



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

**Epidemiologia molecular de les
betalactamases AmpC plasmídiques en
enterobacteris aïllats a l'Hospital de la
Santa Creu i Sant Pau i la seva difusió
horitzontal**

Memòria realitzada per a optar al grau de
Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona

Caterina Mata García

Barcelona, 2011

Barcelona 11 de Maig de 2011.

La **Dra. Beatriz Mirelis Otero**, Professora Titular Universitària del Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap Clínic del Servei de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i El **Dr. Ferran Navarro Risueño**, Professor Associat Mèdic del Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap Clínic del Servei de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Certifiquen que:

La present tesis titulada "**Epidemiologia molecular de les betalactamases AmpC plasmídiques en enterobacteris aïllats a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i la seva difusió horitzontal**" presentada per **Caterina Mata García** per optar al grau acadèmic de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona, ha estat elaborada sota la nostra direcció i compleix amb els requisits necessaris per a la seva tramitació i posterior defensa davant del tribunal corresponent.

I per que així consti, firmem aquest document als efectes oportuns.

Dr. Ferran Navarro
Servei de Microbiologia
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Pau
Sant Quintí, 89
08041 Barcelona

Dra. Beatriz Mirelis
Servei de Microbiologia
Hospital de la Santa Creu i Sant
Pau
Sant Quintí, 89
08041 Barcelona

"Always dream and shoot higher than you know you can do. Don't bother just to be better than your contemporaries or predecessors. Try to be better than yourself."

William Faulkner (Premi Nobel de Literatura, 1949)

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.”

Mahatma Gandhi

*Als meus pares, per la seva generositat i amor,
sense ells no seria qui sóc.*

*Al meu germà Raimon,
per confiar sempre en mi.*

*A la meva iaia Teresa
i als avis que ja no estan.*

*A la resta de la meva família,
pel seu recolzament incansable.*

*Als meus amics,
per ser com són.*

*A Marcel,
l'amor de la meva vida.*

AGRAÏMENTS

Inicie aquestes línies conscient que no hem serà fàcil, que reescriuré aquestes paraules un munt de vegades i que a pesar del meu desig d'agrair a tothom, companys, amics, família, me n'adone que no serà possible, però amb l'esperança que d'alguna forma o altra tothom se senti inclòs.

En primer lloc m'agradaria agrair al Dr. Pere Coll, cap de Servei de la Unitat de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, i al Dr. Ferran Navarro, un dels directores d'aquest projecte, per confiar en mi i donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral.

A la Dra. Beatriz Mirelis, l'altra directora d'aquesta tesi, i a la Dra. Alba Rivera, per introduir-me en el món de la fenotípica i transmetre'm tot l'entusiasme i fascinació per aquest camp, però sobretot per la seva calidesa, per estendre'm la mà sempre que l'he necessitada i per la seva implicació en aquest projecte.

A la Dra. Mapi Garcillán-Barcia, de la Universitat de Cantàbria, per introduir-me en el complex món de les relaxases, però sobretot per fer la meua estança a Santander immillorable, per la seva calidesa humana i per la seva amistat. També al Dr. Fernando de la Cruz per acollir-me al seu laboratori.

Al Dr. Mark Toleman, el meu responsable en Cardiff, per les llargues converses sobre ciència, per retornar-me de nou l'entusiasme i la motivació i per confiar en mi en tot moment. També al Dr. Tim Walsh, per acollir-me al seu laboratori.

A Carolyn Newey per les correccions en l'anglès, pels seus consells i per la seva amabilitat i disponibilitat a pesar de les preses.

A tots els companys del laboratori, pels presents, pels que ja han marxat i pels nouvinguts. Perquè més que companys han sigut la meva família durant aquests quatre anys. Amb els qui he compartit moments molt bons, però també altres molt durs. En especial a la Laura, per introduir-me en les tècniques moleculars i per acollir-me com una més al laboratori des del primer dia; a Karol, per la seva gran generositat i bondat i per ser tot un exemple a seguir; a Rebeca per ser com és i buscar sempre solució als problemes; i amb especial èmfasi a la Montse, amb la que he compartit llargues tardes de feina i d'amistat, per la seua professionalitat, per estar sempre disposada a ajudar-me sacrificant el seu temps personal, per ser el meu mocadoret de llàgrimes i pel seu recolzament en tot moment. A tots, Montse, Laura, Karol, Michel, Rebeca, Manel, Oscar C., Oscar E., Paquita, Noe, Mery, gràcies per la vostra amistat.

També com no a totes les companyes de serologia, amb les qui ens reuníem per celebrar els aniversaris, i a tota la gent del Servei de Microbiologia, que d'alguna manera o altra han format part d'aquest projecte.

A tota la meva família, tant de sang com política, especialment als meus pares, qui m'han donat tot el que tinc, per ser un exemple a seguir i per ensenyar-me que l'esforç és una de les millors virtuts. M'agradaria també agrair al meu cosí Ramon, que ha contribuït en gran mesura al disseny gràfic de la portada; als meus amics, per fer la meva vida més plena i gratificant, però sobretot a Marcel, la meva parella, per estar sempre al meu costat, tant en les dures com les madures, i pel seu amor incondicional. A tots, gràcies per formar part de la meva vida.

| | |
|---|-----|
| 0 RESUM/SUMMARY | 3 |
| 1 INTRODUCCIÓ | 13 |
| 1.1. La família <i>Enterobacteriaceae</i> | 15 |
| 1.2. Els antibiòtics betalactàmics | 21 |
| 1.2.1. Context històric | 21 |
| 1.2.2. Estructura, classificació i espectre d'activitat | 24 |
| 1.2.3. Mecanisme d'acció dels antibiòtics betalactàmics | 31 |
| 1.2.4. Mecanismes de resistència als betalactàmics | 34 |
| 1.3. Les betalactamases | 37 |
| 1.3.1. Nomenclatura i classificació de les betalactamases | 38 |
| 1.3.2. Mecanisme d'acció de les betalactamases | 43 |
| 1.3.3. Betalactamases naturals en enterobacteris | 44 |
| 1.3.4. Betalactamases adquirides en enterobacteris | 47 |
| 1.4. Betalactamases AmpC adquirides (pACBL) | 51 |
| 1.4.1. Classes d'AmpC adquirides | 53 |
| 1.4.2. Distribució i prevalença | 61 |
| 1.4.3. Mètodes de detecció al laboratori | 73 |
| 1.5. Adquisició i transmissió de les resistències | 77 |
| 1.5.1. Transferència horitzontal | 78 |
| 1.5.2. Elements genètics mòbils de DNA | 81 |
| 2 OBJECTIUS | 95 |
| 3 MATERIAL I MÈTODES | 99 |
| 3.1. Control de qualitat a nivell nacional | 99 |
| 3.1.1. Selecció de soques | 99 |
| 3.1.2. Disseny de l'estudi i avaluació dels resultats | 101 |

| | |
|---|-----|
| 3.2. Caracterització de les soques productores de pACBL i dels vectors implicats en la seva disseminació | 105 |
| 3.2.1. Selecció de les soques | 105 |
| 3.2.2. Caracterització fenotípica dels diferents gens de resistència | 106 |
| 3.2.3. Caracterització genotípica dels diferents gens de resistència | 111 |
| 3.2.4. Relació epidemiològica de les soques | 117 |
| 3.2.5. Transferibilitat dels gens de resistència | 122 |
| 3.2.6. Estudi dels elements genètics mòbils | 124 |
| 4 RESULTATS | 141 |
| 4.1. Capacitat dels centres espanyols per a detectar i informar fenotips de resistència a betalactàmics | 141 |
| 4.1.1. Tècniques d'identificació i estudi de sensibilitat microbiana utilitzades pels centres participants | 141 |
| 4.1.2. Resultats de la identificació bacteriana per part dels laboratoris participants | 143 |
| 4.1.3. Capacitat dels centres espanyols per a realitzar i informar correctament els resultats de sensibilitat antimicrobiana | 143 |
| 4.1.4. Capacitat dels centres espanyols per a detectar correctament el mecanisme de resistència | 148 |
| 4.2. Transmissió <i>in vivo</i> d'un plasmidi portador de <i>bla</i>_{DHA-1} i <i>qnr</i> entre una soca d'<i>Escherichia coli</i> i una de <i>Serratia marcescens</i> | 151 |
| 4.3. Caracterització i epidemiologia de les pACBL | 154 |
| 4.3.1. Caracterització de les pACBL | 154 |
| 4.3.2. Relació clonal de les soques | 155 |
| 4.4. Prevalença i distribució de les pACBL | 157 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5. Caracterització dels vectors implicats en la disseminació de pACBL | - 161 |
| 4.5.1. Determinació de la freqüència d'autotransferència | ----- 161 |
| 4.5.2. Caracterització dels plasmidis portadors dels gens <i>ampC</i> | ----- 162 |
| 4.5.3. Correlació entre la PBRT i la tipificació de la relaxasa | ----- 168 |
| 4.5.4. Localització cromosòmica dels gens <i>ampC</i> | ----- 169 |
| 4.6. Caracterització de l'entorn genètic de les pACBL | ----- 175 |
| 4.6.1. Organització genètica de <i>bla</i> _{CMY-2,-4,-25,-27 i -40} | ----- 175 |
| 4.6.2. Organització genètica de <i>bla</i> _{DHA-1} | ----- 177 |
| 4.6.3. Organització genètica de <i>bla</i> _{ACC-1} | ----- 178 |
| 4.6.4. Organització genètica de <i>bla</i> _{CMY-2} mobilitzats per ICE | ----- 178 |
| 4.7. Sensibilitat a antimicrobians no betalactàmics | ----- 180 |
| 4.8. Prevalença de gens <i>qnrB</i> en soques portadores de <i>bla</i>_{DHA-1} | ----- 182 |
| 5 DISCUSSIÓ | ----- 189 |
| 6 CONCLUSIONS | ----- 205 |
| 7 BIBLIOGRAFIA | ----- 217 |
| 8 ANNEXOS | ----- 245 |
| 8.1. Detection and reporting β-lactam resistance phenotypes in <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>: a multicenter proficiency study in Spain. | ----- 247 |
| 8.2. <i>In vivo</i> transmission of a plasmid coharbouring <i>bla</i>_{DHA-1} and <i>qnrB</i> genes between <i>Escherichia coli</i> and <i>Serratia marcescens</i>. | ----- 259 |
| 8.3. Prevalence of acquired AmpC β-lactamases in <i>Enterobacteriaceae</i> lacking inducible chromosomal <i>ampC</i> genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007 | ----- 267 |

| | |
|---|-----|
| 8.4. Plasmid typing and genetic context of AmpC β-lactamases in <i>Enterobacteriaceae</i> lacking inducible chromosomal <i>ampC</i> genes: findings from a Spanish hospital 1999-2007 | 275 |
| 8.5. Prevalence of SXT/R391-like integrating conjugative elements carrying <i>bla</i>_{CMY-2} | 301 |
| 8.6. Association of <i>bla</i>_{DHA-1} and <i>qnrB</i> genes carried by broad-host-range plasmids among isolates of <i>Enterobacteriaceae</i> at a Spanish hospital | 309 |

INSTITUCIONS

HSCSP: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

OMS: Organització Mundial de la Salut

UE: Unió Europea

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*

DETERMINANTS DE RESISTÈNCIA

pACBL: *Plasmid-mediated AmpC β -lactamase* (al llarg del text s'utilitzarà el terme pACBL indistintament tant per a les betalactamases AmpC plasmídiques com per a les betalactamases adquirides de localització cromosòmica).

BLEA: Betalactamasa d'espectre ampliat

ESBL: *Extended-spectrum β -lactamase*

Qnr: *Quinolone resistance*

ELEMENTS GENÈTICS MÒBILS

MGE: *mobile genetic elements*

ICE: *integrative conjugative elements*

IME: *integrative mobilisable elements*

IG: illes genòmiques

ANTIBIÒTICS

AMP: ampicil·lina

PIP: piperacil·lina

CEF: cefalotina

CXM: cefuroxima

CTX: cefotaxima

CAZ: ceftazidima

FEP: cefepima

AZT: aztreonam

IMP: imipenem

FOX: cefoxitina

AMC: amoxicil·lina-àcid clavulànic

PTZ: piperacil·lina-tazobactam

SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol

SSS: sulfonamides

TMP: trimetoprim

NAL: àcid nalidíxic

CIP: ciprofloxacina

CHL: cloranfenicol

TET: tetraciclina

GEN: gentamicina

KAN: kanamicina

TOB: tobramicina

AMK: amikacina

STR: estreptomicina

RIF: rifampicina

C1G: cefalosporines de primera generació

C2G: cefalosporines de segona generació

C3G: cefalosporines de tercera generació

C4G: cefalosporines de quarta generació

ALTRES

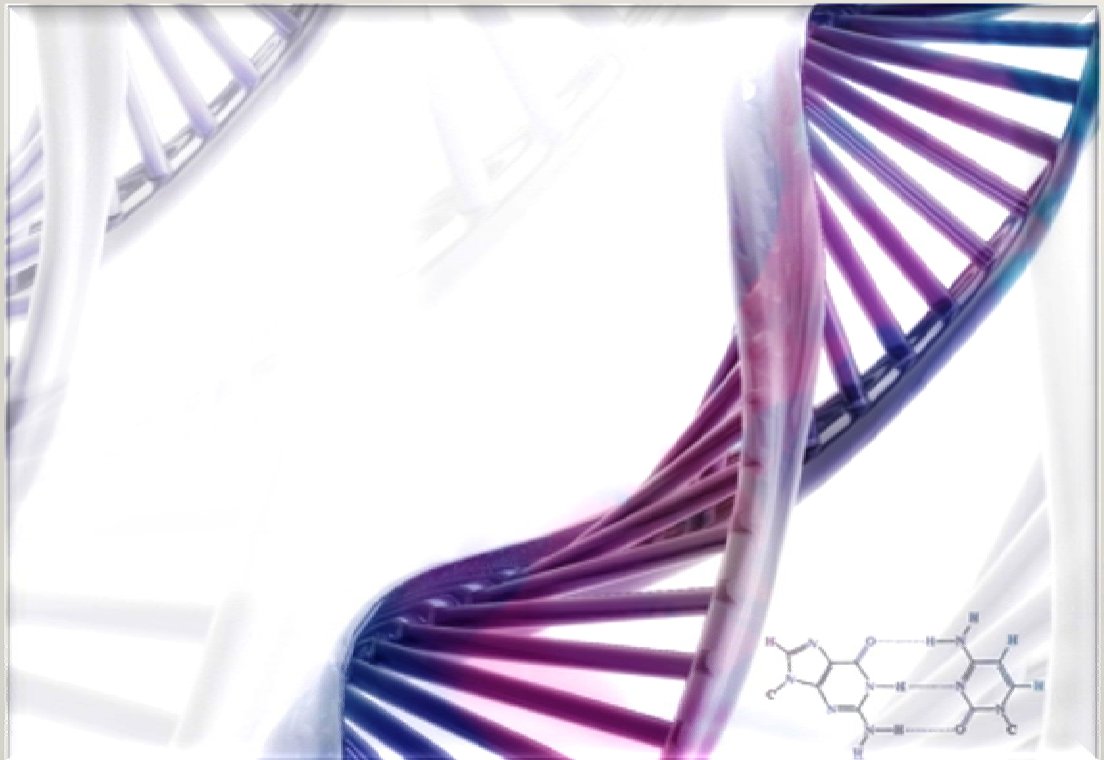
DNA: Àcid desoxiribonucleic

RNA: Àcid ribonucleic

PBRT: *PCR-based replicon typing*

Inc: Incompatibilitat

0. RESUM/SUMMARY



0. RESUM

Les betalactamases AmpC plasmídiques (pACBL) es varen descriure a finals de la dècada dels 80 i es caracteritzen per presentar un patró fenotípic indistingible a la hiperproducció d'una betalactamasa AmpC cromosòmica, sent per tant resistents a les penicil·lines, cefalosporines de primera, segona i tercera generació, monobactàmics i combinacions amb inhibidors, mantenint-se únicament sensibles a cefalosporines de quarta generació i carbapenèmics.

La detecció de les pACBL suposa tot un repte per als laboratoris de microbiologia clínica degut a la falta de mètodes fenotípics estandarditzats. En l'estudi nacional de control de qualitat que hem realitzat, s'observa que la capacitat dels centres espanyols per a detectar i informar la producció de betalactamases d'espectre ampliat (BLEA) en aïllats de *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* és molt superior a la capacitat per a detectar i informar la producció d'enzims AmpC en aquestes espècies (Annex I). Recentment s'han desenvolupat mètodes comercials per a la detecció fenotípica de pACBL al laboratori. El problema és que aquests mètodes no són vàlids per a detectar pACBL en microorganismes productors d'una AmpC cromosòmica natural. No obstant, la presència de colònies situades a la proximitat dels halos d'inhibició de cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima i aztreonam s'ha descrit com un possible indicador de la presència d'aquests enzims en *Escherichia coli*. Aquesta va ser l'única eina fenotípica que ens ha permès sospitar la presència d'una pACBL en una soca productora d'una AmpC cromosòmica natural, descrivint per primer cop una pACBL en una soca de *Serratia marcescens*. En aquest estudi, s'ha suggerit també la transferència horitzontal *in vivo* d'un plasmidi de 70 kb

portador dels gens *bla*_{DHA-1} i *qnrB* entre aïllats de *S. marcescens* i d'*E. coli* (Annex II).

L'increment del nombre de soques productores de pACBL i els escassos estudis de prevalença d'aquests enzims a l'Estat Espanyol va propiciar la realització d'un estudi per a determinar la prevalença de pACBL en enterobacteris sense AmpC cromosòmica induïble. Les soques d'estudi foren aïllades entre 1999 i 2007 a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Annex III). Encara que la prevalença global ha estat del 0,4%, s'observa un increment significatiu del 0,06% el 1999 a l'1,3% el 2007. *Proteus mirabilis* ha sigut l'espècie productora de pACBL més prevalent (1%). Del total de 117 pACBL caracteritzades durant aquest període, CMY-2 és l'enzim majoritari (67%), seguit de DHA-1 (26%). Altres pACBL aïllades amb menor proporció són ACC-1, CMY-4, CMY-25, CMY-27 i CMY-40, sent les tres últimes variants de CMY-2 descrites per primer cop.

El continu augment de la prevalença d'aquests enzims es deu principalment a la disseminació dels gens *ampC* per transferència horitzontal. A dia d'avui, encara existeix poca informació disponible sobre el tipus de vectors implicats en la seva expansió. És per aquest motiu que es va procedir a la caracterització dels vectors que mobilitzen els gens *ampC* en la col·lecció de soques del present estudi. Els resultats han mostrat que els gens *ampC* estan mobilitzats per plasmidis en el 84% (98/117) de les soques mentre que en el 6% (7/117) dels casos es mobilitzen via *Integrative conjugative elements* (ICE) de la família SXT/R391. L'anàlisi plasmídica mostra una estreta relació entre el gen *ampC* i el plasmidi implicat (Annex IV). En el 6% dels casos on els gens *ampC* han estat mobilitzats per ICE, es tracta de soques de *P. mirabilis*

productores de *bla_{CMY-2}* (Annex V). El fet que un ICE sigui el responsable de la mobilització dels gens *bla_{CMY-2}* en el 37% de les soques de *P. mirabilis* i que recentment s'hagi aïllat una soca de *P. mirabilis* portadora de *bla_{CMY-2}* al Japó fa pensar que aquests elements juguen un paper molt important en la disseminació de *bla_{CMY-2}*, almenys en aquesta espècie en els darrers anys. El transposó *Tn10* sembla ser el responsable de la mobilització de *bla_{CMY-2}* a l'interior de l'ICE.

Els entorns genètics dels gens *bla_{CMY-2,-4,-25,-27 i -40}* i *bla_{ACC-1}* explorats són molt conservats, relacionant-se en tots els casos amb l'element mòbil *ISEcp1*. En canvi, els entorns genètics dels gens *bla_{DHA-1}* presenten una major variabilitat, relacionant-se principalment amb els gens conservats de l'extrem 3'CS d'un integró de classe 1, *qacEΔ1* i *sul1*, i l'element mòbil *IS26*.

De la mateixa manera que ocorre amb les soques portadores de BLEA, els plasmidis que vehiculen els gens *ampC* solen contenir altres gens que confereixen resistència a altres famílies d'antibiòtics, limitant encara més les opcions terapèutiques. L'estudi de sensibilitat mostra un elevat grau de resistència a la majoria dels antibiòtics no betalactàmics testats en les soques clíniques. La resistència a àcid nalidíxic s'ha transferit per conjugació en el 62% de les soques productores de DHA-1. Des de fa uns anys s'ha constatat una clara associació entre *bla_{DHA-1}* i els gens *qnr* (gens que confereixen resistència de baix nivell a quinolones). En la majoria de casos ambdós gens s'han trobat al mateix plasmidi, associats a integrons o transposons compostos. La co-localització dels gens *qnrB* i *bla_{DHA-1}* en plasmidis d'ampli rang d'hostatger, principalment IncL/M, s'ha demostrat en totes les soques estudiades. L'anàlisi de l'entorn d'una d'elles revela que ambdós gens es

troben mobilitzats per un transposó IS26 compost, sent el primer cop que es detalla aquesta estructura en una soca d'*E. coli* (Annex VI).

SUMMARY

Plasmid-mediated AmpC β -lactamases (pACBL) were first described in the late 1980s. The phenotype of these enzymes is indistinguishable from the phenotype of hyperproducing chromosomal AmpC β -lactamases. Thus, pACBL confer resistance to penicillins, first, second and third generation cephalosporins, monobactams and β -lactamase inhibitors, and they are only susceptible to fourth generation cephalosporins and carbapenems.

Detecting pACBL is a great challenge for microbiological laboratories because standardised phenotypic methods are lacking. The results of a proficiency study that we developed and conducted in Spain showed that the ability of microbiological laboratories to detect and report extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* was greater than the ability to detect and report AmpC enzymes in these isolates (Annex I). Commercial methods have recently been developed to detect the pACBL phenotype in the laboratory. Their main problem is that they do not allow differentiation between chromosomal and acquired AmpC enzymes. Nevertheless, the presence of scattered colonies near the edge of the inhibition zones of ceftazidime, ceftazidime-avibactam and aztreonam has been described as a possible indicator of the presence of these enzymes in *Escherichia coli*. This was the only phenotypic tool that led us to suspect the presence of a pACBL in a chromosomal AmpC producer, thus, allowing the detection of a pACBL in a *S. marcescens* for the first time. Findings in this study also suggested *in vivo* horizontal transfer of a 70 kb IncL/M plasmid coharbouring

*bla*_{DHA-1} and *qnrB* resistance genes between *S. marcescens* and *E. coli* isolates (Annex II).

The increasing number of pACBL-producing isolates and the few studies of prevalence based on these enzymes in Spain led us to conduct a study to determine the prevalence of pACBL in *Enterobacteriaceae* isolates lacking inducible chromosomal *ampC* genes. These isolates were collected from 1999 to 2007 at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona, Spain (Annex III). Although the overall prevalence was 0.4%, we observed a significant increase, from 0.06% in 1999 to 1.3% in 2007. *Proteus mirabilis* showed the highest prevalence (1%). Among the 117 pACBL characterised during this period, CMY-2 was the most predominant enzyme (67%), followed by DHA-1 (26%). Less commonly found enzymes were ACC-1, CMY-4, CMY-25, CMY-27 and CMY-40. The latter three CMY-2-variants mentioned are reported in this study for the first time.

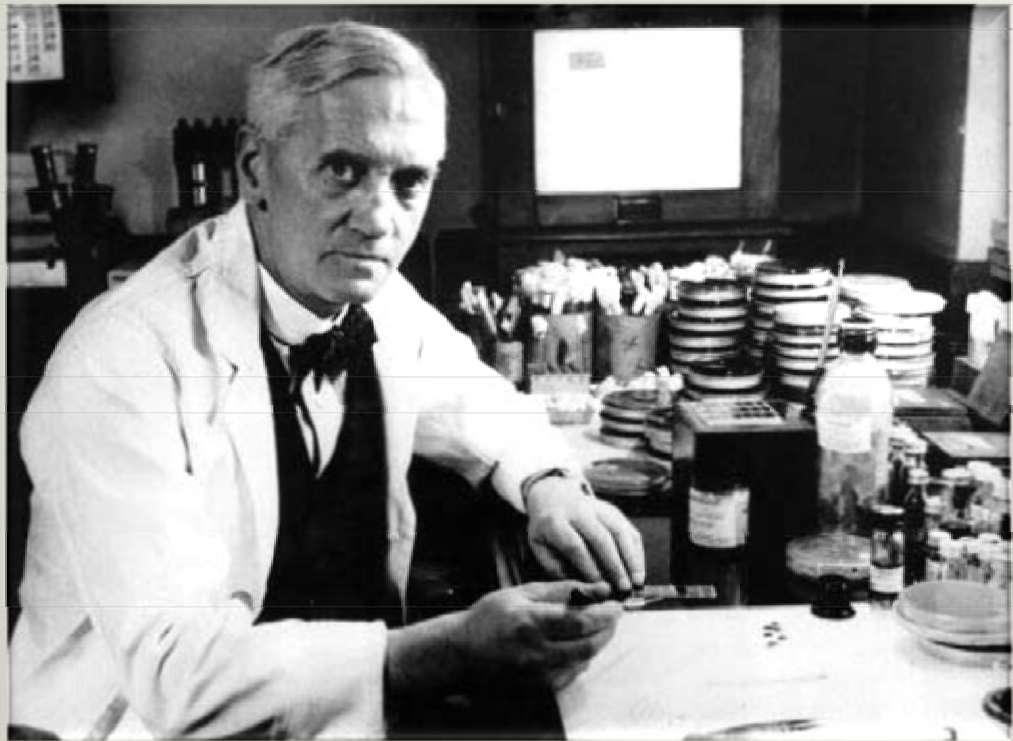
The continuous increase in the prevalence of AmpC enzymes is mainly due to the spread of *ampC* genes by horizontal transfer. Nowadays, there is little information available among the kind of vectors involved in their spread. For this reason, we characterized vectors mobilising *ampC* genes. Results show that *ampC* genes were mobilised by plasmids in 84% (98/117) of the strains, whereas 6% (7/117) of cases were mobilised through integrative conjugative elements (ICE) belonging to the SXT/R391 family. Plasmid analyses revealed a close relationship between the plasmid-mediated *ampC* gene and the specific plasmid family involved (Annex IV). In six percent of the cases in which *ampC* genes were mobilised by an ICE, all of them were CMY-2 producing *P. mirabilis* (Annex V). The fact that an ICE was responsible for

mobilising *bla*_{CMY-2} genes in 37% of *P. mirabilis* isolates and that a CMY-2 producing *P. mirabilis* strain was recently described in Japan suggests that these elements play an important role in the dissemination of *bla*_{CMY-2}, at least in this species in recent years. The Tn10 transposon seems to be responsible for mobilising *bla*_{CMY-2} inside the ICE.

The regions surrounding *bla*_{CMY-2,-4,-25,-27,-40} and *bla*_{ACC-1} were highly conserved. In all cases they were associated with the *ISEcp1* mobile element. The regions surrounding *bla*_{DHA-1} were more variable and mainly associated with the conserved genes of the 3'CS of class 1 integrons, *qacEΔ1* and *sul1*, and the IS26 mobile element.

As occurs for ESBL-producing strains, plasmids carrying *ampC* genes usually contain other genes that confer resistance to other antibiotic families. This limits the therapeutic options even further. Susceptibility testing results displayed a high level of resistance to most non-β-lactam agents tested in clinical isolates. The nalidixic acid resistance determinant was transferred by conjugation in the 62% of DHA-1-producing *Enterobacteriaceae*. A clear association between *bla*_{DHA-1} and *qnr* genes (genes that confer a low level resistance to quinolones) have been reported in recent years. In most cases both genes are located on the same plasmid, associated with integrons or composite transposons. Co-localization of *qnrB* and *bla*_{DHA-1} genes on broad-host-range plasmids, all but one belonging to the IncL/M group, was demonstrated in all the studied isolates. Analysis of the genetic environment of one of the isolates revealed that both genes were mobilised through an IS26 composite transposon. This is the first time that this genetic structure is detailed in an *E. coli* strain (Annex VI).

1. INTRODUCCIÓ



1. INTRODUCCIÓ

La problemàtica de la resistència antibiòtica està catalogada com una de les tres amenaces més greus a la salut pública per la Organització Mundial de la Salut. El fenomen de la resistència microbiana és complex. A grans trets, els microorganismes poden fer-se resistents per l'aparició de mutacions o per l'adquisició de nous gens de resistència per transferència horitzontal. Encara que molts microorganismes són resistents de forma natural a algunes famílies d'antibiòtics, el cert és que l'ús continuat i indiscriminat dels antibiòtics, no solament en l'àmbit clínic sinó també en l'àmbit veterinari i en l'agricultura entre d'altres, està lligat inequívocament a la selecció i disseminació dels microorganismes resistents. Des de fa un temps, s'ha observat que els microorganismes resistents tenen major facilitat que els sensibles per a adquirir nous mecanismes de resistència, fent-se doncs resistents a més d'una família d'antibiòtics, fenomen conegut com a multiresistència, o panresistència quan els microorganismes són resistents a la totalitat dels antibiòtics d'ús terapèutic (152, 194). La causa més freqüent de multiresistència és la resistència adquirida i es dona gràcies a la facilitat de disseminació i d'intercanvi genètic que tenen els bacteris. Cada cop són més freqüents els exemples de bacteris multiresistents, tals com *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, múltiples bacteris de la família *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc (152), comprometent enormement l'eficàcia del tractament antimicrobià, tant a nivell empíric com dirigit, augmentant els nivells de morbimortalitat de causa infecciosa i els costos de l'atenció sanitària.

