup 2be, trobem les anomenades β -lactamases d'espectre ampliat

(BLEA) moltes de les quals deriven de TEM i SHV. Les BLEA, descrites per primera vegada a Alemanya el 1983, són enzims capaços d'hidrolitzar, a més de les penicil·lines i les cefalosporines de primera generació, les de segona (exceptuant les cefamicines), les de tercera i els monobactams (aztreonam) però mantenint la sensibilitat als carbapenems (Figura 21); són més sensibles

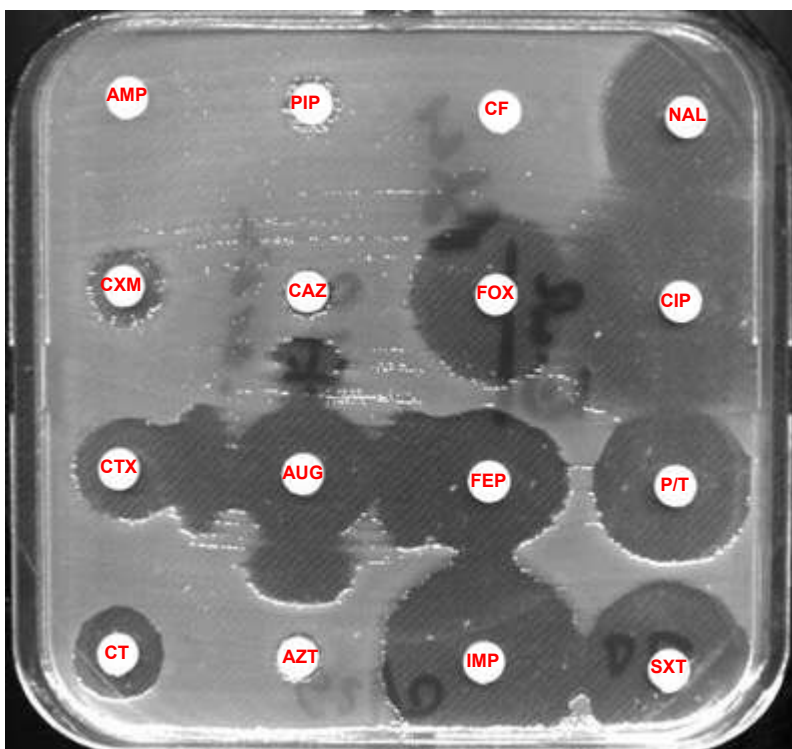


Figura 21. Imatge d'un antibiograma d'una soca que expressa una BLEA.

AMP, ampil·lina; PIP, piperacil·lina; CF, cefazolina; NAL, àc. nalidíxic; CXM, cefuroxima; CAZ, ceftazidima; FOX, cefoxitina; CIP, ciprofloxacina, CTX, cefotaxima, AMC, amoxicil·lina-àc. clavulànic; FEP, cefepime, P/T, piperacil·lina-tazobactam; CT, colistina; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.

que les d'ampli espectre en quant a la inhibició per àcid clavulànic. Actualment se n'han descrit més de 150 i es troben arreu del món en els diferents gèneres de la família *Enterobacteriaceae* i *P. aeruginosa*.⁴⁸ En l'actualitat predominen tres grans grups:

TEM: deriven de TEM-1 i TEM-2 i el seu punt isoelèctric varia de 5.2 a 6.5. Hi ha enzims que hidrolitzen la cefotaxima i la ceftazidima (p. ex. TEM-4), altres que presenten preferència per la hidròlisi de ceftazidima, anomenades ceftazidimases (p. ex.: TEM-5, TEM-7, TEM-12, TEM-16), altres que preferencialment hidrolitzen la cefotaxima, cefotaximases (p. ex.: TEM-3, TEM-20, TEM-25) i altres, com la TEM-22, que hidrolitzen preferentment l'aztreonam més que no pas les cefalosporines de tercera generació.^{45,50} Majoritàriament aïllades en *E. coli* i *K. pneumoniae* però també s'han descrit en altres enterobacteris, *P. aeruginosa* (TEM-42) i *Capnocytophaga ochracea* (TEM-17).⁴⁸

SHV: deriven de SHV-1. De la mateixa manera que en el cas anterior hi ha enzims que tenen activitat hidrolítica preferent per cefotaxima i ceftazidima (ex.: SHV-2, SHV-12), altres que hidrolitzen més ràpidament la cefotaxima que la ceftazidima o l'aztreonam, com SHV-13, i d'altres que mostren preferència d'hidròlisi enfront de la ceftazidima (p. ex.: SHV-4, SHV-6).^{45,50} Encara que la majoria s'han aïllat en *K. pneumoniae* també se n'han descrit en *C. koseri*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *Acinetobacter*.^{46,48}

CTX-M: enzims amb potent activitat hidrolítica en front cefotaxima. Actualment hi ha descrits cap a 50 enzims, incloent-hi Toho-1, Toho-2 i UOE-1 (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). Els estudis filogenètics revelen cinc grups majoritaris d'enzims CTX-M (Figura 22); l'homologia intragrup és superior al 94%, mentre que l'homologia intergrups és inferior o igual al 90%.⁵¹ L'homologia amb les BLEA tipus TEM i SHV és de menys del 40%.⁴⁶ L'homologia amb les β -lactamases cromosòmiques de classe A de *Serratia fonticola*, *K. oxytoca*, *Proteus vulgaris* i *Citrobacter koseri* oscil·la entre el 62-75%.

Les relacions entre les seqüències aminoacídiques dels enzims naturals de *Kluyvera* i els enzims CTX-M suggereixen que les β -lactamases de *K. ascorbata*,⁵² *K. cryocrescens*⁵³ i *K. georgiana*⁵⁴ són els progenitors del grups CTX-M-2, CTX-M-1 i CTX-M-8, respectivament. Els progenitors dels grups CTX-M-9 i CTX-M-25 encara són desconeguts.

A part d'aquests tres grans grups s'han descrit les β -lactamases tipus **PER**, que presenten entre el 25-27% d'homologia amb les BLEA tipus TEM i SHV. PER-1 té activitat hidrolítica en front penicil·lines i cefalosporines i és sensible a l'acció de l'àcid clavulànic; s'ha detectat en *P. aeruginosa*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *P. mirabilis*, *Alcaligenes faecalis* i *Acinetobacter*. PER-2 presenta una homologia del 86% amb PER-1 i s'ha detectat en *S. enterica* serovar Typhimurium, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* i *Vibrio cholerae* O1 El Tor.⁴⁶

Recentment, s'han descrit β -lactamases de classe A plasmídiques o associades a integrons de diversa distribució geogràfica i que no deriven de cap dels altres enzims coneguts. VEB-1, CME-1 i TLA-1 són enzims relacionats que presenten una homologia d'entre el 40-50%, confereixen resistència a les oximinocefalosporines, especialment a ceftazidima, i aztreonam; presenten homologia amb les cefalosporinases cromosòmiques de *Bacteroides* de les quals es creu es podrien haver originat.^{46, 48} Aquests enzims s'han trobat en diverses espècies com *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *Enterobacter sakasaki* i *P. aeruginosa*.⁵⁵⁻⁵⁸ Altres BLEA infreqüents són: SFO-1 que hidrolitza les cefamicines i s'inhibeix amb l'àcid clavulànic; clarament relacionada amb la β -lactamasa de classe A de *S. fonticola* i GES-1 que mostra una homologia del 36% amb la carbenicil·lasa de *P. mirabilis*.

Subgrup 2br trobem les **β -lactamases resistents als inhibidors (IRT)**. Les IRT (descrites a França el 1993) es caracteritzen per presentar el mateix perfil d'hidròlisi que les β -lactamases plasmídiques d'ampli espectre però essent resistents als inhibidors de β -lactamases com l'àcid clavulànic, el tazobactam i el sulbactam. La majoria deriven del tipus TEM, d'aquí el nom de IRT (*inhibitor resitant TEM-type*),

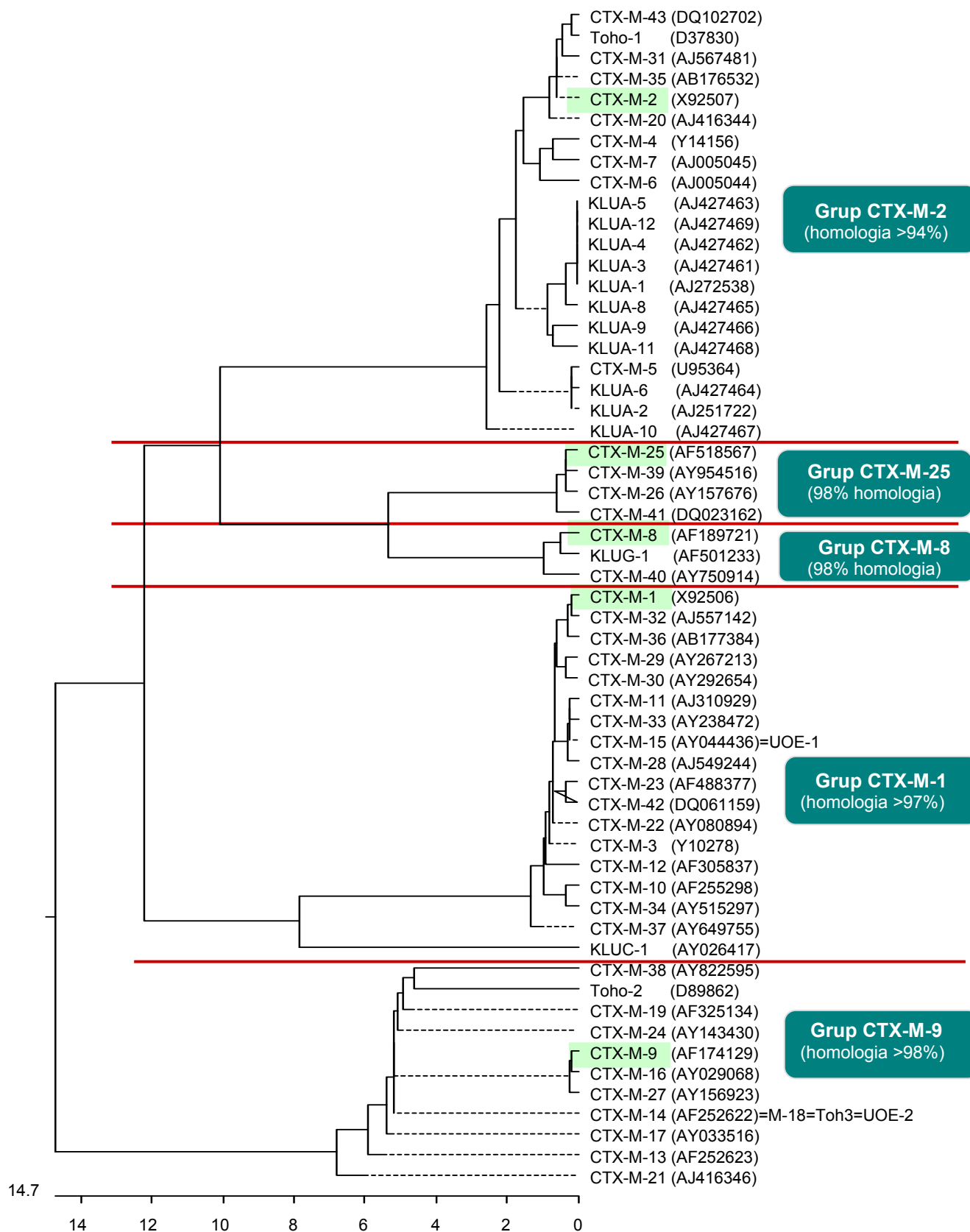


Figura 22. Arbre filogenètic realitzat a través de la comparació de seqüències aminoacídiques seguint el mètode Clustal i el programa DNASTar

encara que també se n'ha descrit una derivada de SHV, la SHV-10. Així com, també, s'ha descrit un enzim, la TEM-50, derivat d'una BLEA de la família TEM, que es caracteritza per presentar una mutació que li confereix el fenotip de les β -lactamases d'espectre ampliat i una altra mutació que li dóna resistència als inhibidors expressant-se com un patró mixt.⁴⁴

Subgrup 2c Una altra família de β -lactamases d'ampli espectre són les **carbenicil·linases**, CARB o PSE (per raó que majoritàriament s'han aïllat en espècies de *Pseudomonas*). Aquests enzims com el seu nom indica, hidrolitzen preferentment les carboxipenicil·lines (carbenicil·lina i ticarcil·lina) i són menys sensibles a l'àcid clavulànic. Comprèn des de la CARB-1 (PSE-4), CARB-2 (PSE-1), PSE-3, CARB-3 a CARB-6 i CARB-7 (PSE-5).

Subgrup 2d (de la classe D d'Ambler) trobem les **oxacil·linases** anomenades així per la seva capacitat d'hidrolitzar l'oxacil·lina (>50%). El seu perfil d'hidròlisi és similar a les β -lactamases d'ampli espectre, però són més resistents a l'acció de l'àcid clavulànic, de fet, fenotípicament poden confondre's amb les IRT. Majoritàriament s'han aïllat en *P. aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* encara que també se n'han trobat en altres bacteris gramnegatius. Mutacions en el gen estructural els hi confereixen activitat davant les C3G, adquirint aleshores el fenotip de BLEA (OXA-11, OXA-14 a OXA-19, OXA-31, OXA-32, OXA-35 i OXA-45). Algunes oxacil·linases a més a més han adquirit la capacitat d'hidrolitzar els carbapenems (OXA-10, OXA-23 a OXA-27 i OXA-40).⁴⁶

De fet l'enzim tipus OXA més comú, OXA-1(també anomenada OXA-30), es troba entre 1-10% dels *E. coli* aïllats i en *P. aeruginosa*.

Subgrup 2e s'inclouen les cefalosporinases cromosòmiques, pròpies d'espècies de *P. vulgaris*, *C. koseri* i *C. sedlakii*. A diferència de les cefalosporinases del grup 1, aquestes pertanyen a la classe A d'Ambler i són inhibides per l'àcid clavulànic.

Subgrup 2f són serina β -lactamasas de classe A que hidrolitzen els carbapenems i són parcialment inhibides per l'àcid clavulànic però no per EDTA. Aquests enzims són penicil·lases però també hidrolitzen els carbapenems i l'aztreonam. Hidrolitzen dèbilment les cefalosporines i, amb l'excepció de l'enzim NMC-A, no hidrolitzen la cefoxitina. S'han descrit tres carbapenemases de classe A, totes en *Enterobacteriaceae*: Sme-1 en dues soques de *S. marcescens* (Anglaterra 1982), IMI-1 en dos aïllaments d'*E. cloacae* (Califòrnia, 1984) i NMC-A en una sola soca d'*E. cloacae* (París, 1990). Totes són induïbles, no transferibles i, al contrari de les carbapenemases de classe B, la hidròlisi d'imipenem és menor que la del meropenem.^{45, 59}

c. β -lactamasas del grup 3

Totes es caracteritzen per pertànyer a la classe B d'Ambler i necessitar per a la seva acció enzimàtica cations divalents, principalment el zinc (d'aquí que també rebin el nom de metal·loenzims). Són inactivades per agents quelants (EDTA). El seu perfil d'hidròlisi inclou tots els β -lactàmics (inclosos cefamicines i carbapenems, però no l'aztreonam) i no s'inhibeixen amb l'àcid clavulànic, sulbactam o tazobactam.

Distingim tres subgrups que es poden diferenciar tant pel perfil d'hidròlisi com per la seva estructura molecular:⁴⁴

- **B1**: *C. meningosepticum* BLAB-1, -2, -3; *C. indologenes* IND-1, -2, -2a, -3; *B. cereus* BclI; *B. fragilis* CcrA (CfiA).
- **B2**: *A. hydrophila* CphA, Cph2; *A. sobria* ImiS; *S. fonticola* Sfh1.
- **B3**: *S. maltophilia* L1; *C. meningosepticum* GOB; *Janthinobacterium lividium* THIN-B; i *Legionella gormanii* FEZ-1.

La majoria d'aquestes β -lactamasas són cromosòmiques i poden ser constitutives i induïbles; actualment se n'han descrit de plasmídiques, com les VIM o IMP, en bacils gramnegatius.

d. **β -lactamases del grup 4**

Aquest grup només inclou la penicil·linasa de *Burkholderia cepacia*.

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

Els objectius d'aquest estudi són:

- 1.** Avaluar l'evolució de la resistència a β -lactàmics en enterobacteris aïllats a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en el decenni 1994-2004.
- 2.** Avaluar la prevalença d'enterobacteris amb BLEA i cefamicinases plasmídiques. Caracteritzar les β -lactamases implicades, observant la seva evolució temporal.
- 3.** Mostrar els trets clínics de les soques amb BLEA i cefamicinases.
- 4.** Observar les resistències associades a antibiòtics no β -lactàmics presents en les soques que produeixen BLEA o cefamicinasa.

**MATERIALS
I
MÈTODES**

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Soques

S'ha estudiat la sensibilitat d'un total de 37.207 soques de la família *Enterobacteriaceae* aïllades de mostres clíniques entre els anys 1994 i 2004 en l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i pertanyents a les espècies d'*E. coli* (25.525), *K. pneumoniae* (2.437), *S. enterica* (2.699), *P. mirabilis* (2.992), *C. freundii* (489), *E. cloacae* (1.539), *M. morganii* (763) i *K. oxytoca* (763). De tot aquest grup de soques se'n van seleccionar 330 que van presentar sensibilitat disminuïda a C3G i/o aztreonam, mitjançant la tècnica de disc-difusió, i sinèrgia amb l'àcid clavulànic amb el fi de detectar les β -lactamases d'espectre ampliat (BLEA) i 28 soques amb fenotip de cefamicinasa que presentaven resistència intermitja o total a amoxicil·lina-àcid clavulànic, cefotaxima, ceftazidima i/o cefoxitina segons les recomenacions del *CLSI* (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, abans NCCLS) amb un test de sinèrgia amb l'àcid clavulànic negatiu.

3.2 Determinació de la sensibilitat als antibiòtics

3.2.1 Tècnica de disc-difusió. Detecció de BLEA i cefamicinasa

El patró fenotípic de les BLEA es pot detectar en l'antibiograma convencional per disc difusió i es caracteritza per resistència a penicil·lines, cefalosporines de primera i segona generació, sensibilitat a cefoxitina, reducció significativa d'alguna cefalosporina de tercera o quarta generació o aztreonam i efecte de sinèrgia (presència d'una zona ampliada dels halos d'inhibició) dels compostos anteriors situats pròxims a un disc d'amoxicil·lina-àcid clavulànic.

Tècnicament, consisteix en col·locar discs de paper de filtre que contenen una quantitat coneguda d'antimicrobià en la superfície d'una placa de medi prèviament inoculada amb el microorganisme problema. Quan el disc entra en contacte amb el medi de cultiu absorbeix aigua d'aquest i immediatament l'antimicrobià comença a difondre's de forma radial, formant un gradient de concentració que serà en cada

punt inversament proporcional a la distància respecte el disc. En aquelles zones on la concentració assoleix un valor suficient, el microorganisme prèviament inoculat no podrà créixer i passat el temps d'incubació, normalment 18h, apareixerà un halo d'inhibició del creixement al voltant del disc. El diàmetre de l'halo d'inhibició indica el grau de sensibilitat del microorganisme al corresponent antimicrobià.

La principal limitació d'aquest mètode és la impossibilitat de determinar la concentració inhibidora mínima (CIM) o la concentració bactericida mínima (CBM) de l'antimicrobià.

Taula 5. Punts de tall proposats pel *CLSI* per avaluar la sensibilitat de les soques per la tècnica de disc-difusió.

| ATB ¹ / mm diàmetre | Resistent | Intermig | Sensible |
|--------------------------------|-----------|----------|----------|
| Ampicil·lina | ≤13 | 14-16 | ≥17 |
| Piperacil·lina | ≤17 | 18-20 | ≥21 |
| AMC ² | ≤13 | 14-17 | ≥18 |
| Cefazolina | ≤14 | 15-17 | ≥18 |
| Cefoxitina | ≤14 | 15-17 | ≥18 |
| Cefuroxima | ≤14 | 15-17 | ≥18 |
| Ceftazidima | ≤14 | 15-17 | ≥18 |
| Cefotaxima | ≤14 | 15-22 | ≥23 |
| Aztreonam | ≤15 | 16-21 | ≥21 |
| Imipenem | ≤13 | 14-15 | ≥16 |

¹ATB: antibiòtics. ²AMC: amoxicil·lina-àcid clavulànic 2:1.

La determinació de la sensibilitat per la tècnica de disc-difusió en agar Muëller-Hinton es va realitzar segons tècniques estàndars^{60,61} utilitzant els següents antimicrobians (Unipath Limited, Basingtoke, Hampshire, U.K. i Bio-Rad ,France): ampicil·lina (30 µg), piperacil·lina (100 µg), amoxicil·lina-àcid clavulànic 2:1 (30/10µg), cefazolina (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefuroxima (30 µg), cefotaxima (30 µg), aztreonam (30 µg) i imipenem (10 µg).

Per a determinar la categoria de la sensibilitat (soques resistents, moderadament resistents, intermèdies o sensibles), es segueixen les recomanacions del *CLSI* (Taula 5).

Si el patró fenotípic resultava dubtós es varen realitzar les tècniques confirmatòries detallades a continuació.

3.2.2 Determinació de la concentració inhibidora mínima (CIM)

L'estudi de la sensibilitat bacteriana *in vitro* s'efectuà determinant la concentració inhibidora mínima (CIM), la qual és la mínima concentració d'antibiòtic expressat en µg/ml capaç d'inhibir el creixement bacterià.

L'estudi de l'esmentat paràmetre, es va determinar mitjançant tècniques de dilució en medi líquid (microdilució) i el mètode de l'Epsilon-test (Etest).

3.2.2.1 Tècnica de microdilució

Es realitza en plaques de microdilució de poliestirè comercialitzades (*Sensititre*^R) amb pouets que contenen 26 antimicrobians liofilitzats en dilucions dobles progressives. Els antibiòtics estudiats i les seves concentracions van ser: ampil·lina (1-16 µg/ml), piperacil·lina (16-32 µg/ml), ticarcil·lina (16-64 µg/ml), amoxicil·lina-àcid clavulànic (4/2-/16/8 µg/ml), piperacil·lina/tazobactam (8/4-/64/4 µg/ml), ampil·lina/sulbactam (8/4 i 16/8 µg/ml), cefazolina (8 i 16 µg/ml), cefoxitina (4-16 µg/ml), cefuroxima (4-16 µg/ml), cefixima (8 i 16 µg/ml), cefotaxima (0,25-32 µg/ml), ceftazidima (0,25-16 µg/ml), cefepime (1-16 µg/ml), aztreonam (4-16 µg/ml), imipenem (0,25-8 µg/ml), meropenem (0,5-8 µg/ml), gentamicina (1-8 µg/ml), tobramicina (2-8 µg/ml), amikacina (4-32 µg/ml), ciprofloxacina (0,25-2 µg/ml), levofloxacino (0,25-2 µg/ml), tetraciclina (4 i 8 µg/ml), cloramfenicol (8 i 16 µg/ml),

trimetoprim-sulfametoxazole (0,5/9-2/38 $\mu\text{g/ml}$), fosfomicina + G6P (128 $\mu\text{g/ml}$) i norfloxacin (4 i 8 $\mu\text{g/ml}$).

S'inoculen les plaques de microtitulació (*InoculatorSensititre*) amb 50 μl de la suspensió bacteriana en brou Muëller-Hinton prèviament preparat per a obtenir una concentració final de 5×10^5 ufc/ml. S'incuba a 35°C durant 16-20 h.

3.2.2.2 Mètode de l'Epsilon-test (Etest)

S'ha emprat la tècnica quantitativa d' Etest (*AB Biodisk, Solna, Sweden*) per a determinar la sensibilitat antimicrobiana dels bacteris; l'esmentada tècnica es basa en un gradient predefinit d'antibiòtic que s'usa per tal de determinar la concentració inhibidora mínima (CIM, $\mu\text{g/ml}$) d'antibiòtics individuals sobre medi sòlid.