El problema de la resistència microbiana, avui per avui impossible d'erradicar, comporta implicacions clíniques, terapèutiques i econòmiques i exigeix el desenvolupament d'estratègies a curt termini per a intentar posar-li fre a aquesta alarmant situació. És per aquest motiu que varies institucions internacionals com la OMS (Organització Mundial de la Salut), la UE (Unió Europea), el CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) i el ECDC (*European Center for Disease Prevention and Control*) han elaborat diferents estratègies per a combatre l'emergència i disseminació de la resistència microbiana (46). Algunes de les mesures proposades consisteixen en la vigilància de la resistència i del consum, la reducció de la càrrega de la malaltia mitjançant la vacunació, l'establiment de mesures de control de la infecció, l'educació dels ciutadans i professionals sanitaris i el desenvolupament de nous antimicrobians, entre d'altres.

1.1. LA FAMILIA *Enterobacteriaceae*

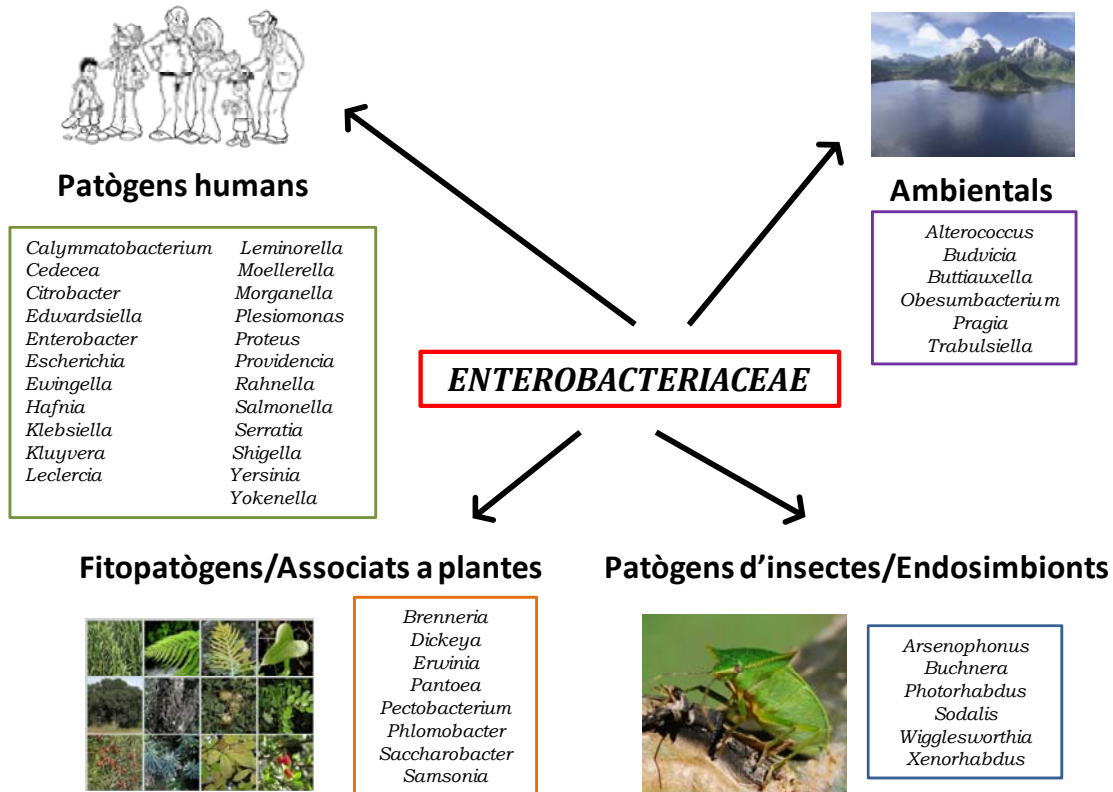
Encara que el origen de membres de la família *Enterobacteriaceae* estan datats a principis del segle XIX, no fou fins a l'any 1937 que el microbiòleg Otto Rahn va proposar el terme *Enterobacteriaceae* per a agrupar aquell conjunt de microorganismes bioquímica i morfològicament semblants (132).

La família *Enterobacteriaceae*, denominada així perquè molts dels seus integrants formen part de la microbiota habitual del tub digestiu d'animals i humans, és el grup més gran i heterogeni de bacils gramnegatius amb importància clínica. En l'actualitat s'han descrit més de 40 gèneres cultivables i centenars d'espècies, diversos gèneres d'endosimbionts o paràsits d'insectes i plantes, alguns dels quals no són cultivables en medis convencionals, i diversos grups no nominats (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy) i (www.bacterio.cict.fr).

La classificació d'aquests gèneres s'ha fet segons les seves propietats bioquímiques, la seva estructura antigènica i posteriorment mitjançant l'ús de tècniques moleculars tals com la hibridació DNA-DNA, la seqüenciació dels gens que codifiquen per al 16S rRNA o la seqüenciació completa del seu genoma (37, 132).

Els enterobacteris constitueixen una família molt diversa i molt ubiqüa (132). Els diferents gèneres d'enterobacteris i l'associació amb els diferents nínxols ecològics on s'han trobat aïllats estan llistats a la figura 1.

Figura 1. Associació dels gèneres de la família *Enterobacteriaceae* en els diferents hàbitats on s'han trobat amb més freqüència.



Modificació de la Figura 3 capítol 2 del llibre “The enterobacteria” (132).

Els membres d'aquesta família es caracteritzen per ser bacils gramnegatius, aerobis i anaerobis facultatius i no esporulats. En general tenen requeriments nutricionals simples, sent capaços de créixer en medis amb una sola font d'energia. Redueixen els nitrats a nitrits, fermenten la glucosa per la via àcid-mixta o del butanodiol, amb producció o no de gas, i són capaços de degradar un gran ventall de carbohidrats. Són catalasa positiva i oxidasa negativa, excepte *Plesiomonas shigelloides*, sent aquesta última característica molt important a l'hora de diferenciar-los amb d'altres gramnegatius fermentadors i no fermentadors (37, 132).

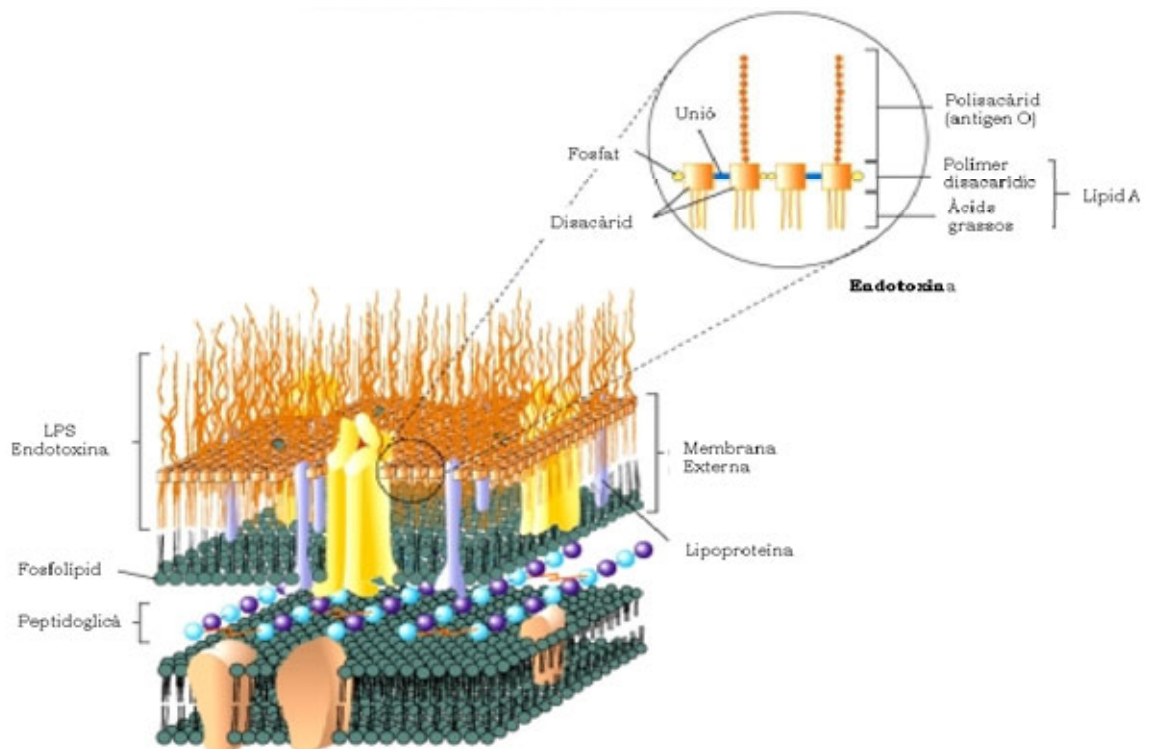
Són mòbils gràcies a la presència de flagels peritrics (envolten a tota la cèl·lula), a excepció d'alguns gèneres immòbils com *Klebsiella* i *Shigella*. A més a més dels flagels, moltes espècies produeixen fimbries o pili, càpsules, o ambdues, que en ocasions són importants factors de virulència. Les fimbries o pili estan presents en quasi totes les espècies i són responsables de la fixació de les cèl·lules bacterianes a altres bacteris, a les cèl·lules de l'hoste o actuant com a receptors de bacteriòfags. En canvi, la majoria d'enterobacteris no són capsulars, a excepció del gènere *Klebsiella* i algunes soques d'*Escherichia coli*. Aquestes càpsules poden estar ben definides o ser una estructura laxa i mal definida, de composició polisacàridica (212).

En quant a les seves característiques genotípiques, els enterobacteris es caracteritzen per tindre un contingut en G+C d'entre el 38 i el 60%, tret que va començar a utilitzar-se per a la classificació dels membres d'aquesta família a principis dels anys 60 (132).

Des del punt de vist estructural, presenten la típica paret cel·lular dels bacteris gramnegatius. Aquesta es troba envoltant a la membrana interna o citosòlica i està composta per la membrana externa o bicapa lipídica i l'espai periplasmàtic, on es troba immers el peptidoglicà (Figura 2). Les seves principals funcions són les de mantenir la forma cel·lular i conferir rigidesa al microorganisme, oferir protecció front a condicions ambientals adverses, mantenir la pressió osmòtica per a evitar la lisi cel·lular i constituir una barrera impermeable a molècules no lipofíliques, carregades i de gran tamany (31). És degut a aquesta última característica de la paret cel·lular d'on deriva el nom de bacteris gramnegatius, englobant sota aquesta definició a tots aquells bacteris que perden la coloració blava obscura proporcionada pel

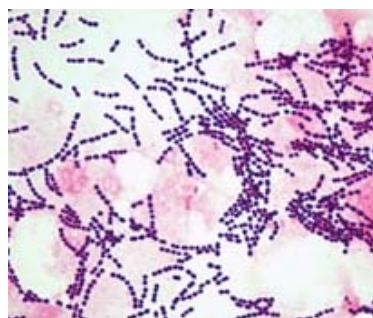
colorant cristall violeta, durant la fase de decoloració de la tinció de Gram. L'ús d'un colorant de contrast, la fucsina bàsica, és el causant de la coloració rosàcia dels bacteris gram negatius (Figura 3).

Figura 2. Estructura de la paret cel·lular dels bacteris gramnegatius.



<http://wenliang.myweb.uga.edu/mystudy/immunology/ScienceOfImmunology/ImmunitytoBacteria.html>

Figura 3. Exemples de tincions de Gram. La imatge situada a l'esquerra prové d'un cultiu d'estreptococs. A la dreta trobem un cultiu d'*E. coli*.



Tinció grampositius



Tinció gramnegatius

Imbricats al llarg de la paret cel·lular trobem una sèrie de components estructurals la funció dels quals es troba detallada a la taula 1:

Taula 1. Principals components de la paret cel·lular i les seves funcions.

| ▪ Membrana externa: | |
|--|---|
| Components | Funció |
| Proteïnes de membrana i canals proteïcs (porines) | Permeten el pas selectiu de substàncies petites i hidrofíliques |
| Lipopolisacàrids (LPS) o endotoxines. Amb 3 regions ben diferenciades: lípid A, nucli R i cadena lateral O | Lípid A: amb propietats tòxiques (endotoxina) Nucli R: compostat per polisacàrids especials Cadena lateral O: funcionen com a llocs de reconeixement, conferint al bacteri propietats antigèniques (antigen O) |
| Lipoproteïnes o proteïnes de Braun | Implicades en la unió entre la membrana externa i el peptidoglicà |
| Fosfolípids | Confereixen rigidesa i impermeabilitat a la membrana |
| ▪ Espai periplasmàtic: | |
| Components | Funció |
| Peptidoglicà | Contribueix conjuntament amb la membrana externa a l'estabilitat química i estructural del bacteri |
| Enzims hidrolítics (ex. fosfatases, proteases, betalactamases) | Degradació i metabolització de macromolècules |
| Oligosacàrids | S'acumulen a l'espai periplasmàtic per al manteniment de la pressió osmòtica |

A més a més de les característiques immunogèniques de l'antigen somàtic O del LPS, s'han utilitzat 2 grups d'antígens més com a mètode de classificació serotípica: els antígens flagel·lars "H" i els antígens capsulars "K".

Poc més de 20 gèneres (Figura 1) i al voltant d'unes 40 espècies d'aquesta extensa família han estat associades a quadres clínics en humans. Dins d'aquests trobem aquells que són patògens primaris *per se* i els patògens oportunistes. Dins dels considerats com a patògens primaris trobem les salmonel·les, les shigel·les, les yersínies i les serovars enteropatògenes d'*E. coli*. Les infeccions causades per aquests gèneres poden ser a nivell

gastrointestinal, a través de mecanismes de tipus invasius o toxigènics, o infeccions septicèmiques com les febres tifoides o paratifoides, causades per *Salmonella enterica* serovar Typhi i Paratyphi, o la pesta, causada per *Yersinia pestis* (212). Dins dels considerats patògens oportunistes trobem una gran varietat d'espècies formant part de la microbiota del tub digestiu. Els gèneres d'enterobacteris oportunistes que s'aïllen amb major freqüència són *Escherichia* i *Klebsiella* seguides d'*Enterobacter*, *Citrobacter* i les diferents espècies dels gèneres *Proteus*, *Morganella* i *Providencia*. Les infeccions causades per aquest grup són de tipus extra-intestinals tals com infeccions urinàries, bacterièmies, meningitis, peritonitis, infeccions pulmonars i de ferides entre d'altres (211).

Entre els factors de patogenicitat associats als enterobacteris trobem les adhesines, relacionades amb uropatogenicitat d'algunes serovars d'*E. coli* i enteropatogenicitat en altres gèneres; la càpsula, associada a una major invasivitat, particularment en les meningitis causades per *E. coli*; les exotoxines, causants de desordres gastrointestinals, els sideròfors i les endotoxines com els LPS, que poden provocar el shock endotòxic. Una gran varietat d'elements mòbils (ex. plasmidis, integrons, transposons, illes de patogenicitat, etc) són els responsables de l'adquisició de nous gens de resistència i d'altres factors de virulència.

Els enterobacteris presenten resistència natural a la penicil·lina G, glucopèptids, macròlids com l'eritromicina, clindamicina, àcid fusídic, mupirocina, estreptogramines i linezolid, però són sensibles a la majoria d'antibiòtics betalactàmics d'ampli espectre, aminoglucòsids, tetraciclins, quinolones, sulfamides, colistina i cloranfenicol (159, 190). No obstant, degut

a la gran facilitat que tenen aquests microorganismes per a adquirir nous gens de resistència via transferència horitzontal, la realització d'antibiogrames de forma rutinària als laboratoris de microbiologia és imprescindible a l'hora de determinar el seu patró de sensibilitat.

1.2. ELS ANTIBIÒTICS BETALACTÀMICS

Els antibiòtics betalactàmics constitueixen la família més nombrosa d'antimicrobians i la més utilitzada en la pràctica clínica. Tenen una acció bactericida lenta, presenten escassa toxicitat i un ampli marge terapèutic. El seu espectre d'activitat ha anat augmentant al llarg del temps per la incorporació de noves molècules amb major activitat front a bacils gramnegatius, però la progressiva aparició de resistències adquirides ha limitat el seu ús empíric i la seva eficàcia en determinades situacions (169).

1.2.1. CONTEXT HISTÒRIC

El descobriment de la penicil·lina G el 1928 per part d'Alexander Fleming (88), a partir d'una soca fúngica de *Penicillium notatum*, va establir els inicis de l'era antibiòtica. No obstant, a pesar que Fleming va demostrar l'acció bactericida d'aquesta substància en front a soques d' *S. aureus* amb les que treballava, no fou fins l'any 1941 que la penicil·lina G o benzilpenicil·lina va ser usada per primer cop en l'àmbit clínic, degut als grans problemes que plantejava l'extracció de grans quantitats d'aquesta substància.

A pesar que el descobriment de la penicil·lina fou tota una revolució a l'hora de fer front a malalties infeccioses abans intractables, pocs anys després varen començar a sorgir les primeres resistències. El 1944, Kirby

descriu la primera soca d' *S. aureus* resistent a la penicil·lina G, degut a la producció de penicil·linases que la hidrolitzaven fent-la així inactiva (142). Encara que inicialment es tractava de casos puntuals i esporàdics, els nivells de resistència en *S. aureus* varen començar a augmentar estrepitosament al cap de pocs anys, arribant en l'actualitat a nivells de resistència del 95% a l'Estat espanyol (169).

Fruit de l'aparició dels primers casos de resistència, sorgeix la necessitat de buscar noves molècules que foren actives front a les penicil·linases estafilocòcciques i amb un major espectre d'activitat, sent capaces d'actuar també front a bacteris gramnegatius. En pocs anys es descobreixen una gran quantitat de compostos amb activitat antibiòtica, originats principalment de derivats semi-sintètics de les substàncies secretades de forma natural per diferents fongs i bacteris, alguns dels quals es troben detallats a la taula 2.

A principis dels anys 60 s'obtenen les primeres penicil·lines, entre les que destaquen les penicil·lines resistents a penicil·linases estafilocòcciques com la meticil·lina (227), sintetitzada el 1960, o les aminopenicil·lines, sent l'ampicil·lina la primera molècula d'ampli espectre utilitzada front a bacils gramnegatius l'any 1961 (226). Un any més tard es sintetitza la primera cefalosporina semi-sintètica, la cefalotina (una cefalosporina de primera generació; C1G), activa front a grampositius i gramnegatius productors de penicil·linases (213). El 1967 apareixen les primeres carboxipenicil·lines (143), on s'observa que la incorporació d'un grup carboxil augmenta l'espectre d'activitat actuant també front a bacils gramnegatius no fermentadors com *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp. Poc després apareixen altres

penicil·lines semi-sintètiques com les ureidopenicil·lines (225), amb major activitat antipseudomònica que les anteriors.

Taula 2. Organismes productors d'antibiòtics naturals i els seus derivats semi-sintètics.

| ORGANISME PRODUCTOR | SUBSTÀNCIA SECRETADA | ANTIBIÒTICS DERIVATS | REF. |
|----------------------------------|----------------------|---|-------|
| <i>Penicillium notatum</i> | Penicil·lina G | Penicil·lines naturals i semi-sintètiques | (88) |
| <i>Acremonium chrysogenum</i> | Cefalosporina C | Cefalosporines | (192) |
| <i>Streptomyces lactamdurans</i> | Cefamicines A, B i C | Cefamicines | (238) |
| <i>Streptomyces clavuligerus</i> | Àcid clavulànic | Àcid clavulànic i altres inhibidors de betalactamases | (217) |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | SQ26180 | Aztreonam | (245) |
| <i>Streptomyces cattleya</i> | Tienamicina | Carbapenèmics | (138) |

A principis dels anys 70 apareixen les cefalosporines de segona generació (C2G) (213) i les cefamicines (238), amb un espectre d'acció variable però amb millor activitat front gramnegatius, major estabilitat front a algunes betalactamases i alguns bacteris anaerobis. Pocs anys més tard, entre finals dels 70 i principis dels 80, comença l'era de les cefalosporines de tercera i quarta generació (C3G i C4G) (213), carbapenèmics (138), inhibidors de betalactamases (217) i monobactàmics (244).

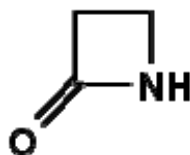
Amb l'aparició de tots aquests últims compostos es pensava que s'havia assolit la quimera de l'antibiòtic ideal, dotat d'amplíssim espectre d'activitat, estabilitat als mecanismes de resistència bacterians, farmacocinètica propícia per a l'administració més còmoda i espaiada, i absència o minimització dels efectes secundaris. Aquest fet va fer pensar falsament que el tractament de les principals malalties infeccioses bacterianes havia quedat resolt. No obstant, la resistència als antimicrobians va començar a aparèixer al poc de

comercialitzar-se aquests compostos. Des d'aleshores, l'increment de soques resistents i dels problemes clínics causats per aquestes es troba en continu augment (170).

1.2.2. ESTRUCTURA, CLASSIFICACIÓ I ESPECTRE D'ACTIVITAT

Els betalactàmics constitueixen la família més àmplia d'antibiòtics coneguts en l'actualitat i reben aquest nom per la presència d'un anell betalactàmic en la seva estructura química (Figura 4), el qual els confereix les seves propietats més importants: el seu mecanisme d'acció i l'escassa toxicitat. La unió d'aquest anell a un de secundari origina els diferents grups descrits dins de la família (Taula 3), i condiciona el seu espectre d'acció i les seves propietats farmacocinètiques (243).

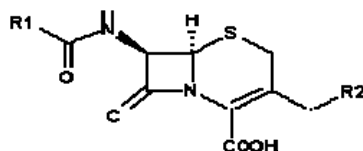
Figura 4. Estructura de l'anell betalactàmic.



1.2.2.1. Penicil·lines

Aquest grup presenta una estructura bicíclica, l'àcid 6-aminopenicil·lànic (6-APA), format per un anell betalactàmic i un anell de tiazolidina (resultat de la condensació d'una molècula de cisteïna i d'una de valina) (Figura 5). A més a més, tenen una cadena lateral, que varia d'unes penicil·lines a altres en la posició 6 de l'anell betalactàmic i que és el que defineix les seves propietats.

Figura 5. Estructura de l'àcid 6-aminopenicil·lànic (6-APA).



Taula 3. Principals antibiòtics betalactàmics.

| CLASSE | GRUP | BETALACTÀMIC |
|--------------------------------|--|---|
| 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 BETALACTAMASES * | Àcid clavulànic | Amoxicil·lina-àcid clavulànic ^{iv, o} Ticarcil·lina-àcid clavulànic ^{iv, o} |
| | Sulbactam | Ampicil·lina-sulbactam ^{iv, o} |
| | Tazobactam | Piperacil·lina-tazobactam ^{iv} |
| CEFALOSPORINES | C1G | Cefalotina ^{iv} , Cefazolina ^{im, iv} , Cefradina ^{im, iv, o} Cefalexina ^o , Cefdinir ^o |
| | C2G | Cefamandol ^{im, iv} , Cefuroxima ^{im, iv} , Cefaclor ^o Cefuroxima axetil ^o |
| | C3G | Cefoperazona ^{im, iv} , Cefotaxima ^{im, iv} , Ceftriaxona ^{im, iv} , Cefixima ^o Ceftazidima ^{im, iv} , Cefibutè ^o , Cefpodoxima ^o , Cefdinir ^o |
| | C4G | Cefepima ^{im, iv} , Cefpiroma ^{im, iv} |
| | Cefamicines | Cefoxitina ^{im, iv} , Cefotetan ^{im, iv} |
| | Oxacefems | Moxalactam ^{im, iv} |
| | Carbacefems | Loracarbef ^o |
| MONOBACTÀMICS | | Aztreonam ^{im, iv} |
| CARBAPENÈMICS | | Imipenem ^{iv} , Meropenem ^{iv} , Ertapenem ^{iv} |

(**im**: intramuscular; **iv**: intravenós; **o**: oral). * S'utilitzen associats a un altre betalactàmic.

Taula modificada del capítol “Els betalactàmics” dels Treballs de la SCB. (2004) Vol. 55 pp. 91-106 (179).

Podem distingir diverses classes de penicil·lines (Taula 3) en funció de si són naturals, sintètiques o semi-sintètiques, de la seva activitat antibacteriana i el seu espectre d'acció (Taula 4). Les penicil·lines sintètiques o semi-sintètiques s'obtenen a partir de la modificació química de l'estructura bàsica 6-APA, mitjançant la incorporació de diferents radicals, donant lloc així a diversos grups en funció de la seva d'activitat, les propietats farmacològiques i resistència a les betalactamases.

Taula 4. Classificació i espectre d'activitat de les penicil·lines.

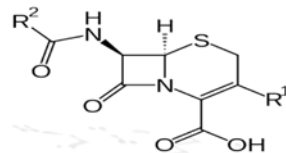
| GRUP | ANTIBIÒTIC | ESPECTRE D'ACTIVITAT |
|--|-------------------------------|---|
| PENICIL·LINES NATURALS | Benzilpenicil·lina | Bacteris grampositius: Ex. estreptococs, pneumococs, <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Actinomyces israelii</i> Alguns gramnegatius: Ex. meningococs, gonococs no productors de betalactamases, <i>Pasteurella multocida</i> Bacteris anaerobis no productors de betalactamases Espiroquetes: Ex. <i>Treponema pallidum</i> |
| PENICIL·LINES RESISTENTS A PENICIL·LINASES | Cloxacil·lina Oxacil·lina | <i>S. aureus</i> i estafilococs coagulasa negativa |
| AMINOPENICIL·LINES | Ampicil·lina Amoxicil·lina | Igual que les benzilpenicil·lines però més actius contra enterococs, listèries i hemòfils i també front a alguns enterobacteris com <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. enterica</i> i <i>Shigella</i> |
| CARBOXIPENICIL·LINES | Ticarcil·lina | Igual que les aminopenicil·lines ampliant l'espectre a bacils gramnegatius. La ticarcil·lina no és activa front a <i>Klebsiella</i> spp. |
| UREIDOPENICIL·LINES | Piperacil·lina | Amplia l'espectre d'activitat a <i>P. aeruginosa</i> |

Taula modificada de Marín M. et al. "Antibióticos betalactámicos" (169).

1.2.2.2. Cefalosporines

Són derivats semi-sintètics de la cefalosporina C i estructuralment semblants a les penicil·lines. Dins d'aquesta classe d'antibiòtics betalactàmics, s'inclouen altres grups de compostos químicament diferents com les cefamicines, els carbacefems i els oxacefems. L'estructura bàsica està constituïda per un nucli cefem que consisteix en la fusió d'un anell betalactàmic i un anell de dihidrotiazina (Figura 6). Diferents substitucions de les cadenes laterals situades en les posicions 3 i 7 modifiquen les seves propietats antibacterianes i farmacocinètiques.

Figura 6. Estructura del grup cefem.



Es classifiquen en generacions atenent al desenvolupament històric i l'espectre antimicrobià (Taula 5).

Taula 5. Classificació i espectre d'activitat de les cefalosporines.

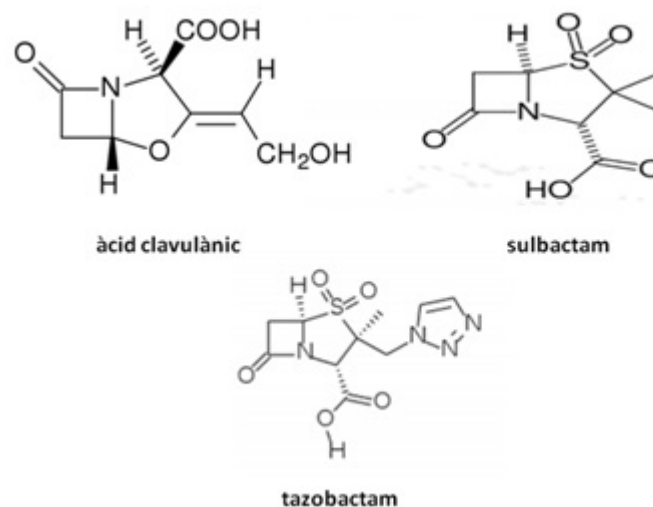
| GRUP | ANTIBIÒTIC | ESPECTRE D'ACTIVITAT |
|-------------|---------------------------|---|
| C1G | Cefalexina | Cocs grampositius, incloent estafilococs productors de penicil·linasa i enterobacteris com <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. i <i>Proteus mirabilis</i> |
| | Cefazolina | |
| C2G | Cefuroxima Cefonicid | Més actives que les C1G front bacils gramnegatius com <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> i alguns enterobacteris |
| CEFAMICINES | Cefoxitina | Espectre similar a les C2G però actives també front a anaerobis |
| C3G | Cefotaxima Ceftriaxona | Més actives front a bacils gramnegatius que les C2G. Excel·lent activitat front enterobacteris, estreptococs, <i>H. influenzae</i> i neissèries. Regular activitat front estafilococs |
| | Ceftazidima | Excel·lent cobertura front a <i>P. aeruginosa</i> . Discreta activitat front a grampositius. |
| C4G | Cefepima | Excel·lent activitat front a grampositius i gramnegatius, incloent <i>P. aeruginosa</i> . Més actiu que altres cefalosporines front a <i>Enterobacter</i> |

Taula modificada de Marín M. et al. "Antibiòtics betalactàmics" (169).

1.2.2.3. Inhibidors de betalactamases

Els inhibidors de betalactamases presenten escassa activitat antibacteriana intrínseca i s'utilitzen en combinació amb penicil·lines per a restaurar l'activitat inicial dels antibiòtics betalactàmics en organismes productors de betalactamases. Existeixen tres tipus d'inhibidors utilitzats en l'àmbit clínic: l'àcid clavulànic, el tazobactam i sulbactam. En l'àcid clavulànic, l'àtom de sulfur de l'anell tiazolidínic és substituït per un oxigen, i el sulbactam i tazobactam presenten una oxidació del sulfur present a l'anell betalactàmic (Figura 7).

Figura 7. Estructura química dels inhibidors de betalactamases.

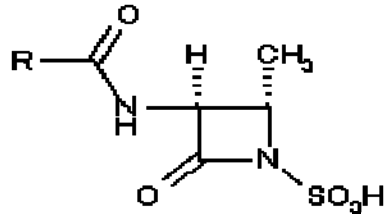


1.2.2.4. Monobactàmics

Són composts monocíclics derivats de l'àcid-3-amino-monobactàmic (3-AMA), on el nitrogen de l'anell betalactàmic es troba unit a un radical sulfònic. Tenen una estructura betalactàmica senzilla on l'anell betalactàmic no està fusionat a un altre anell secundari (Figura 8). L'aztreonam és l'únic

monobactàmic utilitzat en l'àmbit clínic i el seu espectre d'activitat és limita a bacils gramnegatius aerobis facultatius.

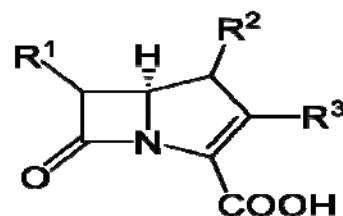
Figura 8. Estructura bàsica dels monobactàmics.



1.2.2.5. Carbapenèmics

Són derivats de la tienamicina, substància aïllada d' *Streptomyces cattleya*. La seva estructura bàsica consisteix en un anell betalactàmic fusionat amb un anell de pirrolidina (Figura 9). Aquestes modificacions i les cadenes laterals, així com la posició espacial d'aquestes, condiciona la major afinitat per les proteïnes fixadores de penicil·lina (PBP) diana, un increment de la potència, de l'espectre antibacterià i de la resistència a les betalactamases, sent els betalactàmics de major espectre (Taula 6).

Figura 9. Estructura bàsica dels carbapenèmics.



Taula 6. Espectre d'activitat de les combinacions betalactàmic-inhibidors de betalactamases, monobactàmics i carbapenèmics.

| GRUP | ANTIBIÒTIC | ESPECTRE D'ACTIVITAT |
|--|---|--|
| COMBINACIONS BETALACTÀMIC/ INHIBIDORS DE BETALACTAMASES | Amoxicil·lina-àcid clavulànic Ampicil·lina-sulbactam | Amplien l'espectre d'activitat front a bacteris productors de betalactamases, cobrint cocs grampositius i gramnegatius, bacils gramnegatius i anaerobis |
| | Piperacil·lina-tazobactam | Semblant a l' amoxicil·lina- àcid clavulànic però amb major activitat front a bacils gramnegatius incloent <i>P. aeruginosa</i> |
| MONOBACTÀMICS | Aztreonam | Bacils gramnegatius, incloent <i>P. aeruginosa</i> . No cobreix grampositius ni anaerobis |
| CARBAPENÈMICS | Imipenem Meropenem Ertapenem | Excel·lent activitat front a enterobacteris productors i no productors de betalactamases, bacils gramnegatius no fermentadors, com <i>P. aeruginosa</i> i <i>Acinetobacter</i> , hemòfils productors i no productors de betalactamasa i anaerobis. No presenten activitat front estafilococs resistents a la meticil·lina (MRSA), als enterococs resistents a l'ampicil·lina i a <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |

Taula modificada de Marín M. et al. "Antibióticos betalactámicos" (169).

1.2.3. MECANISME D'ACCIÓ DELS ANTIBIÒTICS BETALACTÀMICS

Els antibiòtics betalactàmics són agents bactericides que actuen principalment a través de dos mecanismes: inhibint l'última etapa de síntesi del peptidoglicà i induint l'autòlisi bacteriana (254).

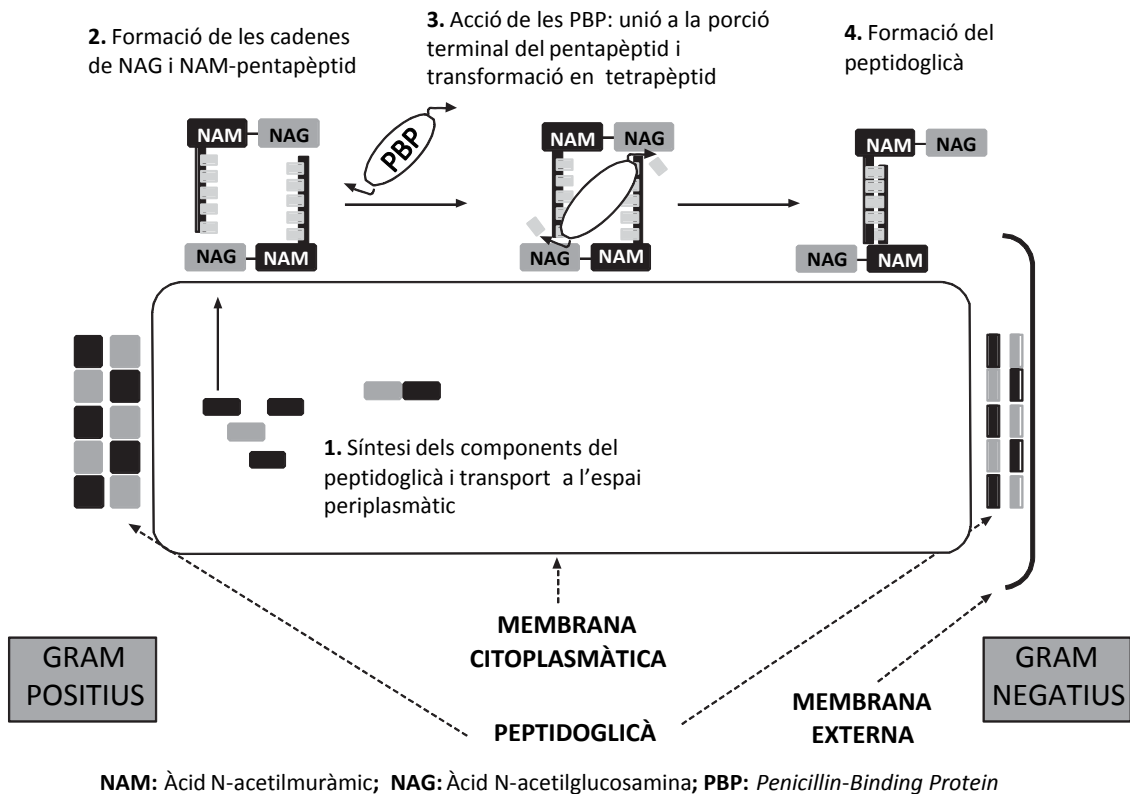
Les cèl·lules en fase estacionària o sense paret cel·lular com els micoplasmes no es troben afectats per aquesta família d'antibiòtics, ja que la seva acció bactericida sols es produeix a nivell del peptidoglicà quan les cèl·lules es troben en fase de creixement. És per aquest motiu que els betalactàmics presenten una activitat reduïda en determinades situacions clíniques, com els abscessos, on una gran part de la població bacteriana es troba en estat estacionari.

L'esquelet del peptidoglicà està compost per una part proteica i una glucídica. La part glucídica està formada per molècules de N-acetilglucosamina (NAG) i N-acetilmuràmic (NAM) unides per enllaços β -(1,4), mentre que la part peptídica està formada per quatre aminoàcids (L-alanina, àcid glutàmic, àcid diaminopimèlic i D-alanina) que s'uneixen a la part glucídica, pel N-acetilmuràmic, formant el que es coneix com a tetrapèptid de glicà.

El peptidoglicà està format per cadenes llargues d'aquesta subunitat unides per enllaços creuats entre la D-alanina d'una subunitat i l'àcid diaminopimèlic d'una altra subunitat, necessaris per a aconseguir la rigidesa i impedir la lisi cel·lular del bacteri. Els enzims que catalitzen les reaccions d'unió entre les diferents subunitats que conformen el peptidoglicà s'anomenen de forma genèrica PBP, per la capacitat d'unir-se covalentment a

l'anell betalactàmic. Es coneixen diverses classes de PBP en funció del seu pes molecular, la seva afinitat pels antibiòtics betalactàmics o per la seva funció fisiològica, entre les quals s'inclouen activitats de transpeptidació, transglicosilació i carboxipeptidació, pròpies del procés de síntesi i ensamblatge de la paret bacteriana (179, 210).

La síntesi del peptidoglicà es duu a terme en diverses etapes (Figura 10). En la primera etapa, que té lloc al citoplasma, es realitza la síntesi dels precursors de la paret (NAM i NAG) i l'addició seqüencial i ordenada dels diferents aminoàcids al NAM, en aquest cas formant un pentapèptid. En la segona etapa, aquests precursors són transportats a través de la membrana citoplasmàtica cap a l'espai periplasmàtic en forma d' UDP-NAM-pentapèptid i UDP-NAG-pentapèptid, gràcies a l'acció d'un transportador lipídic anomenat bactoprenol. Durant el transport a través de la membrana es produirà l'ensamblatge parcial, per transglicosilació, dels precursors NAG i NAM-pentapèptid. En l'última etapa de síntesi del peptidoglicà s'originarà la reacció de transpeptidació entre la subunitat peptídica del peptidoglicà naixent i la del peptidoglicà acceptor (amb pèrdua de l'últim aminoàcid del pentapèptid) gràcies a l'acció de les PBP localitzades a l'espai periplasmàtic.

Figura 10. Etapes de formació de la paret cel·lular.**Figura extreta de Suárez, C. i Gudiol F. Antibióticos betalactámicos, 2009 (243).**

L'anell betalactàmic, present en tots els antibiòtics d'aquesta família, és un anàleg estructural del substrat natural de les PBP transpeptidases encarregades de l'última etapa de síntesi del peptidoglicà. El betalactàmic s'uneix al centre actiu de la PBP mitjançant un enllaç covalent, inactivant així la seva funció. La paret cel·lular continua sintetitzant-se però com que no es formen els enllaços creuats, la paret queda debilitada i, conjuntament amb les reaccions que desencadenen l'alliberament descontrolat d'autolisines, acaba produint-se la lisi bacteriana (254) (Figura 11).

Figura 11. Mecanisme d'acció dels betalactàmics.

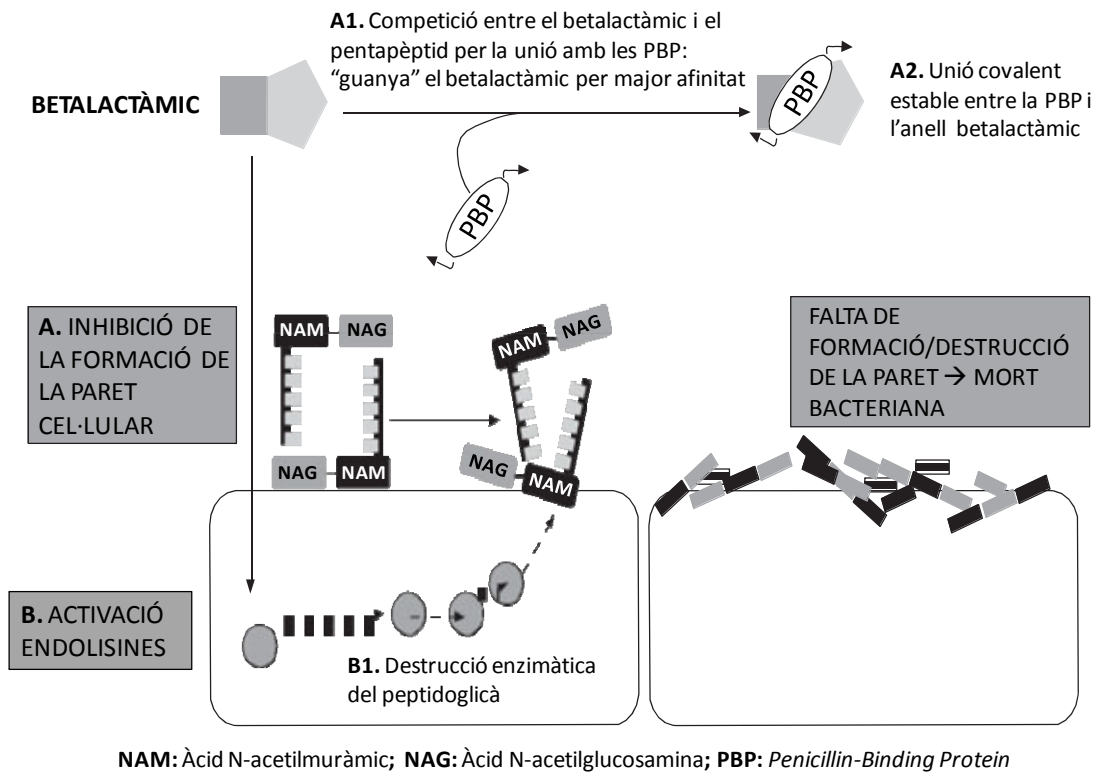


Figura extreta de Suárez, C. i Gudiol F. Antibióticos betalactámicos, 2009 (243).

1.2.4. MECANISMES DE RESISTÈNCIA ALS BETALACTÀMICS

Els bacteris poden desenvolupar resistència als betalactàmics mitjançant diversos mecanismes (Figura 12), que poden presentar-se sols o associats a altres mecanismes causants de resistència, tant a la mateixa família antibacteriana com a altres antibiòtics. L'aparició d'aquests mecanismes de resistència pot ser deguda a mutacions puntuals dins del propi organisme o per adquisició de material genètic exogen. Els principals mecanismes implicats en la resistència als betalactàmics es troben detallats a continuació.

1.2.4.1. Alteració de la permeabilitat cel·lular

Els canals proteics o porines són necessaris per a la penetració, a través de la membrana externa, dels antibiòtics betalactàmics. La disminució en el nombre de porines o la seva modificació estructural disminueix la penetració dels betalactàmics a l'espai periplasmàtic, lloc on es troba present la seva diana (193).

1.2.4.2 Modificació de la diana

Els betalactàmics han d'unir-se a les PBP per a exercir el seu efecte bactericida. Canvis a nivell de les PBP, generalment per mutacions, recombinacions o adquisicions de noves PBP, poden dificultar la unió del betalactàmic a la seva diana i per tant suposar una disminució de la seva activitat (104). Aquest mecanisme de resistència es dona principalment en cocs grampositius com *S. aureus* resistents a la meticil·lina (MRSA), en *Streptococcus pneumoniae* o *Enterococcus* spp. Però també en gramnegatius com *H. influenzae* o neissèries, quan el mecanisme de resistència als betalactàmics no és la producció de betalactamasa (179).

1.2.4.3. Bombes d'expulsió activa

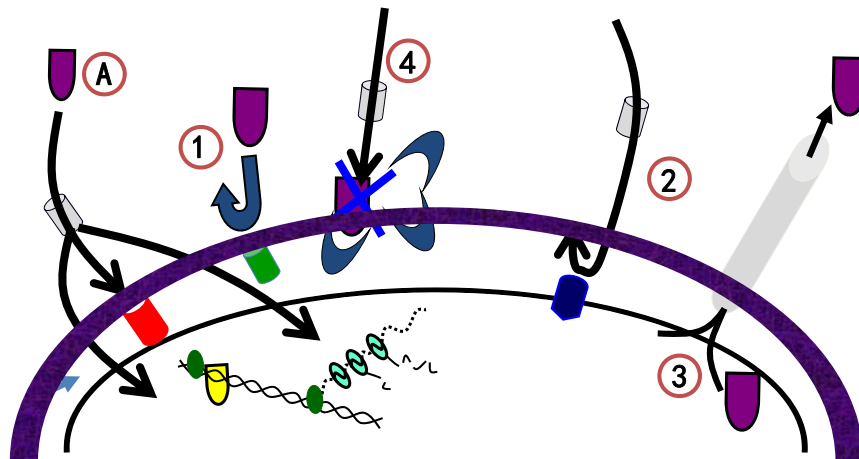
Els sistemes d'expulsió activa són proteïnes de transport encarregades de bombejar les substàncies tòxiques cap a l'exterior. L'activació d'aquests sistemes comporta l'eliminació de l'antibiòtic de l'espai periplasmàtic cap a l'exterior. En l'actualitat es coneixen 5 famílies de bombes d'expulsió activa, que difereixen en la manera d'obtenir l'energia per a desenvolupar la seva activitat, en la seva organització estructural i en els substrats que són capaces d'eliminar (153). Aquestes bombes s'han trobat tant en bacteris grampositius

com negatius, fent especial èmfasi en *P. aeruginosa*. Tal i com ocorre amb el cas de les alteracions de permeabilitat, les bombes d'expulsió activa no solen causar un elevat grau de resistència per si mateixes, encara que poden actuar de forma sinèrgica amb altres mecanismes de resistència, arribant a assolir nivells amb significació clínica (153, 170).

1.2.4.4. Producció d'enzims inactivants

És el principal mecanisme de resistència als antibiòtics betalactàmics, sobretot en bacteris gramnegatius. Consisteix en la producció d'uns enzims, anomenats betalactamases, que hidrolitzen l'anell betalactàmic donant lloc a un derivat inactiu incapaç d'unir-se a les PBP. La quantitat i naturalesa de l'enzim produït influeix en el fenotip de resistència observat.

Figura 12. Principals mecanismes de resistència.



El mecanisme d'acció dels antibacterians segueix el procés indicat: **A**: l'antibiòtic travessa la membrana externa a través d'una porina i passa a l'espai periplasmàtic fins que troba la diana (PBP). Els punts de l'1 al 4, indiquen els mecanismes de resistència als betalactàmics: **1**. Alteració de la permeabilitat cel·lular; **2**. Modificació de la diana; **3**. Bombes d'expulsió activa; **4**. Producció d'enzims inactivants.

1.3. LES BETALACTAMASES

Les betalactamases són enzims capaços d'unir-se a l'anell betalactàmic i hidrolitzar-lo en un compost inactiu. El descobriment de la primera betalactamasa està datat abans de l'ús clínic de l'antibiòtic (1). S'han descrit quasi un miler de variants d'aquest tipus d'enzims (www.lahey.org/Studies) (44), tant d'origen cromosòmic com plasmídic. Existeixen múltiples raons que justifiquen aquesta enorme varietat de betalactamases entre les quals cal destacar: l'enorme antiguitat d'aquests enzims, estimada fa més de tres bilions d'anys; que són enzims molt ben estudiats degut a la seva importància clínica; que s'han trobat en una gran varietat d'ambients sotmesos a múltiples pressions de selecció, demostrant així que són enzims altament adaptables que han evolucionat per a fer front als múltiples compostos amb acció antibiòtica o amb efecte inhibidor; i que són capaços de disseminar-se a altres microorganismes a través d'una gran varietat d'elements mòbils que afavoreixen així la seva promiscuïtat i recombinació (44).

Encara que l'origen de les betalactamases no és del tot clar, es creu que provenen d'un ancestre comú de les PBP, implicades originalment en el metabolisme de la paret cel·lular bacteriana i que han divergit d'aquestes especialitzant-se en la funció de resistència antibiòtica. Aquesta idea ja fou pinzellada el 1965 per Tipper i Strominger (252) i investigacions posteriors han anat reforçant-la. Algunes de les raons que senyalen en aquesta direcció són la seva semblança estructural i nucleotídica amb les PBP (la majoria de les betalactamases, a excepció de les metal·lo-betalactamases, presenten una serina en el seu centre actiu, igual que totes les PBP amb acció DD-peptidasa)

(140, 171) i que s'ha vist que alguns dels components implicats en la regulació de les betalactamases AmpC induïbles (ex. AmpD, AmpG) són essencials en el procés de reciclatge de la paret cel·lular (66, 128).

Encara que la seva funció original podria haver estat participar en la síntesi de la paret bacteriana, es postula que l'aparició dels primers microorganismes productors d'antibiòtics, amb la finalitat de fer front als seus competidors, va propiciar l'inici de les primeres PBP amb funció betalactamasa. Aquestes betalactamases podrien presentar una funció d'autoprotecció en aquells microorganismes productors d'antibiòtics i de retruc provocar l'aparició de noves betalactamases en altres microorganismes no productors, amb la finalitat de protegir-se d'aquestes substàncies tòxiques (171). Aquesta continua pressió evolutiva i l'enorme pressió selectiva exercida per l'ús dels antibiòtics és un factor primordial per a la subsistència, evolució i disseminació de les betalactamases i la seva especialització en la resistència antibiòtica.

1.3.1. NOMENCLATURA I CLASSIFICACIÓ DE LES BETALACTAMASES

Les primeres betalactamases descrites s'anomenaven en funció del nom de la soca o del plasmidi que les produïa (ex. PC1 i P99), però a mesura que es van anar descobrint una gran quantitat d'aquests enzims, la nomenclatura s'ha anat complicant, seguint criteris d'allò més diversos tals com la preferència de substrat (ex. CTX: més activa contra cefotaxima), el lloc d'aïllament (ex. CTX-M: aïllada per primer cop a Munich, NDM: New Delhi metallo- β -lactamase), del bacteri on és va aïllar per primer cop (ex. KPC: *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), del pacient d'on provenia la mostra

(ex. BIL: el nom del pacient era Bilal), de la seva classificació estructural (ex. ACC: Ambler Class C) i amb menys freqüència dels descobridors d'aquestes betalactamases (ex. HMS: Hedges, Matthew i Smith) (130).

Les betalactamases s'han classificat tradicionalment segons les seves propietats funcionals o estructurals. La primera classificació funcional, basada en l'espectre i perfil de substrat d'hidròlisi, fou proposada per Richmond i Sykes el 1973 (220) seguida pocs anys més tard d'una classificació estructural, basada en la seqüència aminoacídica de les betalactamases, proposada per Ambler el 1980 (8) i posteriorment completada i actualitzada per altres autors (9, 30, 96, 97, 125, 133, 198). Aquest esquema agrupa les betalactamases en 4 classes (A, B, C i D).

Les betalactamases de la classe A (penicil·linases), C (cefalosporinases) i D (oxacil·linases) es caracteritzen per presentar una molècula de serina al seu centre actiu mentre que la classe B són metal·loenzims que requereixen de cations divalents de zinc (Zn^{2+}) al seu centre actiu i són inhibits per agents quelants com l'EDTA però no per inhibidors de betalactamases com l'àcid clavulànic (Taula 7).

Anys més tard, el 1989, seguint amb la línia de la classificació funcional, Bush proposa un nou esquema, diferenciant les betalactamases en quatre grups en funció de les seves propietats fenotípiques, la seva capacitat d'hidrolitzar diferents substrats i de si són inhibides o no per l'àcid clavulànic (43). Posteriorment, Bush, Jacoby i Medeiros (45) actualitzen aquesta classificació correlacionant-la també amb la seva estructura molecular. En la recent actualització publicada el 2010 (44), el seu esquema de classificació

queda reduït a tres grups, que a grans trets es resumeixen en betalactamases amb activitat cefalosporinasa (Grup 1), que inclou la classe molecular C d'Ambler, les serina betalactamases (Grup 2), que inclouen les classes moleculars A i D d'Ambler i representen el grup més gran de betalactamases, incloent 12 subgrups, i per últim les metal·lo-betalactamases (Grup 3), pertanyents a la classe B d'Ambler. Informació més detallada d'aquests grups i els seus corresponents subgrups es troba reflectida a la taula 7 i en posteriors apartats.

Taula 7. Classificació esquematitzada de les betalactamases atenent tant a propietats funcionals com moleculars.

| Grups de Bush-Jacoby (2009) | Grups de Bush-Jacoby-Medeiros (1995) | Classe molecular (subclasses) | Substrats preferents | Inhibit per | | Principals característiques | Enzims representatius |
|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---|-------------|------|--|---|
| | | | | AC o TZB | EDTA | | |
| 1 | 1 | C | Cefalosporines | NO | NO | Major activitat front a cefalosporines que benzilpenicil·lina; hidrolitzen cefamicines | AmpC d' <i>E.coli</i> , P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 |
| 1e | NI | C | Cefalosporines | NO | NO | Major hidròlisi de ceftazidima i sovint altres oximiino-betalactàmics | GC1, CMY-37 |
| 2a | 2a | A | Penicil·lines | SI | NO | Major activitat front a cefalosporines que benzilpenicil·lina | PC1 |
| 2b | 2b | A | Penicil·lines i C1G | SI | NO | Nivell d'hidròlisi semblant entre benzilpenicil·lina i cefalosporines | TEM-1, TEM-2, SHV-1 |
| 2be | 2be | A | Cefalosporines d'ampli espectre i monobactàmics | SI | NO | Major hidròlisi de C3G i C4G i aztreonam | TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1 |
| 2br | 2br | A | Penicil·lines | NO | NO | Resistència a inhibidors de betalactamases | TEM-30, SHV-10 |
| 2ber | NI | A | Cefalosporines d'ampli espectre i monobactàmics | NO | NO | Major activitat oximiino-betalactàmics combinat amb inhibidors de betalactamases | TEM-50 |
| 2c | 2c | A | Carbenicil·lines | SI | NO | Major activitat front a carbenicil·lines | PSE-1, CARB-3 |
| 2ce | NI | A | Carbenicil·lines i C4G | SI | NO | Major activitat front a carbenicil·lines, cefepima i cefpiroma | RTG-4 |
| 2d | 2d | D | Cloxacil·lina | Variable | NO | Major activitat front cloxacil·lina o oxacil·lina | OXA-1, OXA-10 |
| 2de | NI | D | Cefalosporines d'ampli espectre | Variable | NO | Major activitat front cloxacil·lina o oxacil·lina i oximiino-betalactàmics | OXA-11, OXA-15 |
| 2df | NI | D | Carbapenèmics | Variable | NO | Major activitat front cloxacil·lina o oxacil·lina i carbapenèmics | OXA-23, OXA-48 |

Cont. Taula 7

| Grups de Bush-Jacoby (2009) | Grups de Bush-Jacoby-Medeiros (1995) | Classe molecular (subclasses) | Substrats preferents | Inhibit per | | Principals característiques | Enzims representatius |
|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------|------|---|---------------------------|
| | | | | AC o TZB | EDTA | | |
| 2e | 2e | A | Cefalosporines d'ampli espectre | SI | NO | Hidrolitzen cefalosporines. Inhibides per àcid clavulànic però no aztreonam | CepA |
| 2f | 2f | A | Carbapenèmics | Variable | NO | Major activitat front a carbapenèmics, oxiiimino-betalactàmics, cefamicines | KPC-2, IMI-1, SME-1 |
| 3a | 3 | B (B1) | Carbapenèmics | NO | SI | Hidròlisi d'ampli espectre incloent carbapenèmics però no monobactàmics | IMP-1, VIM-1, CerA, IND-1 |
| | | B (B3) | | | | | L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1 |
| 3b | 3 | B (B2) | Carbapenèmics | NO | SI | Preferència d'hidròlisi front carbapenèmics | CphA, Sfh-1 |
| NI | 4 | Desconegut | | | | | |

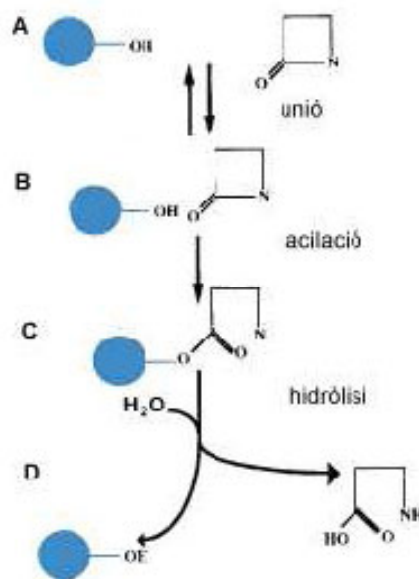
NI: no identificat; **AC:** àcid clavulànic; **TZB:** tazobactam; **C1G, C3G i C4G:** cefalosporines de primera, segona i quarta generació.

Taula extreta de Bush, K. i Jacoby, G. 2010 (44).

1.3.2. MECANISME D'ACCIÓ DE LES BETALACTAMASES

Les betalactamases reconeixen l'anell betalactàmic i s'uneixen a ell de forma no covalent generant un complex acil-enzim, el qual s'hidrolitza ràpidament en presència de molècules d'aigua, alliberant-se per una banda l'enzim inactiu i per altra banda l'antibiòtic inactiu. En aquelles betalactamases amb un residu de serina al seu centre catalític, i que conformen la gran majoria, la unió acil-enzim és covalent (Figura 13), mentre que aquesta unió és no covalent en les metallo-betalactamases.

Figura 13. Mecanisme d'acció de les serina betalactamases.