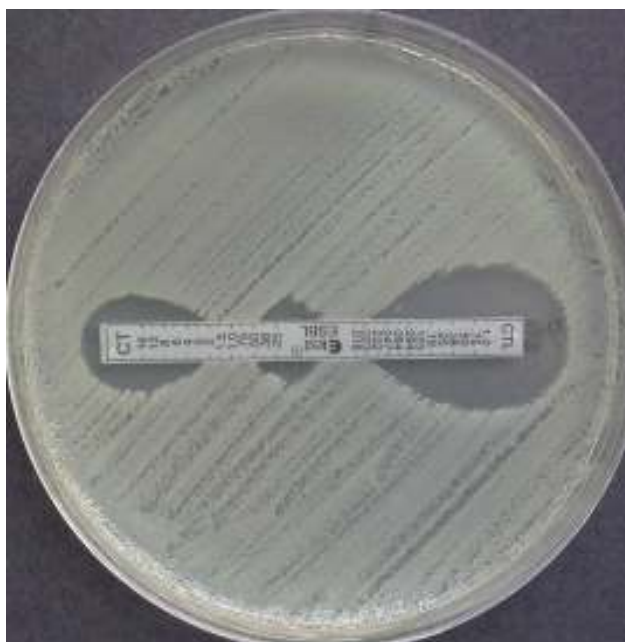


Figura 23. Mètode de l'Etest

L'Etest consisteix en un suport de plàstic no porós, fi i inert de 5 mm d'amplada i 50 mm de llargada. En una de les cares hi ha impresa una escala, en termes de $\mu\text{g/ml}$. En l'altra cara del suport es troba un gradient exponencial predefinit d'antibiòtic, liofiolitzat i estabilitzat.

El gradient cobreix un valor continu de concentracions des de 0,016 fins a 256 $\mu\text{g/ml}$, o des de 0,002 fins a 32 $\mu\text{g/ml}$, corresponents a 15 dilucions dobles progressives d'un mètode de CIM convencional. Quan l'Etest es diposita sobre una

placa d'agar inoculada, es produeix una difusió immediata de l'antibiòtic des de la superfície del suport cap a la matriu de l'agar. Per sota del suport es crea directament un gradient exponencial i continu de les concentracions de l'antibiòtic. Un cop transcorregut el temps adequat d'incubació (18 h. a 35°C) es pot observar una zona d'inhibició de forma elipsoidal i simètrica centrada al llarg del suport. El punt en el qual l'extrem de l'esmentada zona coincideix amb l'escala del suport, és el punt en el que ja no existeix inhibició del creixement i, serà el valor de la CIM obtinguda, en µg/ml (Figura 23).

Es van utilitzar els següents Etest: cefotaxima (0,25-16 µg/ml)/cefotaxima-àcid clavulànic (0,016-1,0 µg/ml) i ceftazidima (0,50-32 µg/ml) /ceftazidima-àcid clavulànic (0,064-4 µg/ml) valorant-se la reducció de la CIM de cefotaxima i ceftazidima en presència de inhibidors de β-lactamases com és l'àcid clavulànic. Aquesta reducció de la CIM suggeria la presència de BLEA en les soques estudiades.

3.2.2.3 Prova de doble difusió en disc (estudi de sinèrgia)

La detecció inicial de les BLEA es basa en la realització d'una placa de sinèrgia mitjançant la prova de doble difusió en disc en la qual s'observa un increment en la sensibilitat a les C3G o aztreonam en presència de l'àcid clavulànic (Figura 24).

S'inocula la placa d'agar Muëller-Hinton amb la soca problema; en el centre de la placa s'hi posa un disc d'amoxicil·lina-àcid clavulànic 2:1 (30 µg) i, radialment, es dipositen els següents discs: cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), aztreonam (30 µg) i cefepime (30 µg). Aquests discs es situen entre 25 mm i 30 mm del disc d'amoxicil·lina-àcid clavulànic. Les plaques s'incuben a 37°C durant 18 hores. Es considera la prova positiva quan s'observa un augment de l'halo d'inhibició en qualsevol dels discs de C3G o de l'aztreonam en la zona pròxima al disc que conté àcid clavulànic.

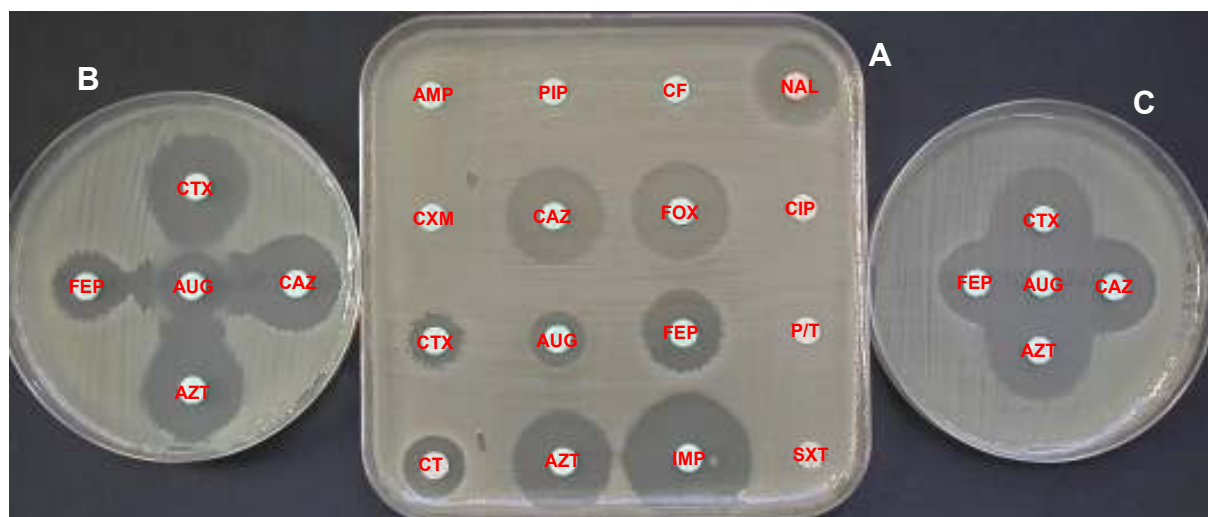


Figura 24. Prova de doble difusió en disc. La distància entre els discs és fonamental per a poder visualitzar l'increment de la sensibilitat a les cefalosporines de tercera generació i aztreonam en presència de l'àcid clavulànic. **A:** antibiograma original en el que només la disminució de la sensibilitat a les cefalosporines de tercera generació ens posa en alerta sobre l'existència d'algun mecanisme enzimàtic (en aquest cas els discs d'antibiòtic estan situats a una distància de 25 mm). **B:** Estudi de sinèrgia situant els discs d'antibiòtic a una distància de 30 mm, s'observa sinèrgia entre les cefalosporines de tercera generació i l'amoxicil·lina-àc. clavulànic. **C:** el mateix estudi de sinèrgia però situant els discs d'antibiòtic a una distància de 20 mm, en aquest cas tampoc es va observar sinèrgia.

AMP, ampicil·lina; PIP, piperacil·lina; CF, cefazolina; NAL, àc. nalidíxic; CXM, cefuroxima; CAZ, ceftazidima; FOX, cefoxitina; CIP, ciprofloxacina; CTX, cefotaxima; AMC, amoxicil·lina-àc. clavulànic; FEP, cefepime; P/T, piperacil·lina-tazobactam; CT, colistina; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; SXT: trimetoprim-sulfametoxazole.

3.2.2.4 Mètodes per a la detecció de les cefamicinases

La detecció de soques portadores de β -lactamases AmpC plasmídiques és força problemàtica degut a la manca de mètodes fenotípics estandaritzats. S'han proposat alguns mètodes^{62, 63} però cap d'ells permet discriminar entre l'enzim AmpC cromosòmic del plasmídic en soques naturalment productores d'AmpC.

En aquest treball per a diferenciar la resistència a cefoxitina deguda a AmpC o a alteracions en la permeabilitat es va realitzar un test tridimensional modificat (Figura 25) emprant les soques bacterianes, enlloc de l'extracte bacterià, segons la tècnica descrita per Shahid *et al.*⁶⁴ i amb la diferència que el tall en l'agar es va fer amb un portaobjectes estèril.

Figura 25. Test tridimensional modificat per esbrinar la resistència a cefoxitina (FOX) per AmpC vs permeabilitat. **A:** *K. pneumoniae* que expressa una cefamicinasa; **B:** *E. coli* ATCC 25922; **C:** *P. mirabilis*; **D:** *E. coli* que expressa una hiperproducció de la seva β -lactamasa cromosòmica; **E:** *E. cloacae* desreprimat

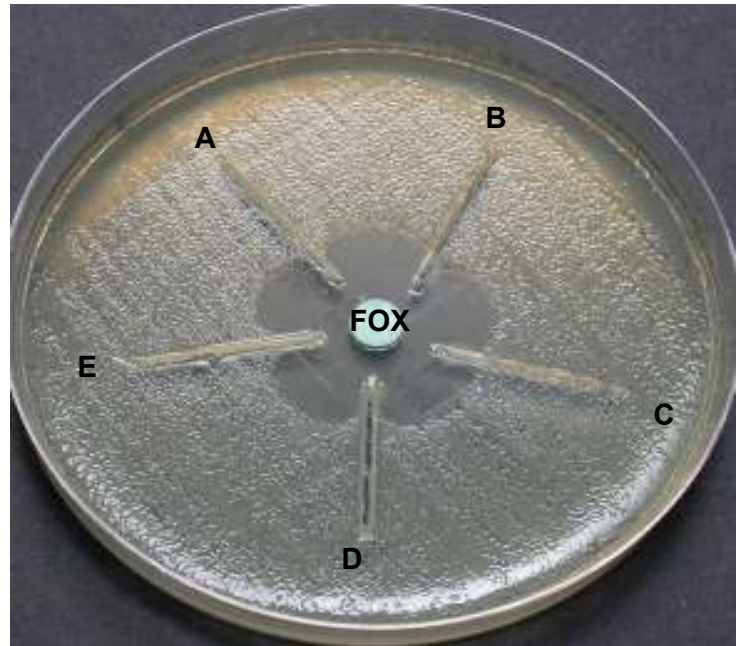


Figura 26. Test de sinèrgia amb doble disc per a detectar AmpC. Observi's l'augment de l'halo d'inhibició de les C3G en l'àrea propera a la cloxacil·lina; CLX. Cloxacil·lina

Adicionalment, vam realitzar una modificació del test de sinèrgia amb doble disc⁶⁵ col·locant un disc de cloxacil·lina (500 μ g) (Neo-sensitabs, Rosco Diagnostica S/A Taastrup, Denmark), inhibidor dels enzims AmpC, a una distància de 25 mm dels discs de ceftazidima i cefoxitina en una placa de Muëller-Hinton.

Després de la incubació de la placa a 37°C durant 18 hores qualsevol augment de l'halo d'inhibició en els discs de C3G en la zona pròxima al disc de cloxacil·lina es considerava com evidència de la presència d'AmpC (Figura 26).

Una característica fenotípica altament indicativa de la presència d'enzim AmpC adquirit és la presència de colònies en l'interior dels halos d'inhibició de cefoxitina, C3G i aztreonam⁶⁶ (Figura 27).

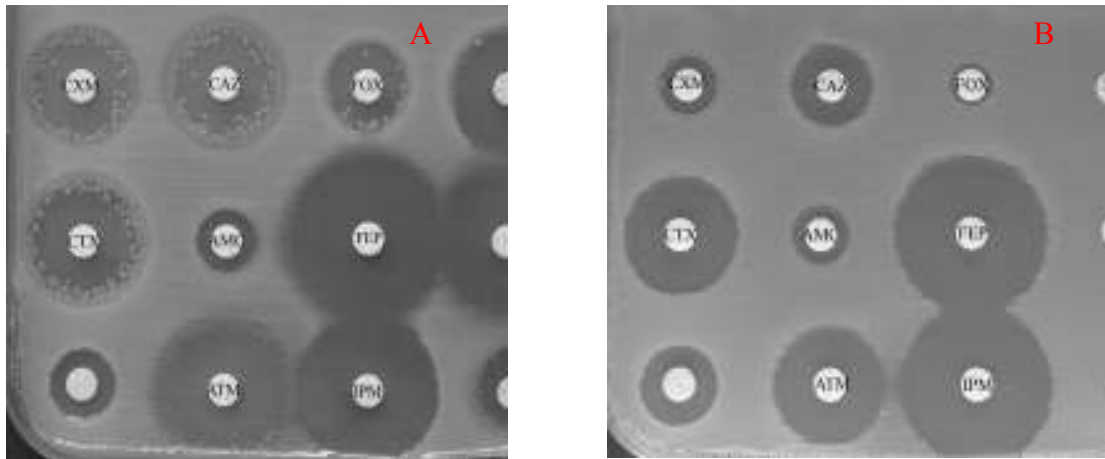


Figura 27. Tècnica de disc-difusió. **A:** *E. coli* que expressa una cefamicinasa plasmídica; **B:** *E. coli* que expressa una β -lactamasa cromosòmica. CAZ, ceftazidima; FOX, cefoxitina; CTX, cefotaxima; AMC, amoxicil·lina-àc. clavulànic; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IPM, imipenem.

3.3 Determinació del punt isoelèctric de les β -lactamases

3.3.1 Obtenció de l'extracte cru de β -lactamases

L'extracció de les β -lactamases es realitza per lisi cel·lular mitjançant sonicació. Seguint el mètode de Mathew *et al.* (1975)⁶⁷ s'obté tot el contingut proteic cel·lular (inclosa la β -lactamasa) anomenat **extracte cru**.

Procediment

1. Sembrar una o dues colònies en un tub que conté 5 ml de medi LB, o en qualsevol medi ric i incubar 4 h a 37°C amb agitació forta.
2. Afegir 2 ml d'aquest cultiu a 200 ml de medi LB, que conté l'antibiòtic necessari per la inducció de la β -lactamasa, generalment ampicil·lina [100 μ g/ml].
3. Incubar 18 h a 37°C en agitació suau.
4. Fer un antibiograma del cultiu per a comprovar l'expressió de la β -lactamasa.
5. Centrifugar a 4000 rpm 30 min a 4°C.

6. Llençar el sobrenadant i resuspendre el sediment en 5 ml d'aigua ultrapura. Homogeneïtzar amb el vòrtex.
7. Centrifugar a 4000 rpm 30 min a 4°C.
8. Llençar el sobrenadant i resuspendre el sediment en 3 ml d'aigua ultrapura (<5 mg en 5 ml i si >5 mg en una proporció 1:1).
9. Sonicar la suspensió bacteriana (3 pulsos d'un minut amb intervals d'un minut, 15 μ M, 4°C). Observar un descens en la terbolesa.
10. Centrifugar a 15000 rpm 30 min a 4°C.
11. Eliminar el sediment i el sobrenadant correspon a l'extracte cru el qual es conserva a – 20°C.

3.3.2 Isoelectroenfoc (IEF)

El mètode emprat és el descrit per Barthélemy *et al.* (1978).⁶⁸

Com descriu el mot isoelectroenfoc, per aquesta tècnica les proteïnes es focalitzen aprofitant el seu punt isoelèctric. El **punt isoelèctric** (pI) és aquell on la càrrega elèctrica (càrrega neta) de la proteïna és zero. Per a establir la càrrega neta de la proteïna s'utilitza un gel de poliacrilamida en el qual s'hi estableix un gradient de pH aprofitant les característiques químiques dels anomenats **amfòlits**. Els amfòlits són una barreja de substàncies orgàniques amb propietats amfotèriques, és a dir, substàncies que en funció del pH del medi presenten una càrrega elèctrica determinada.

Aquest gradient de pH s'estableix entre l'ànode i el càtode. En l'ànode es dona la reacció: $6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}_3\text{O}^+ + 4\text{e}^-$, que ve reforçada per una solució àcida (en el nostre cas l'àcid ortofosfòric, H_3PO_4) que s'aplica en l'electrode. Per altra banda, en el càtode els electrons que arriben del corrent són atrapats per a produir els grups hidroxils (grups bàsics) : $4\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2 + 4 \text{OH}^-$, reacció que és reforçada per la solució de NaOH.

Mentre s'estableix aquest gradient de H_3O^+ que van cap al càtode i de OH^- que van cap a l'ànode, els amfòlits van adquirint la seva càrrega neta establint-se el gradient de pH.

Les proteïnes, i millor dit els aminoàcids, també presenten aquesta propietat amfotèrica, o altrament dita zwitteriònica. Per tant, en funció dels aminoàcids que presenti la proteïna, aquesta es mourà de l'ànode al càtode fins que la seva càrrega neta sigui zero, és a dir, fins adquirir el seu punt isoelèctric, que coincidirà amb el valor del pH del gradient on la proteïna s'hagi aturat.

Per a la realització de l'isoelectroenfoc cal preparar el gel de poliacrilamida, fer una electroforesi i revelar el gel.

- a. Preparació del gel de poliacrilamida** en el que s'empra una barreja de diferents amfòlits depenent de la resolució dels diferents pI a obtenir, utilitzant amfòlits de pH 3,5-9 i pH 9-11 per la resolució de pI bàsics i amfòlits de pH 3,5-9 i pH 4-6,5 per pI àcids.

Procediment

1. Pesar 2,36 g d'acrilamida, 0,062 g de bis-acrilamida i 3,56 g de sacarosa i dissoldre en 29,25 ml d'aigua ultrapura.
2. Afegir 1,3 ml d'amfòlits pH 3,5-9 i 0,38 ml d'amfòlits pH 9-11 o 0,5 ml d'amfòlits pH 3,5-9 i 0,5 ml d'amfòlits pH 4-6,5, segons la resolució de pI que ens interressi. Homogeneïtzar per agitació suau.
3. Filtrar utilitzant un paper de filtre de 5,5 cm (*Whatman 541, Maidstone, England*) i desgasificar fent el buit, durant un temps aproximat d'una hora.
4. Afegir a la mostra desgasificada 1,5 ml de riboflavina [50 mg/ml]. Realitzar aquest pas en la foscor doncs la riboflavina és sensible a la llum.
5. Per altra banda, es netegen dos vidres (important no deixar restes de greix) amb aigua destil·lada primer i alcohol després.
6. Es fixen els dos vidres, separats per una junta de silicona de 1 mm de gruix, mitjançant unes pinces. I es segellen amb cinta adhesiva per evitar el contacte amb l'aire (l'aire és un inhibidor de la polimerització).

7. Abocar el contingut corresponent al gel d'IEF amb l'ajut d'una xeringa (evitar la formació de bombolles) entre els vidres prèviament preparats i exposar a la llum ultraviolada durant 2 hores.
 8. Passat el temps necessari de polimerització es col·loca el gel a 4°C durant una hora per tal de facilitar la posterior retirada del vidre.
- b. Electroforesi:** les condicions d'electroforesi també són dependents dels pl a obtenir: essent d'un voltatge màxim de 1000 V, amperatge màxim de 50 mA i utilitzant una potència fixa de 2 W durant 18-20 h a 4°C quan els pl esperats eren àcids i d'un voltatge màxim de 1500 V, amperatge màxim de 50 mA i una potència fixa de 40 W durant 3-4 h a 4°C en la resta de casos. Per a l'electrofocalització s'ha utilitzat l'aparell Multiphor II (LKB, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden).

Procediment

1. Separar un vidre del gel amb l'ajut d'una espàtula fent palanca entre els dos vidres, de manera que l'aire entri suaument.
 2. Untar la superfície del refrigerador amb una solució aquosa de parafina (3:1) i situar el gel a sobre tenint cura d'evitar la formació de bombolles.
 3. Col·locar unes tires de paper de filtre (*Pharmacia, Uppsala, Sweden*) en contacte amb la solució H_3PO_4 1M (ànode) i una altra amb la solució NaOH 1M (càode). Col·locar cada tira de paper de filtre en un extrem del gel.
 4. Posar els discs de paper de filtre de $\frac{1}{4}$ " (*Difco, Detroit Michigan, USA*) a 1 cm aproximadament de l'ànode.
 5. Disposar les mostres i els seus corresponents controls a estudiar en els discs de paper de filtre i a continuació connectar al camp elèctric, que treballarà a potència fixa.
 6. Passat el temps de correguda l'aparell manté un voltatge de 400 V per evitar la desfocalització de les proteïnes.
- c. Revelat:** el revelat del gel es basa en una reacció enzimàtica on els gels de revelat contenen l'antibiòtic (penicil·lina en un cas i ceftriaxona en l'altre) i iode (substància colorimètrica). El gel de revelat es superposa al gel d'IEF i en els punts on s'hagin focalitzat les β -lactamases aquestes

degradaran l'anell β -lactàmic de l'antibiòtic produint una baixada de pH que és visualitzada pel canvi de color del iode (de blau a transparent).

Procediment

1. Pesar 1,2 g d'agar, 0,4 g de midó i afegir 80 ml de tampó fosfat 0,25 M pH 7,0.
2. Muntar els vidres de la mateixa manera que per fer el gel d'IEF i atemperar a l'estufa de 60°C, per tal d'evitar una ràpida solidificació de l'agar.
3. Bullir el contingut preparat en el pas 1 fins a la seva total dissolució.
4. Repartir els 80 ml en dues ampolles i deixar atemperar fins a 60°C aproximadament, per evitar la desnaturalització de l'antibiòtic.
5. Un cop atemperat, afegir a cada ampolla 1 ml de solució I-I₂ (IK 3,2 M i I₂ 0,1 M) juntament amb 10 mg de penicil·lina en un cas i 10 mg de ceftriaxona en l'altre.
6. Dipositar el contingut entre els dos vidres prèviament atemperat amb l'ajut d'una xeringa i deixar reposar fins a la total solidificació.
7. Col·locar a 4°C (mínim una hora), per tal de facilitar la separació dels dos vidres.
8. Colocar a sobre del gel d'IEF el gel de revelat que conté ceftriaxona i esperar el temps necessari per a que tingui lloc la reacció enzimàtica, aproximadament 1 hora.
9. Extreure el gel de revelat que contenia ceftriaxona i col·locar el gel de revelat que conté penicil·lina, esperar que la reacció enzimàtica tingui lloc.
10. Interpretar els resultats obtinguts.

Com a soques controls es van utilitzar soques de diferents col·leccions de pl coneguts, depenent en cada cas del pl esperat. Es detallen en la taula 6.

Taula 6. Soques control utilitzades en les tècniques d'IEF i PCR

| Espècie | Enzim | pI | Soca | Origen |
|----------------------|---------|----------|----------|---------------|
| <i>E. coli</i> | TEM-1 | 5,4 | RL111 | R. Labia |
| <i>K. pneumoniae</i> | TEM-3 | 6,3 | CF104 | D. Sirot |
| <i>E. coli</i> | TEM-12 | 5,2 | K12J53-2 | I. Pasteur |
| <i>E. coli</i> | SHV-1 | 7,6 | J53R1010 | A.A. Medeiros |
| <i>E. coli</i> | SHV-5 | 8,2 +5,4 | TR 349 | R. Labia |
| <i>E. coli</i> | SHV-4 | 7,8 | TR 210-2 | R. Labia |
| <i>E. coli</i> | CTX-M-9 | 8 + 5,4 | 785-D | F. Navarro |

3.4 Tècnica de PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és una tècnica que permet la generació (amplificació) *in vitro* de grans quantitats d'un fragment d'ADN.

Clàssicament aquesta tècnica es divideix en tres etapes:

- **Iniciació**: comprèn una desnaturalització tèrmica de l'ADN bicatenari per tal d'obtenir cadenes monocatenàries a les quals puguin aparellar-se els iniciadors o *primers*. Els iniciadors són una cadena sintètica d'oligodesoxiribonucleòtids, complementària als extrems 5' o 3' de cada cadena monocatenària del fragment a amplificar.
- **Hibridació** entre els iniciadors i l'ADN monocatenari necessària ja que la polimerasa requereix d'una regió d'ADN de doble cadena per a la iniciació de la síntesi de la cadena complementària a partir d'una única cadena.
- **Extensió** és l'etapa on la polimerasa sintetitzarà les dues cadenes monocatenàries.

Aquestes tres etapes formen un **cicle** que es repeteix un nombre *n* de vegades. L'elevada estabilitat de la *Taq*DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* a temperatures elevades que permet una desnaturalització, una hibridació i una extensió de la cadena sense necessitat d'afegir-hi nous reactius, així com el desenvolupament dels termocicladors actuals que permeten que els canvis de temperatura es produeixin d'una manera ràpida i acurada, han permès que aquesta tècnica hagi tingut una gran expansió.

Procediment

1. **Preparació de la mostra**: A partir d'un cultiu fresc en placa d'agar sang agafem una petita porció de colònia i fem una suspensió en 100µl d'aigua bidestil·lada estèril i bullim durant 15 min per tal de lisar les cèl·lules i obtenir el seu material en suspensió.