A: L'enzim s'associa de forma reversible a l'antibiòtic i forma un complex no covalent; **B:** L'anell betalactàmic és reconegut per un grup hidroxil lliure de la cadena del residu de la serina del lloc actiu de l'enzim, amb la qual cosa es produeix un enllaç covalent acil-éster; **C:** Hidròlisi de l'enllaç éster on s'allibera l'enzim actiu i l'antibiòtic inactiu.

Figura extreta de Livermore D. 1995 (158).

1.3.3. BETALACTAMASES NATURALS EN ENTEROBACTERIS

Les betalactamases són el principal mecanisme de resistència als antibiòtics betalactàmics en enterobacteris. Tant és així, que tots els enterobacteris d'interès clínic, amb excepció de *S. enterica* i *P. mirabilis*, presenten una betalactamasa natural i pròpia de cada espècie (158, 190).

1.3.3.1. Betalactamases de classe C

Són les més abundants dins dels membres de la família *Enterobacteriaceae* i poden expressar-se tant a nivell constitutiu com induïble.

- **Expressió constitutiva**

En soques d'*E. coli* i *Shigella*.

La presència d'un promotor dèbil i un atenuador de la transcripció fa que el gen que codifica la betalactamasa, anomenada AmpC, s'expressa a nivells basals molt baixos, sent aquestes soques sensibles a tots els antibiòtics betalactàmics, a excepció dels que són resistents de forma natural, per alteracions de permeabilitat, com la benzilpenicil·lina i les penicil·lines resistents a penicil·linases. No obstant, mutacions en la regió promotora o en l'atenuador (255), insercions d'elements mòbils que actuen com a promotors forts (134) o mutacions en la seva regió estructural (166) poden causar la hiperproducció de la betalactamasa, produint-se un increment considerable de la producció d'enzim. En aquestes circumstàncies el microorganisme expressa nivells elevats de resistència a aminopenicil·lines, carboxipenicil·lines, C1G i C2G, cefamicines i inhibidors de betalactamases. Si el grau d'hiperproducció

és molt elevat poden afectar també a ureidopenicil·lines, C3G i monobactàmics.

- **Expressió induïble**

En *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Providencia* i *Hafnia alvei*.

Els microorganismes on l'*ampC* es troba induït, per la presència d'inductors forts tals com cefoxitina, imipenem, ampicil·lina, amoxicil·lina, benzilpenicil·lina, àcid clavulànic i C1G, presenten patrons de resistència natural a aminopenicil·lines, carboxipenicil·lines, C1G, inhibidors de betalactamases i una sensibilitat variable a C2G i cefamicines. *Enterobacter* i *C. freundii* són resistents a cefoxitina i presenten una sensibilitat disminuïda a cefuroxima, mentre que *M. morganii*, *Providencia* i *Serratia* són resistents a cefuroxima i moderadament resistents a cefoxitina.

Hi ha alguns casos de desrepressió permanent, originats per mutacions d'alguns dels gens encarregats de la regulació de l'expressió de la betalactamasa, majoritàriament en el gen *ampD* i *ampR* (28). En aquest cas, tant en presència com en absència d'inductor, els nivells de resistència són extremadament elevats, fent-se resistents a C3G i monobactàmics però mantenint-se sensibles a C4G i carbapenèmics.

1.3.3.2. Betalactamases de classe A

Els membres de la família *Enterobacteriaceae* presenten diferents tipus de betalactamases de classe A, que poden agrupar-se en diferents subgrups (classificació de Bush, Jacoby i Medeiros) (44), en funció del patró de

sensibilitat que confereixen i l'espècie on es troben naturalment presents. Aquestes també poden expressar-se tant a nivell constitutiu com induïble.

- **Expressió constitutiva**

- Subgrup 2a: En *K. pneumoniae*

Algunes soques de *K. pneumoniae* expressen betalactamases cromosòmiques de classe A anomenades OKP i LEN (113, 247) amb activitat penicil·lina, conferint resistència a ampicil·lina, amoxicil·lina, carbenicil·lina i ticarcil·lina de forma natural.

- Subgrup 2b: En *K. pneumoniae*

La majoria de soques de *K. pneumoniae* presenten la betalactamasa cromosòmica SHV-1, amb un espectre d'activitat similar a les anteriors, a diferència que quan s'hiperproduïxen poden arribar a conferir resistència a C1G i afectar de forma moderada a ceftazidima i combinacions amb inhibidors (159).

- Subgrup 2be: En *Klebsiella oxytoca*

Les soques de *K. oxytoca* presenten una betalactamasa natural anomenada KOXY, amb un espectre d'activitat similar a les anteriors, excepte quan aquesta es troba hiperproduïda. En aquest cas, les soques són altament resistents a totes les penicil·lines, les C2G i l'aztreonam, i amb resistència moderada o alta a les combinacions amb inhibidors i C3G, però mantenint-se sensibles a la ceftazidima. Aquest perfil de sensibilitat, amb sinèrgia positiva entre C3G (excepte ceftazidima) i amoxicil·lina-àcid clavulànic, pot confondre's fàcilment amb el patró produït per una betalactamasa d'espectre ampliat

(BLEA), encara que aquestes presenten major activitat front a ceftazidima.

- **Expressió induïble**

En *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter koseri* i *Citrobacter sedlakii*.

Són actives front a penicil·lines, C1G i cefuroxima, però es mantenen sensibles front a C3G i C4G, cefamicines, combinacions amb inhibidors, monobactàmics i carbapenèmics. La seva desrepressió comporta a més a més resistència a C3G i sensibilitat disminuïda a C4G.

Dins dels enterobacteris, trobem espècies amb més d'una betalactamasa cromosòmica, com és el cas de *Yersinia enterocolitica*, amb una cefalosporinasa induïble de classe C i una betalactamasa de classe A. El seu fenotip salvatge inclou resistència a aminopenicil·lines, carboxipenicil·lines, combinacions amb inhibidors, cefamicines, C1G i C2G, sent sensibles a C3G i C4G i carbapenèmics.

1.3.4. BETALACTAMASES ADQUIRIDES EN ENTEROBACTERIS

A banda de les betalactamases naturals presents en enterobacteris, l'adquisició de nous gens que confereixen resistència als antibiòtics betalactàmics és cada cop més freqüent. La primera penicil·linasa de naturalesa plasmídica fou descoberta per Novick l'any 1963 en soques d' *S. aureus* (195). Dos anys més tard, el 1963, Datta i Kontomichalou (72) descobreixen que la síntesi de la penicil·linasa TEM-1 en *Enterobacteriaceae* era codificada per gens de resistència continguts en plasmidis. La mobilització

d'aquests gens per elements mòbils via transferència horitzontal ha permès la seva ràpida expansió i disseminació arreu del món.

L'origen de les betalactamases plasmídiques no està totalment dilucidat però es creu que moltes d'elles deriven de les betalactamases cromosòmiques d'algunes espècies com és el cas de les betalactamases AmpC plasmídiques, procedents principalment dels gens *ampC* cromosòmics de molts enterobacteris tals com *C. freundii*, *M. morgani*, *H. alvei* o *Enterobacter* entre d'altres (206); les betalactamases d'espectre ampliat tipus CTX-M, derivades de l'enzim cromosòmic de diferents espècies de *Kluyvera* (124, 208); la betalactamasa plasmídica SHV-1, derivada del gen cromosòmic de *K. pneumoniae*, etc. No obstant, en moltes betalactamases plasmídiques la soca original d'on podrien haver derivat és encara desconeguda.

Les betalactamases de localització plasmídica es poden classificar segons el fenotip de resistència que proporcionen.

1.3.4.1. Betalactamases d'ampli espectre

Dins de les betalactamases d'ampli espectre s'inclouen les betalactamases tipus TEM i SHV del subgrup 2b de Bush, les PSE i CARB del subgrup 2c i les OXA pertanyents al subgrup 2d. Totes presenten un fenotip de resistència a penicil·lines, carboxi i ureidopenicil·lines i segons el seu nivell d'expressió també a les C1G, encara que les PSE i les OXA poden presentar també una sensibilitat disminuïda a combinacions amb inhibidors. Una altra particularitat de les OXA, d'on deriva el seu nom, és que presenten una gran afinitat per les penicil·lines isoxazòliques o resistents a penicil·linases.

1.3.4.2. Betalactamases resistents a inhibidors

Dins d'aquest grup s'inclouen les IRT (*inhibitor resistant TEM*) pertanyents al subgrup 2br de Bush i les CMT (*complex mutant TEM*) del subgrup 2bre. Les IRT deuen el seu nom a la seva descripció inicial com a variants de TEM-1 i TEM-2, encara que recentment s'han descrit variants de SHV-1. Els seu patró és igual al de les betalactamases d'ampli espectre sent capaces de resistir també a les combinacions amb inhibidors, degut a l'adquisició de mutacions aminoacídiques en posicions concretes. Les CMT són variants de les TEM amb resistència a inhibidors però amb un major espectre d'activitat, afectant també a les C3G i C4G.

1.3.4.3. Betalactamases d'espectre ampliat (BLEA)

Existeixen una gran varietat de BLEA entre les quals distingim les de tipus TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, SFO, BES i TLA (pertanyents a la classe A d'Ambler o subgrup 2be de Bush) i les de tipus OXA (classe D o 2dc de Bush). El seu espectre d'activitat inclou gran part de les penicil·lines, monobactàmics i cefalosporines, a excepció de les cefamicines, però es mantenen sensibles a combinacions amb inhibidors i carbapenèmics. Les primeres BLEA descrites deriven de mutacions puntuals de les betalactamases TEM-1, TEM-2 i SHV-1 mentre que l'origen d'altres BLEA roman desconegut. Segons el tipus de mutació, les preferències de substrat a hidrolitzar seran diferents. Les BLEA aïllades amb més freqüència són les de tipus TEM, SHV i CTX-M, sent el grup de les CTX-M el grup aïllat amb més freqüència en els darrers anys.

1.3.4.4. Betalactamases AmpC

Dins d'aquesta família de betalactamases plasmídiques trobem les de tipus CMY, DHA, ACC, FOX, MOX, ACT, MIR, LAT i CFE, totes pertanyents a la classe C d'Ambler o al grup 1 de Bush. El seu espectre d'activitat és semblant al de les BLEA, amb excepció que són actives front a combinacions amb inhibidors i cefamicines i que presenten una activitat més reduïda front a C4G. Existeixen petites excepcions a aquest patró de resistència com és el cas de la família ACC (sensibles a cefoxitina) i MOX (sensibles a combinacions amb inhibidors). Aquest grup de betalactamases es troba més detallat en apartats posteriors.

1.3.4.5. Carbapenemases

Dins de les betalactamases amb activitat carbapenemàsica trobem les KPC, GES, NMC, IMI i SME, pertanyents a la classe A d'Ambler o 2f de Bush, les IMP i VIM, pertanyents a la classe B o 3a de Bush i algunes OXA (OXA-23 a -27, -40, -48 i -54), pertanyents a la classe D o 2df de Bush. Es caracteritzen per hidrolitzar, almenys parcialment imipenem o meropenem juntament amb altres penicil·lines i cefalosporines. L'activitat front a combinacions amb inhibidors i monobactàmics és variable segons els tipus de carbapenemasa expressada. Les carbapenemases de classe A són inhibides per l'àcid clavulànic i la seva activitat front a l'aztreonam és variable, sent més fàcilment hidrolitzat per les variants KPC i GES. Les de classe B es caracteritzen per ser metal·loenzims, requerint zinc al seu centre actiu. Hidrolitzen tots els betalactàmics a excepció de l'aztreonam i són inhibides per quelants de metalls com l'EDTA entre d'altres. Finalment trobem les de classe D o

oxacil·linases, amb activitat variable sobre els betalactàmics i combinacions amb inhibidors.

1.4. BETALACTAMASES AmpC ADQUIRIDES

La idea que els gens *ampC* estaven localitzats exclusivament al cromosoma va començar a canviar a meitat dels anys 70 quan Bobrowski *et al.* (33) detecten la presència d'una betalactamasa indistingible de l'enzim AmpC d'*E. coli*, vehiculada per un plasmidi, en una soca de *P. mirabilis*. Desafortunadament el plasmidi original es va perdre i es va dubtar de la veracitat dels experiments de transferència. No fou fins a finals dels 80 que Bauernfeind *et al.* (22) i Papanicolaou *et al.* (202) demostren amb certesa que les betalactamases de tipus AmpC podien ser transferides via plasmidis.

Des de la descripció de les primeres betalactamases AmpC plasmídiques (pACBL), anomenades així per ser principalment vehiculades per plasmidis, l'aparició de noves variants ha estat constant i en continu augment, encara que d'una manera molt més gradual que l'observada per a les BLEA. Actualment s'han descrit 106 variants (actualitzat Gener del 2011) agrupades en 9 tipus d'enzims diferents: CMY (64 variants), ACT (9 variants), FOX (7 variants), MOX (8 variants), DHA (7 variants), MIR (5 variants), ACC (4 variants) i CFE i LAT (amb una variant cadascun) (www.lahey.org/Studies).

Les pACBL deriven de les betalactamases cromosòmiques de diferents membres de bacteris gramnegatius de la família *Enterobacteriaceae* i *Aeromonadaceae*, que en algun moment es varen transferir a plasmidis gràcies

a la seva mobilització via elements mòbils com seqüències d'inserció i transposons entre d'altres.

Les pACBL pertanyen a la classe molecular C d'Ambler o al grup 1 de Bush. Es caracteritzen per presentar un patró fenotípic indistingible al de les betalactamases AmpC cromosòmiques hiperproduïdes, sent per tant resistents a les penicil·lines i cefalosporines d'ampli espectre, monobactàmics i combinacions amb inhibidors, mantenint-se únicament sensibles a cefepima i carbapenèmics. Trobem petites excepcions com és el cas de les ACC, sensibles a cefoxitina, les pACBL MOX-1, CMY-8 i CMY-9, sensibles a combinacions amb inhibidors i les variants CMY-19, CMY-33 i CMY-44 amb sensibilitat reduïda a cefepima (81, 263). Es diferencien de les cromosòmiques en que la gran majoria s'expressen de forma constitutiva, a excepció de DHA, ACT i CMY-13 (129) i que presenten un major nivell d'expressió. En alguns tipus de pACBL com ACT i MIR s'ha vist que el major nivell d'expressió podria estar determinat per la presència d'un major nombre de còpies del gen *ampC* o per la presència de promotors i inicis de la transcripció diferents als cromosòmics (218, 219).

Encara que les pACBL s'han descrit principalment vehiculades per plasmidis, també s'han trobat pACBL de localització cromosòmica en algunes soques de *P. mirabilis* (38, 85, 156, 175) i *E. coli* (188) i més recentment vehiculades per *integrative conjugative elements* (ICE) de la família SXT/R391 (116).

1.4.1. CLASSES D'AmpC ADQUIRIDES

Encara que no existeix una classificació formal, la majoria de les pACBL poden agrupar-se en 6 classes (Taula 8) segons les seves similituds nucleotídiques i aminoacídiques amb diferents betalactamases cromosòmiques de classe C (205, 206).

Taula 8. Classes de pACBL i el seu possible origen cromosòmic.

| CLASSES DE pACBL | VARIANTS INCLOSES | POSSIBLE ORIGEN AmpC | REF. |
|------------------|--|--------------------------|------------|
| CIT | Inclou CMY-2 a -7, -12 a -18, -20 a -64, CFE-1 i LAT-1 | <i>C. freundii</i> | (266) |
| DHA | Inclou DHA-1 a -7 | <i>M. morgani</i> | (266) |
| ACC | Inclou ACC-1 a -4 | <i>H. alvei</i> | (108) |
| FOX | Inclou FOX-1 a -8 | <i>Aeromonas caviae</i> | (91) |
| MOX | Inclou MOX-1 a -8 i CMY-1, -8 a -11 i -19 | <i>Aeromonas</i> spp. | (266) |
| EBC | Inclou ACT-1 a -9 i MIR-1 a -5 | <i>Enterobacter</i> spp. | (228, 266) |

La nomenclatura utilitzada per a denominar aquestes classes de pACBL ha sigut molt variada, incloent en alguns casos la preferència de substrat que hidrolitzen (ex. CMY: cefamicines; MOX: moxalactam, FOX: cefoxitina; LAT: latamoxef), el tipus de betalactamases (ex. ACT: *AmpC-type*; ACC: *Ambler class C*), el lloc on foren descobertes (ex. MIR: “Miriam Hospital” als Estats Units; DHA: “Dhahran Hospital” en Aràbia Saudi), el nom del pacient d'on provenia la mostra (ex. BIL: procedent d'un pacient anomenat Bilal) o l'origen del gen *ampC* (ex. CFE: provinent de l'*ampC* de *C. freundii*).

1.4.1.1. CIT

Tal i com es mostra en la taula 8, les pACBL pertanyents a aquesta classe deriven del l'AmpC cromosòmic de *C. freundii*, amb homologies que oscil·len entre el 89,2 i el 97,1% (266). Dins d'aquest grup s'inclouen els

enzims CMY-2 a -7, CMY-12 a -18, CMY-20 a -64, CFE-1 i LAT-1. Quinze d'aquestes variants tenen un nom assignat però encara no està disponible la seva seqüència nucleotídica en la base de dades del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En algunes revisions més antigues és possible trobar les variants LAT-2 a LAT-4 i BIL-1 dins d'aquest grup, encara que estudis més detallats de les seqüències nucleotídiques de les pACBL derivades de *C. freundii* mostraren que BIL-1 i LAT-2 eren idèntiques a CMY-2, que LAT-3 era idèntica a CMY-6 i que LAT-4 era idèntica a LAT-1 (15).

Els primers representants d'aquest grup foren aïllats principalment en soques de *Klebsiella* spp., *E. coli* i *P. mirabilis* a finals dels 80 i al llarg de la dècada dels 90 (206), encara que el descobriment de noves variants, principalment derivades de CMY-2, ha continuat fins a l'actualitat.

Tots els enzims derivats d'aquest grup s'expressen a nivell constitutiu, a excepció de CMY-13, on tant el gen *ampC* com el seu regulador *ampR* foren mobilitzats des del cromosoma de *C. freundii* a un plasmidi tipus N en una soca d'*E. coli* (177). En l'enzim CFE-1 també s'observa la presència del gen regulador *ampR*, encara que en aquest cas no sembla que la betalactamasa sigui induïble (187).

CMY-2 (BIL-1, LAT-2) és el principal representant d'aquest grup. Va ser aïllat d'una soca de *K. pneumoniae* procedent d'un pacient grec el 1990, sent publicada la seva seqüència nucleotídica el 1996 (24).

Les variants CMY-33, CMY-37 i CMY-44 es caracteritzen per presentar sensibilitat disminuïda o resistència a la cefepima, degut a delecions

aminoacídiques en zones pròximes a la regió hèlix H-10 de les betalactamases de classe C (4, 81). S'ha demostrat que mutacions en aquesta zona augmenten l'espectre d'activitat de les betalactamases AmpC (17, 165, 166, 263).

1.4.1.2. DHA

Aquest grup està conformat per set variants, encara que les últimes quatre tan sols tenen el nom assignat. Deriven del gen *ampC* cromosòmic de *M. morganii*, amb una homologia que oscil·la entre el 98,2 i el 100% (266).

El primer representant caracteritzat, DHA-1, va ser aïllat el 1992 d'una *S. enterica* serovar Enteritidis, procedent d'una femta d'un pacient hospitalitzat a l'Aràbia Saudita (94). Quasi al mateix temps es va aïllar una soca de *K. pneumoniae* portadora de DHA-2 en un abscess perianal a França (90). Anys més tard, s'aïlla una *K. pneumoniae* portadora de DHA-3 d'un abscess hepàtic a Taiwan (277). No ha sigut fins recentment que no s'han descrit altres variants (dades no publicades) indicant que aquestes pACBL presenten menys capacitat d'evolució que les variants tipus CIT.

A pesar que la majoria de les betalactamases adquirides s'expressen de forma constitutiva, els representants d'aquesta família són induïbles (Figura 14). Verdet *et al.* (258) demostren, en una soca de *S. enterica*, que tant l'*ampC* com el seu regulador *ampR* provenien d'una regió de 2,6 kb del cromosoma de *M. morganii* amb una identitat entre el 98-100% i que ambdós gens estaven disposats en la mateixa configuració que al cromosoma. La regió *ampC-ampR* es va trobar associada a un integró complex de classe 1 associat a *ISCR1*, sent la possible causa de la mobilització d'aquesta regió de *M. morganii* a un plasmidi conjugatiu.

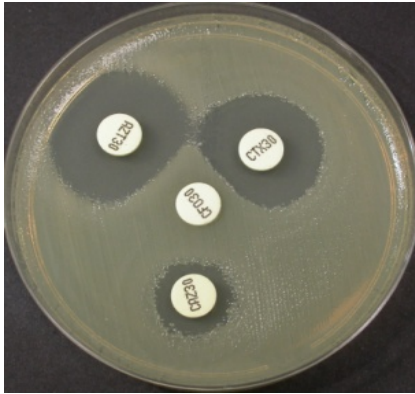


Figura 14. Antibiograma mostrant la inducció.

La presència de betalactamases induïbles es posa de manifest en l'antibiograma convencional per la tècnica d'aproximació de discs amb la presència d'halos d'inhibició truncats (en forma de D) d'antibiòtics inductors dèbils, com cefotaxima (CTX) o aztreonam (AZT) en la zona adjacent als discs d'antibiòtics que són inductors forts, com la cefoxitina (situat al centre).

1.4.1.3. ACC

Existeixen quatre variants d'aquest grup, encara que únicament dos, ACC-1 i ACC-4, són de localització plasmídica. ACC-2 i ACC-3 són betalactamases AmpC cromosòmiques procedents de les soques d'*H. alvei* HA-1 (AF180952) i HA-7 (AF180958) respectivament.

Les ACC són les úniques betalactamases de tipus AmpC sensibles a cefoxitina, cosa que dificulta el seu reconeixement al laboratori (108).

La primera representant plasmídica, ACC-1, va ser aïllada el 1997 a Alemanya d'una soca de *K. pneumoniae*, causant de pneumònia nosocomial (23). Tan sols un any més tard Girlich *et al.* (108) senyalen a l'AmpC cromosòmica d'*H. alvei* com l'origen de l'AmpC plasmídica ACC-1, amb una identitat de seqüència del 99,7%, on tan sols s'observa un substitució aminoacídica (Ala19Val) en la seqüència del pèptid senyal. L'homologia d'ACC-1 amb altres variants cromosòmiques d'*H. alvei* oscil·la entre el 88,2 i el 94,8%.

No fou fins a pocs anys més tard que s'aïlla una soca d'*E. coli* portadora d'ACC-4 d'una mostra d'orina a Atenes, encara que la seva seqüència no es publica fins el 2007 (201). Aquesta nova variant té la particularitat de

presentar un major espectre d'activitat front a les cefalosporines d'ampli espectre, particularment ceftazidima i ceftriaxona, respecte a ACC-1. Això és degut a la substitució (Gly211Val) en la seva seqüència aminoacídica.

1.4.1.4. FOX

Existeixen 7 variants d'aquest grup que van de FOX-1 a FOX-8, ja que FOX-6 és idèntica a FOX-5, sent recentment assignada l'última variant FOX-8. La similitud entre les diferents variants d'aquest grup oscil·la entre el 96 i el 97%. Deriven de l'AmpC cromosòmica d'*A. caviae* amb la que presenten un grau d'homologia superior al 96% (91).

La primera representant d'aquest grup, FOX-1, fou aïllada en una soca de *K. pneumoniae* a Argentina l'any 1989, encara que la seva seqüència no es va publicar fins 1994 (110). Pocs anys més tard s'aïlla el 1993 a Alemanya una *K. pneumoniae* portadora de FOX-2 d'un pacient procedent de Guatemala (26) i soques de *K. pneumoniae* i *K. oxytoca* portadores de FOX-3 a Itàlia. A l'any 2000 s'aïlla la variant FOX-4 d'una soca d'*E. coli*, sent la primera pACBL tipus FOX descrita per primer cop a Espanya, concretament a les Illes Canàries (13). Un any més tard apareix en la ciutat de Nova York la variant FOX-5, aïllada d'una soca de *K. pneumoniae* (215). Adjacent a aquesta última variant es va trobar una seqüència d'inserció, la ISAS2, present també en *Aeromonas salmonicida*. Finalment, al 2004, apareix a Itàlia l'última variant assignada, la FOX-7, aïllada en *K. pneumoniae* i posteriorment descrita el 2009 en *K. oxytoca* i *Pantoea agglomerans* en un brot a la unitat de cures intensives de neonats a un hospital italià (183).

1.4.1.5. MOX

Aquest grup inclou les variants MOX-1 a -8, CMY-1, CMY-8 a -11 i CMY-19. A excepció de MOX-3 i MOX-5 a -7, presents al cromosoma d'*A. caviae*, la resta de variants són de localització plasmídica.

Originalment es va pensar que aquest grup estava relacionat amb l'AmpC cromosòmica de *P. aeruginosa* amb homologies aminoacídiques inferiors al 60% (25, 122). No obstant, el nivell d'homologia entre les presents variants i les betalactamases AmpC d'*Aeromonas sobria* (265) i *Aeromonas hydrophila* (14, 129) mostren una relació filogenètica més pròxima amb homologies superiors al 78%. Malgrat això, la descripció de les variants MOX-3 i MOX-5 a -7 al cromosoma d'*A. caviae* pel grup de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau fa pensar que aquesta espècie és l'origen d'aquests enzims (comunicació personal E. Miró).

El primer representant d'aquest grup, CMY-1, es va aïllar el 1988 a partir d'una soca de *K. pneumoniae* a Corea del Sud (22, 25). Pocs anys més tard es varen aïllar soques de *K. pneumoniae* productores de MOX-1 a Japó (1991) i MOX-2 a Grècia (1995) (122, 216), seguides d'aïllats d'*E. coli* productors de CMY-8 a Taiwan (1998) i *K. pneumoniae* productores de CMY-9 a Japó (1995) (82, 283). El 2003, es descriu per primera vegada una betalactamasa de localització plasmídica (CMY-10) en *Enterobacter aerogenes*, soca productora d'una AmpC cromosòmica pròpia (149). Finalment apareix una soca d'*E. coli* portadora de CMY-11 a Corea del Sud (150) i quatre *K. pneumoniae* portadores de la variant CMY-19 a Japó, recol·lectades durant el període 1995-1997 (263). Recentment, es descriu la nova variant MOX-4 en

una soca d'*A. caviae* aïllada d'un pacient amb pneumònia el 2007 a la Xina (285).

Presenten el patró fenotípic de resistència característic d'una betalactamasa AmpC, amb la particularitat que MOX-1, CMY-8 i CMY-9 (82, 122) són inhibides per l'àcid clavulànic i que CMY-19 (263) és més activa front a cefalosporines d'ampli espectre, incloent cefepima, particularitat remarcable ja que les C4G són generalment estables front a betalactamases AmpC.

El grau d'homologia entre les diferents variants d'aquest grup és molt elevat entre el 98 i el 99,9%. La majoria de variants han evolucionat a partir de CMY-1 i MOX-1 com a conseqüència de mutacions puntuals. Aquest seria el cas de CMY-10 i CMY-11, que haurien derivat de CMY-1 (totes tres aïllades a Corea del Sud), i CMY-8, CMY-9 i CMY-19, derivades de MOX-1 (aïllades majoritàriament al Japó). En el primer exemple, els investigadors coreans Lee *et al.* (150) proposen que CMY-11 hauria evolucionat a partir de CMY-1 via CMY-10, ja que CMY-10 presenta una única substitució aminoacídica respecte a CMY-1 (Ile292Ser), mentre que CMY-11 presenta a més a més una altra substitució (Asn366Ile). Alguna cosa semblant ocorre per a les variants de MOX-1, on CMY-8 difereix de CMY-9 per un canvi aminoacídic (Glu85Asp) en la zona de reconeixement dels betalactàmics, conferint-li un major espectre d'hidròlisi front a ceftazidima i menor front a C1G i C2G (82); i la substitució (Iso292Ser), en la regió adjacent a l'hèlix H-10 de CMY-19 respecte a CMY-9, responsable del seu major espectre d'activitat (263).

1.4.1.6. EBC

Inclou les variants ACT-1 a -9 i MIR-1 a -5, sent ACT-8 i -9 recentment assignades. Encara que la majoria són de localització plasmídica, alguns dels seus representants s'han trobat únicament al cromosoma com ACT-2 i ACT-4, aïllades de soques d'*Enterobacter asburiae*, i MIR-2 i MIR-3, presents al cromosoma d'*Enterobacter cloacae*.

La primera representant d'aquest grup, MIR-1, fou descrita l'any 1990 en soques de *K. pneumoniae* als Estats Units (202), encara que la seva seqüència no es va publicar fins el 1999 (131). Anys més tard, el 1994 s'aïlla la segona representant d'aquest grup, l'ACT-1, en soques de *K. pneumoniae* i d'*E. coli* als Estats Units (35). El gen que codifica aquest enzim va ser localitzat tant al cromosoma com en plasmidis d'algunes de les soques estudiades i presenta la particularitat de ser induïble en presència d'antibiòtics betalactàmics, degut a la co-transferència del gen *bla*_{ACT-1} i el seu regulador *ampR* des del cromosoma d'*E. asburiae* a un plasmidi (228).

En anys posteriors es descriuen altres variants d'aquest grup en soques de *K. pneumoniae* (ACT-3, ACT-6, ACT-7 i MIR-5) i *E. coli* (ACT-5 i MIR-4).

Inicialment, tant ACT-1 com MIR-1 es varen relacionar amb l'*ampC* cromosòmic d'*E. cloacae*, amb homologies que oscil·laven entre el 85 i el 91,1%, encara que estudis posteriors senyalen a *E. asburiae* com el verdader origen, amb una homologia del 97,6% per a ACT-1 i del 92,9% per a MIR-1 (228, 266).

1.4.2. DISTRIBUCIÓ I PREVALENÇA

Des de la descripció de la primera pACBL a finals dels anys 80 en una soca de *K. pneumoniae*, els exemples de soques portadores de pACBL han estat nombrosos, principalment en soques de *K. pneumoniae* i d'*E. coli*. Encara que inicialment aquests enzims apareixien com a casos esporàdics, el continu augment de publicacions en diferents parts del món descrivint nous casos, mostren que la presència d'aquests enzims és cada cop més freqüent i que continua creixent any darrere any.

1.4.2.1. Distribució

Aquests enzims es troben presents en mostres clíniques, tant d'origen nosocomial com associades a la comunitat, en una gran varietat d'animals, tant domèstics com salvatges (3, 40, 76, 111, 186), aliments (27, 40, 115, 284, 289) i aigües (172), possiblement actuant com a reservoris ambientals d'aquests enzims.

S'aïllen freqüentment en soques d'enterobacteris que no presenten una AmpC cromosòmica induïble com *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. enterica*, *K. oxytoca*, *Shigella* i *P. penneri* (129, 178, 273); encara que també s'han trobat en soques portadores d'AmpC cromosòmica induïble com *E. aerogenes*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *P. agglomerans*, *A. caviae*, *Providencia stuartii* i *C. koseri* (n° Genbank FR719923) (102, 127, 178, 183, 203, 285).

Les espècies on s'han aïllat amb major freqüència són *E. coli* i *K. pneumoniae*, encara que el nombre d'aïllats de *P. mirabilis* portadors de betalactamases AmpC adquirides, de localització tant plasmídica com cromosòmica, és cada cop més important (11, 85, 156, 160).

Encara que amb algunes excepcions, existeix una clara associació entre determinats tipus de pACBL i l'espècie estudiada. Aquest és el cas de les DHA-1, que encara que s'han trobat en una gran varietat d'enterobacteris (Taula 9), aquestes pACBL es troben íntimament lligades a soques de *Klebsiella* spp., especialment *K. pneumoniae*, sent la pACBL aïllada amb més freqüència en aquesta espècie; o el cas CMY-2 i les seves variants, més freqüentment aïllades en soques de *P. mirabilis*, *S. enterica* i *E. coli*.

Presenten una àmplia distribució mundial, trobant-se representats en tots els continents (Taula 9). Aquests enzims s'han trobat en diferents parts d'**Europa** com Grècia, França, Espanya, Dinamarca, Polònia, Noruega, Portugal, Suïssa, Suècia, Irlanda, Regne Unit, Bèlgica, República Txeca, Croàcia, Alemanya, Hongria, Itàlia i Holanda; a **Àsia**, amb representants a la Xina, Japó, Singapur, Taiwan, Índia, Corea del Sud, Pakistan, Turquia, Palestina i Aràbia Saudita; a **Amèrica**, amb representants a més de 25 estats nord-americans, Canadà, Mèxic, Argentina i Guatemala; a l'**Àfrica**, amb representants a Egipte, Líban, Algèria, Tunísia i Sud-àfrica; i finalment a **Oceania**, amb representants a Nova Zelanda i Austràlia.

Taula 9. Distribució mundial de les pACBL i les diferents espècies on s'han aïllat.

| pACBL | PAÏSOS | ESPÈCIES | REFERÈNCIES/Nº GenBank |
|------------------------|--|--|--|
| <p>▪ VARIANTS CIT:</p> | | | |
| CMY-2 | Pakistan (BIL-1), Grècia, França, Espanya, Estats Units, Taiwan, Algèria, Turquia, Regne Unit, Canadà, Xina, Dinamarca, Mèxic, Singapur, Suïssa, Japó, Noruega, Holanda, Portugal, Corea del Sud | <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>C. koseri</i> (FR719923) | (2, 10, 20, 24, 73, 76, 79, 111, 114, 127, 137, 144, 181, 188, 191, 273-275, 279, 280, 286, 288) |
| CMY-3 | França, Regne Unit | <i>P. mirabilis</i> , <i>K. pneumoniae</i> | (38, 135) |
| CMY-4 | Tunísia, Suècia, França, Estats Units, Regne Unit, Itàlia, Índia, Espanya, Polònia, Grècia, Egipte | <i>P. mirabilis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> , <i>C. freundii</i> | (19, 51, 59, 73, 115, 120, 156, 259, 289) |
| CMY-5 | Suècia | <i>K. oxytoca</i> | (278) |
| CMY-6 | Grècia (LAT-3), Índia, Corea del Sud, Regne Unit | <i>E. coli</i> | (103, 206, 234, 286) |
| CMY-7 | Índia, Regne Unit, Noruega | <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> | (120, 188, 206) |
| CMY-12 | Paris (mostra d'Algèria), Polònia | <i>P. mirabilis</i> | (73, 156) |
| CMY-13 | Grècia | <i>E. coli</i> | (177) |
| CMY-14 | Polònia | <i>P. mirabilis</i> | (156) |
| CMY-15 | Polònia | <i>P. mirabilis</i> | (156) |
| CMY-16 | Itàlia, Tunísia | <i>P. mirabilis</i> , <i>P. stuartii</i> (FJ855437) | (69, 160) |
| CMY-17 | Xina | <i>E. coli</i> | (AY513266) |
| CMY-18 | Corea del Sud | <i>E. coli</i> | (148) |
| CMY-20 | Sud Àfrica | <i>E. coli</i> | (180) |
| CMY-21 | Regne Unit | <i>E. coli</i> | (120) |
| CMY-22 | Xina | <i>E. coli</i> | (DQ256079) |
| CMY-23 | Regne Unit, Irlanda, Estats Units | <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> | (272, 275) |
| CMY-24 | Singapur | <i>E. coli</i> | (144) |
| CMY-25 | Espanya | <i>K. pneumoniae</i> | Present estudi (Annex III) |
| CMY-26 | Japó | <i>K. oxytoca</i> | (3) |
| CMY-27 | Espanya | <i>E. coli</i> | Present estudi (Annex III) |

| pACBL | PAÏSOS | ESPÈCIES | REFERÈNCIES/Nº GenBank |
|------------------------|--|--|-----------------------------|
| CMY-28 | Irlanda | <i>E. coli</i> | (EF561644) |
| CMY-29 | Nova Zelanda | <i>E. coli</i> | (209) |
| CMY-30 | Nova Zelanda | <i>E. coli</i> | (209) |
| CMY-31 | Suïssa, Estats Units | <i>K. pneumoniae, S. enterica</i> | (2, 291) |
| CMY-32 | Estats Units | <i>E. coli</i> | (EU496815) |
| CMY-33 | Estats Units | <i>E. coli</i> | (EU496816) |
| CMY-34 | Xina | <i>C. freundii</i> | (EF394370) |
| CMY-35 | Xina | <i>C. freundii</i> | (EF394371) |
| CMY-36 | Grècia | <i>K. pneumoniae</i> | (291) |
| CMY-37 | Palestina | <i>C. freundii</i> | (4) |
| CMY-38 | Polònia | <i>P. mirabilis</i> | (85) |
| CMY-39 | Japó | <i>C. freundii</i> | (AB372224) |
| CMY-40 | Espanya | <i>E. coli</i> | Present estudi (Annex III) |
| CMY-41 | Egipte | <i>C. freundii</i> | (115) |
| CMY-43 | Corea | <i>E. coli</i> | (FJ360626) |
| CMY-44 | Estats Units | <i>E. coli</i> | (FJ437066) |
| CMY-47 | Espanya | <i>C. freundii</i> | (HM046998) |
| CMY-49 | Xina | <i>C. freundii</i> | (GQ402541) |
| CMY-54 | Espanya | <i>E. coli</i> | (HM544039) |
| CMY-55 | Espanya | <i>E. coli</i> | (HM544040) |
| CMY-57 | Espanya | <i>E. coli</i> | (HQ285243) |
| LAT-1 | Grècia | <i>K. pneumoniae, E. coli</i> | (256) |
| CFE-1 | Japó | <i>E. coli</i> | (187) |
| ▪ VARIANTS ACC: | | | |
| ACC-1 | Alemanya, Tunísia, França, Espanya, Irlanda, Holanda | <i>K. pneumoniae, P. mirabilis, E. coli, S. enterica</i> | (23, 76, 83, 145, 178, 223) |
| ACC-2 | França | <i>H. alvei</i> | (108) |
| ACC-3 | França | <i>H. alvei</i> | (108) |
| ACC-4 | Grècia, Hongria | <i>E. coli, P. mirabilis</i> | (70, 201) |

| pACBL | PAÏSOS | ESPÈCIES | REFERÈNCIES/Nº GenBank |
|------------------------|---|--|---|
| ▪ VARIANTS DHA: | | | |
| DHA-1 | Aràbia Saudita, Holanda, Itàlia, Estats Units, Corea del Sud, Taiwan, Japó, Espanya, Regne Unit, Irlanda, Xina, Bèlgica, Singapur, Suïssa, Croàcia, Algèria, República Txeca, Noruega, Portugal | <i>S. enteritidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>S. marcescens</i> (present estudi; Annex II) | (2, 6, 16, 19, 75, 78, 79, 86, 87, 90, 106, 127, 144, 148, 178, 185, 188, 223, 257, 260, 282) |
| DHA-2 | França | <i>K. pneumoniae</i> | (90) |
| DHA-3 | Taiwan | <i>K. pneumoniae</i> | (277) |
| ▪ VARIANTS MOX: | | | |
| CMY-1 | Corea del Sud | <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> | (22, 141) |
| CMY-8 | Taiwan, Japó | <i>K. pneumoniae</i> | (279, 283) |
| CMY-9 | Japó | <i>K. pneumoniae</i> | (82) |
| CMY-10 | Corea del Sud | <i>E. aerogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> | (148, 149) |
| CMY-11 | Corea del Sud | <i>E. coli</i> | (150) |
| CMY-19 | Japó | <i>K. pneumoniae</i> | (263) |
| MOX-1 | Japó | <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> | (122, 279) |
| MOX-2 | Grècia, França | <i>K. pneumoniae</i> | (216) |
| MOX-3 | Espanya | <i>A. caviae</i> | (EU515248) |
| MOX-4 | Xina | <i>A. caviae</i> | (285) |
| MOX-5 | Espanya | <i>A. caviae</i> | (GQ152600) |
| MOX-6 | Espanya | <i>A. caviae</i> | (GQ152601) |
| MOX-7 | Espanya | <i>A. caviae</i> | (GQ152602) |
| ▪ VARIANTS FOX: | | | |
| FOX-1 | Argentina | <i>K. pneumoniae</i> | (110) |
| FOX-2 | Alemanya (pacient procedent de Guatemala) | <i>E. coli</i> | (26) |
| FOX-3 | Itàlia | <i>K. oxytoca</i> | (168) |
| FOX-4 | Espanya (Illes Canàries) | <i>E. coli</i> | (34) |
| FOX-5 | Estats Units | <i>K. pneumoniae</i> | (215) |
| FOX-7 | Itàlia | <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. agglomerans</i> | (AJ703795), (AJ703796), (183) |

| pACBL | PAÏSOS | ESPÈCIES | REFERÈNCIES/Nº GenBank |
|-----------------|-----------------------------|--|------------------------|
| ▪ VARIANTS EBC: | | | |
| ACT-1 | Estats Units, Corea del Sud | <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> | (35, 237) |
| ACT-2 | Itàlia | <i>E. asburiae</i> | (AM076977) |
| ACT-3 | Xina | <i>K. pneumoniae</i> | (67) |
| ACT-5 | Xina | <i>E. coli</i> | (FJ237369) |
| ACT-6 | Xina | <i>K. pneumoniae</i> | (FJ237366) |
| ACT-7 | Xina | <i>K. pneumoniae</i> | (FJ237368) |
| MIR-1 | Estats Units | <i>K. pneumoniae</i> | (202) |
| MIR-2 | Portugal | <i>E. cloacae</i> | (AY227752) |
| MIR-3 | Corea del Sud | <i>E. cloacae</i> | (AY743435) |
| MIR-4 | Xina | <i>E. coli</i> | (269) |
| MIR-5 | Xina | <i>K. pneumoniae</i> | (FJ237367) |

Ressaltat en lila el lloc i la soca on foren aïllades per primer cop.

Les variants CMY-42, -45, -46, -48, -50 a -53, -56, -58 a -64, ACT-8, ACT-9, DHA-4 a -7, FOX-8 i MOX-8 no estan incloses en la taula perquè estan assignades (www.lahey.org/Studies) però encara no estan disponibles al GenBank (última revisió: Gener 2011).

1.4.2.2. Prevalença

La prevalença i els tipus de pACBL detectades depenen en gran mesura de l'àrea geogràfica, de les espècies analitzades i del període d'estudi, així com també del criteri de selecció utilitzat. És per aquest motiu que la comparació dels valors de prevalença entre estudis és sovint complicada.

Encara que els nivells de prevalença d'aquests enzims són relativament baixos arreu del món, en tots els estudis on s'avaluen diferents períodes de temps, a excepció d'un cas puntual a la Xina (154), s'observa un increment continu any darrere any del nombre de soques portadores de pACBL (Taula 10). Aquest increment és especialment important al continent asiàtic, on s'observen els valors de prevalença més elevats (Taula 10), degut principalment a l'emergència de soques de *K. pneumoniae* portadores de DHA-1, convertint-se en la pACBL més prevalent i de major importància clínica en aquesta zona (79, 144, 236, 237).

A pesar de l'emergència de soques portadores de DHA-1, CMY-2 continua sent la pACBL més prevalent i més àmpliament distribuïda, sobretot en soques d'*E. coli*, *P. mirabilis* i *S. enterica*. Aquesta situació pot variar significativament quan es compara amb altres espècies i zones geogràfiques concretes. Aquest és el cas de les pACBL ACT-1 i FOX-5, que són enzims molt prevalents als Estats Units, sobretot en soques de *K. pneumoniae*, però que en canvi s'han trobat de forma molt esporàdica en altres parts del món com Canadà, Corea i més recentment Espanya (Taula 10). Altres enzims específics de l'àrea geogràfica són CMY-1 i les seves variants, únicament aïllades a Corea, Japó i Taiwan (Taula 10).

Taula 10. Estudis poblacionals de pACBL en enterobacteris.

| PERÍODE D'ESTUDI | ESPÈCIES ESTUDIADAES (n) | LOCALITZACIÓ | pACBL TROBADES (n) | Nº pACBL | Nº AÏLLATS | PREVALENÇA | REF. |
|------------------|--|--|------------------------------------|----------|------------|---|-------|
| 1996-1997 | <i>E. coli</i> | 10 hospitals grecs | LAT-3 (CMY-6) i LAT-4 (LAT-1) | 55 | 2133 | 2,6% | (103) |
| 1996-1998 | <i>S. enterica</i> | 17 estats nord-americanos i departaments de salut | CMY-2 (13) | 13 | 4093 | 0,32% (0,1% el 1996; 0,5% el 1998) | (84) |
| 1995-1999 | <i>K. pneumoniae</i> d'hemocultius | 30 hospitals americans en 23 estats | FOX-5 (3) i ACT-1 (2) | 5 | 190 | 2,6% | (62) |
| 1997-1999 | <i>E. coli</i> (683) <i>K. pneumoniae</i> (371) <i>P. mirabilis</i> (232) | Hospital a Virginia, Estats Units | No especificat | 16 | 1286 | 1,2% | (63) |
| 1996-2000 | <i>K. pneumoniae</i> | 24 hospitals americans en 18 estats | DHA-1, ACT-1, CMY-2 i FOX-5 | 54 | 408* | 13,2%* | (181) |
| 1997-2000 | <i>S. enterica</i> (384) <i>E. coli</i> (5520) <i>K. pneumoniae</i> (3680) | Hospital universitari Taiwan | CMY-2 (103) | 103 | 9584 | 1,1% (0,2% el 97-98 a >4% el 2000 per a <i>E. coli</i>) | (281) |
| 1992-2000 | <i>E. coli</i> (117) <i>K. pneumoniae</i> (517) <i>K. oxytoca</i> (4) | 70 llocs en 25 estats americans i el districte de Columbia | ACT-1, FOX-5, CMY-2 i DHA-1 | 55 | 752* | 7,2%* | (6) |
| 1999-2000 | <i>E. coli</i> (8741) <i>P. mirabilis</i> (1395) <i>S. enterica</i> (959) <i>K. pneumoniae</i> (719) <i>K. oxytoca</i> (242) <i>Shigella</i> (34) | 2 hospitals espanyols en dos regions diferents (País Basc i Catalunya) | CMY-2 (21) | 21 | 12090 | 0,17% (0,07% al 1999 a 0,41% al 2000) | (191) |
| 1998-2002 | <i>K. pneumoniae</i> de mostres sanguínies | Hospital universitari de Seul (Corea del Sud) | DHA-1 (14) i CMY-1-like (14) | 28 | 389 | 7,2% | (199) |
| 1999-2002 | <i>K. pneumoniae</i> | Hospital universitari, Taiwan | DHA-1 (36), CMY-2 (32) i CMY-8 (9) | 77 | 99* | 77,8%* | (282) |

Continuació Taula 10

| PERÍODE D'ESTUDI | ESPÈCIES ESTUDIADAES (n) | LOCALITZACIÓ | pACBL TROBADES (n) | Nº pACBL | Nº AÏLLATS | PREVALENÇA | REF. |
|------------------|--|---|---|----------|------------|------------|-------|
| 2000-2002 | <i>K. pneumoniae</i> (853) <i>P. mirabilis</i> (359) <i>K. oxytoca</i> (137) <i>S. enterica</i> (4) | 42 sales UCI i 21 sales no-UCI als Estats Units | FOX-5, DHA-like i ACT-like | 40 | 1353 | 2,9% | (182) |
| 2000-2002 | <i>K. pneumoniae</i> | 8 hospitals a Japó | DHA-1 (41) i CMY-2 (2) | 43 | 46* | 93,5%* | (185) |
| 2000-2003 | <i>E. coli</i> | Calgary Health Region, Canadà | CMY-2 (125) | 125 | 369* | 34%* | (207) |
| 1995-2003 | <i>E. coli</i> | Agència de Salut Pública (Anglaterra i Gal·les) | CMY-7 (20), CMY-2 (6) i CMY-4 (1) | 25 | 449* | 5,6%* | (120) |
| 1998-2003 | <i>K. pneumoniae</i> (11) <i>K. oxytoca</i> (1) | Hospital universitari Francès | DHA-1 (12) | 12 | 12* | - | (260) |
| 1999-2003 | <i>Salmonella</i> (106) | Agència de Salut Pública (Anglaterra i Gal·les) | CMY-2 (6), DHA-1 (2) i CMY-4 (1) | 9 | 278308 | 0,003% | (19) |
| 2003 | <i>E. coli</i> (291) <i>K. pneumoniae</i> (282) | 7 centres mèdics a Taiwan | CMY-2-like (137) i DHA-like (31) | 168 | 573* | 29,3%* | (280) |
| 2003 | <i>E. coli</i> (116) <i>K. pneumoniae</i> (122) | 16 hospitals de Corea del Sud | DHA-1 (103), CMY-2-like (38), CMY-10-like (16) i CMY-18 (1) | 159 | 238* | 66,8%* | (148) |
| 2002-2003 | <i>K. pneumoniae</i> de mostres respiratòries | Hospital a Corea | CMY-2 (21), DHA-1 (17) i CMY-1 (1) | 40 | 373 | 10,7% | (287) |
| 2002-2003 | <i>E. coli</i> | Hospital espanyol (Logroño) | CMY-2 (2) | 2 | 1700 | 0,12% | (39) |
| - | <i>E. coli</i> | Hospital universitari, Algèria | CMY-2-like | 2 | 203 | 0,98% | (174) |
| 2004 | <i>E. coli</i> | 30 centres mèdics Nord Americans | CMY-2 (13), FOX-5 (3) i DHA-1 (1) | 17 | 1429 | 1,2% | (75) |
| 2004 | <i>E. coli</i> | Singapur | CMY-2 (53) i CMY-24 (1) | 54 | 158* | 34,2%* | (144) |

Continuació Taula 10

| PERÍODE D'ESTUDI | ESPÈCIES ESTUDIADAES (n) | LOCALITZACIÓ | pACBL TROBADES (n) | Nº pACBL | Nº AÏLLATS | PREVALENÇA | REF. |
|------------------|---|--------------------------------------|---|----------|------------|---------------------------------------|-------|
| 2002-2004 | <i>K. pneumoniae</i> (1374) <i>K. oxytoca</i> (200) <i>P. mirabilis</i> (156) <i>S. enterica</i> (130) | Hospital universitari, Corea del Sud | DHA-1 (43), ACT-1 (1), CMY-1 (1) i CMY-2 (2) | 46 | 1860 | 2,5% (0,6% en 2002 a 4,3% en 2004) | (237) |
| 2003-2004 | Enterobacteris de pacients hospitalitzats | 13 hospitals a Polònia | CMY-15 (19), CMY-12 (4) i CMY-38 (1); la resta no seqüenciades | 71 | 2388 | 3% (20,5% en <i>P. mirabilis</i>) | (85) |
| 2000-2005 | <i>P. mirabilis</i> | Hospital Sant Pau (Catalunya) | CMY-2 (5) | 5 | 1423 | 0,35% | (11) |
| 2001-2005 | <i>S. enterica</i> | 17 regions espanyoles | CMY-2 (5) i DHA-1 (1) | 6 | 10317 | 0,06% | (109) |
| 2004-2005 | <i>K. pneumoniae</i> | Singapur | DHA-1 (23) | 23 | 121* | 19%* | (144) |
| 2003-2005 | <i>E. coli</i> | 12 laboratoris de Noruega | CMY-2-like (10) | 10 | 106* | 9,4%* | (114) |
| 2003-2005 | <i>E. coli</i> (1203) <i>K. pneumoniae</i> (699) <i>K. oxytoca</i> (33) | Hospital universitari a Xina | DHA-1 (41) i CMY-2 (13) | 54 | 1935 | 2,79% (3,7% en 2003; 3% en 2005) | (154) |
| 2003-2005 | <i>E. coli</i> (88) <i>K. pneumoniae</i> (22) | Hospital situat al Nord de la Índia | CMY-6 (22) | 22 | 110* | 20%* | (234) |
| 2004-2006 | <i>E. coli</i> (136) <i>K. pneumoniae</i> (38) | Agència de Salut Pública, Regne Unit | CMY-2-like (59), CMY-23 (1), ACC-like (14), FOX-like (11), DHA-like (3) | 88 | 173* | 50,6%* | (275) |
| 2004-2006 | <i>P. mirabilis</i> | Laboratori italià | CMY-16 (43) | 43 | 2070 | 2,1% (0,3% el 2004; 4,6% el 2006) | (160) |
| 2005-2006 | <i>K. pneumoniae</i> (637) <i>E. coli</i> (494) | 5 hospitals infantils a Xina | DHA-1 (69) i CMY-2 (5) | 74 | 1131 | 6,5% (2,6% en 2005; 9,3% en 2006) | (79) |
| 2005-2006 | <i>E. coli</i> (69) <i>K. pneumoniae</i> (33) | Hospital al centre de Taiwan | CMY-2 (11) i DHA-1 (3) | 14 | 102 | 13,7% | (155) |
| 2005-2006 | <i>E. coli</i> | 19 hospitals a Canadà | CMY-2 (26) i ACT-1 (1) | 27 | 493 | 5,5% | (21) |

Continuació Taula 10

| PERÍODE D'ESTUDI | ESPÈCIES ESTUDIADAES (n) | LOCALITZACIÓ | pACBL TROBADES (n) | Nº pACBL | Nº AÏLLATS | PREVALENÇA | REF. |
|------------------|--|--|---|----------|------------|---|-------|
| 2006 | <i>E. coli</i> | Hospital a França | CMY-2 (7) i ACC-1 (1) | 8 | 2800 | 0,29% | (164) |
| 2007 | Enterobacteris aïllats de mostres de formatge | Supermercats de dos llocs d'Egipte | CMY-4 (1) i CMY-41 (1) aïllats en soques de <i>C. freundii</i> | 2 | 215 | 0,93% | (115) |
| 1999-2007 | <i>E. coli</i> (6097) <i>K. pneumoniae</i> (941) <i>K. oxytoca</i> (398) <i>P. mirabilis</i> (397) <i>S. enterica</i> (215) | Hospital pediàtric a Seattle (Washington, Estats Units) | CMY-2-like (29) i DHA-like (6) | 35 | 8048 | 0,43% (0,11% durant 99-01; 0,96% durant 05-07) | (214) |
| 2003-2007 | <i>S. enterica</i> | Diferents regions d'Alemanya | CMY-2 (6) | 6 | 22679 | 0,03% | (224) |
| 2003-2007 | <i>E. coli</i> (223) <i>E. cloacae</i> (149) <i>K. pneumoniae</i> (112) <i>P. stuartii</i> (8) <i>P. mirabilis</i> (7) <i>S. marcescens</i> (6) | 3 hospitals d'Algèria | CMY-2 (8) i DHA-1 (3) | 11 | 505 | 2,18% | (127) |
| 2003-2007 | <i>E. coli</i> | 21 laboratoris de diagnòstic a Noruega | CMY-2 (38), DHA-1 (2) i CMY-7 (1) | 41 | 402* | 10,2%* | (188) |
| 2004-2007 | <i>E. coli</i> | 3 centres espanyols | CMY-2 (43), DHA-1 (2) i CMY-4 (1) | 46 | 2538 | 1,8% | (197) |
| 2005-2007 | <i>K. pneumoniae</i> | Hospital a Dublín (Irlanda) | ACC-1 (13) i 2 (DHA-1) | 15 | 500 | 3% | (223) |
| 2006-2007 | <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. enterica</i> , <i>Shigella</i> | Hospital universitari Suís + 45 mostres de 5 laboratoris Suïssos | 17 soques dels 5 laboratoris [CMY-2 (14), DHA-1 (2) i CMY-31 (1)] + 5 no especificades procedents de l'hospital | 5+17 | 3217+45 | 0,16% (prevalença de l'hospital) | (2) |

Continuació Taula 10

| PERÍODE D'ESTUDI | ESPÈCIES ESTUDIADAES (n) | LOCALITZACIÓ | pACBL TROBADES (n) | Nº pACBL | Nº AÏLLATS | PREVALENÇA | REF. |
|------------------|---|--|--|----------|------------|-------------------------|-------|
| 2002-2008 | <i>E. coli</i> (13995) <i>K. pneumoniae</i> (5970) <i>K. oxytoca</i> (1722) <i>P. mirabilis</i> (1182) | 17 laboratoris situats al Nord de Japó | CMY-2 (20), DHA-1 (6), CMY-8 (2) i MOX-1 (1) | 29 | 22869 | 0,13% (0,02% a 0,5%) | (279) |
| 2004-2008 | <i>E. coli</i> | Hospital universitari a Nantes, França | CMY-2 (22) i CMY-2-like (1) | 23 | 25861 | 0,09% | (61) |
| 2007-2008 | <i>E. coli</i> | Laboratori a Minesota, Estats Units | CMY-2 (20) i FOX-5 (2) | 22 | 26* | 84,6%* | (221) |
| 2007-2008 | Enterobacteris procedents de 2459 pacients | Hospital de Granollers (Catalunya) | DHA-1 (26) (totes en <i>K. pneumoniae</i>) | 26 | 2885 | 0,9% | (78) |
| 2008-2009 | <i>E. coli</i> (159) <i>K. pneumoniae</i> (117) | 2 laboratoris a Corea del Sud | DHA-1 (49), CMY-2 (1) i CMY-6 (1) | 51 | 276 | 18,5% | (286) |
| 2009 | Enterobacteris aïllats dins del període | 35 hospitals espanyols | CMY-2-like (479), DHA-like (73), la resta no detallades (ACC-like, ACT-like, FOX-like) | 640 | 100132 | 0,6% | (178) |

* Els valors corresponents a la casella de nombre d'aïllats i de prevalença marcats amb lila i asterisc no són comparables amb la resta perquè en aquests estudis el criteri de selecció de les soques és variable. En alguns únicament s'estudien les soques resistents a cefoxitina, en altres aquells que presenten sensibilitat disminuïda a C3G i negatives per a BLEA o amb sensibilitat disminuïda a C3G i resistents a cefoxitina.

1.4.3. MÈTODES DE DETECCIÓ AL LABORATORI

A diferència de les BLEA, no existeixen mètodes fenotípics estandarditzats per a la detecció de soques productores de pACBL, fet que dificulta enormement la seva detecció al laboratori.