2. **Preparació dels dNTPs:** Barregem 20 μ l de cada oligonucleotid (A, C, G, T) a 100mM en 920 μ l d'aigua bidestil·lada estèril, quedant una concentració final de 2 mM.
3. **Preparació dels iniciadors:** La solució mare dels iniciadors sempre és de 100 μ M. La concentració dels iniciadors per a fer la PCR és 10 μ M. Per tant, en un tub eppendorf afegim 90 μ l d'aigua bidestil·lada i 10 μ l de solució mare. Els iniciadors utilitzats per a cadascuna de les PCR es mostra en la taula 7.
4. **Preparació de la master-mix:** tot el material utilitzat ha d'estar a la cabina estèril, prèviament esterilitzat i irradiat per evitar possibles contaminacions.

2 μ l de Primer A

2 μ l de Primer B

5 μ l de DNTPs

5 μ l de Tampó

30,6 μ l d'H₂O estèril

0,4 μ l de Taq (es treu en el moment de manipulació i es retorna al congelador seguidament)

Cada quantitat s'ha de multiplicar pel nombre de mostres afegint dos més, una per al control positiu i l'altra pel blanc.

L' esquema de treball serà el següent:

1. Preparació de les mostres
2. Preparació de la cabina de pre-PCR
3. Preparació de la Master-mix repartint la barreja en tubs eppendorfs petits
4. Afegir les mostres (DNA)
5. Situar els tubs eppendorfs amb la barreja final al termociclador, segons les condicions descrites en la taula 7.
6. Els fragments amplificats per PCR van ser separats mitjançant electroforesi en gels d'agarosa al 0,8%, tenyits amb bromur d'etidi (0,5 μ g/ml) i visualitzats amb llum ultraviolada.
7. Posteriorment es van seqüenciar si s'esqueia.

Taula 7. Iniciadors utilitzats per a les tècniques de PCR i seqüenciació

| Gens de resistència | Iniciadors | Seqüència | Tm | Desnat. | Cicles | Desnat | Hibr. | Ext. | Ext. final | Mida (pb) | Bibliografia |
|-------------------------------|------------|----------------------------------------------------------|------|---------|--------|----------|----------|---------|------------|-----------|---------------------------------------------------|
| <i>bla_{TEM1}</i> | P4 | AAAGAATTCTAAATACATTCAAATATG (AB103506, -80 a -60) | 58,6 | 94°C 4' | 35 | 94°C 1' | 48°C 2' | 72°C 2' | 72°C 10' | 938 | |
| | P3 | AGTGTCTGACTTACCAATGCTTAATCAG T (AB103506, 906-933) | 68,8 | | | | | | | | |
| <i>bla_{SHV1}</i> | SHVA | CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC (AF124984, 128 a 163) | 72,1 | 95°C 5' | 30 | 94°C 30" | 55°C 30" | 72°C 2' | 72°C 10' | 992 | Nüesch et al. 1996. EJCMID 15:398-402 |
| | SHVB | TCTTTCCGATGCCGCCAGTCA (AF124984, 1143 a 1120) | | | | | | | | | |
| <i>bla_{CTX-M-9t}</i> | IATG | GTGACAAAGAGAGTGCAACGG (AF174129, 4 a 24) | 66,2 | 95°C 5' | 30 | 95°C 1' | 55°C 1' | 72°C 1' | 72°C 7' | 850 | Sabaté et al. 2000. AAC. 44:1970-1973 |
| | ISTOP | ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC (AF174129, 860 a 840) | 72,1 | | | | | | | | |
| <i>bla_{CTX-M-AB}</i> | CTX-A | CTTACCCAGCGTCAGA (X92506, 601 a 585) | 52,8 | | | | | | | 393 | |
| | CTX-B | GCGATGTGCAGTACCAGTAA (X92506, 208 a 227) | 57,3 | | | | | | | | |
| <i>bla_{CTX-M-1t}</i> | CTX-M-1 up | AAGGCGTTTTGACAGACTAT (X92506, -63 a -53) | 60,2 | | | | | | | 1014 | |
| | CTX-M-1 dn | CCGTTTCCGCTATTACAA (X92506, 951 a 931) | 59,9 | | | | | | | | |
| <i>bla_{CTX-M-3t}</i> | M3 up | ATGGTTAAAAAATCACTGCG (Y10278, 1 a 21) | 60,7 | | | | | | | 879 | |
| | M3 dn | CTATTACAAACCGTCGGTG (Y10278, 879 a 861) | 59,7 | | | | | | | | |
| <i>bla_{CTX-M-5t}</i> | CTX-M-5 up | TAGGTGGTAATGGAGGAT (AF286192, -50 a -32) | 54,8 | | | | | | | 1004 | |
| | CTX-M-5 dn | GTCAGGAGCACATTTTAA (AF286192, 954 a 934) | 58,1 | | | | | | | | |
| <i>bla_{ACC}</i> | ACCMF | AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA (AJ133121, 861-881) | 72,1 | 94°C 5' | 30 | 94°C 30" | 50°C 30" | 72°C 1' | 72°C 10' | 346 | Pérez-Pérez et al. 2002. JCM. 40:2153- 2162 |
| | ACCMR | TTCGCCGCAATCATCCCTAGC (AJ133121, 1206-1186) | | | | | | | | | |

| Gens de resistència | Iniciadors | Seqüència | Tm | Desnat. | Cicles | Desnat | Hibr. | Ext. | Ext. final | Mida (pb) | Bibliografia |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------|------|---------|--------------------------------------------|----------|----------|---------|------------|-----------|--------------------------------------------|
| <i>bla</i> _{ACC-1} | ACC-1 up | TGCGTAAAAAATGCAGAA (AJ133121, 47-65) | 60,3 | 94°C 5' | 30 | 94°C 30" | 50°C 30" | 72°C 1' | 72°C 10' | 346 | Pérez-Pérez et al. 2002. JCM. 40:2153-2162 |
| | ACC-1 dn | CTACTTATTCCTTCCA (AJ133121,1094-1078) | 50,3 | | | | | | | | |
| <i>bla</i> _{MIR-11} <i>bla</i> _{ACT-1} | EBCMF | TGCGTAAAGCCGATGTTGCGG (M37839, 1115-1135) | 72,1 | | | | | | | 302 | Pérez-Pérez et al. 2002. JCM. 40:2153-2162 |
| | EBCMR | CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT (M377839, 1416-1396) | | | | | | | | | |
| <i>bla</i> _{FOX-1 a} <i>bla</i> _{FOX-5b} | FOXMF | AACATGGGGTATCAGGGAGATG (X77455, 1475-1496) | 66,5 | | | | | | | 190 | Pérez-Pérez et al. 2002. JCM. 40:2153-2162 |
| | FOXMR | CAAAGCGCGTAACCGGATTGG (X77455, 1664-1644) | 72,1 | | | | | | | | |
| <i>bla</i> _{DHA} | DHAMF | AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT (Y16410, 1244-1265) | 69,4 | | | | | | | 405 | Pérez-Pérez et al. 2002. JCM. 40:2153-2162 |
| | DHAMR | CCGTACGCATACTGGCTTTGC (Y16410, 1648-1628) | 70,4 | | | | | | | | |
| <i>bla</i> _{DHA-1} | DHA-1A | CTGATGAAAAAATCGTTATC (AY887126, 41-61) | 54,0 | | | | | | | 405 | |
| | DHA-1B | ATTCCAGTGCACTCCAAAATA (AY887126, 1181-1161) | 62,0 | | | | | | | | |
| <i>bla</i> _{CMY-1} , <i>bla</i> _{CMY-8 a} <i>bla</i> _{CMY-11} , <i>bla</i> _{MOX-1} , <i>bla</i> _{MOX-2} | MOXMF | GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT (D13304, 358-378) | 69,3 | | | | | | | 520 | Pérez-Pérez et al. 2002. JCM. 40:2153-2162 |
| | MOXMR | CACATTGACATAGGTGTGGGTGC (D13304, 877-856) | 65,9 | | | | | | | | |
| <i>bla</i> _{CMY-2 a} <i>bla</i> _{CMY-7} , <i>bla</i> _{LAT-1 a} <i>bla</i> _{LAT-4} , <i>bla</i> _{BIL-1} | CITMF | TGGCCAGAACTGACAGGCAAA (X78117, 478-498) | 71,0 | 462 | Pérez-Pérez et al. 2002. JCM. 40:2153-2162 | | | | | | |
| | CITMR | TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC (X78117, 939-919) | 71,9 | | | | | | | | |

Per a la caracterització dels gens *bla*_{CTX-M-9} i *bla*_{CTX-M-14}, no sempre es va procedir a la seqüenciació. En la majoria de casos es va determinar l'entorn genètic de la β -lactamasa, sabent que la *bla*_{CTX-M-9} es troba dins l'integró In60⁶⁹ i que *bla*_{CTX-M-14} es pot trobar entre dues seqüències d'inserció, la *ISEcp1* en l'extrem 5' i la *IS903* en l'extrem 3' (*bla*_{CTX-M-14a}) o bé dins de l'In60 (*bla*_{CTX-M-14b}).⁷⁰ La regió subjacent als gens *bla*_{CTX-M-9} i *bla*_{CTX-M-14b} fou amplificada utilitzant els iniciadors 341stop i I_{ATG}R de l'In60, tal com s'ha descrit prèviament.⁶⁹ Per a l'entorn genètic del gen *bla*_{CTX-M-14} s'han usat els iniciadors B3A (5'-AACGGCACAATGACGCTGGC-3', número accés del GeneBank AF174129, posicions 6682-6701) i IS903.2mig (5'-TGTAATCCGGGCAGCGTA-3', número accés AJ972954, posicions 2869-2852).

Finalment, la diferenciació entre les soques portadores del gen *bla*_{CTX-M-9} i *bla*_{CTX-M-14-b}, ambdues positives per a la PCR i ambdues portadores de l'entorn de l'In60, es va fer digerint l'amplificat amb l'enzim *Pst*I. Si s'observava restricció es corresponia amb el gen *bla*_{CTX-M-9} i si no es corresponia al *bla*_{CTX-M-14-b}.

3.5 Seqüenciació amb terminadors marcats

La seqüenciació es realitza segons el mètode enzimàtic descrit per F. Sanger⁷¹ i col·laboradors (1977, 1980). La reacció de seqüenciació té com a base una reacció de PCR però dividida en quatre tubs, on a cada tub hi ha un dideoxynucleòtid que impedeix que continuï la formació de la nova cadena de DNA. Així, per exemple, en el tub amb ddATP hi trobarem totes les cadenes que acabin amb una adenosina, en el dels ddCTP totes les cadenes acabades amb citosina, etc. Aquesta elongació de la cadena de DNA és possible perquè la DNA polimerasa (*Sequenase*[®]) reconeix els dideoxynucleòtids i els incorpora a la cadena.

La separació d'aquestes cadenes es realitza per mitjà d'un gel de poliacrilamida d'elevada resolució. La lectura del gel es realitza automàticament amb el sistema ALFexpress[™] (*AmershamPharmaciaBiotech*) que es basa en la lectura de l'excitació que produeix un llum làser al marcador fluorescent Cy[™]5, que en

aquest cas es troba en els dideoxynucleòtids (terminadors) utilitzats. L'anàlisi de les seqüències es fa per mitjà del software Sequence Analyser 2.10 (*AmershamPharmaciaBiotech*).

Material i Reactius

PCR Product Pre-Sequencing Kit (USB)

Kit de seqüenciació CyTM5 Thermo SequenaseTM Dye Terminator Kit (*Amersham PharmaciaBiotech*)

Acetat Amònic (Sigma)

EDTA (Sigma)

Mocadors de cel·lulosa

Rentavaixelles Mistol

Alcohol 70°C

Aigua destil·lada estèril

Etanol 100% (Merck)

Àcid acètic 10% (Merck)

Bind-Silane plusOne (*AmershamPharmacia Biotech*)

ReproGel High Resolution (*AmershamPharmacia Biotech*)

ReproGel Long Read (*AmershamPharmacia Biotech*)

El procés consta de cinc parts:

- a. **Purificació del producte de PCR**: gràcies a l'ús de dos enzims, l'exonucleasa i la fosfatasa alcalina, que eliminen l'excés d'iniciadors i de dNTPs fruit de la PCR. La exonucleasa hidrolitza els iniciadors i possibles cadenes monocatenàries de DNA que hagin quedat, mentre que la fosfatasa hidrolitza els dNTPs eliminant el fosfat i per tant impedit que formin la cadena de DNA. Ambdós enzims són inactivats a 80°C. És important que abans de començar i un cop descongelats els vials del kit se'ls hi faci un spin.

Procediment

1. Es prepara una sèrie de tubs eppendorfs de 0,2 ml amb el mateix nombre de mostres a estudiar.

2. A cada tub se li afegeix 1 µl d'exonucleasa, 1 µl de fosfatasa alcalina i 5 µl de DNA de la mostra. Si es necessita un volum superior a 7 µl es multiplicarà mantenint la proporció 1:1:5 fins a obtenir el volum desitjat.
3. Reacció de purificació: 15 min a 37°C
 15 min a 80°C

Es guarda la reacció a 4°C o en gel fins al seu ús immediat. Aquesta purificació no és estable i s'ha de fer cada cop que es procedeix a seqüenciar.

b. Reacció de seqüenciació:

Procediment: És important que abans de començar i un cop descongelats els vials del kit se'ls hi faci un spin.

1. Es preparen 4 tubs eppendorf de 1,5 ml i es barregen:

| | |
|---------------|-------|
| NTP | 2 µl |
| ddNTP | 2 µl |
| EDTA | 2 µl |
| Aigua estèril | 14 µl |
2. Es barreja amb vòrtex i es fa un spin. Es guarda en gel fins al seu ús.
3. Per a cada mostra a seqüenciar es prepara un tub eppendorf de 1,5 ml amb:

| | |
|---------------|----------------------------|
| DNA | * |
| Tampó | 3,5 µl |
| Iniciador | 2µl (concentració 4 pmols) |
| Taq | 1µl |
| Aigua estèril | Fins a 27 µl |

* La quantitat de DNA està entre 4 i 40 fmols i es determina bé amb el GeneQuant (*Amersham PharmaciaBiotech*), bé amb gels d'agarosa.

4. Es situen en els tub eppendorfs de 0,2 ml 2 µl de ddNTPs i 4 µl de la barreja
5. Es barreja amb el vòrtex i es fa un spin.
6. Es rotulen els tubs i es procedeix a l'amplificació:

| | | | |
|------|-------------|---|-----|
| 95°C | 30 seg | } | 30X |
| *°C | 30 seg | | |
| 72°C | 1 min 20seg | | |

*La temperatura d'hibridació depèn de la temperatura de *melting* (T_m) de l'iniciador. Un cop acabada la reacció es fa un spin i es guarda a 4°C.

7. Es preparen 40 tubs eppendorf amb 2 µl d'acetat d'amoni 7,5 M.
8. Es recull la reacció de seqüenciació i es barreja amb l'ajut de la pipeta amb els 2 µl d'acetat d'amoni.
9. S'afegeixen 2 µl de glicogen a cada tub i 30 µl d'etanol al 100%.
10. Es vorteja cada mostra i es deixa en gel 20 min. Es recomana però deixar precipitar el DNA tota la nit a -20°C.
11. Es centrifuga entre 10.000 g i 16.000 g 15 min a temperatura ambient.
12. Es retira el sobrenedant amb cura de no endur-se el pellet, i s'hi afegeix 200 µl d'etanol al 70% (fred).
13. Es centrifuga entre 10.000 g i 16.000 g 5 min a temperatura ambient i es retira el sobrenedant amb cura de no endur-se el pellet.
14. S'asseca el pellet en el SpeedVac no més de 5 min.
15. Es resuspen amb 8 µl de la solució d'aturada.

c. Preparació del gel de seqüenciació

Procediment

1. Es renten els vidres amb el rentavaixelles Mistol (que és el que menys interacció dóna amb el llum làser). S'esbandeix abundantment amb aigua destil·lada. Un cop secs, i amb un mocador de cel·lulosa es repassen amb alcohol 70°. Es fa el mateix amb els separadors i la pinta per a fer els pouets.
2. Es prepara una solució fixadora, que ens facilitarà la forma dels pouets:

| | |
|----------------|--------|
| etanol 100% | 1 ml |
| àc. acètic 10% | 250 µl |
| Bind-Silane | 3 µl |
3. S'unta amb un tros de paper de cel·lulosa impregnat de la solució fixadora 5 cm del vidre exterior i 3 cm del vidre interior.
4. Es monten els vidres i es netegen amb alcohol 70 les superfícies exteriors. Es situen sota el llum ultraviolat.
5. Es prepara la barreja d'acrilamida/bisacrilamida segons ens indica el kit. Utilitzant el ReproGel High Resolution quan la seqüència que volem obtenir es mou al voltant dels 400 pb o el ReproGel Long Read quan es vol una seqüència el més llarga possible. En aquest darrer cas, s'utilitzen els espaiadors de 0,3 mm i per tant de cada ampolla de ReproGel es

poden fer dos gels. No així quan s'usa el ReProGel High Resolution on s'utilitzen els espaiadors de 0,5 mm i cada ampolla és per a un únic gel.

6. Es situa la pinta que dibuixarà els pouets i s'apliquen 10 min del llum ultraviolat.

d. Electroforesi:

Procediment

1. S'inicia el programa ALFwin.
2. S'inicia el seqüenciador ALFexpress.
3. Es carrega el casbook High Resolution o Long Read en funció de la longitud de la seqüència que vulguem obtenir. Les condicions de correcció són:
 - a. High Resolution: 1.500V, 60mA, 25 W, 55°C durant 450 min.
 - b. Long Read: 1.500V, 60mA, 25 W, 55°C durant 700 min.
4. Es situa el gel de poliacrilamida en l'ALFexpress i es prepara 1 L de tampó d'electroforesi TBE 0,5X per a cada cubeta.
5. Es deixa que el llum làser s'aliniï i s'observa el valor màxim que adquireix. Seguidament es fa un preset per tal que el tampó arribi a la temperatura de 55°C. Durant aquest preset el valor del làser disminueix però mai ha d'estar per sota de 300.
6. Un cop el gel està a 55°C, es procedeix a retirar la pinta i es netegen els pouets de restes d'acrilamida amb l'ajut d'una xeringa, injectant tampó de cubeta a pressió damunt de cada pouet.
7. Immediatament, es desnaturalitzen les mostres 3 min a 72°C, i es situen a 4°C (en gel).
8. Es carrega el gel. Es situen els electodes i es prem el botó de Start.

e. Anàlisi de les seqüències:

Procediment

1. Un cop acabada la correcció les seqüències es guarden automàticament en el software Sequence Analyser 2.10.
2. Es procedeix automàticament a l'anàlisi utilitzant el sistema d'autoanàlisi.
3. S'imprimeixen els resultats o es guarden en suport informàtic.

Les seqüències nucleotídiques i la d'aminoàcids deduïda es van analitzar utilitzant el suport informàtic *Lasergene DNASTAR software package* (GATC Biotech, Cambridge, UK) i els programes accessibles per internet a la web del *National Centre of Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTATS

4. RESULTATS

4.1 Evolució de la resistència als antimicrobians en enterobacteris aïllats en el decenni 1994-2004

Els 37.207 enterobacteris estudiats en el nostre servei, alguns dels quals expressaven BLEA, corresponen a soques aïllades durant el decenni 1994-2004 i pertanyen a les següents espècies: *E. coli* (25.525 soques), *K. pneumoniae* (2.437 soques), *K. oxytoca* (763 soques), *P. mirabilis* (2.992 soques), *E. cloacae* (1.539 soques), *C. freundii* (489 soques), *M. morgani* (763 soques) i *S. enterica* (2.699 soques). Altres espècies o gèneres d'*Enterobacteriaceae* que hem aïllat, a vegades de manera infreqüent, no s'han inclòs en el treball.

En les taules 8, 9, 10 i 11 es recullen els percentatges de resistència a diferents antimicrobians obtinguts en les diferents espècies; les dades de l'any 1998 no s'inclouen perquè no es van recollir.

A l'avaluar els resultats globals pot observar-se que *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. mirabilis* constitueixen les espècies d'enterobacteris causants, en major freqüència, d'infecció oportunista assolint en el nostre cas el 90% del total d'aïllats (30.954/34.508).

E. coli manté una bona sensibilitat als β -lactàmics avaluats (Taula 8), exceptuant l'ampicil·lina que, en aquest decenni, ha presentat percentatges de resistència d'entre el 57%-68% (similars als que ja es venien observant en altres períodes estudiats)⁷² i observant-se un increment de la resistència a aztreonam i a cefalosporines de tercera i quarta generació, fet que ha motivat la present tesi doctoral. També cal destacar el percentatge, encara que discret, de resistència a l'associació amoxicil·lina-àcid clavulànic que oscil·la entre el 4% i el 7%. *E. coli*, també presenta un increment de la resistència a les quinolones (15,5% vs 27%) però no a trimetoprim-sulfametoxazole que es manté entre 35%-45% i molt menys als aminoglicòsids, en particular a l'amikacina, 0,04%-0,5% (Figura 28).

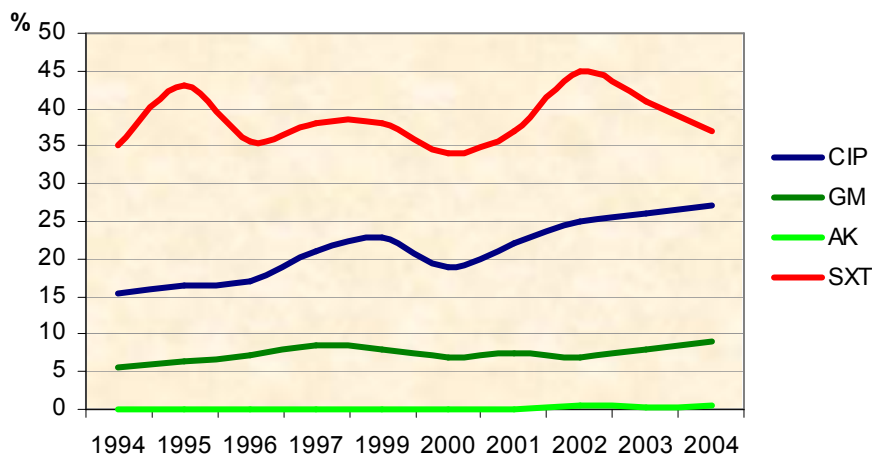


Figura 28. Evolució de la de resistència a diferents antimicrobians en soques d' *E. coli*. CIP: Ciprofloxacina; GM: Gentamicina; AK: Amikacina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazole

En *K. pneumoniae*, naturalment resistent a ampicil·lina per la presència en el seu cromosoma d'una penicil·lina, cal destacar també l'increment de la resistència a aztreonam i a cefalosporines de tercera i quarta generació (0,5% al 7%), la resistència a quinolones (1%-23%), a gentamicina (0,6%-4%) i a trimetoprim-sulfametoxazole (3%-38%) (Figura 29). Aquest fet és el que descriurem en l'apartat 4.4 com a increment de les resistències associades a β -lactàmics, el qual s'ha relacionat amb l'expressió de BLEA i/o cefamicinases.