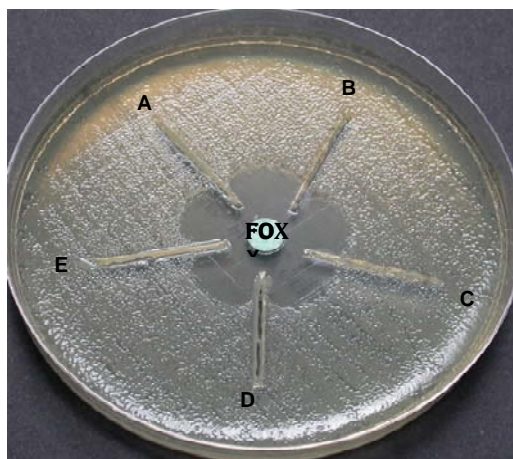
Les pACBL presenten un patró fenotípic indistingible d'una hiperproducció d'una betalactamasa AmpC cromosòmica, sent per tant resistents a les penicil·lines i cefalosporines d'ampli espectre, monobactàmics i combinacions amb inhibidors, mantenint-se únicament sensibles a cefepima i carbapenèmics. Aquestes característiques fenotípiques ens han de fer sospitar de la presència d'aquests enzims. A pesar que l'observació d'aquest patró és altament suggestiu de la presència d'aquests enzims, existeixen excepcions en el patró de sensibilitat d'algunes pACBL com és el cas de les ACC, sensibles a cefoxitina, MOX-1, CMY-8 i CMY-9, sensibles a combinacions amb inhibidors i les variants CMY-19, CMY-33 i CMY-44 amb sensibilitat reduïda a cefepima (81, 263). A més a més existeixen altres mecanismes de resistència que podrien estar justificant l'observació d'aquest patró fenotípic. Aquest és el cas de les soques hiperproductores de la seva pròpia AmpC cromosòmica, soques resistents a cefoxitina per alteracions de permeabilitat o soques amb sensibilitat disminuïda a C3G i resistents a combinacions amb inhibidors per altres mecanismes de resistència (80).

A pesar de tots aquests inconvenients, existeixen tota una sèrie de tests confirmatoris disponibles que ens permeten discriminar les soques productores d'AmpC amb major facilitat. Són altament sensibles i específics en soques no productores d'AmpC cromosòmica, però cap d'ells permet

discriminar entre l'enzim AmpC cromosòmic del plasmídic. En aquest últim cas, l'únic mètode fiable és l'aplicació de tècniques moleculars (205).

Els primers mètodes confirmatoris desenvolupats estan basats en la detecció de la hidròlisi enzimàtica de pACBL i es pot efectuar mitjançant tècniques microbiològiques amb un microorganisme indicador sensible, com són els test de Hodge (119) o el test tridimensional (251), tests que han estat posteriorment modificats amb la intenció de fer-los més simples de realitzar i més reproduïbles (63, 147, 167, 189). En aquests tests, l'activitat betalactamasa es detecta demostrant la pèrdua d'activitat de l'agent betalactàmic en presència d'un microorganisme indicador sensible. S'utilitza una soca control sensible junt amb la soca problema, de manera que si la resistència és enzimàtica, la soca problema hidrolitza l'antibiòtic del seu entorn i permet créixer a la soca (Figura 15).

Figura 15. Test tridimensional modificat.



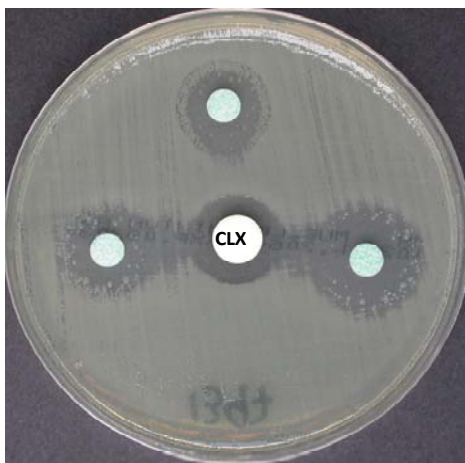
- A:** *K. pneumoniae* que expressa una pACBL
- B:** *E. coli* ATCC 25922
- C:** *E. coli* ATCC 35218/TEM-1
- D:** *E. coli* que expressa una hiperproducció de la seva betalactamasa cromosòmica
- E:** *E. cloacae* desreprimat

Més recentment han aparegut mètodes confirmatoris basats en la utilització de compostos inhibidors de betalactamases AmpC com Ro 47-8284, Ro 48-1220, Ro 48-1256, LN-2-128, Syn 2190, cloxacil·lina i àcid borònic (80,

129), que es poden utilitzar addicionats al medi de cultiu en les proves de sensibilitat amb la finalitat de detectar un augment dels halos d'inhibició d'alguns betalactàmics en presència de l'inhibidor o bé mitjançant tècniques d'aproximació de discs amb C3G per detectar sinèrgia. D'aquests compostos, únicament la cloxacil·lina i l'àcid borònic estan comercialitzats.

La modificació del test de sinèrgia amb doble disc col·locant un disc de cloxacil·lina (500 µg) o d'àcid borònic (300 µg) a una distància de 25 mm dels discs de C3G com poden ser la ceftazidima i/o cefotaxima en una placa de Mueller-Hinton (Figura 16) és una de les tècniques més utilitzades als laboratoris de microbiologia clínica, per la seva simplicitat i la seva elevada sensibilitat i especificitat, amb les limitacions prèviament mencionades.

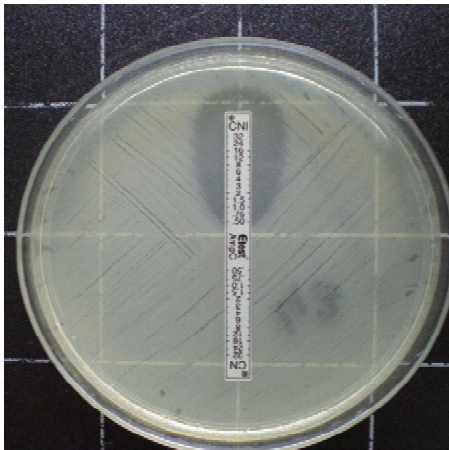
Figura 16. Modificació del test de sinèrgia amb doble disc amb cloxacil·lina.



Com que la cloxacil·lina és un inhibidor dels enzims AmpC, l'observació de sinèrgia entre el disc de cloxacil·lina i les C3G es considera una evidència de la presència d'aquest enzim.

També existeixen versions d'aquesta tècnica utilitzant tires comercials impregnades amb un gradient de cefotetan o cefoxitina en una meitat i el mateix combinat amb una concentració constant de cloxacil·lina a l'altra meitat (ex. tires Etest) (Figura 17) (129).

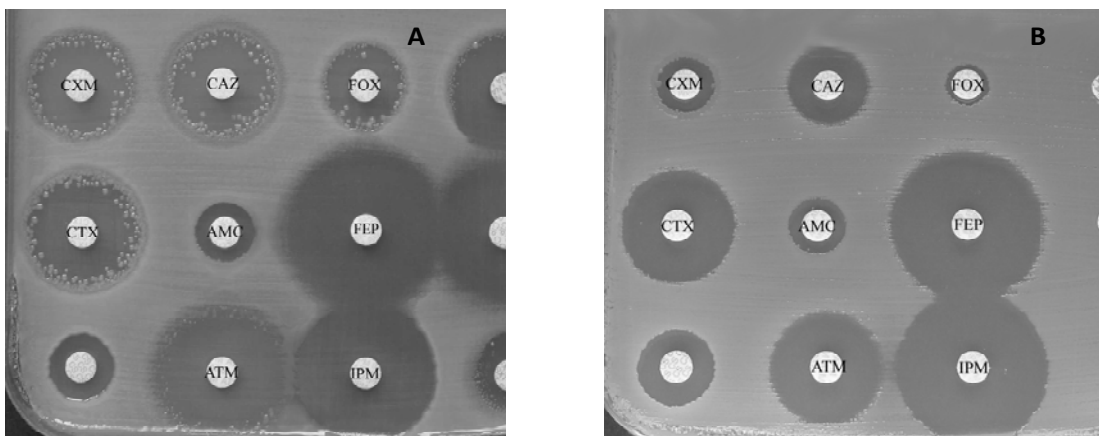
Figura 17. Etest per a la detecció d'AmpC amb cefotetan/cefotetan + cloxacil·lina.



El test es considera positiu quan en presència de cloxacil·lina, el valor de la CIM del cefotetan és menor o igual a la disminució de tres dilucions dobles de la CIM del cefotetan sol.

Una altra característica fenotípica altament indicativa de la presència d'una pACBL, és la presència de colònies situades a la proximitat dels halos d'inhibició de la cefoxitina, les C3G i l'aztreonam (Figura 18) (176).

Figura 18. Tècnica de disc difusió.



A: *E. coli* que expressa una cefamicinasa plasmídica; **B:** *E. coli* que expressa una hiperproducció de la seva betalactamasa AmpC cromosòmica.

1.5. ADQUISICIÓ I TRANSMISSIÓ DE LA RESISTÈNCIA

El principal problema que planteja la resistència microbiana és la facilitat que tenen els microorganismes d'adquirir nous mecanismes de resistència i la seva disseminació a altres espècies naturalment sensibles.

Els microorganismes poden fer-se resistents per dues vies: per l'aparició de mutacions puntuals o per l'adquisició de nous gens de resistència per transferència horitzontal. En el primer cas la resistència s'origina com a conseqüència d'errors en la replicació del DNA, fenomen que sol ocórrer amb una freqüència de 10^{-8} per divisió cel·lular. Si el gen mutat li proporciona algun avantatge adaptatiu al bacteri, aquest se seleccionarà i serà transmès a la descendència per transferència vertical durant la replicació bacteriana, és a dir, de cèl·lula mare a cèl·lula filla. L'aparició de la resistència per mutacions puntuals pot ocórrer en un sol pas, com és el cas de la resistència a rifampicina, o fruit de l'acumulació de varies mutacions, com és el cas de les fluoroquinolones. A banda dels propis errors durant la replicació se sap que aquelles situacions d'estrès ambiental que activen el sistema de resposta SOS, com l'exposició a la llum ultraviolada o a substàncies com les quinolones entre d'altres, augmenten la taxa de mutació, afavorint així l'aparició de mutants resistents (170).

La segona via d'adquisició de resistències per part dels microorganismes és mitjançant la transferència horitzontal, que consisteix en l'adquisició de material genètic exogen procedent d'altres microorganismes resistents. Els mecanismes bacterians per a l'adquisició de gens de resistència via horitzontal són la transformació, la transducció i la conjugació.

1.5.1. TRANSFERÈNCIA HORITZONTAL

1.5.1.1. Transformació

És el sistema de transferència genètica més antic que es coneix. Fou descobert per F. Griffith el 1928 i consisteix en la captació de DNA lliure present en l'ambient i la seva posterior integració al cromosoma bacterià o a un plasmidi per recombinació (250).

Per a que un bacteri siga capaç de captar DNA forani ha de trobar-se amb el que es coneix com estat de competència. Aquesta competència pot donar-se de forma natural (competència fisiològica), en molts microorganismes com *Streptococcus*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* i *Bacillus* o induïr-se artificialment al laboratori (competència artificial), per diferents mecanismes com l'electroporació o tractaments amb fred i clorur de calci. Aquests tractaments modifiquen la permeabilitat de la membrana permetent l'entrada de DNA lliure.

El procés de transformació natural és diferent en gramnegatius i positius però en ambdós casos es requereix la presència de receptors localitzats a la superfície cel·lular capaços de reconèixer i unir-se a DNA lliure de cadena doble (13). Aquest DNA serà internalitzat i protegit per a evitar la seva degradació. Un cop a l'interior es dirigirà al cromosoma bacterià o a algun plasmidi i s'integrarà per un procés de recombinació homòloga. Si no existeix un elevat grau d'homologia entre el fragment de DNA a integrar i el cromosoma bacterià, la transformació no tindrà lloc i el DNA incorporat serà degradat.

1.5.1.2. Transducció

És un procés mitjançant el qual el DNA és transferit des d'un bacteri a un altre per acció d'un bacteriòfag. Aquest fenomen es coneix des de 1951 gràcies als experiments realitzats per Zinder i Lederberg on observaren que els fags actuaven com a vectors de transferència de material genètic en soques de *S. enterica* serovar Typhimurium (290).

Els fags que actuen com a mediadors de la transducció s'anomenen fags defectius. Aquests s'originen quan el fag infecta a una soca donadora i fruit d'un error en la seva replicació inclouen DNA bacterià en la seva nucleocàpsida. Aquesta partícula vírica defectuosa, a l'infectar un altre bacteri, que actua com a receptor, injecta el DNA procedent de la soca donadora a una altra cèl·lula bacteriana, produint-se així la transferència de material genètic. Si existeixen regions homòlogues, aquest DNA transductor pot ser incorporat al genoma de la cèl·lula receptora. En funció de si el fag defectiu incorpora DNA bacterià d'un fragment qualsevol del genoma o si el DNA bacterià prové d'una regió específica, la transducció es considera generalitzada o especialitzada respectivament. Si bé la transducció generalitzada pot dur-se a cap per un gran nombre de fags, la transducció especialitzada està limitada a fags lisogènics o integratius, com el fag λ d'*E. coli*, que s'integren sempre en una regió determinada del cromosoma bacterià, normalment entre els gens *bio* i *gal*, de forma que els gens bacterians que el fag encapsida per error són els gens adjacents al seu punt d'integració.

1.5.1.3. Conjugació

És el principal mecanisme de disseminació de gens de resistència per transferència horitzontal, on l'intercanvi de material genètic entre la soca donadora i la receptora implica necessàriament un contacte físic entre ambdues cèl·lules. Aquest fenomen fou observat per primer cop el 1946 per Lederberg i Tatum, que el varen descriure originalment com una forma arcaica de reproducció sexual entre bacteris (146).

La conjugació es un procés que utilitzen els plasmidis i els transposons conjugatius per a la seva mobilització, amb la finalitat de perpetuar-se, permetent la seva disseminació entre la població bacteriana (29).

El mecanisme conjugatiu es basa en la confluència de dos processos diferents: un sistema de transport de macromolècules i un sistema de mobilització del DNA plasmídic (162). Els gens encarregats de formar la maquinària de transport s'engloben en la regió *Mpf* (*Mating pair formation* o formació del par conjugatiu) mentre que la regió que codifica per als gens implicats en la mobilització del DNA es denomina *Dtr* (*DNA transfer replication* o transferència replicativa del DNA). El sistema *Mpf* pertany a la família dels sistemes de secreció de tipus IV (T4SS) i és l'encarregat de formar el canal o *pilus* conjugatiu per on es mobilitzarà el DNA plasmídic cap a la cèl·lula receptora.

El contacte entre la soca donadora i la receptora s'aconsegueix, presumiblement, per contracció o desacoblament del *pilus* sexual. Aquest contacte, inicialment inestable, és detectat per unes proteïnes sintetitzades a la regió *tra* (regió de transferència), que originen canvis que inicien la

transferència del DNA plasmídic d'una cèl·lula a l'altra. La proteïna TraM actua com una proteïna senyalitzadora activant les proteïnes TraN i TraG, encarregades d'estabilitzar i mantenir unides les dues cèl·lules. La proteïna TraM junt amb altres proteïnes causaran porus en les parets donant com a resultat el contacte dels dos citoplasmes. Posteriorment, la relaxasa, que és un dels principals components del relaxosoma (complex format per DNA i proteïnes), reconeixerà l'*oriT* del plasmidi (origen de transferència) i realitzarà un tall, de manera que una de les cadenes es trencarà, quedant la relaxasa unida covalentment a l'extrem 5' de la cadena. Es produirà un desenrotllament de la cadena trencada, per l'acció de les helicases. A partir de l'extrem 3'-OH lliure s'iniciarà la replicació per cercle rodant. La relaxasa, covalentment unida al DNA, es posarà en contacte amb el *Mpf* per mitjà de la proteïna acobladora (T4CP) que actua com una bomba, injectant la relaxasa, unida al DNA de cadena simple fins a la cèl·lula receptora. Una vegada s'hagi finalitzat la còpia de la cadena simple i el traspàs, la relaxasa lligarà els dos extrems per a circularitzar el plasmidi.

En bacteris grampositius, el contacte entre la soca donadora i la receptora no està mitjançada pel pilus conjugatiu, sinó per mitjà d'una sèrie de substàncies d'agregació i feromones (55).

1.5.2. ELEMENTS GENÈTICS MÒBILS DE DNA

Els elements genètics mòbils o MGE (*mobile genetic elements*) juguen un paper clau en la plasticitat bacteriana i en la capacitat que tenen els bacteris per a evolucionar i adaptar-se a un entorn en continu canvi. Existeixen una gran varietat de MGE dels quals destaquem els elements transposables, els

integrans i els elements conjugatius, tots ells implicats en la disseminació de resistències.

1.5.2.1. Elements transposables

La visió estàtica que es tenia del genoma va començar a canviar cap als anys quaranta gràcies als estudis de Barbara McClintock sobre el comportament genètic d'alguns trets de la dacs. Aquesta autora va suggerir l'existència d'elements genètics mòbils capaços de canviar la seva localització en el genoma. Aquests elements són el que avui anomenem elements transposables o transposons i foren descrits per primera vegada en bacteris cap als anys 70 (58).

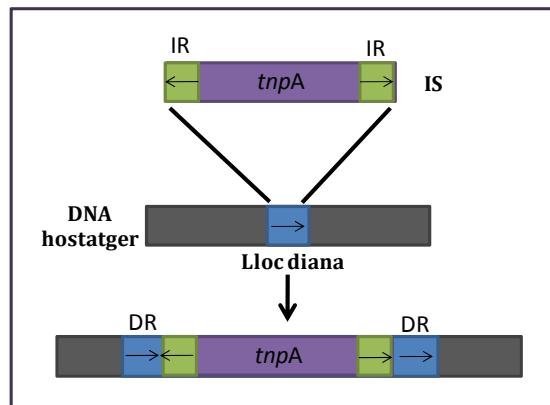
Dins dels elements transposables típics dels bacteris trobem les seqüències d'inserció, els transposons compostos i els transposons de la família TnA. Aquests elements es caracteritzen per la seva capacitat de moure's dins del genoma bacterià o del DNA plasmídic sense necessitat de recombinació homòloga amb la seqüència receptora.

- Seqüències d'inserció (IS)

Constitueixen el transposó de tipus més senzill. Es tracta de seqüències curtes de DNA que codifiquen únicament les proteïnes necessàries per a la seva pròpia mobilitat, la transposasa (TnpA) i altres factors implicats en la seva regulació (Figura 19) (163). A excepció de les famílies IS91, IS110 i IS200/605, es caracteritzen per la presència de repeticions terminals invertides (IR) a cada extrem, amb una longitud variable entre 9 i 42 pb. La transposasa actua reconeixent aquestes repeticions terminals. La transposició dels elements IS, provoca la generació de seqüències repetides directes (DR)

curtes al lloc diana on s'insereixen (65), a excepció de les IS91, que no formen repeticions directes o de les IS1549, IS1634 i IS1630, que formen llargues DR de longitud variable (99).

Figura 19. Representació esquemàtica de la inserció d'una IS al cromosoma.

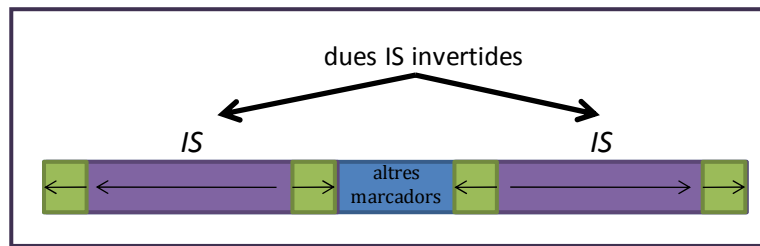


IR: repeticions invertides; **DR:** repeticions directes fruit de la inserció;
***tnpA*:** transposasa

- Transposons compostos (Tn)

Són unitats autònomes de DNA flanquejades per dues seqüències d'inserció iguals o molt similars, que poden estar orientades en el mateix sentit o de forma invertida (Figura 20). A diferència de les IS, aquests elements duen, a banda dels gens necessaris per a la seva mobilització, gens addicionals situats a la regió central, normalment marcadors de resistència. Els transposons compostos més coneguts són el Tn5, Tn9, Tn10 i Tn903 (Taula 11). Totes les funcions de transposició d'aquests elements són responsabilitat de les seqüències IS. Quan els dos mòduls són idèntics, qualsevol pot dur a terme la mobilització, però quan són diferents és molt probable que tan sols un mòdul siga funcional (ex. mòdul IS10R del Tn10).

Figura 20. Esquema d'un transposó compost amb IS invertides.



Taula 11. Característiques d'alguns transposons compostos.

| ELEMENT | MIDA (pb) | MARCADOR GENÈTIC | MÒDULS TERMINALS | ORIENTACIÓ DELS MÒDULS |
|---------|-----------|------------------------|------------------|------------------------|
| Tn5 | 5700 | <i>kan^R</i> | IS50R IS50L | Invertida |
| Tn9 | 2500 | <i>chl^R</i> | IS1 | Directa |
| Tn10 | 9300 | <i>tet^R</i> | IS10R IS10L | Invertida |
| Tn903 | 3100 | <i>kan^R</i> | IS903 | Invertida |

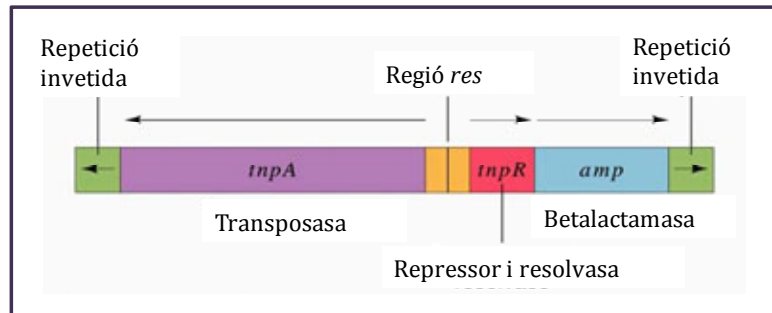
Kan: kanamicina; **chl:** cloranfenicol; **tet:** tetraciclina

- **Transposons de la família TnA**

El principal representant d'aquesta família és el Tn3, amb ampicil·lina com a marcador de resistència. Els transposons d'aquesta família són de gran mida (d'unes 5 kb), i a diferència dels anteriors no contenen una regió central flanquejada per dues IS, sinó un gen de resistència a drogues, generalment antibiòtics, junt amb dos gens necessaris per a la seva transposició: *tnpA*, que codifica la transposasa, i *tnpR*, que codifica l'enzim de la resolvasa. A més a més, presenten una regió denominada *res* que, juntament amb el gen *tnpR*, constitueix un sistema de recombinació específica de lloc, i dues repeticions terminals invertides, en general d'un 38 parells de bases (Figura 21). La seva integració sol provocar repeticions directes de 5 pb en el genoma receptor. Una característica funcional d'aquests elements és que generalment es transposen

de manera replicativa, originant un augment en el nombre de còpies d'aquest element (99).

Figura 21. Esquema d'un transposó *Tn3*.



1.5.2.2. Integrons (In)

El terme integró o element d'integració fou proposat per Stokes i Hall en 1989 (239). Els integrons es caracteritzen per ser elements capaços d'integrar o mobilitzar en la seva estructura molècules de DNA no replicatives anomenades gens *cassette*, que generalment inclouen un únic gen, que codifica en molts casos determinants de resistència antibiòtica; i una seqüència de recombinació de lloc específic coneguda com *attC* o element de 59 bases, la qual permet el reconeixement i la mobilització dels *cassettes* per part de l'integró.

Encara que els integrons no són mobilitzables per si mateixos, realitzen una funció important en l'adquisició i disseminació dels gens de resistència, ja que sovint s'associen a seqüències d'inserció, transposons i plasmidis conjugatius, que actuen com a vectors per a la seva transmissió tant intra-con inter-espècie.

Els integrons es componen de tres elements essencials localitzats en una regió conservada denominada 5'-CS (*5'-conserved region*): un lloc de recombinació específic (*attI*), per on es fixen els gens *cassette*; un gen que codifica per a una integrasa (*intI*), que reconeix l'*attC* d'aquests gens i els incorpora a l'integró per l'*attI*; i finalment un promotor (P_{ant}) que controla l'expressió dels gens *cassette* adjacents. A vegades contenen un segon promotor més fort, P_2 , situat al costat de l'anterior (230). En funció de la proximitat d'aquest gens *cassette* al promotor, els seus nivells d'expressió seran diferents, sent més elevats quan el gen de resistència s'ubica al primer *cassette*, és a dir, més pròxim al promotor (60).

S'han identificat cinc classes d'integrons associats a la disseminació de gens de resistència en *Enterobacteriaceae*, que difereixen entre si en les seqüències de les seves integrases (229), sent els integrons de classe 1 els que es troben amb major freqüència en bacteris resistents a antibiòtics, tant en l'àmbit intra com extrahospitalari (89, 151, 232). Els integrons de classe 1 es caracteritzen per presentar a banda de la regió 5'-CS, una altra regió conservada al seu extrem 3' (3'-CS), composta per gens que confereixen resistència a components d'amoní quaternari (*qacEΔ1*), sulfonamides (*sul1*) i una pauta de lectura oberta (*orf5*) de funció desconeguda (239). S'han descrit integrons de classe 1 amb delecions en l'extrem 3'-CS (230) i també integrons inusuals o integrons de classe 1 associats a *ISCR1* (ex. In6, In7, In8, In35 i In60, pSAL-1) que presenten una duplicació de la regió 3'-CS i una altra regió que inclou l'*ISCR1* o *orf513* (12, 95, 230, 253, 258).

1.5.2.3. Elements conjugatius

Aquests elements, a diferència dels transposables, posseeixen no tan sols la capacitat de mobilitzar-se, sinó també la d'autotransferir-se d'una cèl·lula a una altra. En aquest grup trobem tant els plasmidis com els transposons conjugatius i en ambdós casos, el contacte entre dues cèl·lules és imprescindible per a que el procés de transferència tingui lloc.

- Plasmidis

Són elements extracromosòmics de DNA, generalment de cadena doble i superenrotllats negativament, que duen informació no essencial per a la cèl·lula que els conté. Es troben presents en la pràctica totalitat dels gèneres bacterians coneguts i tenen grandàries que oscil·len entre pocs centenars a milers de pb.

Encara que existeix una gran variabilitat plasmídica, tots els plasmidis comparteixen una sèrie de funcions, que encara que no són universals (no estan presents en tots ells), si que són comunes, com la replicació, el manteniment estable i la transferència (únicament en plasmidis conjugatius i mobilitzables) (93). La replicació és una característica essencial dels plasmidis i té com a objectiu aconseguir un nombre suficient de còpies del plasmidi per a ser repartides entre les dues cèl·lules filles en el moment de la divisió cel·lular. Els elements genètics necessaris per a la seva replicació i el control del nombre de còpies es troben agrupats en una mateixa regió, coneguda com replicó, que típicament conté: un origen de replicació (*oriV*); els gens *cop/inc* encarregats del control del nombre de còpies; i una proteïna Rep, necessària per al control de la replicació (74).

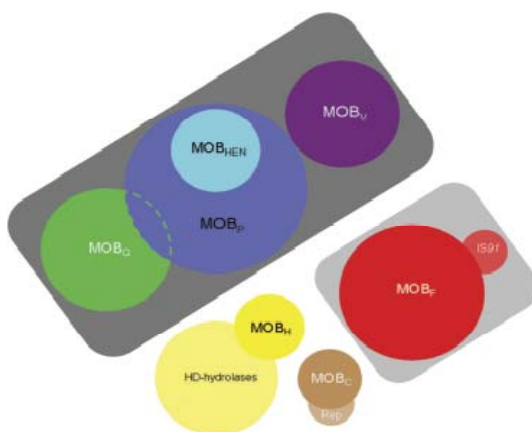
A banda de replicar-se, els plasmidis han de ser capaços de sobreviure i dispersar-se entre les poblacions bacterianes. Per a que això sigui possible, han d'assegurar-se que són transferits d'una manera estable a les cèl·lules filles durant la divisió cel·lular, dotant-se de diversos mecanismes com els sistemes de resolució de multímers, els sistemes d'addició molecular o els sistemes de partició activa (sobretot en plasmidis amb poc nombre de còpies) (36, 105, 112, 117).

A banda d'aquestes tres funcions generals, els plasmidis poden presentar una regió variable on es localitzen els gens que confereixen característiques fenotípiques, sovint avantatjoses, als seus hostatgers, tals com resistència a antibiòtics o metalls pesats, la capacitat de metabolitzar diferents compostos, l'expressió de factors de virulència o la síntesi de bacteriocines.

La gran variabilitat de plasmidis existents ha fet que els intents per classificar-los sigui tot un repte. Els primers intents de classificació dels plasmidis es basaren en les característiques fenotípiques que conferien als seus hostatgers. Degut als grans inconvenients que suposava aquesta classificació, Watanabe proposa el 1963 dividir els plasmidis en f_i^+ i f_i^- en funció de si eren capaços d'inhibir o no la transferència del factor F (270). Anys més tard Datta i Hedges classifiquen els plasmidis en funció del seu grup d'incompatibilitat, definint la incompatibilitat com la incapacitat de certs plasmidis de conviure en el mateix hostatger (71). L'anàlisi d'incompatibilitat clàssic consisteix en introduir, bé per conjugació o per transformació, el plasmidi a analitzar en una soca que conté un altre plasmidi ben caracteritzat. D'aquesta manera, els plasmidis que mostren incompatibilitat mútua s'engloben en un mateix grup d'incompatibilitat (Inc). Actualment es coneixen

al voltant d'uns 27 Inc per a enterobacteris, uns 14 grups per al gènere *Pseudomonas* i uns 15 per a *Staphylococcus*. Degut als problemes associats amb la definició de plasmidis incompatibles (plasmidis amb varis replicons, exclusió de superfície, etc.), aquesta classificació va anar quedant obsoleta i fou substituïda per la tipificació del replicó, inicialment basat en tècniques d'hibridació per *Southern blot* utilitzant els replicons com a sondes (64) i posteriorment mitjançant tècniques de PCR i seqüenciació (53, 98). Aquesta última tècnica, coneguda amb el nom de PBRT (*PCR-based replicon typing*), és la més utilitzada avui en dia per a la classificació de plasmidis en bacteris clínicament rellevants, permetent la detecció dels replicons de la majoria de les famílies plasmídiques aïllades en enterobacteris (HI1, HI2, I1/I γ , X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FIIs, K, B/O, F, ColE, R i U). Recentment ha aparegut un nou sistema de classificació plasmídica basat en la tipificació de la regió *mob* que codifica per a la relaxasa, característica present en tots els plasmidis conjugatius i mobilitzables. Segons les similituds de les seqüències aminoacídiques i les propietats de les relaxases, els plasmidis conjugatius i mobilitzables es poden classificar en 6 famílies: MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_P i MOB_V (Figura 22) (92, 100).

Figura 22. Representació esquemàtica de les diferents famílies de relaxases.



Els cercles representen les diferents famílies de relaxases mentre que la seva mida equival al nombre de relaxases disponibles en les bases de dades de seqüències de DNA (s'han inclòs en l'anàlisi totes les relaxases seqüenciades fins a Desembre del 2007).

Figura extreta de Garcillán-Barcia, MP. et al. FEMS Microbiol Rev, 2009 (100).

A diferència de la PBRT que està basada en els Inc clàssics d'enterobacteris, aquesta nova classificació engloba una major diversitat plasmídica, incloent una àmplia diversitat de plasmidis presents en γ -proteobacteris i MGE tals com ICE, *integrative mobilizable elements* (IME) i illes genòmiques (IG) amb relaxases funcionals. Dins d'aquesta classificació també s'analitzen plasmidis procedents d' α -proteobacteris, β -proteobacteris, cianobacteris, actinobacteris, firmicutes i tenericutes. El desenvolupament d'aquesta nova classificació plasmídica neix amb l'objectiu de fer front a les limitacions que planteja la tipificació molecular del replicó tals com: el fet que estan essencialment basades en els Inc clàssics d'enterobacteris, la dificultat a l'hora de classificar plasmidis amb més d'un replicó o els possibles problemes a l'hora d'identificar les regions replicatives degut a l'existència dels múltiples sistemes que utilitzen els plasmidis per a replicar-se.

- **Transposons conjugatius**

El terme de transposó conjugatiu (CTn) va ser inicialment utilitzat per a descriure elements de DNA, com el Tn916, capaços de transposar-se d'un lloc a un altre del genoma bacterià i d'autotransferir-se per conjugació a una cèl·lula receptora d'una forma similar a la proposada per als plasmidis. A diferència d'aquests, no disposen d'una replicació autònoma per a mantenir-se, de forma que la seva supervivència i disseminació roman en el fet de trobar-se integrats al cromosoma bacterià. Aquests elements estan composts per una regió altament conservada, on es troben els gens que codifiquen per a recombinases lloc-específiques, encarregades de la seva escissió i integració, tota una sèrie de gens implicats en la seva transferència horitzontal; i regions

variables anomenades punts calents o “hotspots”, regions altament recombinogèniques que permeten la captura de gens addicionals tals com gens de resistència antibiòtica o a metalls pesats (42, 231, 276). Encara que en la gran majoria dels CTn descrits, les recombinases lloc-específiques pertanyen a la família de les tirosina recombinases, també hi ha alguns elements conjugatius amb serina recombinases, com és el cas del Tn5397 de *Clostridium difficile* (235, 267). Existeix una gran variabilitat dins dels diferents CTn descrits en quant a la seva especificitat d'integració, trobant elements conjugatius com Tn906 o Tn1549, amb una baixa especificitat d'integració, i per tant, amb facilitat per a transposar-se intercel·lularment, o elements que sols poden integrar-se en un lloc específic, com els elements de la família STX/R391 (42). Aquesta especificitat pot variar en funció de l'hostatger on s'ubiquen, sent capaços d'integrar-se en diferents localitzacions en un hostatger i tan sols en un lloc específic en un altre i viceversa (ex. Tn916, és capaç d'integrar-se en una gran quantitat de llocs en *Enterococcus faecalis*, però tan sols en un lloc específic en *C. difficile*) (268). Aquestes i altres diferències entre els diferents elements conjugatius descrits ha fet que la nomenclatura sigui d'allò més heterogènia, incloent els transposons conjugatius, illes genòmiques, els plasmidis integratius, els CONSTIN (*conjugal*, *self-transmissible*, *integrating element*) i nombrosos elements no classificats. El 2002, Burrus *et al.* (42) proposen homogeneïtzar la nomenclatura amb el terme ICE (*Integrative and conjugal element*) per a agrupar tots els elements genètics mòbils auto-transferibles capaços de mobilitzar-se des del cromosoma d'un hostatger al cromosoma d'una cèl·lula receptora per un procés d'escissió, conjugació i integració. Encara que la majoria dels CTn o ICE descrits mobilitzen gens de resistència antibiòtica,

principalment a macròlids, tetraciclina i cloranfenicol, recentment s'ha descrit un ICE de la família SXT/R391, aïllat en una soca de *P. mirabilis*, vehiculant gens de resistència a cefalosporines d'ampli espectre, concretament *bla*_{CMY-2} (116).

Els primers representants d'aquesta família, SXT i R391, foren aïllats en soques de *Vibrio cholerae* i *Providencia rettgeri* respectivament, però s'han trobat en molts altres bacteris (41, 57, 101, 264, 276). Molts dels seus membres foren inicialment aïllats en la seva forma circular intermèdia i erròniament identificats com a plasmidis del grup IncJ.

Hi ha més de 30 elements de la família SXT/R391 descrits i s'agrupen junts perquè codifiquen per a una integrasa altament conservada (276). Aquesta integrasa és la responsable de la integració lloc específica de l'ICE a la regió 5' terminal del gen conservat *prfC*, gen que codifica per al factor 3 d'elongació (118).

2. OBJECTIUS

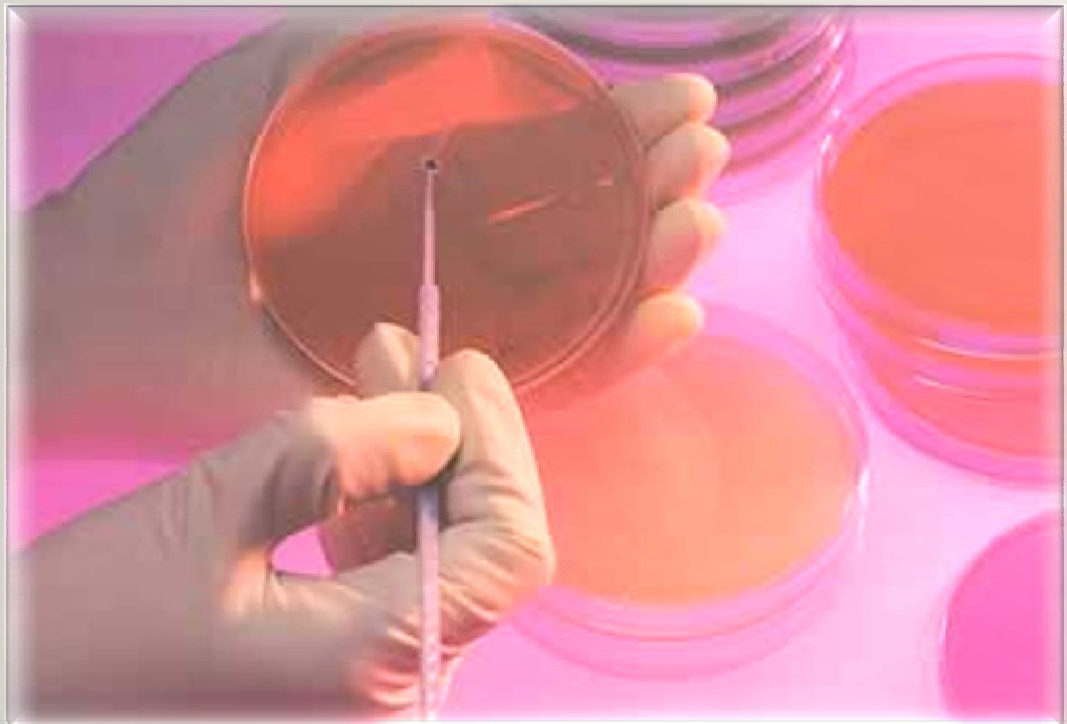


2. OBJECTIUS

Els objectius de la present tesi doctoral foren:

1. Determinar la capacitat dels centres espanyols per a detectar i informar correctament fenotips de resistència a betalactàmics en soques de *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* (**Annex I**).
2. Caracteritzar els mecanismes de resistència d'una soca de *Serratia marcescens* i determinar la possible transmissió *in vivo* d'aquests mecanismes entre la soca de *Serratia marcescens* i una soca d'*Escherichia coli* (**Annex II**).
3. Determinar la prevalença i distribució de soques productores de pACBL en enterobacteris aïllats a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau durant 1999-2007 i establir la relació clonal d'aquestes soques (**Annex III**).
4. Caracteritzar els vectors implicats en la disseminació dels gens *ampC* i els entorns genètics d'aquests gens (**Annexos IV i V**).
5. Determinar el tipus i la prevalença de gens *qnr* en soques productores de *bla_{DHA-1}* i establir la possible co-localització d'ambdós gens en un mateix context genètic (**Annex VI**).

3. MATERIAL I MÈTODES



MATERIAL I MÈTODES

3.1. CONTROL DE QUALITAT A NIVELL NACIONAL (Annex I)

3.1.1. SELECCIÓ DE LES SOQUES

Es varen seleccionar 12 soques bacterianes ben caracteritzades: set productores de BLEA, incloent sis aïllats clínics productors de BLEA més prevalents al nostre país i la soca de *K. pneumoniae* ATCC 700603, control de qualitat positiu de BLEA recomanat pel CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*); una soca d'*E. coli* hiperproductora de la seva AmpC cromosòmica; una soca de *K. pneumoniae* productora de FOX-5; una soca d'*E. coli* productora de CMY-2 i dues soques de referència ATCC d'*E. coli* (ATCC 25922 i ATCC 35218) recomanades pel CLSI per al control de qualitat en la realització de l'antibiograma.

La identificació de les soques, determinació de la seva sensibilitat antimicrobiana i confirmació dels mecanismes de resistència als betalactàmics es va verificar de manera independent per dos laboratoris de referència (Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla i Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona). Per a la identificació de les soques es varen usar tires API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Els antibiogrames es varen realitzar tant per la tècnica de disc-difusió com per microdilució, seguint les recomanacions del CLSI (Taula 12). La caracterització de les betalactamases produïdes pels aïllats clínics es realitzà segons els mètodes establerts, incloent tècniques de PCR i seqüenciació de DNA (veure apartat 3.2.3).

Taula 12. Característiques de les soques d'estudi, valors de CIM esperats i categoria clínica interpretada, segons els criteris del CLSI.

| SOCA | CARACTERÍSTIQUES | CIM (mg/l) | | | | | | | | | | |
|-------|--|-------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|---------------|
| | | AMC | PTZ | CRO | CTX | CAZ | FEP | AZT | FOX | IMP | MEM | ERT |
| CCG01 | <i>E. coli</i> 33-22/ CTX-M-14 | 16/8 (I) | 2/4 (S) | >64 (R) | >64 (R) | 1 (R) | 8-16 (R) | 8 (R) | 8 (S) | 0,125 (S) | ≤0,03 (S) | ≤0,03 (S) |
| CCG02 | <i>E. coli</i> 10-7/CTX-M-9 | 4/2-8/4 (S) | 2/4 (S) | >64 (R) | 16-32 (R) | 0,25 (R) | 2 (R) | 1 (R) | 8 (S) | 0,125 (S) | ≤0,03 (S) | ≤0,03 (S) |
| CCG03 | <i>E. coli</i> 23-9/ CTX-M-10 | 4/2-8/4 (S) | 2/4 (S) | >64 (R) | 32-64 (R) | 1 (R) | 16 (R) | 4 (R) | 2 (S) | 0,125 (S) | ≤0,03 (S) | ≤0,03 (S) |
| CCG04 | <i>E. coli</i> 22-3/SHV-12 | 4/2-8/4 (S) | 4/4 (S) | 16 (R) | 4-8 (R) | >64 (R) | 1 (R) | >64 (R) | 4 (S) | 0,125 (S) | ≤0,03 (S) | ≤0,03 (S) |
| CCG05 | <i>K. pneumoniae</i> 16-3/ TEM-4 | 8/4 (S) | 32/4 (I) | 4-8 (R) | 4-8 (R) | >64 (R) | 0,5 (R) | >64 (R) | 4 (S) | 0,06 (S) | ≤0,03 (S) | ≤0,03 (S) |
| CCG06 | <i>K. pneumoniae</i> 25-2/ SHV-1 + CTX-M-10 | 8/4 (S) | 4/4 (S) | >64 (R) | >64 (R) | 4 (R) | 4 (R) | 16 (R) | 4 (S) | 0,125 (S) | ≤0,03 (S) | 0,03-0,06 (S) |
| CCG07 | <i>K. pneumoniae</i> 1960/FOX-5 | 32 (R) | 16 (S) | 4 (S) | 4 (S) | 16 (I) | 0,25 (S) | 1 (S) | >128 (R) | 0,125 (S) | ≤0,03 (S) | 0,06 (S) |
| CCG08 | <i>E. coli</i> TG31 hiperproductora d'AmpC cromosòmica | 64 (R) | 16 (S) | 2-4 (S) | 4 (S) | 16 (I) | 0,125 (S) | 8 (S) | 64 (R) | 0,125 (S) | ≤0,03 (S) | ≤0,03 (S) |
| CCG09 | <i>E. coli</i> TG22/CMY-2 | 32 (R) | 8 (S) | 32 (I) | 16 (I) | 32 (R) | 0,5 (S) | 8 (S) | 128 (R) | 0,125 (S) | ≤0,03 (S) | 1-2 (S) |
| CCG10 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 4 (S) | 2 (S) | 0,06 (S) | 0,06 (S) | 0,25 (S) | ≤0,03 (S) | 0,125 (S) | 2-4 (S) | 0,06 (S) | ≤0,03 (S) | ≤0,03 (S) |
| CCG11 | <i>E. coli</i> ATCC 35218/TEM-1 | 4-8 (S) | 1 (S) | ≤0,03 (S) | ≤0,03 (S) | 0,125 (S) | ≤0,03 (S) | ≤0,03 (S) | 2-4 (S) | 0,125 (S) | ≤0,03 (S) | ≤0,03 (S) |
| CCG12 | <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603/SHV-18 | 4/2-8/4 (S) | 16/4 (S) | 4 (R) | 2-4 (R) | 32 (R) | 1 (R) | 32 (R) | 16 (I) | 0,125 (S) | ≤0,03 (S) | 0,06 (S) |

AMC: amoxicil·lina-àcid clavulànic (2/1); **PTZ:** piperacil·lina-tazobactam (tazobactam a concentració fixa de 4 mg/l); **CRO:** ceftriaxona; **CTX:** cefotaxima; **CAZ:** ceftazidima; **FEP:** cefepima; **AZT:** aztreonam; **FOX:** cefoxitina; **IMP:** imipenem; **MEM:** meropenem; **ERT:** ertapenem.

3.1.2. DISSENY DE L'ESTUDI I AVALUACIÓ DELS RESULTATS

Es va dissenyar un estudi a nivell nacional, incloent 57 laboratoris de microbiologia clínica repartits per tot l'àmbit nacional (Figura 23). Tots els centres participants reberen simultàniament les 12 soques problema, així com un manual d'instruccions. Se'ls va demanar que aplicaren els mètodes que utilitzaren rutinàriament per a la identificació i l'estudi de sensibilitat antimicrobiana, considerant les soques com a aïllats d'hemocultius. Tots els participants havien de subministrar els resultats de la identificació i l'antibiograma (tant quantitativus, en diàmetres dels halos d'inhibició o valors de CIM, com qualitativus, en categories clíniques de sensible, intermedi o resistent d'acord amb el valor de CIM o diàmetre d'halo i categories clíniques interpretades en funció del fenotip de resistència detectat).

Figura 23. Distribució geogràfica dels centres participants.



Se'ls va demanar que proporcionaren els resultats qualitius de la forma que normalment ho informarien als clínics, incloent notes addicionals. Els participants havien de subministrar també la següent informació: i) mètodes utilitzats (és a dir, tipus de sistema automàtic o manual); ii) criteris d'interpretació dels resultats dels antibiogrames.

Les discrepàncies en la interpretació dels resultats de l'estudi de sensibilitat antimicrobiana trobades foren classificades com errors màxims, majors o menors. Es va considerar que ocorrien errors màxims (VME) quan els resultats obtinguts pel centre participant es trobava en la categoria de sensible mentre que era resistent pel mètode de referència (el percentatge de VME, utilitzant com a denominador el nombre de determinacions realitzades per a aquesta combinació microorganisme-antimicrobià, es va calcular sols per a microorganismes resistents). Es va considerar que ocorrien errors majors (MaE) quan els resultats obtinguts pel centre participant es trobaven en la categoria de resistent mentre que era sensible pel mètode de referència (el percentatge de MaE, utilitzant com a denominador el nombre de determinacions realitzades per a aquesta combinació microorganisme-antimicrobià, es va calcular sols per a microorganismes sensibles). Finalment, es va considerar que ocorrien errors menors (MiE) quan els resultats obtinguts pel centre participant es trobaven en la categoria de sensible o resistent i era intermedi pel mètode de referència o quan els resultats obtinguts pel centre participant es trobaven en la categoria d'intermedi i era sensible o resistent pel mètode de referència (Taula 13).

Taula 13. Classificació de les discrepàncies en funció la categoria clínica interpretativa obtinguda de l'estudi de sensibilitat antimicrobiana.

| CLASSIFICACIÓ ERRORS | CENTRE PARTICIPANT | CENTRE DE REFERÈNCIA |
|----------------------|--------------------|----------------------|
| Errors màxims (VME) | S | R |
| Errors majors (MaE) | R | S |
| Errors menors (MiE) | S/R I | I S/R |

Per a l'anàlisi de les dades corresponent a l'estudi de la sensibilitat antimicrobiana s'utilitzaren les categories clíniques interpretades subministrades pels participants, degut a que els laboratoris utilitzaven diferents sistemes, amb diferents panells o targetes i diferents rangs de concentració de l'antimicrobià i en alguns laboratoris la tècnica de sinèrgia amb doble disc. Els criteris aplicats foren els del CLSI, amb les següents matisacions (Taula 14):

a) encara que no existeix cap recomanació específica sobre com deu informar-se la sensibilitat a amoxicil·lina-àcid clavulànic i piperacil·lina-tazobactam en soques de *K. pneumoniae* i *E. coli* productores de BLEA, es va considerar correcte informar la categoria d'intermedi per la possibilitat de fracàs terapèutic en infeccions greus. Per aquest motiu, ambdós resultats (S/I) es varen considerar vàlids per a les soques el valor de CIM de les quals es trobava dins de la categoria de sensible.

b) encara que no existeix cap recomanació específica sobre com deu informar-se la sensibilitat a ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima i aztreonam en soques de *K. pneumoniae* i *E. coli* productores de pACBL o *E. coli* hiperproductora de la seva AmpC cromosòmica natural, es va considerar correcte informar la categoria d'intermedi quan la seva CIM estava dins de la

categoria sensible, o resistent quan la seva CIM estava dins de la categoria d'intermedi. Per aquest motiu, ambdós resultats (S/I, I/R) es varen considerar vàlids.

c) encara que no existeix cap recomanació específica sobre com deu informar-se la sensibilitat a piperacil·lina-tazobactam en soques productores de pACBL o *E. coli* hiperproductora de la seva AmpC cromosòmica natural, es va considerar correcte informar la categoria d'intermedi quan la seva CIM estava dins de la categoria sensible davant el risc de fracàs terapèutic en infeccions greus. Per aquest motiu, ambdós resultats (S/I) es varen considerar vàlids.

Taula 14. Notes addicionals a les recomanacions del CLSI sobre com interpretar soques de *K. pneumoniae* i *E. coli* productores de BLEA i AmpC.

| ANTIBIÒTICS I MECANISMES DE RESISTÈNCIA | CATEGORIA CLÍNICA QUALITATIVA | CATEGORIA CLÍNICA INTEPRETATIVA |
|--|-------------------------------|---------------------------------|
| PRODUCTORS BLEA: | | |
| ▪ Penicil·lines combinades amb inhibidors de betalactamases: AMC i PTZ | S | S/I |
| PRODUCTORS AmpC: | | |
| ▪ Penicil·lines combinades amb inhibidors de betalactamases: PTZ | S | S/I |
| ▪ C3G (CRO, CTX, CAZ) i AZT | S I | S/I I/R |

AMC: amoxicil·lina-àcid clavulànic (2/1); **PTZ:** piperacil·lina-tazobactam; **CRO:** ceftriaxona; **CTX:** cefotaxima; **CAZ:** ceftazidima; **FEP:** cefepima; **AZT:** aztreonam; **C3G:** cefalosporines de tercera generació.

3.2. CARACTERITZACIÓ DE LES SOQUES PRODUCTORES DE pACBL I DELS VECTORS IMPLICATS EN LA SEVA DISSEMINACIÓ (Annexos II-VI)

3.2.1. SELECCIÓ DE LES SOQUES

Es va estudiar la sensibilitat d'un total de 27.119 soques d'enterobacteris sense AmpC cromosòmica induïble aïllades de mostres clíniques a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau entre els anys 1999 i 2007. Quan un pacient presentava múltiples aïllats en un període d'un mes, únicament es va seleccionar el primer aïllat per a l'anàlisi. Entre aquests aïllats, es varen analitzar un total de 19.929 soques d'*E. coli*, 2.387 de *K. pneumoniae*, 2.095 de *P. mirabilis*, 1.771 de *K. oxytoca*, 509 de *S. enterica*, 211 de *C. koseri*, 108 de *P. vulgaris*, 101 de *Shigella* spp. i vuit soques de *P. penneri*.

Com que algunes pACBL no confereixen resistència a cefoxitina, les soques seleccionades en aquest estudi foren aquelles amb resistència intermèdia o total a amoxicil·lina-àcid clavulànic, cefotaxima, ceftazidima i/o cefoxitina i negatives per a la producció de BLEA (test de sinèrgia amb l'àcid clavulànic negatiu), mitjançant la tècnica de disc-difusió, seguint els punts de tall proposats pel CLSI (56). També es varen incloure totes aquelles soques positives per a la producció de BLEA amb sensibilitat intermèdia o total a l'amoxicil·lina-àcid clavulànic o a la cefoxitina.

3.2.2. CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DELS DIFERENTS GENS DE RESISTÈNCIA

3.2.2.1. Estudis de sensibilitat a agents antimicrobians

L'estudi de la sensibilitat dels microorganismes als antimicrobians es porta a terme mitjançant una sèrie de procediments que sota condicions específiques i estandarditzades permeten avaluar *in vitro* la resposta d'una soca bacteriana a un o diversos antimicrobians, traduint el seu resultat com a factor predictiu de l'eficàcia clínica.

La determinació de la sensibilitat per la tècnica de disc difusió en agar Muëller-Hinton (MH) es va realitzar utilitzant els següents antimicrobians (Neo-Sensitabs, Rosco Diagnostica S/A, Taastrup, Denmark): ampicil·lina (10 µg), piperacil·lina (100 µg), cefalotina (30 µg), cefuroxima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 µg), cefoxitina (30 µg), amoxicil·lina-àcid clavulànic (20+10 µg), piperacil·lina-tazobactam (100+10 µg), àcid nalidíxic (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), sulfonamides (240 µg), trimetoprim (5 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (25+23,75 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg), tobramicina (10 µg), amikacina (30 µg) i estreptomycin (10 µg).

Tècnica de disc difusió en agar

Aquesta tècnica està basada amb els treballs de Kirby i Bauer i es basa en la utilització d'una quantitat determinada d'antimicrobià disposat en un reservori (discs de paper, tablettes) que és aplicat sobre la superfície d'una placa d'agar prèviament inoculada amb el microorganisme. L'antibiòtic difon radialment a través de l'espessor de l'agar a partir del reservori formant-se un

gradient de concentració. Concomitant a la difusió de l'antimicrobià, el microorganisme inoculat es multiplica fins a l'àrea on la concentració de l'antimicrobià inhibeix el seu creixement donant lloc a la formació d'halos d'inhibició. Els diàmetres d'inhibició es correlacionen inversament amb la CIM obtinguda per mètodes de dilució. No obstant això, el mètode de disc difusió no permet una lectura directa del valor de CIM sinó que proporciona un resultat qualitatiu expressat en les categories de sensible, intermedi o resistent en base a la referència de la mida de les zones d'inhibició amb punts de tall establerts per diversos comitès.

Procediment:

1. Seleccionar varies colònies aïllades de la mateixa morfologia d'una placa de cultiu preferiblement de 18 a 24 hores i realitzar una suspensió en 2 ml de solució salina fins a aconseguir una terbolesa corresponent a l'estàndard 0,5 McFarland.
2. Submergir un escovilló estèril en la suspensió bacteriana. Rotar l'escovilló varies vegades pressionant contra la paret interna del tub sobre el nivell del líquid per tal d'eliminar l'excés d'inòcul.
3. Inocular les plaques de manera uniforme sense deixar cap zona lliure, lliscant l'escovilló per sobre de la superfície de l'agar formant estries paral·leles compactes fins a cobrir tota la superfície. Repetir aquest procediment dues vegades més, rotant la placa aproximadament 60° cada vegada per tal d'assegurar una distribució uniforme de l'inòcul.
4. Deixar assecar les plaques de 3 a 15' per tal que l'agar absorbeixi l'inòcul abans d'aplicar els discs.
5. Dipositar amb dispensador els discs contenint els antibiòtics distribuint-los en la perifèria de la placa, equidistants entre si.
6. Abans que transcorrin 15' des de l'aplicació dels discs, incubar la placa a 35-37°C durant 18-24h.

3.2.2.2. Detecció de soques productores de pACBL

Les proves fenotípiques addicionals per a detectar les soques productores de pACBL de la col·lecció d'aquest estudi foren:

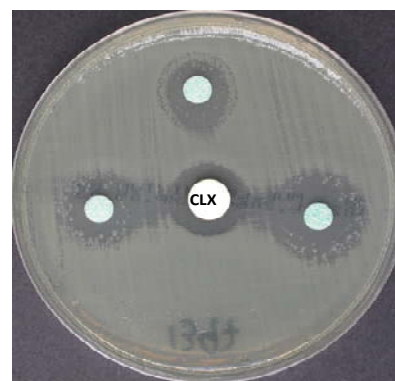
- **Prova de sinèrgia de doble disc amb inhibidors**

Aquest procediment és aplicable a aïllats clínics de la família *Enterobacteriaceae* que no produeixen una betalactamasa AmpC natural. Esta basada en la propietat que presenten aquests enzims de ser inhibits per determinats compostos com la cloxacil·lina o l'àcid borònic i en la utilització de C3G com a indicadors. Una ampliació de l'halo d'inhibició de cefotaxima o ceftazidima en la zona propera al disc de cloxacil·lina o àcid borònic (sinèrgia) o presència d'una "zona fantasma" (inhibició del creixement) entre les cefalosporines i l'inhibidor s'interpretarà com a resultat positiu de la presència de pACBL (Figura 24).

Procediment:

1. Seguir el procediment per a la realització d'un antibiograma per la tècnica de disc difusió i inocular una placa d'agar MH de la soca problema.
2. Situar un disc de cefotaxima i un disc de ceftazidima a una distància d'1,5-2,5 cm (marge a marge) d'un disc de cloxacil·lina (500 µg) o àcid borònic (250 µg). La separació òptima dels discs pot variar en funció de la soca.
3. Incubar la placa a 35-37°C durant 18-24h.

Figura 24. Sinèrgia de doble disc amb cloxacil·lina.



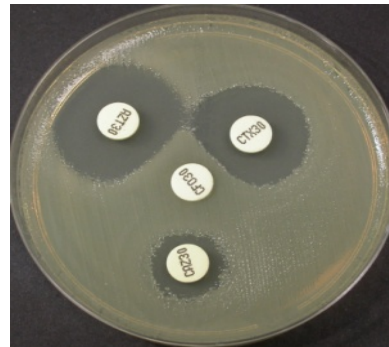
- **Prova d'aproximació de discs:**

Aquesta tècnica és aplicable per a la detecció de betalactamases AmpC induïbles.

Consisteix en realitzar un antibiograma convencional, per a posteriorment situar un disc d'un inductor fort com la cefoxitina o l'imipenem a una distància d' 1,5-2,5 cm

(marge a marge) d'un disc de ceftriaxona, ceftazidima o cefotaxima (antimicrobià revelador). El microorganisme produirà una betalactamasa induïble si s'observa un halo d'inhibició truncat de l'antimicrobià revelador (Figura 25).

Figura 25. Prova d'aproximació de discs.



- **Salt de colònies:**

L'observació de colònies situades a la proximitat dels halos d'inhibició de la cefoxitina, les C3G i l'aztreonam és un indicador de la presència de pACBL (176).