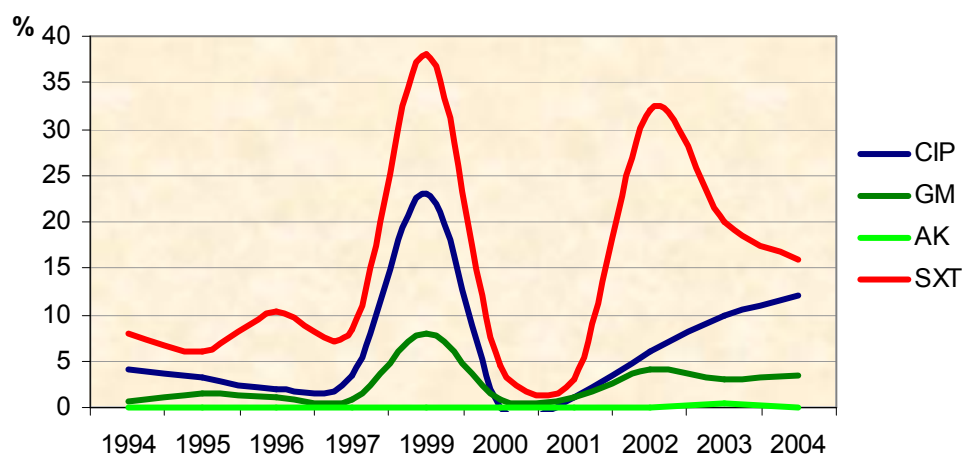


Figura 29. Evolució de la resistència a diferents antimicrobians en soques de *K. pneumoniae*. CIP: Ciprofloxacina; GM: Gentamicina; AK: Amikacina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazole

Taula 8. Percentatge de resistència en soques d' *E.coli*, *K. pneumoniae* i *K. oxytoca*

| Any | Nº Soques | AMP | AMC | IMP | AZT | CTX | CAZ | FEP | CIP | GM | AK | SXT |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|------|------|-----|------|------|-----|-----|------|-----|------|------|
| Percentatge de resistència de 21.885 soques d'<i>E. coli</i> | | | | | | | | | | | | |
| 1994 | 2.302 | 57,5 | 6,4 | 0 | 0,04 | 0,04 | 0,3 | - | 15,5 | 5,5 | 0 | 35 |
| 1995 | 2.476 | 62,2 | 4,6 | 0 | 0 | 0 | 0,3 | - | 16,6 | 6,5 | 0 | 43 |
| 1996 | 2.320 | 58 | 4,9 | 0 | 0,1 | 0,4 | 0,6 | - | 17 | 7,3 | 0,04 | 35,6 |
| 1997 | 2.816 | 58 | 4 | 0 | 0,8 | 2 | 3 | - | 21 | 8,4 | 0,04 | 38 |
| 1999 | 2.283 | 64 | 5 | 0 | 1 | 1 | 1 | - | 23 | 8 | 0 | 38 |
| 2000 | 1.034 | 64 | 4 | 0 | 0,4 | 0,5 | 0,8 | 0,1 | 19 | 7 | 0 | 34 |
| 2001 | 1.820 | 64 | 3,6 | 0 | 1,4 | 4,5 | 4 | 2 | 22 | 7,4 | 0 | 37 |
| 2002 | 2.109 | 68 | 8 | 0 | 2,5 | 4 | 1,5 | 0,5 | 25 | 7 | 0,5 | 45 |
| 2003 | 2.440 | 64 | 7,2 | 0 | 1,9 | 3,6 | 2 | 0,4 | 26 | 8 | 0,3 | 41 |
| 2004 | 2.285 | 65 | 5,6 | 0 | 4,7 | 4,7 | 4,7 | 4,2 | 27 | 9 | 0,4 | 37 |
| Percentatge de resistència de 2.091 soques de <i>K. pneumoniae</i> | | | | | | | | | | | | |
| 1994 | 171 | 100 | 4 | 0 | 1,1 | 0,5 | 0,5 | - | 4 | 0,6 | 0 | 8 |
| 1995 | 214 | 100 | 3,3 | 0 | 0 | 0,5 | 0 | - | 3,3 | 1,4 | 0 | 6 |
| 1996 | 196 | 100 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 2 | 1 | 0 | 10,4 |
| 1997 | 240 | 100 | 0,4 | 0 | 0 | 0,9 | 2,4 | - | 3,4 | 0,9 | 0 | 8,4 |
| 1999 | 214 | 100 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | - | 23 | 8 | 0 | 38 |
| 2000 | 111 | 100 | 0,9 | 0 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0 | 0 | 0,9 | 0 | 4,5 |
| 2001 | 181 | 100 | 3 | 0 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 0,5 | 1 | 1 | 0 | 3 |
| 2002 | 181 | 100 | 11 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 6 | 4 | 0 | 32 |
| 2003 | 288 | 100 | 6,3 | 0 | 4,2 | 4,5 | 4 | 2,5 | 10 | 3 | 0,4 | 20 |
| 2004 | 295 | 100 | 6,4 | 0 | 6,5 | 6,5 | 7 | 6 | 12 | 3,4 | 0 | 16 |
| Percentatge de resistència de 621 soques de <i>K. oxytoca</i> | | | | | | | | | | | | |
| 1994 | 49 | 100 | 8 | 0 | 4 | 2 | 0 | - | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 1995 | 43 | 100 | 25,6 | 0 | 11,6 | 2,3 | 0 | - | 6,9 | 0 | 0 | 13,9 |
| 1996 | 56 | 100 | 26,8 | 0 | 19,6 | 5,3 | 0 | - | 14,3 | 0 | 0 | 21,4 |
| 1997 | 67 | 100 | 28 | 0 | 28 | 24 | 19 | - | 22 | 7 | 0 | 22 |
| 1999 | 97 | 100 | 27 | 0 | 25 | 11 | 10 | - | 14 | 1 | 0 | 27 |
| 2000 | 61 | 100 | 15 | 0 | 15 | 6 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 18 |
| 2001 | 45 | 100 | 22 | 0 | 22 | 11 | 11 | - | 11 | 0 | 0 | 15,5 |
| 2002 | 68 | 100 | 33 | 0 | 25 | 7 | 3 | 7 | 22 | 0 | 0 | 42 |
| 2003 | 65 | 100 | 34 | 0 | 37 | 31 | 9 | 28 | 31 | 0 | 0 | 35 |
| 2004 | 70 | 100 | 44 | 0 | 44 | 44 | 0 | 44 | 27 | 0 | 0 | 7,5 |

AMP: Ampicil·lina; AMC: Amoxicil·lina-clavulànic; IMP: Imipenem; AZT: Aztreonam; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; GM: Gentamicina; AK: Amikacina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazole. L'any 1998 no es va fer registre de dades i l'any 2000 només es feu registre durant els mesos de gener a juliol.

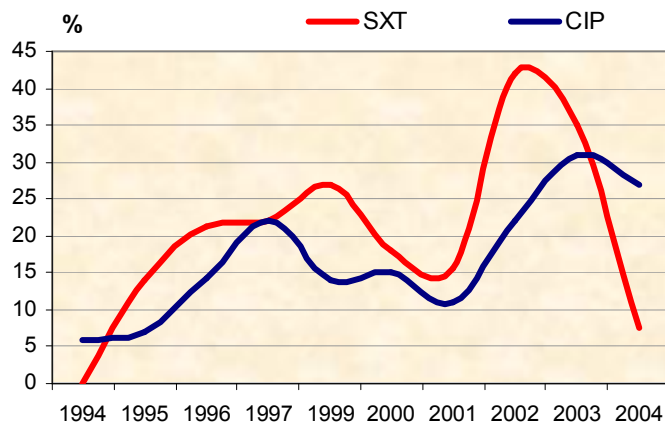


Figura 30. Evolució de la resistència a diferents antimicrobians en soques de *K. oxytoca*. CIP: Ciprofloxacina; SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazole

Les soques de *K. oxytoca* aïllades durant aquest decenni, resistents *per se* a ampicil·lina per l'expressió de la β -lactamasa cromosòmica Koxy, han presentat un increment de la resistència als β -lactàmics, concretament a amoxicil·lina-àcid clavulànic, aztreonam i a cefalosporines ja sigui per la hiperproducció de la Koxy (23%),

majoritàriament o, en molta menor mesura a la producció de BLEA, dues soques en 10 anys (Taula 8). Mentre que els valors per al trimetoprim-sulfametoxazole han anat fluctuant (Figura 30) i la resistència a aminoglicòsids és, pràcticament inexistent, excepte per un pic a gentamicina del 7% l'any 1997, sí s'observa, en canvi, un increment del percentatge de resistència a quinolones (0% vs 27%).

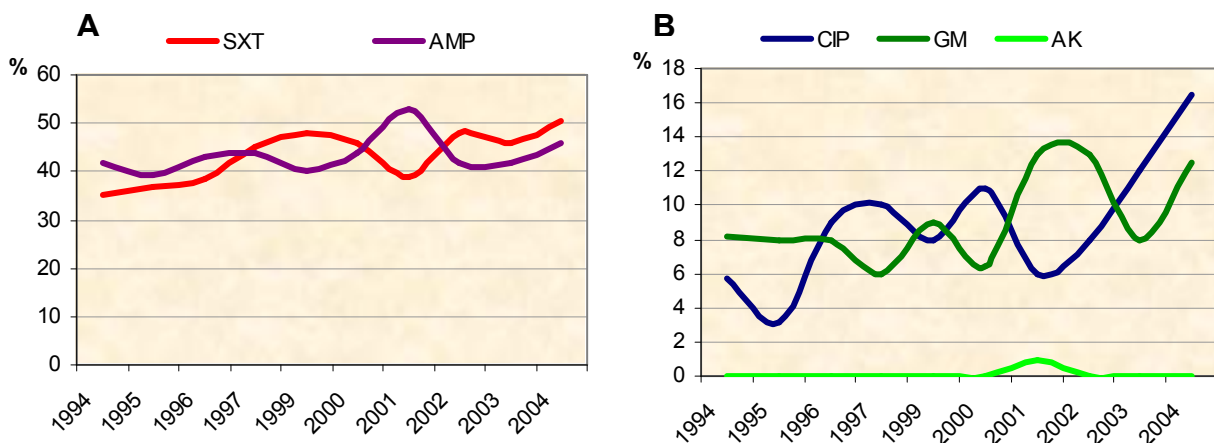


Figura 31. Evolució de la resistència a diferents antimicrobians en soques de *P. mirabilis*. **A:** Evolució de la resistència a ampicil·lina i trimetoprim-sulfametoxazole; **B:** Evolució de la resistència a quinolones i aminoglicòsids. SXT: Trimetoprim-sulfametoxazole; AMP: Ampicil·lina; CIP: Ciprofloxacina; GM: Gentamicina; AK: Amikacina

El perfil de sensibilitat de les soques de *P. mirabilis* és similar al de les d'*E.coli*. Un elevat percentatge de resistència a ampicil·lina per producció de penicilinil·lases (40%-53%) i a l'associació trimetoprim-sulfametoxazole (35%-50%). Cal destacar, però, l'augment del percentatge de resistència a amoxicil·lina-àcid clavulànic (0 al 5%), degut principalment a la producció de cefamicinases, les quals tal com venim dient explicarien també l'increment de la resistència a aminoglicòsids (13,2 al 16,5%) o a les quinolones (82,% vs 13%) (Figura 31).

Taula 9. Percentatge de resistència en 2.572 soques de *P. mirabilis*

| Any | Nº Soques | AMP | AMC | IMP | AZT | CTX | CAZ | FEP | CIP | GM | AK | SXT |
|------|-----------|------|-----|-----|-----|------|-----|------|------|------|-----|------|
| 1994 | 314 | 42 | 1,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 5,7 | 8,2 | 0 | 35 |
| 1995 | 313 | 39,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 3,2 | 8 | 0 | 36,7 |
| 1996 | 323 | 43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 9 | 8 | 0 | 38,4 |
| 1997 | 307 | 44 | 0,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 10 | 6 | 0 | 45 |
| 1999 | 280 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 8 | 9 | 0 | 48 |
| 2000 | 140 | 44 | 0,7 | 0 | 0 | 0,3 | 0,3 | - | 11 | 6,4 | 0 | 46 |
| 2001 | 201 | 53 | 1,4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 13 | 0,9 | 39 |
| 2002 | 178 | 42 | 5 | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 1 | 8 | 13 | 0 | 48 |
| 2003 | 267 | 42 | - | 0 | 0 | 0,25 | 0 | 0,75 | 12 | 8 | 0 | 46 |
| 2004 | 249 | 46 | 3,6 | 0 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0 | 16,5 | 12,5 | 0 | 50,6 |

AMP: Ampicil·lina; AMC: Amoxicil·lina-clavulànic; IMP: Imipenem; AZT: Aztreonam; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; GM: Gentamicina; AK: Amikacina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazole. L'any 1998 no es va fer registre de dades i l'any 2000 només es feu registre durant els mesos de gener a juliol.

La resta d'espècies avaluades: *E. cloacae*, *C. freundii* i *M. morganii* van presentar els patrons de resistència propis de les soques productores de β -lactamasa cromosòmica de classe C; aproximadament el 30% de soques d'*E.cloacae* i *C. freundii* van presentar un fenotip desreprimat, mentre que aquest percentatge va ser menor (7,5%) en *M. morganii*. Pel que fa a la resistència a quinolones, aminoglicòsids i trimetoprim-sulfametoxazole s'ha mantingut amb poques variacions al llarg d'aquests anys (Taula 10), essent *M. morganii* l'espècie més resistent de les tres citades prèviament.

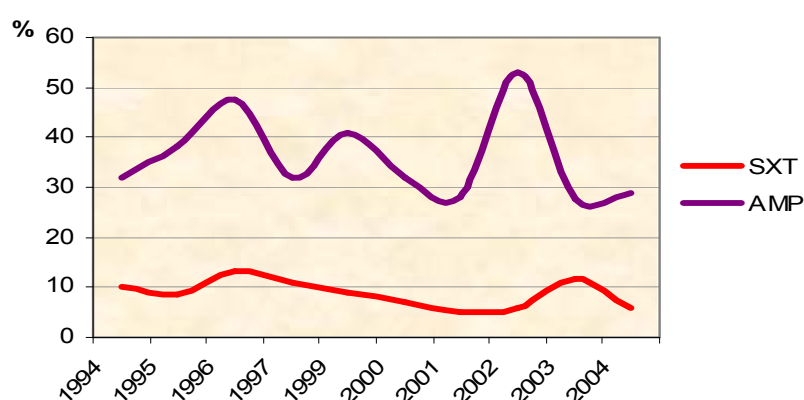
Taula 10. Percentatge de resistència en soques d'*E. cloacae*, *C. freundii* i *M. morgani*

| Any | Nº Soques | PIP | CTX | FEP | AZT | IMP | CIP | GM | AK | SXT |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|------|------|-----|------|-----|------|------|-----|------|
| Percentatges de resistència de 1.321 soques d'<i>E. cloacae</i> | | | | | | | | | | |
| 1994 | 120 | 27 | 27,5 | - | 27,5 | 0,8 | 2,5 | 0,8 | 0,8 | 4 |
| 1995 | 165 | 30 | 31,5 | - | 31,5 | 0 | 8 | 0,6 | 0,6 | 4 |
| 1996 | 168 | 34,5 | 30 | - | 30 | 1,8 | 3 | 4 | 0 | 7 |
| 1997 | 105 | 30 | 35 | - | 35 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| 1999 | 152 | 29 | 26 | - | 26 | 0 | 3 | 4 | 0 | 1 |
| 2000 | 57 | 23 | 23 | 0 | 23 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 2001 | 117 | 23 | 29 | 0 | 29 | 0 | 1,7 | 0 | 0 | 0 |
| 2002 | 143 | 34 | 37 | 0 | 37 | 0 | 5 | 0 | 0 | 15,5 |
| 2003 | 149 | 28 | 37 | 0 | 37 | 0 | 1,4 | 0 | 0 | 8 |
| 2004 | 145 | 30 | 28 | 0,7 | 28 | 0 | 1 | 1 | 0 | 5 |
| Percentatges de resistència de 400 soques de <i>C. freundii</i> | | | | | | | | | | |
| 1994 | 40 | 24 | 24 | - | 24 | 0 | 8 | 5 | 3 | 0 |
| 1995 | 47 | 30 | 32 | - | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| 1996 | 44 | 25 | 16 | - | 16 | 0 | 20 | 2,3 | 2,3 | 11 |
| 1997 | 81 | | 26 | - | 26 | 0 | 11 | 1 | 0 | 10 |
| 1999 | 35 | 23 | 29 | - | 29 | 0 | 6 | 0 | 0 | 3 |
| 2000 | 17 | 29 | 29 | 0 | 29 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 2001 | 25 | 36 | 28 | 0 | 28 | 0 | 4 | 0 | 0 | 8 |
| 2002 | 42 | 29 | 30 | 0 | 30 | 0 | 9,5 | 0 | 0 | 14 |
| 2003 | 23 | 48 | 30,5 | 0 | 30,5 | 0 | 4 | 0 | 0 | 13 |
| 2004 | 46 | 28 | 28 | 2 | 28 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Percentatges de resistència de 625 soques de <i>M. morgani</i> | | | | | | | | | | |
| 1994 | 65 | 10 | 4,6 | - | 4,6 | 0 | 12 | 12 | 0 | 35 |
| 1995 | 52 | 17 | 9 | - | 9 | 0 | 9 | 4,5 | 0 | 32 |
| 1996 | 49 | 8 | 2 | - | 2 | 0 | 8 | 10 | 0 | 39 |
| 1997 | 79 | | 16 | - | 16 | 0 | 21,5 | 2,5 | 0 | 40,5 |
| 1999 | 61 | 15 | 7 | - | 7 | 0 | 10 | 15 | 0 | 43 |
| 2000 | 33 | 15 | 9 | 0 | 9 | 0 | 6 | 12 | 0 | 33 |
| 2001 | 40 | 7,5 | 5 | 0 | 5 | 0 | 12,5 | 5 | 0 | 30 |
| 2002 | 66 | 14 | 9 | 0 | 9 | 0 | 18 | 18 | 0 | 36 |
| 2003 | 93 | 11 | 6,5 | 0 | 6,5 | 0 | 13 | 13 | 1 | 42 |
| 2004 | 87 | 11,5 | 6,9 | 1 | 6,9 | 0 | 10 | 19,5 | 0 | 39 |

AMP: Ampicil·lina; AMC: Amoxicil·lina-clavulànic; IMP: Imipenem; AZT: Aztreonam; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; CIP: Ciprofloxacina; GM: Gentamicina; AK: Amikacina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazole. L'any 1998 no es va fer registre de dades i l'any 2000 només es feu registre durant els mesos de gener a juliol.

Per últim, s'han estudiat 2.235 soques de *S. enterica* pertanyents a diferents serotips i productes patològics. La resistència a ampil·lina (Figura 32) en el cas de les salmonel·les es deu a la producció de penicil·lases. Cal recordar que les penicil·lases tipus OXA produeixen una sensibilitat disminuïda a l'associació amoxicil·lina-àcid clavulànic. Per tant les fluctuacions de les resistències a aquest antibiòtic depenen, en gran mesura, de la major o menor presència d'aquest tipus de β -lactamasa. No s'ha detectat pràcticament resistència a fluoroquinolones, mentre que la taxa de resistència a trimetoprim-sulfametoxazole manté una certa estabilitat (Taula 11).

Figura 32. Evolució de la resistència a diferents antimicrobians en soques de *S. enterica*. AMP: Ampicil·lina; SXT:Trimetoprim-sulfametoxazole



Taula 11. Percentatge de resistència en 2.235 soques de *Salmonella enterica*

| Any | Nº Soques | AMP | AMC | IMP | CTX | CIP | GM | SXT |
|------|-----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 1994 | 185 | 32 | 8 | 0 | 0 | 0 | 1,6 | 10 |
| 1995 | 184 | 38 | 8,1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 8,6 |
| 1996 | 210 | 47,6 | 5,7 | 0 | 0 | 0,9 | 1,9 | 13,3 |
| 1997 | 242 | 32 | 0,6 | 0 | 0,6 | 0 | 2 | 11 |
| 1999 | 355 | 41 | 0 | 0 | 0 | 0,6 | 2 | 9 |
| 2000 | 148 | 32 | 0,6 | 0 | 0,6 | 0 | - | 7 |
| 2001 | 290 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 5 |
| 2002 | 208 | 53 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 6 |
| 2003 | 182 | 27,5 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 2,7 | 11,5 |
| 2004 | 231 | 29 | 1,3 | 0 | 0,5 | 0 | 1,3 | 5,7 |

AMP: Ampicil·lina; AMC: Amoxicil·lina-clavulànic; IMP: Imipenem; CTX: Cefotaxima CIP: Ciprofloxacina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazole. L'any 1998 no es va fer registre de dades i l'any 2000 només es feu registre durant els mesos de gener a juliol.

4.2 Prevalença d'enterobacteris amb β -lactamases d'espectre ampliat i cefamicinases plasmídiques

Durant el decenni 1994-2004, en el laboratori de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, es van seleccionar, mitjançant la tècnica de disc-difusió, 330 soques d'enterobacteris que van presentar sensibilitat disminuïda a C3G i/o aztreonam i sinèrgia amb l'àcid clavulànic amb el fi de caracteritzar les β -lactamases d'espectre ampliat (BLEA). A més també es varen seleccionar 28 soques d'enterobacteris amb fenotip de cefamicinasa que presentaven resistència intermitja o total a amoxicil·lina-àcid clavulànic, cefotaxima, ceftazidima i/o cefoxitina segons les recomenacions del *CLSI* amb un test de sinèrgia amb l'àcid clavulànic, negatiu.

4.2.1 β -lactamases d'espectre ampliat

De 25.525 soques d'*E. coli* avaluades 284 expressaven un total de 303 BLEA. La distribució en aquest decenni de les BLEA es detalla a la taula 12. La prevalença, en aquests 10 anys, de soques d'*E. coli* que expressaven una BLEA fou del 1,11% (284/25.525). Havent-se trobat 19 soques que expressaven dos tipus de BLEA, les quals representen un 0,07% del total de soques (19/25.525). La freqüència de cada família de BLEA fou la següent: 2,3% de BLEA tipus TEM (7/303); 20,1% de BLEA tipus SHV (61/303) i 77,5% de BLEA tipus CTX-M (235/303) essent, aquestes darreres les de més prevalença amb un clar increment des de l'any 2001 (Figures 33 i 34).

Dins de cada família es van caracteritzar els següents enzims:

- **Tipus TEM** (7 soques): TEM-10 (2), TEM-12 (3), TEM-19 (1) i TEM-104 (1) distribuïdes en el temps tal com s'indica en la taula 12.
- **Tipus SHV** (61 soques): SHV-2 (14), SHV-12 (37; 19 de les quals també expressaven CTX-M-9) i 10 soques tipus SHV no seqüenciades (Taula 12).

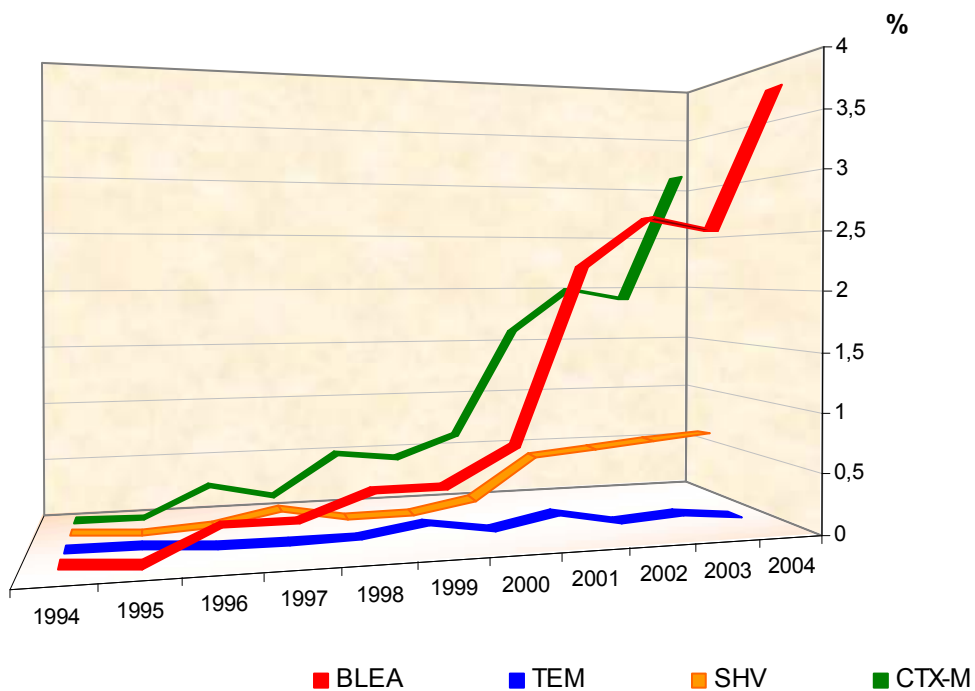


Figura 33. Evolució de la prevalença de BLEA en *E. coli*

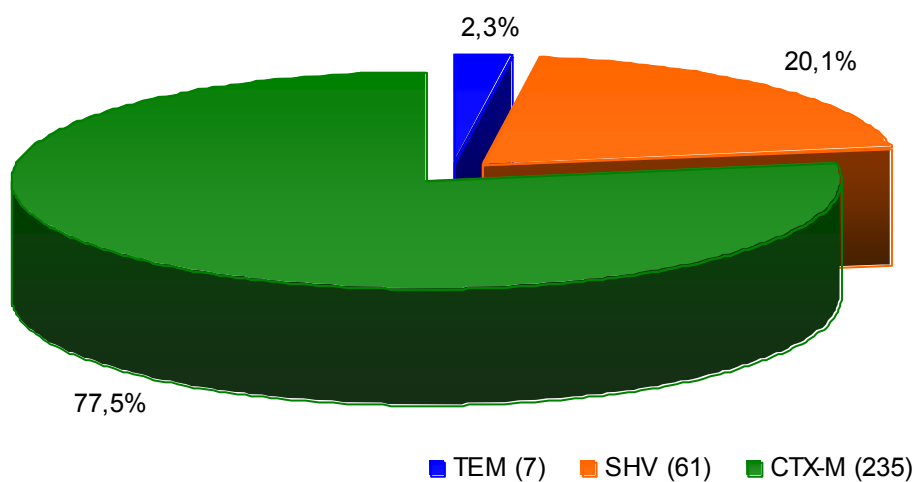


Figura 34. Percentatge de BLEA tipus TEM, SHV i CTX-M en *E. coli* (1994-2004)

- **Tipus CTX-M** (235 soques): CTX-M-9 (101; 19 de les quals també expressaven SHV-12), CTX-M-14 (113: 109 CTX-M-14a i 4 CTX-M-14b), CTX-M-1 (9), CTX-M-2 (1), CTX-M-3 (3), CTX-M-15 (5) i CTX-M-32 (3) (Taula 12).

Taula 12. Prevalença de BLEA en *E. coli* entre 1994 i 2004

| | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | TOTAL |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------|------------------------|
| Nº soques | 2.302 | 2.476 | 2.320 | 2.816 | 2.606 | 2.283 | 2.068 | 1.820 | 2.109 | 2.440 | 2.285 | 25.525 |
| TEM-10 | | | | | | 1 | | | | 1 | | 2 |
| TEM-12 | 1 | 1 | | | | 1 | | | | | | 3 |
| TEM-19 | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| TEM-104 | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| Total TEM | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 7 |
| TEM (%) | 0,04 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0,08 | 0 | 0,11 | 0 | 0,04 | 0 | 0,03 |
| SHV-2 | 1 | | 1 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 4 | | 14 |
| SHV-12 | | | | | | | 2 | 8* | 12** | 10 | 5*** | 37 |
| Total SHV | 1 | 0 | 1 | 4 | 1 | 1 | 3 | 9 | 12 | 14 | 15^a | 61 |
| SHV (%) | 0,04 | 0 | 0,04 | 0,14 | 0,04 | 0,04 | 0,14 | 0,5 | 0,56 | 0,6 | 0,65 | 0,23 |
| CTX-M-9 | | | 6 | 4 | 12 | 8 | 9 | 20* | 21** | 4 | 17*** | 101 |
| CTX-M-14 | | | | | | 1 | 4 | 6 | 17 | 36**** | 49 | 113 |
| CTX-M-1 | | | | | | | | 2 | 4 | | 3 | 9 |
| CTX-M-2 | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| CTX-M-3 | | | | | | 1 | | | | 1 | 1 | 3 |
| CTX-M-15 | | | | | | | | | | 4 | 1 | 5 |
| CTX-M-32 | | | | | | | | | 1 | 2 | | 3 |
| Total CTX-M | 0 | 0 | 6 | 4 | 12 | 10 | 13 | 29 | 43 | 47 | 71 | 235 |
| CTX-M (%) | 0 | 0 | 0,26 | 0,14 | 0,5 | 0,44 | 0,63 | 1,6 | 2 | 1,9 | 3,1 | 0,9 |
| BLEA Total | 2 | 1 | 7 | 8 | 13 | 13 | 16 | 40 | 55 | 62 | 86 | 303^b |
| Prevalença (%) | 0,08 | 0,04 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | 0,8 | 2,2 | 2,6 | 2,5 | 3,7 | 1,18 |

* 8 soques expressaven SHV-12 + CTX-M-9 ; ** 6 soques expressaven SHV-12 + CTX-M-9 ;*** 5 soques expressaven SHV-12 + CTX-M-9

**** 4 soques expressaven CTX-M-14b ; ^a aquestes BLEA només s'han identificat per PCR; ^b que representen 284 soques perquè 19 expressaven dues BLEA

De 2.437 soques de *K. pneumoniae*, 36 expressaven un total de 39 BLEA, la qual cosa suposa una prevalença de l'1,5% amb un lleu increment l'any 1999 i notable l'any 2004 (Figura 35). La seva distribució en aquest decenni es detalla en la taula 13. Les BLEA aïllades pertanyien a les famílies SHV i CTX-M, ambdues amb una freqüència similar (Figura 36).

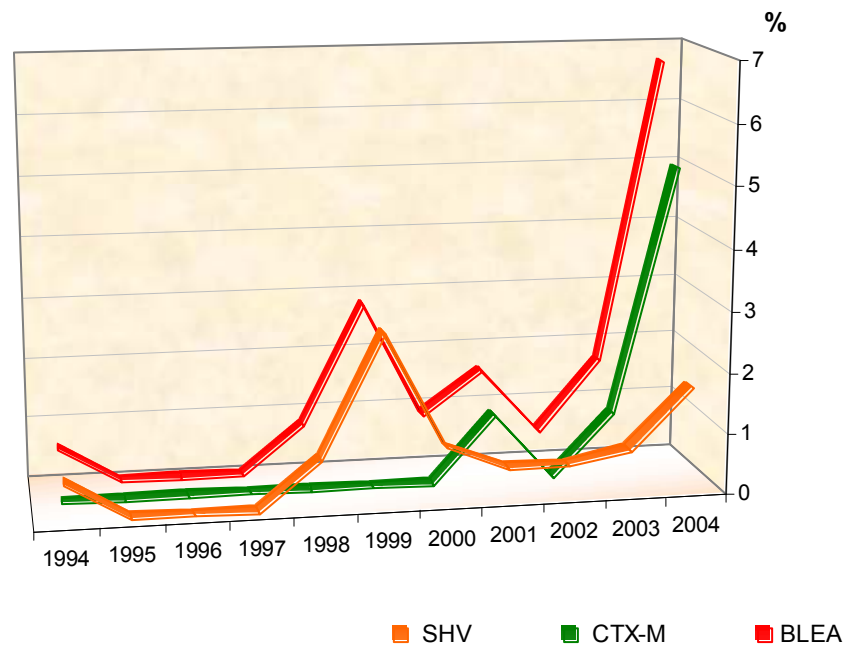


Figura 35. Evolució de la prevalença de BLEA en *K. pneumoniae*

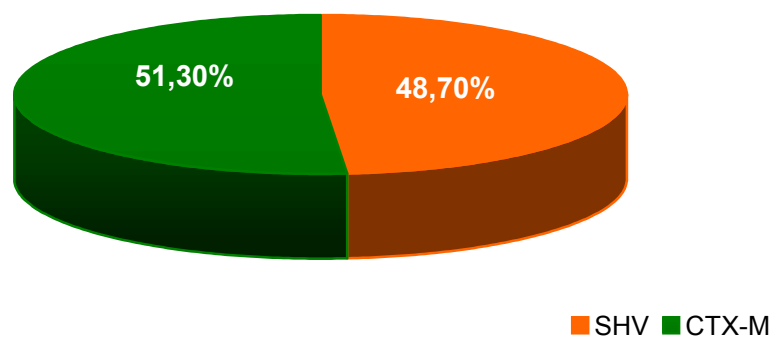


Figura 36. Percentatge de BLEA tipus SHV i CTX-M en *K. pneumoniae* (1994-2004)

- **Tipus SHV** (19 soques): SHV-2 (13), SHV-12 (4, tres de les quals també expressaven CTX-M-9) i 2 de la família SHV no seqüenciades distribuïdes temporalment tal com s'indica en la taula 13.
- **Tipus CTX-M** (20 soques): CTX-M-1 (11), CTX-M-3 (3), CTX-M-9 (5, de les quals 3 soques també expressaven SHV-12) i CTX-M-14 (1) distribuïdes temporalment tal com s'indica en la taula 13.

Taula 13. Prevalença de BLEA en *K. pneumoniae* entre 1994 i 2004

| Nº soques | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | TOTAL |
|--------------------|------------|----------|----------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|----------------------|-----------------------|
| SHV-2 | 1 | | | | 2 | 6 | 1 | 1 | | 2 | | 13 |
| SHV-12 | | | | | | | | | 1 | | 3* | 4 |
| Total SHV | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 | 1 | 1 | 1 | 2 | 5^a | 19 |
| SHV (%) | 0,6 | 0 | 0 | 0 | 0,8 | 2,8 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,7 | 1,7 | 0,8 |
| CTX-M-1 | | | | | | | | 1 | | 2** | 8 | 11 |
| CTX-M-3 | | | | | | | | | | | 3 | 3 |
| CTX-M-9 | | | | | | | | 1 | | | 4* | 5 |
| CTX-M-14 | | | | | | | | | | 1 | | 1 |
| Total CTX-M | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 15 | 20 |
| CTX-M (%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,1 | 0 | 1,04 | 5,1 | 0,82 |
| BLEA Total | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 6 | 1 | 3 | 1 | 5 | 20 | 39^b |
| Prevalença | 0,6 | 0 | 0 | 0 | 0,8 | 2,8 | 0,4 | 1,6 | 0,5 | 1,7 | 6,7 | 1,6 |

* 3 presenten CTX-M-9 + SHV-12 ** una soca també produeix una CMY-2

^a aquestes BLEA només s'han identificat per PCR

^b que representen 36 soques perquè 3 expressaven dues BLEA

L'expressió de BLEA en altres espècies d'enterobacteris aïllades en aquest decenni en el nostre hospital ha estat anecdòtica, de fet es van començar a aïllar a partir de 1997 i caldria destacar un major nombre d'aïllaments l'any 2004.

De 2.699 soques de *S. enterica*, 4 (0,15%) van expressar una BLEA. També s'han aïllat soques portadores de BLEA en *P. mirabilis* (0,03%, 1/2.992), *C. freundii* (0,2%, 1/489), *E. cloacae* (0,06%, 1/1.539), *M. morgani* (0,13%, 1/763) i *K. oxytoca*

(0,3%, 2/763). La seva distribució i prevalença en aquest decenni es detalla en la taula 14.

Taula 14. Prevalença de BLEA en diferents espècies d'enterobacteris entre 1994 i 2004

| | 1997 | | 2002 | 2003 | 2004 | TOTAL ^a |
|----------------------------|------------|-------|-------------|------------|------------|--------------------|
| <i>S. enterica</i> | 242 | | 208 | 182 | 231 | 2.699 |
| CTX-M-9 | 1 | | | 2 | | 3 |
| CTX-M-14 | | | | | 1 | 1 |
| BLEA TOTAL | 1 | | | 2 | 1 | 4 |
| Prevalença (%) | 0,4 | | | 1,1 | 0,4 | 0,15 |
| <i>P. mirabilis</i> | 307 | | 178 | 267 | 249 | 2.992 |
| CTX-M-1 | | | 1 | | | 1 |
| BLEA TOTAL | | | 1 | | | 1 |
| Prevalença (%) | | | 0,56 | | | 0,03 |
| <i>C. freundii</i> | 81 | | 42 | 23 | 46 | 489 |
| CTX-M-9 | | | | | 1 | 1 |
| BLEA TOTAL | | | | | 1 | 1 |
| Prevalença (%) | | | | | 2,1 | 0,2 |
| <i>E. cloacae</i> | 105 | | 143 | 149 | 145 | 1.539 |
| CTX-M-9 | | | | | 1 | 1 |
| BLEA TOTAL | | | | | 1 | 1 |
| Prevalença (%) | | | | | 0,6 | 0,06 |
| <i>M. morgani</i> | 79 | | 66 | 93 | 87 | 763 |
| CTX-M-32 | | | | | 1 | 1 |
| BLEA TOTAL | | | | | 1 | 1 |
| Prevalença (%) | | | | | 1,1 | 0,13 |
| <i>K. oxytoca</i> | 67 | | 68 | 65 | 70 | 763 |
| CTX-M-9 | | | | | 1 | 1 |
| CTX-M-32 | | | | 1 | | 1 |
| BLEA Total | | | | 1 | 1 | 2 |
| Prevalença (%) | | | | 1,5 | 1,4 | 0,3 |

..... anys en els que no s'ha aïllat cap enterobacteri portador de BLEA

^a es contabilitzen tots els bacteris aïllats d'aquella espècie en el període 1994-2004

Analitzant globalment les BLEA que hem caracteritzat durant aquest decenni i, amb independència del microorganisme, cal destacar l'alta prevalença en el nostre hospital de les BLEA tipus CTX-M (75,3%, 265/352) en front les BLEA tipus SHV (22,7%, 80/352) i les tipus TEM (2%, 7/352). Centrant-nos en les β -lactamases del tipus CTX-M, les més prevalents van ser les del grup de la CTX-M-9 (85,6%) seguides a distància per les BLEA dels grups de les CTX-M-1 i CTX-M-2 amb una prevalença del 14% i del 0,4%, respectivament (Figura 37).

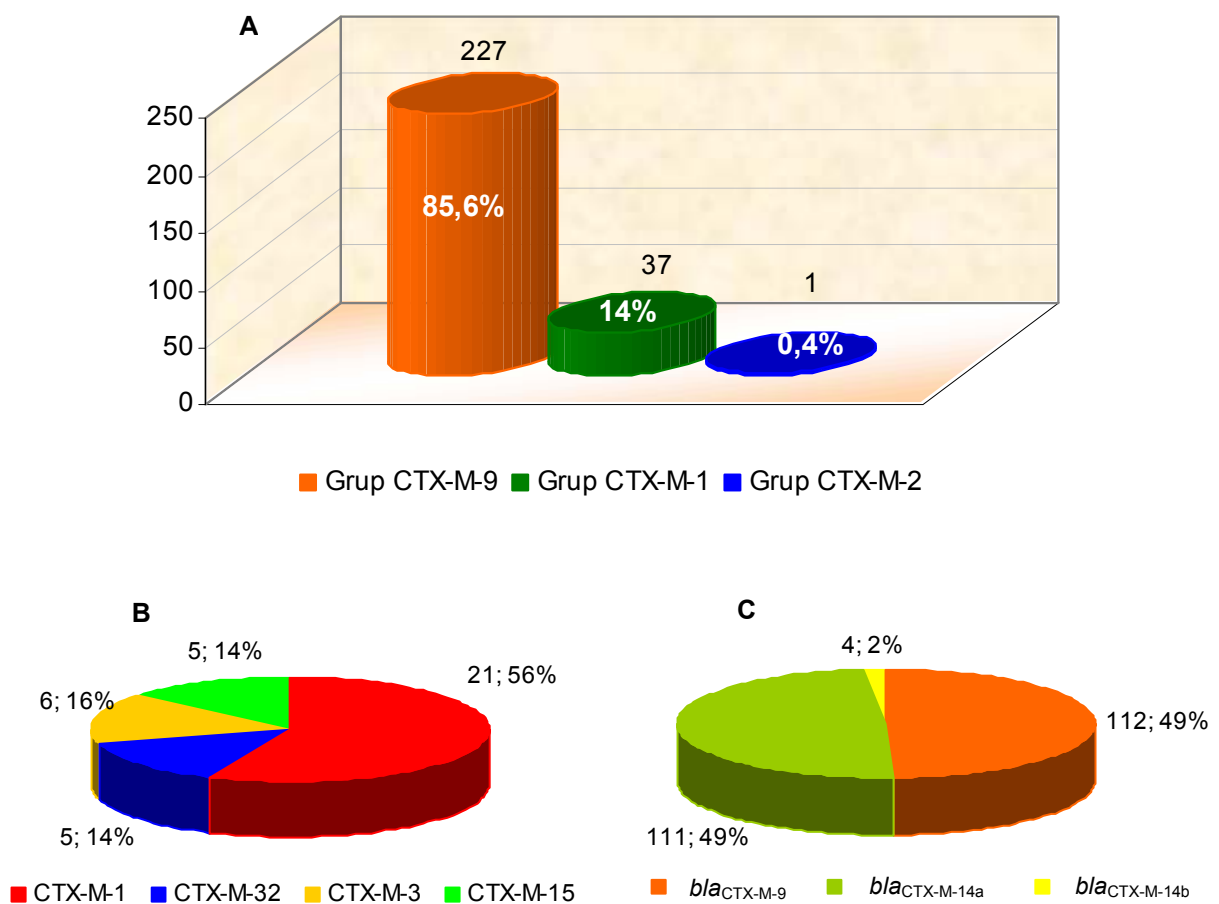


Figura 37. Gràfiques representatives de les BLEA tipus CTX-M detectades entre 1994-2004 en els enterobacteris estudiats. **A:** Percentatge de les diferents famílies d'enzims CTX-M; **B:** Percentatge de BLEA del grup CTX-M-1; **C:** Percentatge de BLEA del grup CTX-M-9

Les BLEA detectades en el grup majoritari, el CTX-M-9, varen ser les següents: CTX-M-9 (112 soques); CTX-M-14 (111 soques foren portadores del gen *bla*_{CTX-M-14a}, i 4 del gen *bla*_{CTX-M-14b}) i en el grup CTX-M-1 es van distribuir de la següent manera: CTX-M-1 (21 soques), CTX-M-3 (6 soques) CTX-M-32 (5 soques) i CTX-M-15 (5 soques) (Figura 37).

4.2.2 Cefamicinases

En aquest període s'han aïllat 28 soques que expressaven una cefamicinasa aïllades en les següents espècies: *E. coli* (21 soques), *K. pneumoniae* (3), *S. enterica* serovar Mikawasima (1) i *P. mirabilis* (3) tal com es representa en la taula 15. Totes les soques van expressar la cefamicinasa CMY-2, excepte una soca d'*E. coli* que produïa una ACC-1.

Taula 15. Prevalença de cefamicinases en diferents espècies d'enterobacteris entre 1999 i 2004

| | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | TOTAL |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| <i>E. coli</i> | 2.283 | 2.068 | 1.820 | 2.109 | 2.440 | 2.285 | 13.005 |
| CMY-2 | 1 | 6 | 1 | 1 | 3 | 8 | 20 |
| ACC-1 | | | | | | 1 | 1 |
| Total cefamicinases | 1 | 6 | 1 | 1 | 3 | 9 | 21 |
| Prevalença % | 0,04 | 0,3 | 0,05 | 0,04 | 0,12 | 0,4 | 0,16 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 214 | 222 | 181 | 181 | 288 | 295 | 1.381 |
| CMY-2 | | 1 | 1 | | | 1 | 3 |
| Total cefamicinases | | 1 | 1 | | | 1 | 3 |
| Prevalença % | | 0,45 | 0,55 | | | 0,34 | 0,22 |
| <i>S. enterica</i> | 355 | 296 | 290 | 208 | 182 | 231 | 1.562 |
| CMY-2 | 1 | | | | | | 1 |
| Total cefamicinases | 1 | | | | | | 1 |
| Prevalença % | 0,3 | | | | | | 0,07 |
| <i>P. mirabilis</i> | 280 | 280 | 201 | 178 | 267 | 249 | 1.455 |
| CMY-2 | | 1 | | | | 2 | 3 |
| Total cefamicinases | | 1 | | | | 2 | 3 |
| Prevalença % | | 0,3 | | | | 0,8 | 0,2 |

4.3 Trets clínics de les soques amb β -lactamasa d'espectre ampliat o cefamicinasa

Les soques d'*E. coli* que expressaven una BLEA es van aïllar d'orines (66,5%, 189/284, 104 de les quals eren d'origen extrahospitalari i 85 intrahospitalari), sang (12,8%, 36/284), ferides (9,8%, 28/284), mostres respiratòries (2,5%, 7/284), catèters (2,1%, 6/284) i altres mostres (6,3%, 18/284) essent aquestes mostres: abscess pèlvic (2), bilis (3), líquid intraabdominal (1), líquid ascític (7), drenatge (2), abscess (1), exsudat vaginal (1) i exsudat uretral (1) (Figura 38).

Cal dir que el criteri que vam aplicar per a classificar les mostres per la seva procedència en intra i extrahospitalàries era el del servei que constava en la petició, essent conscients de la limitació d'aquesta informació.

Les soques de *K. pneumoniae* que expressaven una BLEA es van aïllar d'orines (72,2%, 26/36), sang (8,3%, 3/36), ferides (11,1%, 4/36) i mostres respiratòries (8,3%, 3/36) (Figura 38).

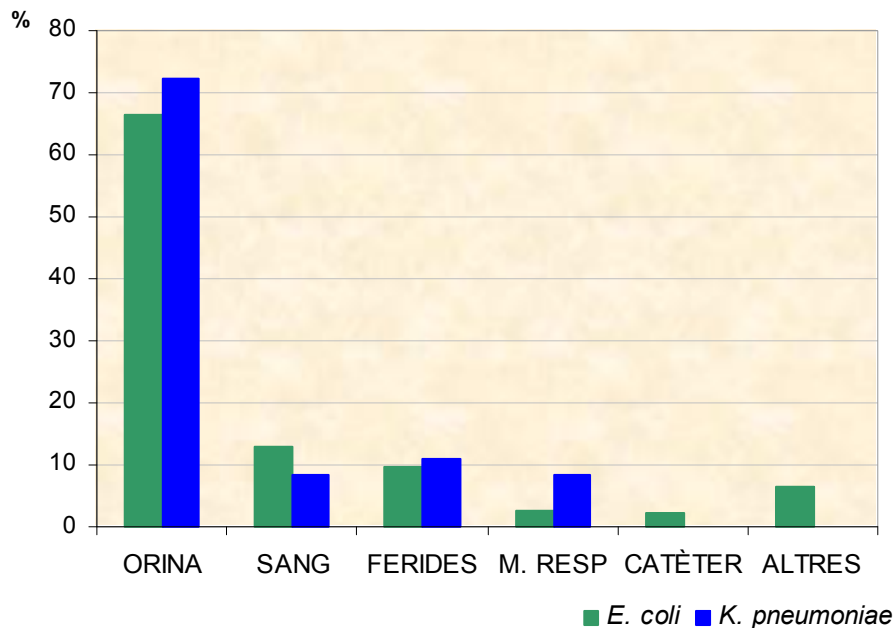


Figura 38. Distribució de les mostres en *E. coli* i *K. pneumoniae*

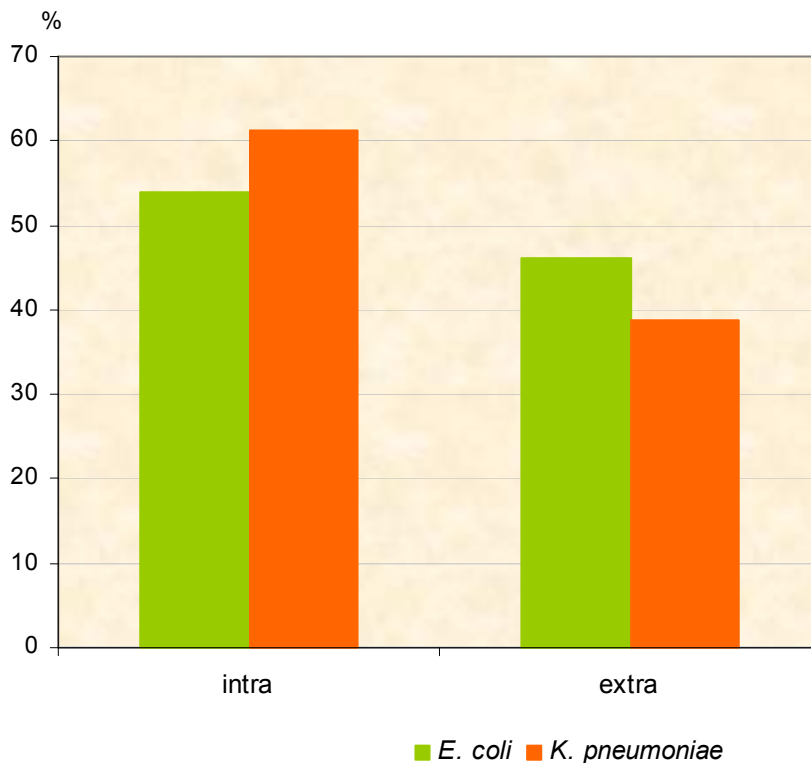


Figura 39. Percentatge de procedència de les mostres

El 53,9% de les mostres en les que es van aïllar soques d'*E. coli* portadores de BLEA eren intrahospitalàries; mentre que aquest percentatge s'elevava fins al 61,2% en les mostres on s'aïllaren soques de *K.pneumoniae* portadores de BLEA (Figura 39).

En *S. enterica* les BLEA s'aïllaren de femta (3 soques) i sang (1). Les BLEA aïllades de *P. mirabilis*, *C. freundii* i *M. morgani* procedien totes elles d'orina d'origen extrahospitalari. En *E. cloacae* d'un catèter d'origen intrahospitalari i en *K. oxytoca* de dos hemocultius essent ambdues mostres d'origen intrahospitalari.

Les soques d'*E. coli* que expressaven una cefamicinasa (21 soques) es van aïllar d'orina (17), sang (3) i ferida (1) i el seu origen era extrahospitalari en un 62% del casos degut a que la majoria s'aïllaren d'orines (12/17). Les soques de *K. pneumoniae* (3 soques) que expressaven una cefamicinasa, s'aïllaren d'una orina, d'una sang i d'una ferida essent intrahospitalàries dos dels tres casos (l'hemocultiu i l'orina). En *P. mirabilis* (3 soques) les cefamicinases es van aïllar en dues orines d'origen extrahospitalari i en una ferida d'origen intrahospitalari. Finalment, la soca de *S. enterica* que expressava una cefamicinasa es va aïllar d'una femta de procedència extrahospitalària.

4.4 Resistències associades dels antibiòtics no β -lactàmics a la producció de β -lactamasa d'espectre ampliat o cefamicinasa

4.4.1 Soques que expressaven β -lactamases d'espectre ampliat

Una de les característiques del mecanisme de resistència per producció de BLEA i cefamicinasa és que va associat a d'altres mecanismes que confereixen resistència a d'altres antibiòtics. A part dels β -lactàmics, a les soques portadores de BLEA o cefamicinasa se'ls va fer un antibiograma per veure les resistències a d'altres antimicrobians, resistències associades; els antimicrobians testats van ser gentamicina, tobramicina, amikacina, trimetoprim-sulfametoxazole, cloramfenicol, àcid nalidíxic, ciprofloxacina i tetraciclina.

Per a les soques productores de BLEA es va obtenir que un 13,6% (43/317) eren resistents a gentamicina, 12,1% (38/313) a tobramicina, 3,8% (12/316) a amikacina, 51,9%(164/316) a trimetoprim-sulfametoxazole, 34,8% (104/299) a cloramfenicol, 35% (111/317) a ciprofloxacina, 84% (167/299) a àcid nalidíxic i 55,7% (161/289) a tetraciclina.

Pel que fa a les soques productores de cefamicinases es va trobar que un 67,8% eren resistents a gentamicina (19/28), 60,7% (17/28) a tobramicina, 57,1% (16/28) a trimetoprim-sulfametoxazole, 85,2% (23/27) a cloramfenicol, 50% (14/28) a ciprofloxacina i un 77,7% (21/27) a àcid nalidíxic. Totes les soques van ser resistents a tetraciclina i no es va trobar cap soca resistent a amikacina.

Si ho desglossem en funció de la BLEA caracteritzada, el percentatge de resistència als antibiòtics no β -lactàmics, així com els de patrons de resistència associats que van presentar les set soques d'*E. coli* amb enzims tipus TEM, mostra l'absència total de resistència als aminoglicòsids. Els resultats es mostren en la taula 16.

Taula 16. Patrons de resistència associada en les soques que expressaven BLEA de la família TEM

| Nº soca | ANY | BLEA | GM | TOB | AK | NAL | CIP | SXT | TE | CL |
|----------------------|------|---------|----------|----------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 333-D | 1994 | TEM-12 | S | S | S | R | R | R | R | R |
| 588-D | 1995 | TEM-12 | S | S | S | R | S | R | S | S |
| 1365-D | 1999 | TEM-12 | S | S | S | R | R | R | S | S |
| 1401-D | 1999 | TEM-10 | S | S | S | R | R | R | R | R |
| N0009 | 2003 | TEM-10 | S | S | S | R | R | R | R | R |
| 1862-D | 2002 | TEM-19 | S | S | S | S | S | S | R | S |
| 1740-D | 2002 | TEM-104 | S | S | S | R | R | R | R | S |
| % Resistència | | | 0 | 0 | 0 | 85,7 | 71,4 | 85,7 | 71,4 | 42,8 |

GM: Gentamicina; TOB: Tobramicina; AK: Amikacina; NAL: Àcid nalidíxic; CIP: Ciprofloxacina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazole; TE: Tetraciclina; CL: Cloramfenicol

Taula 17. Resistència de les soques que expressaven diferents BLEA

| | GM | TOB | AK | NAL | CIP | SXT | TE | CL |
|-----------------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| SHV-2 (n= 27) | 1/27 3,7 | 1/27 3,7 | 0/27 0 | 10/18 55,5 | 7/27 25 | 6/27 22,2 | 14/19 73,4 | 7/23 30,4 |
| SHV-12 (n= 19) | 6/19 31,6 | 5/18 27,7 | 1/19 5,2 | 16/18 88,8 | 12/19 63,1 | 12/19 63,1 | 11/19 57,9 | 10/18 55,5 |
| SHV-12 + CTX-M-9 (n= 22) | 16/21 76,2 | 15/20 75 | 6/21 28,6 | 13/20 65 | 2/21 9,5 | 13/21 62 | 17/19 89,5 | 11/16 68,7 |
| CTX-M-9 (n= 91) | 13/91 14,3 | 8/89 9 | 4/90 4,4 | 62/84 73,8 | 40/91 44 | 72/90 80 | 58/73 79,5 | 23/89 25,8 |
| CTX-M-14 (n= 115) | 3/115 2,6 | 4/115 3,5 | 0/115 0 | 30/115 26,1 | 21/115 18,2 | 30/115 26,1 | 31/114 27,2 | 33/110 30 |
| Grup CTX-M-1 (n= 37) | 4/37 10,8 | 5/37 13,5 | 1/37 2,7 | 30/37 81 | 24/37 64,8 | 25/37 67,5 | 25/36 69,4 | 17/36 47,2 |

Soques resistents/ Soques estudiades (no totes van ser estudiades) % de resistents
 GM: Gentamicina; TOB: Tobramicina; AK: Amikacina; NAL: Àcid nalidíxic; CIP: Ciprofloxacina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazole; TE: Tetraciclina; CL: Cloramfenicol

Si ens fixem en les altres famílies de BLEA (Taula 17) podem observar una elevada resistència a tetraciclina i cloramfenicol, així com a quinolones, sobretot en soques portadores de SHV-12 i CTX-M-1. i al trimetoprim-sulfametoxazole en

soques portadores de CTX-M-9 per la presència de l'integró In60. També és interessant observar que la presència de les dues BLEA, CTX-M-9 i SHV-12 va associada freqüentment (7/17) a la resistència a gentamicina i tobramicina, resistència a aminoglicòsids no tant freqüent en les soques portadores d'un o de l'altre enzim.

Tanmateix, no s'ha obtingut un patró de multiresistència predominant (Taula 18). En les soques portadores de SHV-2 s'han trobat 13 patrons de multiresistència associada però no n'hi havia cap que prevalgués. En les soques portadores de SHV-12 també s'han trobat 13 patrons, cap predominant, i dues soques sense cap altra resistència que no fos als betalactàmics.

En les soques portadores dels gens *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-14a} i *bla*_{CTX-M-1} s'han trobat 18, 20 i 16 patrons de multiresistència associada, respectivament, els quals engloben la resistència a cotrimoxazol, quinolones i tetraciclina, tal com s'ha citat anteriorment. És curiós que el patró de resistència associada en les soques productores de CTX-M-1 també inclou el cloramfenicol, i que cap de les tres soques que expressen el gen *bla*_{CTX-M-14b} presenta la resistència a tetraciclina.

4.4.2 Soques que expressaven cefamicinases

Les 27 soques que expressaven CMY-2 van ser sensibles a amikacina i resistents a tetraciclina (Taula 19)

Taula 18. Sensibilitat de 27 soques que expressaven CMY-2

| GM | TOB | AK | NAL | CIP | SXT | TE | CL |
|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 19/27 | 16/27 | 0/27 | 20/26 | 13/27 | 16/27 | 27/27 | 23/26 |
| 70,4 | 59,2 | 0 | 77 | 48,1 | 59,2 | 100 | 88,5 |

Soques resistents/ Soques estudiades % de resistents
 GM: Gentamicina; TOB: Tobramicina; AK: Amikacina; NAL: Àcid nalidíxic; CIP: Ciprofloxacina; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazole; TE: Tetraciclina; CL: Cloramfenicol

Taula 19. Patrons de resistències associades en soques que expressaven BLEA

| PATRONS DE RESISTÈNCIA | SHV-2 | SHV-12 | CTX-M-9 | SHV-12 + CTX-M-9 | <i>bla</i> _{CTX-M-14a} | <i>bla</i> _{CTX-M-14b} | CTX-M-1t |
|--------------------------------|-------|--------|---------|------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------|
| GM, TOB, NAL, CIP, SXT, TE, CL | | 2 | 1 | | 1 | | |
| GM, TOB, NAL, CIP, SXT, TE | 1 | 1 | 1 | | 1 | | 1 |
| GM, TOB, NAL, CIP, SXT, CL | | | 1 | | | | 1 |
| GM, TOB, NAL, CIP | | 1 | | | | | 1 |
| GM, TOB, NAL, CIP, TE, CL | | | | | | | 1 |
| GM, TOB, NAL, CIP, CL | | | | | 1 | | |
| GM, TOB, NAL, SXT, TE, CL | | | 2 | 7 | 2 | | |
| GM, TOB, NAL, TE | | | | 2 | | | |
| GM, TOB, SXT, TE, CL | | | 1 | 1 | | | |
| GM, TOB, TE | | | | 2 | | | |
| GM, NAL, CIP, SXT, TE, CL | | | 2 | | | | |
| GM, NAL, CIP, SXT, TE | | | 2 | | 1 | | |
| GM, NAL, CIP, TE | | | | | 1 | | |
| TOB, NAL, CIP, SXT, TE | | | | | | | 2 |
| TOB, NAL, CIP, SXT, TE, CL | | | | | 1 | | |
| GM, SXT, TE | | | | | 1 | | |
| NAL, CIP, SXT, TE, CL | | 1 | 10 | 1 | 4 | | 11 |
| NAL, CIP, SXT, TE | | | 11 | | 13 | | 3 |
| NAL, CIP, SXT, CL | 1 | 2 | 1 | | 1 | | 2 |
| NAL, CIP, SXT | 1 | | 1 | | 3 | 2 | 1 |
| NAL, CIP, TE | 2 | 2 | | | 12 | | |
| NAL, CIP, TE, CL | 1 | | | | | | |
| NAL, CIP | | 1 | | | 8 | | 2 |
| NAL, SXT, TE, CL | | 1 | 3 | | 4 | | 1 |
| NAL, SXT, TE | 1 | | 7 | | 3 | | 1 |
| NAL, SXT, CL | | 1 | | 2 | | | |
| NAL, TE, CL | | | | | 1 | | 1 |
| NAL, SXT | | 1 | | | | 1 | |
| NAL, TE | 1 | 1 | 3 | | 10 | | 1 |
| NAL, CL | 2 | 1 | 1 | | | | |
| SXT, TE, CL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| SXT, TE | 1 | | 6 | | 1 | | 2 |
| TE | 3 | | 1 | 1 | | | 1 |
| TE, CL | 1 | | | | | | |
| CL | 1 | | | | | | |

Pel que fa als patrons associats de resistència se'n van aïllar de variats i el que es va repetir amb més freqüència fou gentamicina, tobramicina, àcid nalidíxic, trimetoprim-sulfametoxazole, tetraciclina, cloramfenicol, amb o sense ciprofloxacina (28%, 7/25) (Taula 20).

La soca que expressava ACC-1 presentava resistència a tobramicina, àcid nalidíxic, ciprofloxacina i tetraciclina.

Taula 20. Patrons de resistència de les soques que expressaven CMY-2

| Resistències associades | Nº soques |
|--------------------------------|-----------|
| GM, TOB, NAL, CIP, SXT, TE, CL | 4 |
| GM, TOB, NAL, SXT, TE, CL | 3 |
| GM, TOB, NAL, CIP, TE, CL | 3 |
| GM, TOB, TE, CL | 3 |
| GM, TOB, SXT, TE, CL | 2 |
| NAL, CIP, TE, CL | 2 |
| NAL, CIP, SXT, TE, CL | 1 |
| NAL, SXT, TE, CL | 2 |
| GM, SXT, TE, CL | 1 |
| GM, NAL, SXT, TE, | 1 |
| GM, NAL, CIP, SXT, TE, CL | 1 |
| NAL, TE, CL | 1 |
| SXT, TE | 1 |

DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

L'emergència de la resistència als antimicrobians entre els patògens adquirits en la comunitat, així com en l'àmbit hospitalari, s'ha convertit en un problema global que representa un gran desafiament quan l'objectiu és aconseguir l'èxit terapèutic en les infeccions bacterianes.

Els membres de la família *Enterobacteriaceae* són importants agents causants tant d'infecció nosocomial com adquirida en la comunitat. En la darrera dècada, aquesta emergència de la resistència s'ha vist augmentada dràsticament entre aquests patògens, fet que, com d'altres autors arreu del món,^{24, 73-75} hem constatat en aquesta tesi.

Els principals problemes de la resistència que presenten els enterobacteris i que incideix sobre les pautes clíniques a seguir és la producció de BLEA, principalment en soques d'*E. coli* i *Klebsiella*; la desrepressió de la β -lactamasa cromosòmica de *C. freundii* i *Enterobacter* i la resistència a fluoroquinolones deguda a alteracions en les topoisomerases.⁷⁴

A l'hora d'analitzar les dades de sensibilitat cal tenir en compte la resistència natural de cada espècie.⁷⁶ Així, es poden analitzar conjuntament les espècies d'*Enterobacter*, *Citrobacter* i *Morganella*, que presenten la β -lactamasa cromosòmica de classe C, la qual pot desreprimir-se i conferir resistència a la pràctica totalitat de β -lactàmics amb l'excepció de les cefalosporines de quarta generació i els carbapenems. La resistència a cefepime (C4G) ens insinua la presència d'una BLEA. En aquest estudi al voltant d'un 30% de soques d'*E. cloacae* i *C. freundii* mostraren un fenotip de desrepressió, essent menor en el cas de *M. morganii* (7,5%). Aquestes dades són més elevades que les trobades en estudis anteriors.⁷⁷

Per altra banda, tenim les soques d'*E. coli*, que també presenten la β -lactamasa cromosòmica de classe C però en aquest cas, per reorganitzacions en el promotor del gen, només s'expressa a nivells basals no conferint cap tipus de

resistència natural als β -lactàmics. És per això que la major part de la resistència a l'ampicil·lina es deu a la producció de penicilinil·lases, encara que en un estudi previ es trobà un 54,5% de soques hiperproductores.⁷⁸ La hiperproducció de l'AmpC confereix un fenotip de resistència similar al que s'obté quan la soca produeix cefamicinases.⁶⁶ Ambdós mecanismes, la hiperproducció i la presència de cefamicinases explicarien el percentatge de resistència a l'amoxicil·lina-àcid clavulànic, encara que no s'ha de menysprear la presència de β -lactamases resistents als inhibidors de tipus TEM que durant el període de 1996 a 1998 fou del 7%.⁷⁹

Després vindrien les espècies de *K. pneumoniae* i *K. oxytoca*, ambdues naturalment resistents a ampicil·lina per la presència d'una β -lactamasa cromosòmica. En *K. pneumoniae* s'han descrit tres famílies de β -lactamases cromosòmiques, la SHV (on hi ha la SHV-1 i la SHV-11), la LEN i la OKP, que confereixen resistència a les penicil·lines i cefalosporines de primera generació.⁸⁰ En *K. oxytoca* trobem la Koxy; de la qual s'han descrit 4 subtipus (K1 a K4).⁸¹ Curiosament però, *K. pneumoniae* és una espècie capaç d'adquirir amb certa facilitat diferents mecanismes de resistència, a més de ser causant d'importants brots nosocomials per soques multiresistents, en canvi, *K. oxytoca* manté com a principal mecanisme de resistència a β -lactàmics la hiperproducció de la Koxy amb valors que es troben al voltant del 14%.⁷⁸

Per últim hi ha les espècies de *P. mirabilis* i *S. enterica* que no presenten cap tipus de β -lactamasa en el seu cromosoma i, per tant, tota la resistència a β -lactàmics és adquirida. Diversos són els treballs que han caracteritzat els mecanismes de resistència a β -lactàmics en *P. mirabilis* i tenen en comú l'adquisició de penicilinil·lases i de penicilinil·lases resistents als inhibidors, així com darrerament s'ha descrit la presència de BLEA i cefamicinases.⁸²⁻⁸⁵

En el cas de *Salmonella* la resistència a ampicil·lina es deu a la producció de penicilinil·lases, principalment del tipus TEM en el serotip Enteritidis i del tipus OXA en el serotip Typhimurium. En un estudi paral·lel s'ha observat que el 82,6% de les

S. enterica del serotip Typhimurium eren productores d'OXA-1 mentre que només ho eren el 13% de les *S. enterica* del serotip enteritidis (dades no publicades). Per tant les fluctuacions de les resistències a aquest antibiòtic depenen de la major o menor presència del serotip Typhimurium. No s'ha detectat pràcticament resistència a fluoroquinolones, mentre que la taxa de resistència a trimetoprim-sulfametoxazole manté una certa estabilitat.

A l'analitzar les dades de l'evolució de la resistència en aquest decenni, 1994-2004, cal destacar el fet que els carbapenems han mantingut la seva sensibilitat. Tot i que fa quasi 20 anys que s'estan emprant, segueix essent molt rara aquesta resistència entre els enterobacteris (0,8%). Aquest percentatge concorda amb el descrit per altres autors que presenten dades $\leq 0,005\%$ ⁸⁶ o $< 1\%$.⁷⁴ La producció de carbapenemes en enterobacteris es rara i en el nostre entorn només s'ha descrit en soques de *K. pneumoniae*.⁸⁷

La sensibilitat a cefepime i amikacina en els cinc principals gèneres d'*Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* i *Morganella*) mostra, també, percentatges propers al 95% que no difereixen gaire de les dades trobades per Sader *et al.*⁷⁴

La resistència a fluoroquinolones ha augmentat ostensiblement durant aquest decenni mantenint-se activa en un 75%-90% de les soques *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *M. morganii* i *P. mirabilis*, valor que també reflexa el treball de Sader *et al.*⁷⁴. Aquest fet no s'observa en la resta d'espècies estudiades, concretament, *E. cloacae*, *C. freundii* i *S. enterica* encara que en aquesta espècie es van descriure dues soques que van presentar resistència a quinolones per múltiples mecanismes.³⁷

En resum, doncs, en el recull de les dades de sensibilitat d'aquest treball s'ha trobat que la resistència a carbapenems és inapreciable entre els enterobacteris estudiats en el període 1994-2004 i que cefepime i amikacina romanen força actius amb menys d'un 5% de resistència. Per altra banda, malauradament l'anàlisi

d'aquestes dades ens mostra que hi ha espècies que tendeixen a adquirir mecanismes de resistència més fàcilment que d'altres i que aquests mecanismes s'han de moure dins d'estructures géniques que confereixen no només resistència a una única família d'antibiòtics, com els β -lactàmics, sinó a d'altres com els aminoglicòsids o les quinolones.

Des que es va aïllar la primera soca portadora de BLEA en un laboratori,⁴⁶ l'any 1983, la prevalença de bacteris i, principalment d'enterobacteris, que expressen una β -lactamasa d'aquest tipus no ha cessat d'augmentar, no només en el número de soques aïllades sinó també en el nombre de nous tipus de BLEA descrits.

Les dades que es tenen procedents de diferents estudis mostren que els enterobacteris que expressen una BLEA presenten una distribució mundial, encara que amb grans diferències en el tipus segons les àrees geogràfiques que es contemplin.

Així doncs, les dades de prevalença proporcionades pel projecte SENTRY,⁷⁵ procedents d'aïllaments de pacients hospitalitzats des de 1997 fins 1999, mostren que el major percentatge correspon a Amèrica llatina amb un 45,5% de soques de *K. pneumoniae* productores de BLEA, seguida de la zona del Pacífic est (24,6%) i d'Europa (20%). La incidència als Estats Units i Canadà per aquesta espècie és molt menor, del 7,6 i 4,9%, respectivament. La prevalença d'*E. coli* portador de BLEA va ser, emperò, molt menor, al voltant del 8%, a l'Amèrica llatina i el Pacífic est, del 5% a Europa i d'entre el 3 i el 4% als Estats Units i Canadà.

En un estudi del mateix projecte SENTRY⁸⁸ en el que es van recollir soques procedents de 25 hospitals només europeus durant un període de dos anys, 1997-1998, es va confirmar la producció de BLEA en un 1,3% de soques d'*E. coli* i en un 12,6% de soques de *K. pneumoniae*. Aquesta prevalença no presentava una distribució uniforme: mentre que Grècia, Itàlia, Portugal, Turquia i Israel presentaven una prevalença superior o igual al 10%, la resta d'Europa presentaven taxes inferiors al 5%. En aquest estudi la prevalença de soques d'*E.coli* variava des del 0,3%

d'Espanya al 7% d'Itàlia o el 8% de Turquia. Per contra, la prevalença de les soques de *K. pneumoniae* portadores de BLEA va ser elevada al sud d'Europa, Polònia i Israel (>15%) i de menys del 10% a l'oest d'Europa i Espanya, en concret al nostre país va ser del 5,8%.

Estudis concrets a Itàlia⁸⁹ comuniquen un 2% d'*E.coli* portador de BLEA i un 0,9% de *K. pneumoniae* portadors de BLEA durant un període de quatre mesos l'any 2003. A França,⁹⁰ donen dades del 0,2 i del 0,9% respectivament, en un estudi de dos anys (2001-2002).

La prevalença global a Espanya segons un estudi realitzat en 40 hospitals espanyols en el primer semestre de l'any 2000, és del 0,5% per a *E. coli* i del 2,7% per a *K. pneumoniae* portadors de BLEA.⁹¹ En aquest mateix estudi mostren que la prevalença de soques d'*E. coli* portador de BLEA en tres hospitals de l'àrea de Barcelona, Bellvitge, Hospital Clínic i Vall d'Hebron fou del 0,3%, 0,7% i 0,3%, respectivament, i del 4,8%, 1,7% i 1,4%, per a *K. pneumoniae*.

L'estudi realitzat per Romero *et al*⁹² a l'Hospital Virgen de la Macarena (Sevilla) i que recull les dades d'un període de nou anys (1995-2003), de mostres tant d'origen intra com extrahospitalari (procedents de centres d'atenció primària o d'hospitals de malalts crònics) mostra una prevalença de 1,7% per a soques d'*E. coli* portadores de BLEA (incrementant significativament la prevalença a partir de 1999, que era <0.36%) i del 3,98% per a *K. pneumoniae* (prevalença que decreix a partir del mateix període).

El treball de Yagüe *et al*⁹³ mostra una incidència elevada de soques d'*E. coli* productores de BLEA en dos hospitals de la província d'Alacant: 3% (Hospital Vega Baja, Orihuela) i 2,25% (Hospital General Universitario de Elche), mentre que les dades de Calbo *et al*⁹⁴ obtingudes a l'hospital Mútua de Terrasa (Barcelona) són inferiors, del 1,7%.

Coque *et al*⁹⁵ va trobar un 4,8% de soques de *K. pneumoniae* portadores de BLEA en un període de 12 anys d'un estudi realitzat a l'Hospital Ramón y Cajal (Madrid).

A l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau es va trobar l'any 1994 una prevalença de soques productores de BLEA, del 0,08% en *E. coli* i del 0,6% en *K. pneumoniae*,⁷⁸ l'any 2003 aquesta prevalença va augmentar fins al 2,8% i el 1,9%, respectivament.⁷⁰ En el decenni 1994-2004 la prevalença d'*E. coli* portador de BLEA ha estat del 1,11% i la de *K. pneumoniae* del 1,5%.

Per tant, la prevalença de BLEA al continent europeu és menor que en d'altres continents. I dins d'Europa, Espanya no hi juga un paper destacat. Pel que fa al nostre hospital la prevalença de BLEA en *E. coli* és major que en d'altres centres de la ciutat de Barcelona, no així en *K. pneumoniae* on el percentatge trobat està dins dels rangs descrits.

Les espècies que amb més freqüència adquireixen BLEA, segons la literatura, són *E. coli* o *K. pneumoniae* encara que ja s'han descrit soques de *P. mirabilis*⁹⁶ o *E. cloacae*⁹⁰, entre d'altres. De Champs *et al*⁹⁰, a França, troben en el període 2001-2002 BLEA en *P. mirabilis* (1,7%), *E. cloacae* (0,1%), *C. freundii* (0,8%), *S. enterica* (0,3%) i *K. oxytoca* (0,7%). Luzzaro *et al*⁸⁹, a Itàlia, descriuen, durant l'any 2003, 163 soques de *P. mirabilis* (22%), 15 d'*E. cloacae* (3,1%), 12 de *C. freundii* (8,1%), 3 de *M. morgani* (1,3%) i 18 de *K. oxytoca* (7,4 %) amb uns percentatges més elevats si es comparen amb els descrits en el present treball on, durant el decenni a estudi, s'han aïllat soques de *P. mirabilis* (0,05%), *E. cloacae* (0,09%), *C. freundii* (0,3%), *M. morgani* (0,2%), *S. enterica* (0,2%) i *K. oxytoca* (0,3 %).

La necessitat de caracteritzar la producció de β -lactamasa en un microorganisme aïllat en el laboratori clínic ha arribat a tenir importància en els darrers anys a causa de l'emergència de soques productores de noves β -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.

Durant aquests deu anys hem trobat en les 284 soques d'*E. coli* estudiades una major prevalença de les BLEA tipus CTX-M (0,9%) seguides de les tipus SHV (0,23%) i de manera singular les tipus TEM (0,03%).

En aquest període les BLEA tipus CTX-M més freqüents han estat CTX-M-9, descrita per primer cop per Sabaté *et al*⁹⁷ en una soca d'*E. coli*, l'any 1996, i CTX-M-14, mutant Ala231Val de CTX-M-9 i aïllada a Espanya per primera vegada l'any 2001.⁹⁸ És un grup d'enzims que ha anat augmentant en aquesta espècie en diferents països⁹⁸⁻¹⁰² i comencen a ser les BLEA més aïllades a Espanya, tant en mostres clíniques com en femtes humanes i animals.^{70,98,99,101}

L'any 2003 es va descriure en el nostre hospital un increment de les CTX-M del grup 1, concretament de la CTX-M-15. Actualment, diferents autors^{103,104} han pogut observar el mateix fenomen.

Aquesta major freqüència de CTX-M, en *E. coli*, seguida de SHV és descrita per diferents autors. Luzzaro *et al*⁸⁹ troben una prevalença de les BLEA tipus CTX-M en front SHV i TEM (54,7%, 18% i 32,9% respectivament). En canvi, a França, De Champs *et al*⁹⁰ descriuen una prevalença de BLEA tipus CTX-M del 3,7% (en l'estudi de l'any 1998 no en van trobar cap) i del 1,3% en les BLEA tipus SHV durant el bienni 2001-2002. Pel que fa a les BLEA tipus TEM van trobar una prevalença del 3,1% de TEM-24, 5,1% de TEM-3 i un 2,9% d'altres (TEM-12, -16, -29, -71, -112 i -126).

En l'estudi espanyol de Romero *et al*⁹² observen amb més freqüència els enzims CTX-M i SHV que TEM en soques d'*E. coli* amb prevalences similars en els dos primers (46%, 44% i 27%, respectivament). De la mateixa manera que el Grupo de Estudio de la Infección Hospitalaria (GEIH) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica¹⁰⁵ presenta una prevalença per CTX-M del 52,2% amb predomini de CTX-M-9 i CTX-M-14; del 28,4% per SHV amb predomini de SHV-12 i del 19,3% per TEM.

En el nostre hospital, les BLEA tipus SHV descrites han estat la SHV-2 i la SHV-12 com a majoritària. En canvi, de les BLEA tipus TEM no n'hi ha hagut cap de predominant i la seva freqüència ha estat anecdòtica. Per altra banda, també hem trobat 19 soques que expressaven conjuntament les BLEA CTX-M-9 i SHV-12, fet no nou però que no ha estat descrit amb tanta freqüència.¹⁰⁶

K. pneumoniae és l'altra espècie on hem aïllat més soques productores de BLEA. Amb una prevalença similar entre BLEA tipus CTX-M i SHV. Cap soca va expressar BLEA tipus TEM. La BLEA més freqüent ha estat SHV-2 seguida per CTX-M-1. També en aquesta espècie hem trobat soques que expressaven més d'un enzim: CTX-M-9 i SHV-12 en tres soques i CTX-M-1 i CMY-2 en una soca.

Tot i que nosaltres no hem trobat soques de *K. pneumoniae* que expressessin BLEA tipus TEM si que ho han fet Luzzaro *et al*⁸⁹ a Itàlia on han descrit soques que expressen TEM associades sempre a una BLEA tipus SHV, essent aquestes darreres, en aquesta espècie, les de més prevalença (87,6%). De Champs *et al*⁹⁰ descriu, majoritàriament, soques de *K. pneumoniae* amb BLEA que pertanyen al grup TEM-3 (2,4%) i no troben BLEA tipus CTX-M.

En el territori espanyol les dades, per aquesta espècie, també són força diferents segons els estudis; en trobem en els que hi predominen les soques que expressen SHV⁹² (SHV-12, SHV-4 i SHV-2a) o TEM¹⁰⁵ (TEM-3 i TEM-4).

Tot sembla indicar que en els altres gèneres d'enterobacteris diferents d'*Escherichia* o *Klebsiella* la producció de BLEA és poc freqüent i el tipus de BLEA que expressen acostuma a ser el predominant en aquell moment. Així la BLEA predominant que hem aïllat en *S. enterica*, *P. mirabilis*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *M. morganii* o *K. oxytoca*, és la CTX-M-9, la BLEA predominant en aquest decenni a l'hospital i també en l'estat espanyol.¹⁰²

Cal destacar que no s'ha detectat cap soca d'*Enterobacter* portadora de TEM, havent-se descrit un clon epidèmic que s'ha expandit per França, Bèlgica, Portugal, Itàlia i Espanya.¹⁰⁷⁻¹¹⁴

Las cefamicinases plasmídiques a diferència de les BLEA determinen resistència a les cefamicines i als inhibidors de β -lactamases i, en major o menor grau, a les cefalosporines de tercera generació i monobactams. En aquest treball, que comprèn un decenni, s'ha trobat un 0,16% de soques d'*E. coli*, 0,22% de *K. pneumoniae*, 0,07% de *S. enterica* i 0,2% de *P. mirabilis*. Totes les soques expressaven la cefamicinasa CMY-2, excepte una soca d'*E. coli* que va expressar la cefamicinasa plasmídica ACC-1.

Les cefamicinases plasmídiques foren descrites per primera vegada l'any 1988.¹¹⁵ En l'actualitat se n'han descrit en soques d'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *C. freundii*, *E. aerogenes* i *P. mirabilis*.^{116,117} L'origen d'aquests enzims es troba en el cromosoma de diferents espècies productores de cefalosporinases com les que presenten els gens de la β -lactamasa AmpC induïble. Les cefamicinases plasmídiques, a diferència de les β -lactamases cromosòmiques, no són induïbles amb només una excepció, la cefalosporinasa plasmídica DHA-1,¹¹⁸ l'origen de la qual està en el gen *bla*_{AmpC} de *M. morgani*.

Totes les cefamicinases plasmídiques descrites fins el moment en l'àrea mediterrània pertanyen a un grup molt homogeni (CMY-2 a CMY-5 i de LAT-1 a LAT-4), les quals estan relacionades amb la β -lactamasa cromosòmica de *C. freundii*.¹¹⁹⁻¹²² A Espanya, emperò, la primera cefamicinasa plasmídica descrita fou FOX-4 en una soca d'*E. coli*.¹²³ L'origen d'aquest enzim es desconeix encara. Posteriorment, l'enzim CMY-2 (descrit per primera vegada l'any 1990 a Alemanya) va ser aïllat a Espanya per primer cop l'octubre de 1999 en una soca d'*E. coli*⁸³ i, posteriorment, en *P. mirabilis*, *K. oxytoca* i *S. enterica*. La β -lactamasa CMY-2 ha difós geogràficament per tota l'àrea mediterrània en els últims 10 anys.

Durant aquest decenni es va dur a terme la caracterització de la primera soca d'*E. coli* productora de la cefamicinasa plasmídica ACC-1 aïllada per primera vegada a Espanya. La soca provenia de l'Hospital Germans Trias i Pujol.¹²⁴ La cefamicinasa plasmídica ACC-1 està relacionada amb la β -lactamasa cromosòmica AmpC d'*Hafnia alvei* i que va ser descrita per primera vegada a Alemanya¹²⁵ i posteriorment a França en un brot de *K. pneumoniae* multiresistent,¹²⁶ també s'ha trobat en *E. coli*, *P. mirabilis* i *S. enterica*.¹²⁷⁻¹²⁹ El fet que aquest enzim s'hagi aïllat en quatre països, tres de l'àrea del Mediterrani (Espanya, Tunísia i França) suggereix que aquest enzim s'està expandint per Europa i, especialment, en aquesta zona. A Itàlia i Grècia també s'han referit casos de les cefamicinases pertanyents a un altre grup de β -lactamases AmpC, la FOX-3 en *K. oxytoca*¹³⁰ i la MOX-2¹³¹ en *K. pneumoniae*, respectivament.

Les infeccions representen en l'actualitat un important problema de salut pública per la seva morbimortalitat i per les implicacions econòmiques que suposen per al sistema sanitari. A Espanya, més del 25% de les primeres consultes que es realitzen en els centres d'atenció primària estan relacionades amb un procés infecciós mentre que en els malalts hospitalitzats la infecció presenta una prevalença del 10%, essent les més freqüents la infecció del tracte urinari (ITU), de ferida quirúrgica i la pneumònia.¹³²

En el nostre estudi hem observat que el 54% de les mostres en les que es va aïllar *E. coli* portadors de BLEA eren intrahospitalàries, mentre que aquest percentatge s'elevava fins al 62% en les mostres amb *K. pneumoniae* portadores de BLEA. Les soques d'*E. coli* i *K. pneumoniae* portadores de BLEA presenten un comportament epidemiològic diferent. Mentre que *K. pneumoniae* portador de BLEA ha estat, i encara és, majoritàriament, un patògen nosocomial, *E. coli* portador de BLEA s'ha descrit que està emergent com un important patògen en la comunitat, fet que també han observat altres autors,^{89,92-94} principalment en mostres d'orina,^{89,105} havent-se descrit en els darrers tres anys veritables infeccions o colonitzacions.^{102,133-}

A més, han aparegut força publicacions d'infeccions adquirides en la comunitat i causades per altres organismes productors de BLEA com és el cas de *S. enterica*,¹³⁶⁻¹³⁸ *S. flexneri*,¹³⁹ *S. sonnei*,^{140, 141} *S. dysenteriae*,¹⁴² *V. cholerae* o *E. coli* productor de la toxina de Shiga.^{143, 144}

Una de les hipòtesis que es creu plausible per a la difusió de les BLEA en la comunitat, és a través dels aliments d'origen animal, en els quals es pot produir la selecció d'enteropatògens gràcies a l'adquisició de resistències.^{70,101} Aquest fet ja ha estat documentat en un brot per *E. coli* productor de CMY-2 i CTX-M-9 transmès, probablement, a través de l'aliment.¹⁴⁵

Hi ha certes evidències que els centres socio-sanitaris podrien actuar com a portes d'entrada d'organismes productors de BLEA en els hospitals¹⁴⁶ i, a l'inrevés, pacients que s'han colonitzat o han adquirit una infecció en la seva estada hospitalària poden retornar al seu centre colonitzats per soques portadores de la BLEA.¹⁴⁷

Nombrosos són els estudis que han avaluat els possibles factors de risc associats a l'adquisició d'enterobacteris portadors de BLEA. Malgrat tot, la gran variabilitat en la metodologia, els microorganismes implicats i les BLEA detectades, fa que sigui difícil extreure'n conclusions.^{106,148} De forma genèrica, es solen associar a pacients amb elevada comorbiditat i sotmesos a processos mèdics invasius (sondes urinàries, tubs endotraqueals, catèters venosos), edat avançada (>60 anys) o amb tractaments antibiòtics previs.^{46,134,149} S'ha demostrat la relació entre l'administració de cefalosporines de tercera generació i l'adquisició d'una soca portadora de BLEA,¹⁵⁰⁻¹⁵² així com també s'ha vist la relació que hi ha amb l'administració d'altres antibiòtics. Això inclou quinolones,¹⁵³⁻¹⁵⁵ cotrimoxazole,¹⁵³⁻¹⁵⁵ aminoglicòsids^{151,154} i metronidazol.¹⁵⁴ Per contra, l'ús de β -lactàmics combinats amb inhibidors de β -lactamases, penicil·lines o carbapenems no semblen estar associats amb infeccions produïdes per organismes que expressen BLEA.⁴⁶

Les soques productores de BLEA o cefamicinasa acostumen a ser resistents també a d'altres famílies d'antimicrobians com els aminoglicòsids, les quinolones, les sulfamides, el cloramfenicol o la tetraciclina.^{102,133,156-158}

El grup de les BLEA clàssiques, és a dir, les TEM o SHV acostumen, emperò, a ser menys resistents que no pas les del grup CTX-M.⁹⁹ Tanmateix, i malgrat els pocs casos de soques productores de TEM obtingudes en aquest estudi, en elles hi veiem associada la resistència a sulfamides i quinolones, patrons similars als descrits per a les CTX-M, en canvi cap soca portava associada la resistència als aminoglicòsids.

A diferència del que succeeix amb les BLEA tipus CTX-M, l'entorn genètic de les BLEA tipus TEM o SHV és poc conegut. Darrerament, s'ha descrit l'entorn genètic de la SHV-2 situada en el plasmidi pk245, que conté també els gens *aacC2*, *strA* i *strB* que confereixen resistència als aminoglicòsids, i els gens *catA2*, *sul2*, *tetD* i *drfrA14* que confereixen resistència al cloramfenicol, sulfamides, tetraciclina i trimetoprim, respectivament,¹⁵⁹ i que podria explicar la multiresistència en algunes de les soques aïllades en aquest estudi.

Les β -lactamases tipus CTX-M sovint porten associades estructures genètiques com els integrons, i concretament els integrons de classe 1 associats a *ISCR1*, capaços d'integrar altres gens que confereixen la resistència a aminoglicòsids, cloramfenicol, sulfamides i, en menor grau, a la rifampicina.⁵¹ Concretament s'han descrit diferents integrons com l'In60⁶⁹ que conté la CTX-M-9, conjuntament amb el gen *aadA2*, que confereix resistència als aminoglicòsids, el gen *drfrA16*, que confereix resistència a trimetoprim i *sul1* que confereix resistència a sulfamides. Tanmateix s'ha pogut observar que aquesta estructura és variable i canviant al llarg del temps.¹⁶⁰ També s'han descrit els integrons InS21 i In35 que contenen la CTX-M-2.¹⁶¹

D'altres vegades s'han descrit altres elements genètics, com els transposons, que presenten seqüències repetides, les seqüències d'inserció (IS), i que en alguns

casos s'ha pogut demostrar que faciliten la mobilitat dels gens, de manera que un gen envoltat d'IS fàcilment pot situar-se entre altres gens ja situats dins d'aquestes seqüències. La CTX-M-14, per exemple, presenta en l'extrem 5' la *ISEcp1* i en l'extrem 3' la *IS903*, seqüències també descrites al voltant dels gens de resistència a aminoglicòsids o quinolones.¹⁶¹

En el nostre cas entre un 60% i un 80% de les soques eren resistents a fluoroquinolones, sulfamides i tetraciclines. Essent no menyspreable, encara que molt menor, el percentatge de resistència a aminoglicòsids.

Malauradament, doncs, sembla que els bacteris no només vagin desenvolupant diferents mecanismes de resistència, sinó que a més a més sembla que siguin capaços d'acumular-los, esdevenint d'aquesta forma multiresistents i, en conseqüència, un problema per a la salut pública.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1. Els estudis de sensibilitat en *E. coli* mostren un clar increment de la resistència a cefalosporines de tercera generació (C3G) i aztreonam, fruit d'una major prevalença de soques portadores de BLEA i cefamicinasa.
2. La prevalença de soques d' *E. coli* productores de BLEA fou del 0,08% l'any 1994 i del 3,7% l'any 2004, essent la prevalença en el decenni 1994-2004 del 1,11%.
3. En aquest període les BLEA més freqüents en *E. coli* han estat les del grup CTX-M (77,5%), seguides de les SHV (20%), essent la prevalença de les BLEA tipus TEM anecdòtica.
4. En *E. coli*, dins del grup de les CTX-M, l'enzim CTX-M-9 ha estat el més descrit (representant un 43% d'aquestes) seguit a distància pel CTX-M-1. I en el grup de les BLEA tipus SHV, el més freqüent ha estat el SHV-12 (representant un 61% d'aquestes).
5. La prevalença de soques d' *E. coli* productores de cefamicinases incrementà del 0,04% l'any 1999 al 0,4% l'any 2004, essent la prevalença en el decenni 1994-2004 del 0,16%.
6. En aquest període han estat aïllades només soques d'*E. coli* portadores de CMY-2, amb la única excepció d'una soca que expressà l'ACC-1.
7. El 66,5% de les soques d'*E. coli* portadores de BLEA i el 81% de les soques que expressaven una cefamicinasa han estat aïllades d'orines, de les quals un 55% i un 81%, respectivament, eren d'origen extrahospitalari.
8. Els estudis de sensibilitat en *K. pneumoniae* mostren un increment de la resistència a C3G i aztreonam, sobretot en els darrers dos anys del decenni

estudiat, fruit d'una major prevalença de soques portadores de BLEA i cefamicinasa.

9. La prevalença de soques de *K. pneumoniae* productores de BLEA fou del 0,6% l'any 1994 i del 6,7% l'any 2004, essent la prevalença en el decenni 1994-2004 del 1,6%.
10. En aquest període en *K. pneumoniae* tant les BLEA del grup CTX-M com les SHV han tingut una prevalença similar (50%). No havent-se aïllat cap soca productora de BLEA tipus TEM.
11. En *K. pneumoniae*, dins del grup de les CTX-M, les CTX-M-1 han estat les més freqüents (representant un 55% d'aquestes) que les CTX-M-9 (que representen un 25% d'aquestes). I, en el grup de les BLEA tipus SHV, la més freqüent ha estat la SHV-2 (que representa un 68%).
12. La prevalença de soques de *K. pneumoniae* productores de cefamicinases ha estat puntual, amb només tres soques, totes productores de la cefamicinasa CMY-2.
13. El 72,2% de les soques de *K. pneumoniae* portadores de BLEA han estat aïllades d'orines, el 54% de les quals eren d'origen intrahospitalari.
14. *K. pneumoniae* portador de BLEA ha estat, i encara és, majoritàriament, un patogen nosocomial.
15. Els estudis de sensibilitat al llarg del decenni 1994-2004 mostren que en les espècies amb una β -lactamasa cromosòmica induïble tipus AmpC (*Enterobacter*, *C. freundii* i *M. morgani*) no hi ha hagut un increment de la resistència a C3G indicatiu d'una possible desrepressió de l'enzim, essent el percentatge de soques amb fenotip de desrepressió del voltant del 30% en *Enterobacter* i *C. freundii* i del 7,5% en *M. morgani*.

16. La resistència a cefepime en aquestes espècies només s'ha observat l'any 2004, amb la presència de tres soques (una de cada espècie). En *Enterobacter* i *C. freundii*, fruit de la producció de la BLEA CTX-M-9, i en *M. morganii* de la CTX-M-32.
17. Els estudis de sensibilitat al llarg del decenni 1994-2004 mostren que el percentatge de soques de *K. oxytoca* amb resistència a l'aztreonam ha incrementat al llarg del període estudiat d'un 4% a un 44%. Per tant, el principal mecanisme de resistència a C3G i monobactams és la hiperexpressió de llur β -lactamasa cromosòmica, havent-se trobat només dues soques productores de BLEA (CTX-M-9 i CTX-M-32).
18. En *P. mirabilis*, s'ha pogut observar al llarg dels deu anys un lleuger increment de la resistència a l'associació amoxicil·lina-àcid clavulànic i de manera puntual l'aparició de soques resistents a C3G, fruit de la producció de cefamicinases (tres soques amb CMY-2) o de BLEA (una soca amb CTX-M-1).
19. En *S. enterica* els estudis de sensibilitat no mostren cap increment de la resistència a cap dels antibiòtics d'ús clínic. Només destacar l'aïllament de tres soques productores de BLEA (dues CTX-M-9 i una CTX-M-14) i una soca productora de la cefamicinasa CMY-2.
20. La resistència a carbapenems ha estat pràcticament nul·la en totes les espècies estudiades excepte en el cas d'*E. cloacae* on en els anys 1994 i 1996 es va trobar un 0,8% i un 1,8% respectivament. S'ha descartat la presència de carbapenemases en aquestes soques.
21. De l'estudi de les resistències associades dels antibiòtics no β -lactàmics a la producció de BLEA o cefamicinases no s'ha obtingut un patró predominant associat a cada tipus de β -lactamasa.

- 22.** Les soques productores de BLEA presentaven uns percentatges de resistència a fluoroquinolones, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazole, cloramfenicol i aminoglicòsids, del 84%, 56%, 52%, 35% i 14%, respectivament.
- 23.** Les soques productores de cefamicinasa presentaven uns percentatges de resistència a cloramfenicol, fluoroquinolones, aminoglicòsids, trimetoprim-sulfametoxazole i tetraciclina del 85%, 77%, 67%, 57%, i, 56%, respectivament.

BIBLIOGRAFIA

1. **Prats, G., Mirelis, B.** *Enterobacteriaceae*. A: Perea E.J. Editor. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Barcelona: Doyma, Ed. 1992; 624-46.
2. **Hall, B. G.** Innovation: Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2, 430-5.
3. **Murray, P. R., Roshental, K. S., Kobayashi, G. S. Pfaller, M. A.** *Enterobacteriaceae*. *Microbiología Médica*, 5ª ed. Madrid: Elsevier Mosby. 2002; 323-38.
4. **Prats, G., Mirelis, B.** Enterobacterias. Características generales. Enterobacterias oportunistas. *Escherichia coli*. A: García-Rodríguez, J.A., Picazo, J.J Editores. *Microbiología Médica General*. Madrid: Mosby/Doyma. 1996; 223-37.
5. **Ryan, K. J.** Enterobacterias. A: Sherris, J.C. Editor. *Microbiología Médica*. Barcelona: Doyma. 1993; 407-34.
6. **Murray, P. R., Roshental, K. S., Kobayashi, G. S., Pfaller, M. A.** Morfología, síntesis y estructura de la pared celular de las bacterias. *Microbiología Médica*, 5ª ed. Madrid: Elsevier Mosby. 2002; 11-24.
7. **Beveridge, T. J.** Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 1999;181: 4725-3.
8. **Badiola, I., Pérez, A., Llagostera, M., Saco, M.** Utilització dels antimicrobians en veterinària i l'ús prudent dels antibiòtics. A: Joaquim Ruiz Editor. *Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia*. Barcelona: Societat Catalana de Biologia. 2004; 55: 19-28.
9. **Turnidge, J.** Antibiotic use in animals prejudices, perceptions and realities. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 26-7.

10. Reglamento (CE) N° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de setiembre de 2003 sobre aditivos en la alimentación animal. pp. 29-43.
11. **García, J. E., Fresnadillo, M. J., García, E.** Antibióticos β -lactámicos: concepto y clasificación. *Medicine* 1998; 88: 4109-15.
12. **Marín, M., Gudiol, F.** Antibióticos β -lactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Cli* 2003; 21: 42-3.
13. **García, J. E., Fresnadillo, M. J., Arce, J. J., García, E.** Antibióticos β -lactámicos. A: García Sánchez, J.E., López, R., Prieto J. Editores. *Antimicrobianos en medicina*. Barcelona: Sociedad Española de Quimioterapia/Prous Science. 1999; 213-26.
14. **Fernández, R., Soriano, F.** Concepto, historia, clasificación y aplicaciones de los antimicrobianos. A: García Sánchez, J.E., López, R., Prieto J. Editores. *Antimicrobianos en Medicina*. Barcelona: Sociedad Española de Quimioterapia/Prous Science. 1999; 9-18.
15. **Chambers, H. F.** Penicillins. A: Mandell, G. L., Bennet, J. E., Dolin, R. Editores. Mandell, Douglas and Bennett's. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6ª ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2005; 281-93.
16. **Andes, D. R., Craig, W. A.** Cephalosporins. A: Mandell, G. L., Bennet, J. E., Dolin R. Editores. Mandell, Douglas and Bennett's. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6ª ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2005; 294-311.
17. **Chambers, H. F.** Other β -lactam antibiotics. A: Mandell, G. L., Bennet, J. E., Dolin R. Editores. Mandell, Douglas and Bennett's. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6ª ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2005; 311-8.

18. **Yao, J., R.C., Moellering.** Antibacterial agents. A: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A., Tenover, R.H. Editores. *Manual of Clinical Microbiology*, 8ª ed. Washington DC: ASM Press, 2003; 1039-73.
19. **Fresnadillo, M. J., García, E., Trujillano, I., García, J. E.** β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas. A: García Sánchez, J.E., López, R Prieto J. Editores. *Antimicrobianos en Medicina*. Barcelona: Sociedad Española de Quimioterapia/Prous Science. 1999; 251-72.
20. **Lorian, V. Editor.** *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2005.
21. **Brock, T. H.** *Biología de los Microorganismos*, 2ª ed. Barcelona: Ediciones Omega. 1978.
22. **Georgopapadaku, N. H.** Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2045-53.
23. **Muñoz, J. L., Alonso, M. A., Gutiérrez, M. N.** Penicilinas. A: García Sánchez, J.E., López, R, Prieto J. Editores. *Antimicrobianos en Medicina*. Barcelona: Sociedad Española de Quimioterapia/Prous Science.1999; 227-50.
24. **Cantón, R., Valdezate, S., Mir, N.** Resistencia a los antimicrobianos. A: García Sánchez, J.E., López, R, Prieto J. Editores. *Antimicrobianos en medicina*. Barcelona: Sociedad Española de Quimioterapia/Prous Science. 1999; 41-71.
25. **Rice, I. B., Sahm, D., Bonomo, R. A.** Mechanisms of resistance to Antibacterial Agents. A: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A, Tenover, R.H. Editores. *Manual of Clinical Microbiology*, 8ª ed. Washington DC: ASM Press, 2003; 1074-101.

26. **Sabaté, M.** Tesi: Mecanismes de resistència als β -lactàmics en enterobacteris, 1994-1996. Departament de *Genètica i de Microbiologia*, Universitat Autònoma de Barcelona, 2001. (<http://www.tdx.cbuc.es/TDX-1107102-132330/>)
27. **García, A., Rebollo, M. Navarro, F.** Difusió de la resistència als antimicrobians. Diferents camins amb un mateix final. A: Joaquim Ruiz Editor. *Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia*. Barcelona: Societat Catalana de Biologia. 2004; 29-48.
28. **Marco, F.** Resistència bacteriana. Aspectes generals. A: Joaquim Ruiz Editor. *Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia*. Barcelona: Societat Catalana de Biologia. 2004; 11-18.
29. **Piédrola-Angulo, A.** *Microbiología y parasitología médica*, 2^a ed. Barcelona: Editorial Salvat. 1987.
30. **Goodenough, U.** *Genética*. Barcelona: Ediciones Omega. 1981.
31. **Miró, E., Rivera, A., Mesa, J.** Els β -lactàmics. A: Joaquim Ruiz Editor. *Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia*. Barcelona: Societat Catalana de Biologia. 2004; 91-106.
32. **Chow, J. W., Shlaes, D. M.** Imipenem resistance associated with the loss of a 40 kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28: 499-504.
33. **Weindorf, H., Schmidt, H. Martin, H. H.** Contribution of overproduced chromosomal β -lactamase and defective outer membrane porins to resistance to extended-spectrum β -lactam antibiotics in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 189-95.

34. Vila, J., Sánchez-Céspedes, J., Ribera, A. Sistemes d'expulsió activa i llur relació amb la resistència als agents antibacterians. A: Joaquim Ruiz Editor. *Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia*. Barcelona: Societat Catalana de Biologia. 2004; 49-60.
35. Lomovskaya, O., Watkins, W. J. Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. *Curr Med Chem* 2001; 8: 1699-711.
36. Webber, M. A., Piddock, L. J. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 9-11.
37. Miró, E., Vergés, C., García, I., Mirelis, B., Navarro, F., Coll, P., *et al.* Resistance to quinolones and β -lactams in *Salmonella enterica* due to mutations in topoisomerase-encoding genes, altered cell permeability and expression of an active efflux system. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 204-11.
38. Katayama, Y., Zhang, H. Z., Chambers, H. F. PBP 2a mutations producing very-high-level resistance to β -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 453-9.
39. Pagliero, E., Chesnel, L., Hopkins, J., Croize, J., Dideberg, O., Vernet, T., *et al.* Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in β -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1848-55.
40. Arbeloa, A., Segal, H., Hugonnet, J. E., Josseaume, N., Dubost, L., Brouard, J. P., *et al.* Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated β -lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2004; 186: 1221-8.
41. Mendelman, P. M., Chaffin, D. O., Stull, T. L., Rubens, C. E., Mack, K. D., Smith, A. L. Characterization of non- β -lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26: 235-44.

42. **Dougherty, T. J., Koller, A. E., Tomasz, A.** Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and intrinsically resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18: 730-7.
43. **Neuwirth, C., Siebor, E., Duez, J. M., Pechinot, A., Kazmierczak, A.** Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 335-42.
44. **Helfand, M. S., Bonomo, R. A.** β -lactamases: A survey of protein diversity. *Curr drug targ-Infect disord* 2003; 3: 9-23.
45. **Livermore, D.** β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8: 557-84.
46. **Paterson, D. L., Bonomo, A. B.** Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 657-86.
47. **Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G. A.** (2002). Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1-11.
48. **Bradford, P. A.** Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-51.
49. **Roupas, A., Pitton, J.** R factor-mediated and chromosomal resistance to ampicillin in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 5: 186-91.
50. **Bush, K.** Characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 259-76.
51. **Bonnet, R.** Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1-14.

52. **Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., Philippon, A.** β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3045-9.
53. **Decousser, J. W., Poirel, L., Nordmann, P.** Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3595-8.
54. **Poirel, L., Kampfer, P., Nordmann, P.** Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 4038-40.
55. **Girlich, D., Poirel, L., Leelaporn, A., Karim, A., Tribuddharat, C., Fennewald, M., et al.** Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 175-82.
56. **Naas, T., Poirel, L., Karim, A., Nordmann, P.** Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 176: 411-9.
57. **Alcantar-Curiel, D., Tinoco, J. C., Gayosso, C., Carlos, A., Daza, C., Pérez-Prado, M. C., et al.** Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1067-74.
58. **Silva, J., Aguilar, C., Ayala, G., Estrada, M. A., Garza-Ramos, U., Lara-Lemus, R., et al.** TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 997-1003.

59. **Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A.** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
60. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests- Fifth edition; Approved Standard. NCCLS Document M2-A5. NCCLS, 771 E. Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania 19085 USA, 1993.
Fifth Informational Supplement. NCCLS Document M100-S5, 1994.
Sixth Informational Supplement. NCCLS Document M100-S6, 1995.
61. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests- Sixth edition; Approved Standard. NCCLS Document M2-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1996.
Seventh Informational Supplement. NCCLS Document M100-S7, 1997.
Eighth Informational Supplement. NCCLS Document M100-S8, 1998.
Ninth Informational Supplement. NCCLS Document M100-S9, 1999.
Tenth Informational Supplement. NCCLS Document M100-S10, 2000.
Eleventh Informational Supplement. NCCLS Document M100-S11, 2001.
Twelfth Informational Supplement. NCCLS Document M100-S12, 2002.
Thirteenth Informational Supplement. NCCLS Document M100-S13, 2003.
Fourteenth Informational Supplement. NCCLS Document M100-S14, 2004.
62. **Yagi, T., Wachino, J., Kurokawa, H., Suzuki, S., Yamane, K., Doi, Y., et al.** Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 2551-8.
63. **Coudron, P. E., Moland, E. S., Thomson, K. S.** Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1791-6.

64. **Shahid, M., Malik, A., Agrawal, M., Singhal, S.** Phenotypic detection of extended-spectrum and AmpC β -lactamases by a new spot-inoculation method and modified three-dimensional extract test: comparison with the conventional three-dimensional extract test. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 54: 684-7.
65. **Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., Philippon, A.** Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 867-78.
66. **Mirelis, B., Rivera, A., Miró, E., Mesa, R. J., Navarro, F., Coll, P.** A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 370-2.
67. **Mathew, M., Harris, A., Marshall, M., Ross, G.** The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J Gen Microbiol* 1975; 5: 349-58.
68. **Barthélemy, M., Guionie, M., Labia, R.** β -lactamases: determination of their isoelectric points. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 31: 655-64.
69. **Sabaté, M., Navarro, F., Miró, E., Campoy, S., Mirelis, B., Barbé, J., et al.** Novel complex sul1-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2656-61.
70. **Mesa, R. J., Blanc, V., Blanch, A. R., Cortés, P., Gonzalez, J. J., Lavilla, S., et al.** Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58 (1): 211-5.
71. **Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463-7.

72. **Prats, G., Mirelis, B., Ausina, V., Pericas, R., Coll, P., Rabella, N., et al.** *Epidemiología de las resistencias bacterianas en el Hospital de Santa Creu i Sant Pau (1984-1989)*. Barcelona: J.R. Prous. 1991.
73. **Jones, R. N., Varnam, D. J.** Antimicrobial activity of broad-spectrum agents tested against Gram-negative bacilli resistant to ceftazidime: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 379-82.
74. **Sader, H. S., Biedenbach, D. J., Jones, R. N.** Global patterns of susceptibility for 21 commonly utilized antimicrobial agents tested against 48,440 *Enterobacteriaceae* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 361-4.
75. **Winokur, P. L., Cantón, R., Casellas, J. M., Legakis, N.** Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis* 2001; 32 Suppl 2: S94-103.
76. **Navarro, F., Miró, E., Mirelis, B.** Lectura interpretada del antibiograma en enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20(5): 225-34.
77. **Navarro, F., Alonso, C., Ballús, J., Miró, E., March, F., Coll, P., et al.** Relevancia clínica de las bacterias gramnegativas que poseen β -lactamasa cromosómica inducible en una unidad de cuidados intensivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 14: 171-6.
78. **Sabaté, M., Miró, E., Navarro, F., Vergés, C., Aliaga, R., Mirelis, B., et al.** β -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 989-97.

79. **Miró, E., Navarro, F., Mirelis, B., Sabaté, M., Rivera, A., Coll, P., et al.** Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing inhibitor-resistant β -lactamases at a University Hospital in Barcelona, Spain, over a 3-Year Period. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3991-4.
80. **Haeggman, S., Lofdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J., Brisse, S.** Diversity and evolution of the class A chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2400-8.
81. **Gheorghiu, R., Yuan, M., Hall, L. M., Livermore, D. M.** Bases of variation in resistance to β -lactams in *Klebsiella oxytoca* isolates hyperproducing K1 β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 533-41.
82. **Rodríguez, C., Radice, M., Perazzi, B., Castro, S., Juárez, J., Santini, P., et al.** Resistencia enzimática a β -lactámicos en el género *Proteus* y evaluación de los fenotipos y genotipos de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en *Proteus mirabilis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; **23**: 122-6.
83. **Navarro, F., Pérez-Trallero, E., Marimón, J. M., Aliaga, R., Gomariz, M., Mirelis, B.** CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999-December 2000). *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 383-9.
84. **Pagani, L., Migliavacca, R., Pallecchi, L., Matti, C., Giacobone, E., Amicosante, G., et al.** Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1549-52.
85. **Decre, D., Verdet, C., Raskine, L., Blanchard, H., Burghoffer, B., Philippon, A., et al.** Characterization of CMY-type β -lactamases in clinical strains of *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in four hospitals in the Paris area. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 681-8.

86. **Baquero, F., Cercenado, E., Cisterna, R., de la Rosa, M., García-Rodríguez, J. A., Gobernado, M., et al.** Patterns of susceptibility to antibiotics of *Enterobacteriaceae* causing intra-abdominal infection in Spain: SMART 2003 study outcomes. *Rev Esp Quimioter* 2006; 19: 51-9.
87. **Tórtola, M. T., Lavilla, S., Miró, E., González, J. J., Larrosa, N., Sabaté, M., et al.** First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3492-4.
88. **Nijssen, S., Florijn, A., Bonten, M. J., Schmitz, F. J., Verhoef, J., Fluit, A. C.** β -lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European *Enterobacteriaceae* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 585-91.
89. **Luzzaro, F., Mezzatesta, M., Mugnaioli, C., Perilli, M., Stefani, S., Amicosante, G., et al.** Trends in production of extended-spectrum β -lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1659-64.
90. **De Champs, C., Chanal, C., Sirot, D., Baraduc, R., Romaszko, J. P., Bonnet, R., et al.** Frequency and diversity of Class A extended-spectrum β -lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 634-9.
91. **Hernández, J. R., Pascual, A., Cantón, R., Martínez-Martínez, L.** Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 77-82.
92. **Romero, L., López, L., Rodríguez-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 β -lactamases. *Clinic Microbiol Infect* 2005; 11: 625-31.

93. **Yague, A., Cebrián, L., Rodríguez-Díaz, J. C., Gonzalo-Jiménez, N., Royo, G., Campillos, P., et al.** Expanded-spectrum β -lactamase-producing strains of *E. coli*: origin, characteristics and incidence in Southern Alicante (Spain) in the period 1999-2003. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23: 76-9.

94. **Calbo, E., Romani, V., Xercavins, M., Gómez, L., Vidal, C. G., Quintana, S., et al.** Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 780-3.

95. **Coque, T. M., Oliver, A., Pérez-Díaz, J. C., Baquero, F., Cantón, R.** Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 500-10.

96. **De Champs, C., Bonnet, R., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J.** Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: a two year survey. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 537-9.

97. **Sabaté, M., Tarragó, R., Navarro, F., Miró, E., Vergés, C., Barbé, J., et al.** Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1970-3.

98. **Bou, G., Cartelle, M., Tomas, M., Canle, D., Molina, F., Moure, R., et al.** Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 β -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4030-6.

99. **Valverde, A., Coque, T. M., Sánchez-Moreno, M. P., Rollán, A., Baquero, F., Cantón, R.** Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 4769-75.
100. **Brinas, L., Moreno, M. A., Teshager, T., Saenz, Y., Porrero, M. C., Domínguez, L., et al.** Monitoring and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1262-4.
101. **Miró, E., Mirelis, B., Navarro, F., Rivera, A., Mesa, R. J., Roig, M. C., et al.** Surveillance of extended-spectrum β -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 1152-5.
102. **Rodríguez-Baño, J., Navarro, M. D., Romero, L., Martínez-Martínez, L., Muniain, M. A., Perea, E. J., et al.** Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1089-94.
103. **Livermore, D. M., Hawkey, P. M.** CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 56: 451-4.
104. **Karisik, E., Ellington, M. J., Pike, R., Warren, R. E., Livermore, D. M., Woodford, N.** Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 β -lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58: 665-8.
105. **Hernández, J. R., Martínez-Martínez, L., Cantón, R., Coque, T. M., Pascual, A.** Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2122-5.

106. **Munday, C. J., Whitehead, G. M., Todd, N. J., Campbell, M., Hawkey, P. M.** Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 628-33.
107. **Cantón, R., Oliver, A., Coque, T. M., Varela, M. D. C., Pérez-Díaz, J. C., Baquero, F.** Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1237-43.
108. **Salso, S., Culebras, E., Andrade, R., Picazo, J. J.** Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in a Spanish hospital. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 299-305.
109. **Wu, J. J., Ko, W. C., Tsai, S. H., Yan, J. J.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants, QnrA, QnrB, and QnrS, among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51 (4): 1223-7.
110. **De Gheldre, Y., Struelens, M. J., Glupczynski, Y., De Mol, P., Maes, N., Nonhoff, C., et al.** National epidemiologic surveys of *Enterobacter aerogenes* in Belgian hospitals from 1996 to 1998. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 889-96.
111. **Dumarche, P., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Bonnet, R., Sirot, J.** TEM derivative-producing *Enterobacter aerogenes* strains: dissemination of a prevalent clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1128-31.
112. **Lavigne, J. P., Bouziges, N., Chanal, C., Mahamat, A., Michaux-Charachon, S., et al.** Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3805-8.

113. **Galdbart, J. O., Lemann, F., Ainouz, D., Feron, P., Lambert-Zechovsky, N., Branger, C.** TEM-24 extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter aerogenes*: long-term clonal dissemination in French hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 316-23.
114. **Caccamo, M., Perilli, M., Celenza, G., Bonfiglio, G., Tempera, G., Amicosante, G.** Occurrence of extended spectrum β -lactamases among isolates of *Enterobacteriaceae* from urinary tract infections in southern Italy. *Microb Drug Resist* 2006; 12: 257-64.
115. **Bauernfeind, A., Chong, Y., Schweighart, S.** Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1989; 17: 316-21.
116. **Bauernfeind, A., Chong, Y., Lee, K.** Plasmid-encoded AmpC β -lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Med J* 1998; 39: 520-5.
117. **Philippon, A., Arlet, G., Lagrange, P. H.** Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13 Suppl 1: S17-29.
118. **Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillot, O., Lagrange, P. H., Philippon, A.** *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible β -lactamase (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2352-8.
119. **Koeck, J. L., Arlet, G., Philippon, A., Basmaciogullari, S., Thien, H. V., Buisson, Y., et al.** A plasmid-mediated CMY-2 β -lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 152: 255-60.

120. **Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Giamarellou, H.** Characterization of the plasmidic β -lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 221-4.
121. **Bauernfeind, A., Hohl, P., Schneider, I., Jungwirth, R., Frei, R.** *Escherichia coli* producing a cephamycinase (CMY-2) from a patient from the Libyan-Tunisian border region. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4: 168-70.
122. **Verdet, C., Arlet, G., Ben Redjeb, S., Ben Hassen, A., Lagrange, P. H., Philippon, A.** Characterisation of CMY-4, an AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase in a Tunisian clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 169: 235-40.
123. **Bou, G., Oliver, A., Ojeda, M., Monzón, C., Martínez-Beltrán, J.** Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2549-53.
124. **Miró, E., Mirelis, B., Navarro, F., Matas, L., Giménez, M., Rabaza, C.** *Escherichia coli* producing an ACC-1 class C β -lactamase isolated in Barcelona, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 866-7.
125. **Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., Sahly, H., Ullmann, U.** A novel type of AmpC β -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1924-31.
126. **Nadjar, D., Rouveau, M., Verdet, C., Donay, L., Herrmann, J., Lagrange, P. H., et al.** Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing transferable AmpC-type β -lactamase (ACC-1) originating from *Hafnia alvei*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 187: 35-40.

127. **Girlich, D., Karim, A., Spicq, C., Nordmann, P.** Plasmid-mediated cephalosporinase ACC-1 in clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 893-5.
128. **Makanera, A., Arlet, G., Gautier, V., Manai, M.** Molecular epidemiology and characterization of plasmid-encoded β -lactamases produced by Tunisian clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Mbandaka resistant to broad-spectrum cephalosporins. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2940-5.
129. **Rhimi-Mahjoubi, F., Bernier, M., Arlet, G., Jemaa, Z. B., Jouve, P., Hammami, A., et al.** Identification of plasmid-encoded cephalosporinase ACC-1 among various enterobacteria (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*) isolated from a Tunisian hospital *Pathol Biol (Paris)* 2002; 50: 7-11.
130. **Marchese, A., Arlet, G., Schito, G. C., Lagrange, P. H., Philippon, A.** Characterization of FOX-3, an AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase from an Italian isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 464-7.
131. **Raskine, L., Borrel, I., Barnaud, G., Boyer, S., Hanau-Bercot, B., Gravisse, J., et al.** Novel plasmid-encoded class C β -Lactamase (MOX-2) in *Klebsiella pneumoniae* from Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2262-5.
132. **Pena, C., Pujol, M., Pallarés, R., Corbella, X., Vidal, T., Tortras, N., et al.** Estimation of costs attributable to nosocomial infection: prolongation of hospitalization and calculation of alternative costs. *Med Clin (Barc)* 1996; 106: 441-4.
133. **Brigante, G., Luzzaro, F., Perilli, M., Lombardi, G., Coli, A., Rossolini, G. M., et al.** Evolution of CTX-M-type β -lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 157-62.

134. **Colodner, R., Rock, W., Chazan, B., Keller, N., Guy, N., Sakran, W., et al.** Risk factors for the development of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 163-7.
135. **Mirelis, B., Navarro, F., Miró, E., Mesa, R. J., Coll, P., Prats, G.** Community transmission of extended-spectrum β -lactamase. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1024-5.
136. **AitMhand, R., Soukri, A., Moustouli, N., Amarouch, H., EIMdaghri, N., Sirot, D., et al.** Plasmid-mediated TEM-3 extended-spectrum β -lactamase production in *Salmonella typhimurium* in Casablanca. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 169-72.
137. **Baraniak, A., Sadowy, E., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M.** Two different extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in one of the first ESBL-producing *Salmonella* isolates in Poland. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1095-7.
138. **Bradford, P. A., Yang, Y., Sahm, D., Grope, I., Gardovska, D., Storch, G.** CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1980-4.
139. **Fortineau, N., Naas, T., Gaillot, O., Nordmann, P.** SHV-type extended-spectrum β -lactamase in a *Shigella flexneri* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 685-8.
140. **Radice, M., Gonzealez, C., Power, P., Vidal, M. C., Gutkind, G.** Third-generation cephalosporin resistance in *Shigella sonnei*, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 442-3.
141. **Kim, S., Kim, J., Kang, Y., Park, Y., Lee, B.** Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the genus *Shigella* in the Republic of Korea. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5264-9.

142. **Ahamed, J., Kundu, M.** Molecular characterization of the SHV-11 β -lactamase of *Shigella dysenteriae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2081-3.
143. **Ishii, Y., Kimura, S., Alba, J., Shiroto, K., Otsuka, M., Hashizume, N., et al.** Extended-spectrum β -lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1072-5.
144. **Petroni, A., Corso, A., Melano, R., Cacace, M. L., Bru, A. M., Rossi, A., et al.** Plasmidic extended-spectrum β -lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1462-8.
145. **Prats, G., Mirelis, B., Miró, E., Navarro, F., Llovet, T., Johnson, J. R., et al.** Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among summer camp attendees with salmonellosis. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1273-80.
146. **Bradford, P. A., Urban, C., Jaiswal, A., Mariano, N., Rasmussen, B. A., Projan, S. J., et al.** SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 899-905.
147. **Bird, J., Browning, R., Hobson, R. P., MacKenzie, F. M., Brand, J., Gould, I. M.** Multiply-resistant *Klebsiella pneumoniae*: failure of spread in community-based elderly care facilities. *J Hosp Infect* 1998; 40: 243-7.
148. **Daza, R., Gutiérrez, J., Piédrola, G.** Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18: 211-5.
149. **Borer, A., Gilad, J., Menashe, G., Peled, N., Riesenber, K., Schlaeffer, F.** Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in community-acquired bacteremia in Southern Israel. *Med Sci Monit* 2002; 8: 44-47.

150. **Ariffin, H., Navaratnam, P., Mohamed, M., Arasu, A., Abdullah, W. A., Lee, C. L., et al.** Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in children with febrile neutropenia. *Int J Infect Dis* 2000; 4: 21-5.
151. **Asensio, A., Oliver, A., González-Diego, P., Baquero, F., Pérez-Díaz, J. C., Ros, P., et al.** Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 55-60.
152. **Eveillard, M., Schmit, J. L., Eb, F.** Antimicrobial use prior to the acquisition of multiresistant bacteria. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 155-8.
153. **De Champs, C., Rouby, D., Guelon, D., Sirot, J., Sirot, D., Beytout, D., et al.** A case-control study of an outbreak of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* strains producing CTX-1 (TEM-3) β -lactamase. *J Hosp Infect* 1991; 18: 5-13.
154. **Lautenbach, E., Patel, J. B., Bilker, W. B., Edelstein, P. H., Fishman, N. O.** Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1162-71.
155. **Wiener, J., Quinn, J. P., Bradford, P. A., Goering, R. V., Nathan, C., Bush, K., et al.** Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* 1999; 281: 517-23.
156. **Pitout, J. D., Hanson, N. D., Church, D. L., Laupland, K. B.** Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum β -lactamases: importance of community isolates with *bla*_{CTX-M} genes. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1736-41.

157. **Woodford, N., Ward, M. E., Kaufmann, M. E., Turton, J., Fagan, E. J., James, D., et al.** Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 735-43.
158. **Pournaras, S., Ikonomidis, A., Sofianou, D., Tsakris, A., Maniatis, A. N.** CTX-M-type β -lactamases affect community *Escherichia coli* treatment, Greece. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1163-4.
159. **Chen, Y.-T., Shu, H.-Y., Li, L.-H., Liao, T.-L., Wu, K.-M., Shiau, Y.-R., et al.** Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-Kilobase plasmid conferring quinolone-resistance and extended-spectrum β -lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3861-6.
160. **García, A., Navarro, F., Miró, E., Mirelis, B., Campoy, S. Coll, P.** Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*_{CTX-M-9} gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 819-26.
161. **Eckert, C., Gautier, V., Arlet, G.** DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 14-23.