3.2.2.3. Detecció de soques productores de BLEA

La detecció de BLEA amb les proves de sensibilitat habituals pot ser difícil degut a que l'activitat front a cada cefalosporina és variable en funció del tipus d'enzim i del nivell de producció, de manera que algunes cefalosporines poden presentar una sensibilitat disminuïda però no sempre fins a nivells considerats resistents d'acord als punts de tall establerts. Això fa que sigui necessari la utilització de proves complementàries per a la seva detecció.

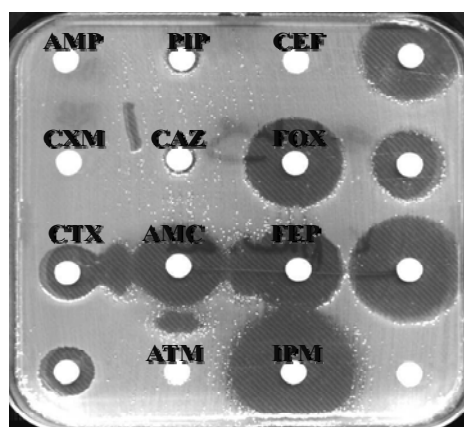
Les proves per a la detecció de BLEA es basen en la propietat que presenten la major part d'aquests enzims de ser inhibits per l'àcid clavulànic i en la utilització de C3G, C4G i aztreonam com a indicadors. Per millorar la detecció de BLEA en soques que produeixen simultàniament una betalactamasa AmpC de codificació cromosòmica o plasmídica aquests mètodes poden modificar-se amb la incorporació, al medi de cultiu o als discs, de cloxacil·lina (inhibidor d'enzims AmpC).

La detecció fenotípica de BLEA es va realitzar mitjançant la tècnica de sinèrgia de doble disc, consistent en situar un disc d'amoxicil·lina-àcid clavulànic proper a discs de betalactàmics indicadors. La producció de BLEA es demostra per l'ampliació de l'halo d'inhibició de cefotaxima, ceftazidima, cefepima o aztreonam en la zona propera al disc d'amoxicil·lina-àcid clavulànic (sinèrgia) o presència d'una "zona fantasma" (inhibició del creixement) entre les cefalosporines o aztreonam i l'inhibidor (Figura 26).

Procediment:

1. Seguir el procediment per a la realització d'un antibiograma per la tècnica de disc difusió i inocular una placa d'agar MH de la soca problema.
2. Situar un disc de cefotaxima, ceftazidima, cefepime i aztreonam a una distància d' 1,5-2,5 cm (marge a marge) d'un disc d'amoxicil·lina-àcid clavulànic. La separació òptima dels discs pot variar en funció de la soca.
3. Incubar a 35-37°C durant 18-24 hores.

Figura 26. Detecció de BLEA per sinèrgia de doble disc.



3.2.3. CARACTERITZACIÓ GENOTÍPICA DELS DIFERENTS GENS DE RESISTÈNCIA

El protocol que és va seguir per a la caracterització dels diferents gens de resistència va consistir en: i) un procés d'extracció del DNA bacterià; ii) l'amplificació dels gens per PCR; iii) la separació dels fragments de DNA amplificats per electroforesi convencional; iv) la purificació dels amplificats amb un kit comercial i seqüenciació dels amplicons; v) l'anàlisi dels resultats mitjançant un suport informàtic.

3.2.3.1. Extracció de DNA

L'extracció de DNA genòmic es va realitzar per tècniques d'extracció convencionals o mitjançant l'ús de kits comercials. Les tècniques d'extracció convencionals utilitzen com agents lítics el calor, solucions alcalines i/o detergents. Els kits comercials combinen els procediments anteriors amb l'ús de columnes específiques de purificació de DNA genòmic.

▪ Tècniques convencionals

Es va realitzar seguint la tècnica d'extracció per calor.

Procediment:

1. Agafar una porció de colònia bacteriana crescuda en una placa d'agar sang (AS) fresca i ressuspendre en 100 µl d'aigua bidestil·lada estèril.
2. Bullir 15' a 99°C.

▪ Kit comercial

Es va realitzar mitjançant el kit comercial GenElute™ Bacterial Genomic DNA de Sigma-Aldrich seguint les recomanacions del fabricant.

(<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/dna-and-rna-purification/bacterial-genomic-miniprep-kit.html>).

3.2.3.2. Amplificació del DNA

L'amplificació dels gens de resistència *bla* i *qnr* es va realitzar mitjançant la tècnica de PCR (*polimerase chain reaction*). En les taules 17,18 i 19 es detallen els iniciadors i les condicions de PCR utilitzades.

Aquesta tècnica permet l'amplificació *in vitro* de grans quantitats d'un fragment de DNA i es divideix en tres etapes que es repeteixen un nombre *n* de vegades. La primera etapa o iniciació comprèn una desnaturalització tèrmica del DNA bicatenari per tal d'obtenir cadenes monocatenàries a les quals puguin aparellar-se els iniciadors (cadenes sintètiques de DNA, complementàries als extrems 5' o 3' de cada cadena monocatenària del fragment a amplificar). La segona etapa consisteix en la hibridació entre els iniciadors i el DNA monocatenari diana. Aquesta hibridació és necessària ja que la polimerasa requereix d'una regió de DNA de doble cadena per a la iniciació de la síntesi de la cadena complementària a partir d'una única cadena. L'última etapa o extensió consisteix en la síntesi de les dues cadenes monocatenàries per part de la Taq polimerasa.

Procediment 1:

1. Es prepara la mostra per la tècnica convencional d'extracció per calor detallada anteriorment en l'apartat 3.2.3.1.
2. Es preparen els dNTP barrejant 20 µl de cada oligonucleòtid (ATP, CTP, GTP i TTP) a 100mM en 920 µl d'aigua bidestil·lada estèril, quedant una concentració final de 2 mM.
3. Es preparen els iniciadors a partir d'una solució mare de 100 µM. La concentració dels iniciadors per a fer la PCR és 10 µM. Per tant, en un tub eppendorf afegim 90µl d'aigua bidestil·lada i 10 µl de solució mare. Els iniciadors i les condicions de PCR utilitzades es mostren en les taules 17, 18 i 19.

4. Es prepara la *master-mix* seguint les proporcions indicades en la taula 15 per a cada mostra. S'haurà de multiplicar pel nombre de mostres afegint dos més, una per al control positiu i l'altra per al control negatiu (*master-mix* sense mostra).
5. Es barrejaran 48 μl de *master-mix* amb 2 μl de mostra, obtenint una V_F de 50 μl .
6. Ficar les mostres al termociclador.

Tot el material utilitzat ha d'estar a la cabina estèril, prèviament esterilitzat i irradiat per evitar possibles contaminacions.

Taula 15. Preparació de la *master-mix* (per mostra).

| REACTIUS | VOLUM/MOSTRA ($V_F=50 \mu\text{l}$) |
|-----------------------|--|
| Iniciador A | 2 μl |
| Iniciador B | 2 μl |
| dNTPs | 5 μl |
| Tampó | 5 μl |
| Aigua estèril | 30,6 μl |
| Taq polimerasa | 0,4 μl |

La preparació dels iniciadors i la *master-mix* utilitzada per a la detecció de les diferents famílies de pACBL serà lleugerament diferent, degut a que realitzarem una PCR múltiple barrejant tots els iniciadors requerits en una única *master-mix*.

Procediment 2 (PCR múltiples per a la detecció de pACBL):

1. Es faran tres mesclades de iniciadors (A, B i C) barrejant 10 μl de cada iniciador a una concentració de 100 μM i afegirem aigua estèril fins a assolir una concentració final de 10 μM . (**Iniciadors Mix A:** 10 μl MOXMF +10 μl MOXMR + 10 μl CITMF + 10 μl CITMR + 10 μl DHAMF + 10 μl DHAMR + 40 μl d'aigua bidestil·lada estèril; **Iniciadors Mix B:** 10 μl ACCMF +10 μl ACCMR + 10 μl EBCMF + 10 μl EBCMR + 60 μl d'aigua; **Iniciadors Mix C:** 10 μl FOXMF + 10 μl FOXMR + 80 μl d'aigua).
2. Es prepara la *master-mix* seguint les proporcions indicades en la taula 16.

Taula 16. Preparació de la *master-mix* (per mostra).

| REACTIUS | VOLUM/MOSTRA ($V_F=50 \mu\text{l}$) |
|------------------------|--|
| Iniciador Mix A | 3 μl |
| Iniciador Mix B | 2,5 μl |
| Iniciador Mix C | 2 μl |
| dNTPs | 5 μl |
| Tampó | 5 μl |
| Aigua estèril | 30 μl |
| Taq polimerasa | 0,5 μl |

Taula 17. Iniciadors i condicions utilitzades per a l'amplificació i seqüenciació de les diferents pACBL.

| PARELLA D' INICIADORS | SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA DELS INICIADORS (5' to 3') | T ^a * | POSICIÓ DELS INICIADORS | MIDA ESPERADA (bp) | DIANA | Nº GENBANK /REFERÈNCIA |
|--------------------------------------|---|------------------|---------------------------------|--------------------|---|------------------------|
| CITMF CITMR | TGGCCAGAACTGACAGGCAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC | 60 | 478-498 919-939 | 462 | Regió intragènica de <i>bla</i> _{CMY-2} i <i>bla</i> _{CMY-2-tipus} | X78117/(205) |
| CMY-2 ATG CMY-2 MIG CMY-2 STOP | ATGATGAAAAAATCGTTATGC GACGTTAGGGATAAAGCCGC TTGCAGCTTTTCAAGAATGCCG | 55 | 142-162 571-590 1263-1284 | 1143 | Amplificació de <i>bla</i> _{CMY-2} i <i>bla</i> _{CMY-2-tipus} | X78117 |
| DHAMF DHAMR | AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT CCGTACGCATACTGGCTTTGC | 60 | 1244-1265 1628-1648 | 405 | Regió intragènica de <i>bla</i> _{DHA-1} i <i>bla</i> _{DHA-1-tipus} | Y16410/(205) |
| DHA-1A DHA-1B | CTGATGAAAAAATCGTTATC ATTCCAGTGCCTCCAAAATA | 55 | 41-61 1161-1181 | 1141 | Amplificació del gens <i>bla</i> _{DHA-1} i <i>bla</i> _{DHA-1-tipus} | AY887126 |
| ACCMF ACCMR | AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA TTCGCCGCAATCATCCCTAGC | 60 | 861-881 1186-1206 | 346 | Amplificació del gens <i>bla</i> _{ACC-1} i <i>bla</i> _{ACC-1-tipus} | AJ133121/(205) |
| ACC up ACC dn | TGCGTAAAAAAATGCAGAA CTACTTATTCCCTTCCA | 50 | 47-65 1078-1094 | 1048 | Regió intragènica de <i>bla</i> _{ACC-1} i <i>bla</i> _{ACC-1-tipus} | AJ133121 |
| FOXMF FOXMR | AACATGGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG | 60 | 1475-1496 1644-1664 | 190 | Regió intragènica de <i>bla</i> _{FOX-1} i <i>bla</i> _{FOX-1-tipus} | X77455/(205) |
| MOXMF MOXMR | GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT CACATTGACATAGGTGTGGTGC | 60 | 358-378 856-877 | 520 | Regió intragènica de <i>bla</i> _{MOX-1} i <i>bla</i> _{MOX-1-tipus} | D13304/(205) |
| EBCMF EBCMR | TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT | 60 | 1115-1135 1396-1416 | 302 | Regió intragènica de <i>bla</i> _{EBC-1} i <i>bla</i> _{EBC-1-tipus} | M377839/(205) |

* T^a: Temperatura d'hibridació utilitzada per cadascuna de les PCR.

| PCR MÚLTIPLES | | |
|---------------|---------------------|---------|
| CICLES (n) | T ^a (°C) | TEMPS |
| 1 | 94 | 3 min. |
| 25 | 94 | 30 seg. |
| | 60 | 30 seg. |
| | 72 | 1 min. |
| 1 | 72 | 7 min. |
| 1 | 4 | ∞ |

| PCR SIMPLES | | |
|-------------|---------------------|--------|
| CICLES (n) | T ^a (°C) | TEMPS |
| 1 | 95 | 5 min. |
| 30 | 95 | 1 min. |
| | 50/55 | 1 min. |
| | 72 | 1 min. |
| 1 | 72 | 7 min. |
| 1 | 4 | ∞ |

Taula 18. Iniciadors i condicions utilitzades per a l'amplificació i seqüenciació de les diferents BLEA.

| PARELLA INICIADORS | SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA DELS INICIADORS (5' to 3') | T ^a * | POSICIÓ DELS INICIADORS | MIDA ESPERADA (bp) | DIANA | Nº GENBANK /REFERÈNCIA |
|--------------------|--|------------------|-------------------------|--------------------|--|------------------------|
| P4 P3 | AAAGAATTCTAAATACATTCAAATATG AGTGTCGACTTACCAATGCTTAATCAG | 55 | 60-80 906-933 | 874 | Amplificació de <i>bla</i> _{TEM} -tipus | AB103506 |
| SHVA SHVB | CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA | 55 | 128-163 1120-1143 | 1016 | Amplificació de <i>bla</i> _{SHV} -tipus | AF124984 |
| CTX-A CTX-B | CTTTACCCAGCGTCAGA GCGATGTGCAGTACCAGTAA | 55 | 585-601 208-227 | 359 | Amplificació de <i>bla</i> _{CTX} -tipus | X92506 |
| IATG ISTOP | GTGACAAAGAGAGTGCAACGG ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC | 55 | 4-24 840-860 | 857 | Amplificació de <i>bla</i> _{CTX-M-9} -tipus | AF174129 |
| M1 up M1 dn | AAGGCGTTTTGACAGACTAT CCGTTTCCGCTATTACAA | 55 | 53-63 931-951 | 899 | Amplificació de <i>bla</i> _{CTX-M-1} -tipus | X92506 |
| M3 up M3 dn | ATGGTTAAAAAATCACTGCG CTATTACAAACCGTCGGTG | 55 | 1-21 861-879 | 879 | Amplificació de <i>bla</i> _{CTX-M-3} -tipus | Y10278 |
| M5 up M5 dn | TAGGTGGTAATGGAGGAT G TTCAGGAGCACATTTTTAA | 55 | 32-50 934-954 | 923 | Amplificació de <i>bla</i> _{CTX-M-5} -tipus | AF286192 |
| M2 up M2 dn | GATCCATCACAGAGTCGTCTCT GGCAGCTCATA CAGGTA ACTCT | 55 | 2295-2316 4167-4188 | 1894 | Amplificació de <i>bla</i> _{CTX-M-2} -tipus | AY079169/(12) |
| OXA 1/4 OXB 1/4 | CAGCAGCGCCAGTGCATC TCCTGTAAGTGCGGACAC | 58 | 389-406 1065-1082 | 694 | Amplificació de <i>bla</i> _{OXA-1} -tipus | HQ170517 |
| OXA 2/3 OXA 2/3 | GCCAAAGGCACGATAGTTGT GCGTCCGAGTTGACTGCCGG | 58 | 118-137 799-818 | 701 | Amplificació de <i>bla</i> _{OXA-2} -tipus | HM131431 |

* **T^a**: Temperatura d'hibridació utilitzada per cadascuna de les PCR. Les condicions de PCR utilitzades són les mateixes que les detallades per a les PCR simples de la taula 17, amb la salvetat de la PCR de M2, on s'allarga el temps d'extensió de 7 minuts a 10.

Taula 19. Iniciadors i condicions utilitzades per a l'amplificació i seqüenciació de Qnr.

| PARELLA INICIADORS | SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA DELS INICIADORS (5' to 3') | T ^a * | MIDA ESPERADA (bp) | DIANA | Nº GENBANK/REFERÈNCIA |
|--------------------|---|------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------|
| QnrA up QnrA dn | ATTTCACGCCAGGATTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA | 53 | 516 | Detecció <i>qnrA</i> -tipus | HQ675013/(222) |
| QnrB up QnrB dn | GATCGTGAAAGCCAGAAAGG ACGATGCCTGGTAGTTGTCC | 53 | 469 | Detecció <i>qnrB</i> -tipus | DQ303921/(222) |
| QnrS up QnrS dn | ACGACATTCGTCAACTGCAA TAAATTGGCACCCTGTAGGC | 53 | 417 | Detecció <i>qnrS</i> -tipus | GQ438249/(222) |

* **T^a**: Temperatura d'hibridació utilitzada per cadascuna de les PCR. Les condicions de PCR utilitzades foren un cicle de 94°C durant 3', 32 cicles de 94°C durant 45", 53°C durant 45", 72°C durant 1' i un cicle final a 4°C indefinidament.

3.2.3.3. Separació i visualització dels fragments de DNA

La separació dels amplificats obtinguts per PCR es va realitzar mitjançant electroforesi de corrent continua o convencional amb gels d'agarosa, tenyits amb bromur d'etidi i visualitzats amb llum ultraviolada. Aquesta tècnica es basa en la migració del DNA carregat negativament cap a un pol positiu dins d'un camp elèctric uniforme i constant. Permet separar fragments de DNA amb una mida entre 10 pb i 50 kb, que migren en el gel en funció del seu pes molecular. El bromur d'etidi s'intercala entre els fragments de DNA permetent la visualització d'aquests fragments quan s'irradia amb una font de llum ultraviolada.

Procediment

1. Preparació dels gels d'agarosa a una concentració entre el 0,8 i el 2% en funció de la mida dels fragments a separar.
2. Mesclar 10 µl de l'amplificat amb 2 µl de tampó de càrrega.
3. Carregar les mostres i el marcador de pes molecular VIII (Roche).
4. Córrer el gel d'agarosa en tampó TBE 0,5X (0,045 M Tris-Borat; 1 mM EDTA) a 90V aproximadament durant 1h.
5. Visualitzar el gel situant-lo sobre el transil·luminador de llum ultraviolada.
6. Fotografiar els resultats amb un digitalitzador d'imatges.

3.2.3.4. Purificació del DNA i seqüenciació

La purificació dels fragments de DNA obtinguts per PCR es va realitzar mitjançant el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR clean-up System de Promega, seguint les recomanacions realitzades pel fabricant (http://www.google.es/search?source=ig&hl=ca&rlz=1G1ACAW_ESUK383&q=manual+wizard+SV+Gel+and+PCR+clean-up+system&aq=f&aqi=&aql=&oq=).

Aquest sistema està basat en l'habilitat del DNA d'unir-se a membranes de sílice en presència d'altres concentracions de sals, permetent l'eliminació de restes d'iniciadors i nucleòtids presents en l'amplificat de DNA. Els purificats foren enviats a seqüenciar a l'empresa Macrogen.

3.2.3.5. Anàlisi dels resultats

Les seqüències obtingudes foren analitzades i editades mitjançant el software Vector NTI Advance (versió 9.0) d'Invitrogen i posteriorment comparades amb les disponibles en les bases de dades del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) i del EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), utilitzant les eines BLASTN o BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

3.2.4. RELACIÓ EPIDEMIOLÒGICA DE LES SOQUES (Annex III)

La relació clonal de les soques es va realitzar mitjançant dues tècniques de *fingerprinting*: l'ERIC-PCR per al *screening* inicial de les soques d'*E. coli* i el camp polsat (PFGE) per a la resta d'enterobacteris. En aquelles soques d'*E. coli* amb patrons d'ERIC-PCR amb homologies superiors o iguals al 80% es va realitzar el PFGE ja que és considerada com la tècnica estàndard de

tipificació per a aquest tipus d'anàlisis. Ambdues tècniques ens permeten obtenir un patró de bandes comparables entre si, la interpretació del qual ens determinarà la relació de similitud entre les diferents soques estudiades.

3.2.4.1. ERIC-PCR

Es tracta d'una tècnica basada en la detecció per PCR, mitjançant l'ús d'iniciadors específics, d'unes seqüències repetitives conservades presents en enterobacteris anomenades *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) (262).

Procediment

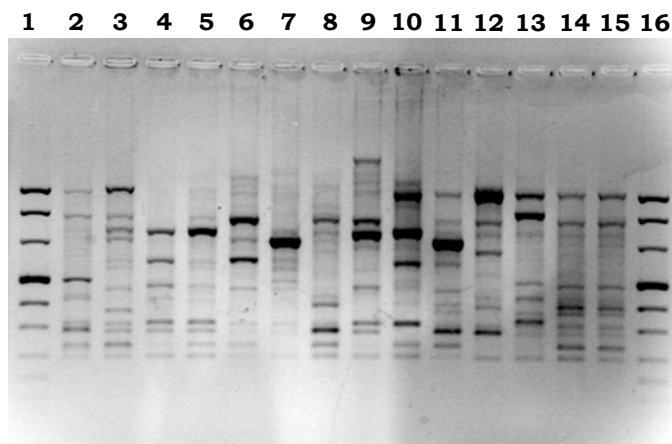
1. Es preparen les mostres per la tècnica convencional d'extracció per calor o mitjançant el kit comercial, quan el patró de bandes obtingut no és de qualitat, detallades anteriorment a l'apartat 3.2.3.1.
2. Es prepara l'iniciador ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') a una concentració de 10 µM.
3. Es prepara la *master-mix* seguint les proporcions indicades en la taula 20 per a cada mostra. S'utilitzarà l'AmpliTaq DNA polimerasa.
4. Es barrejaran 21 µl de *master-mix* amb 4 µl de mostra, obtenint un V_F de 25 µl.
5. Es ficaran les mostres al termociclador programant les condicions de PCR detallades en la taula 20.
6. Es separaran i visualitzaran els fragments de DNA per electroforesi convencional en gel d'agarosa tenyit amb bromur d'etidi tal i com es detalla en l'apartat 3.2.3.3.
7. Anàlisi dels resultats es realitza mitjançant el software d'anàlisi d'imatges FingerPrinting II Informatix (versió 3.0) BioRad.

Taula 20. Preparació de la *master-mix* (per mostra) i condicions de PCR.

| REACTIUS | VOLUM/MOSTRA ($V_F=25 \mu\text{l}$) |
|-------------------------|--|
| Iniciador ERIC-2 | 2 µl |
| dNTPs | 2,5 µl |
| Tampó 10X | 2,5 µl |
| MgCl₂ | 3 µl |
| Aigua estèril | 10,8 µl |
| AmpliTaq 5U/µl | 0,2 µl |

| ERIC-PCR | | |
|---------------|------------------------|--------|
| CICLES (n) | T ^a (°C) | TEMPS |
| 1 | 94 | 4 min. |
| 35 | 94 | 1 min. |
| | 40 | 1 min. |
| | 72 | 2 min. |
| 1 | 4 | |

Figura 27. Exemple dels resultats d'un gel d'ERIC-PCR.



Carrils 1 i 16: marcador de pes molecular MVIII (Roche);
Carrils 2 a 15: diferents soques d'*E. coli*; **Carrils 14 i 15:**
ambdues soques presenten el mateix patró d'ERIC-PCR.

3.2.4.2. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

És una tècnica que permet establir la relació epidemiològica entre aïllats d'una espècie bacteriana mitjançant macrorestricció de DNA cromosòmic i electroforesi en camp polsat (196, 233); és a dir, la digestió del DNA cromosòmic en fragments de gran mida i posterior separació d'aquests fragments utilitzant un gradient de corrent alterna que permet la resolució de molècules d'alt pes molecular (>20 kb). Els canvis de direcció en el camp elèctric permeten la reorientació i migració selectiva de molècules segons el seu pes molecular, possibilitant la separació de molècules de fins a 10 Mb.

Per a aquest tipus d'anàlisi electroforètica es necessita: i) obtenir DNA el més intacte possible, evitant al màxim les ruptures mecàniques. Per això, s'han desenvolupat mètodes d'extracció de DNA en els quals el procés de lisi cel·lular es realitza en blocs d'agarosa (inserts). La matriu d'aquests blocs protegeix les molècules d'alt pes molecular i al mateix temps permet la difusió de detergents i proteases; ii) digerir el DNA total amb enzims de restricció de

baixa freqüència de tall que donen lloc a un nombre relativament petit de fragments de restricció d'alt pes molecular (entre 10 i 20 bandes).

Procediment:**Preparació dels inserts i lisi cel·lular**

1. Ressuspendre diverses colònies del microorganisme en 1 ml de tampó CSB (Tris 100 mM-EDTA 100 mM; pH=7,5).
2. Afegir 250 µl de la suspensió bacteriana a un eppendorf d'1,5 ml i afegir 1,5 µl de proteïnasa K (50 mg/ml).
3. Barrejar 250 µl de suspensió bacteriana amb 250 µl d'agarosa Incert (Lonza) al 2% [dissolta amb TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH=8)] fosa a 52-55°C evitant que es solidifiqui).
4. Dispensar 100 µl de mescla en cada bloc del motlle evitant la formació de bombolles.
5. Deixar solidificar els inserts a la nevera un mínim de 15'.
6. Dispensar, per a cada soca, 2ml de solució de lisis Clysiss B (Tris 50 mM, EDTA 50 mM i Sarkosyl 1%; pH=7,5) en un tub de vidre estèril de 5 ml o similar. Afegir 12 µl (50mg/ml) de proteïnasa K. Posar els inserts solidificats en la solució de lisis i incubar a 55°C durant 2h en agitació al bany maria.

Rentat dels inserts

7. Rentar cada insert amb 2 ml d'aigua bidestil·lada estèril durant 10' al bany maria a 55°C (repetir 2 cops).
8. Canviar l'aigua bidestil·lada per 2 ml de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH=8) i deixar-ho al bany maria durant 10' a 55' (repetir 3 cops).

Digestió enzimàtica de DNA total

La digestió enzimàtica de DNA, igual que la lisi cel·lular, té lloc en el mateix insert gràcies a la difusió de l'enzim a través de la matriu d'agarosa. L'elecció de l'enzim dependrà; i) del contingut en G+C del genoma de l'espècie bacteriana a estudiar; ii) de la seqüència diana de restricció i; iii) de la mida i nombre de fragments obtinguts.

9. Elecció de l'enzim de restricció (*Xba*I per a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* i *S. enterica*; *Nof*I per a *P. mirabilis*).
10. Tallar 1/3 de l'insert i dipositar-lo en un eppendorf amb 200 µl de *master-mix* seguint les proporcions indicades en la taula 21 per a cada mostra.

11. Incubar les digestions al bany maria sense agitació seguint les condicions indicades pel fabricant (Enzim *Xba*I i *Not*I: 18h a 37°C).
12. Guardar a la nevera durant 30' per a aturar la digestió abans de procedir a l'electroforesi en camp polsat.

Taula 21. Preparació *master-mix* (per mostra)

| REACTIUS | VOLUM/MOSTRA |
|---------------------------|--------------|
| Aigua estèril | 144 µl |
| Tampó de restricció | 20 µl |
| BSA (10 mg/ml) | 2 µl |
| 1/3 de l'insert | |
| Enzim de restricció (10U) | 3 µl |

Separació i visualització dels fragments de DNA

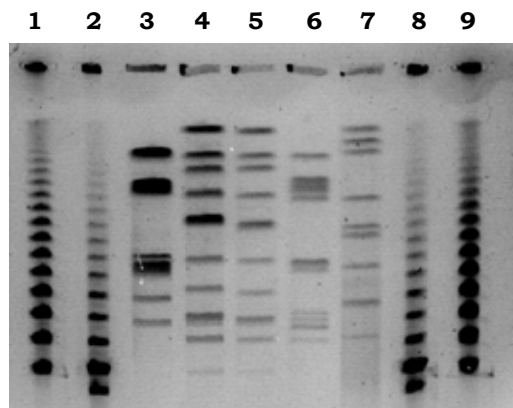
13. Preparació del gel d'agarosa a l'1% dissolent-la amb TBE 0,5X. S'utilitza una agarosa especial (Seakem®; Iberlabo) que permet la separació òptima de fragments de DNA de gran mida per camp polsat.
14. Preparar 2,3 l de TBE 0,5X com a tampó de la cubeta d'electroforesi i refredar el CHEF-DRIII (BioRad) a 14°C.
15. Carregar els inserts digerits en els pouets amb molta cura evitant la seva ruptura i la formació de bombolles.
16. Carregar els marcadors de pes molecular seleccionats: *λ-ladder PFGE* (48,5 a 1018,5 kb) i *Low Range PFG marker* (0,13 a 194 kb).
17. Segellar els pouets amb agarosa a 56°C.
18. Carregar el gel a l'aparell CHEF-DRIII aplicant un voltatge de 6V/cm, a una T^a de 14°C i un angle de 120°, utilitzant les condicions de correguda segons l'espècie bacteriana i l'enzim utilitzat: *E. coli* (un bloc 5-25s durant 8h seguit d'una rampa de 30-70s durant 16h); *K. pneumoniae* (un bloc 10-25s durant 6h seguit d'una rampa de 25-45s durant 18h); *K. oxytoca* (un únic bloc de 5-30s durant 20h); *S. enterica* (un bloc 5-25s durant 16h seguit d'una rampa de 30-70s durant 8h) i *P. mirabilis* (un bloc 1-30s durant 8h seguida d'una rampa de 30-70s durant 16h).
19. Tinció del gel amb una solució de bromur d'etidi (0,4 µg/ml) durant un dia a 4°C.
20. Col·locar el gel al transil·luminador i fotografiar-lo.

Anàlisi dels resultats

Aquesta tècnica s'aplica per a comparar la similitud genètica entre una sèrie d'aïllats comparant els patrons de bandes entre els diferents aïllats seguint el criteri definit per Tenover *et al.* (248) on: si les soques tenen patrons idèntics pertanyen a un brot; si les diferències són de fins a 3 bandes, els aïllats probablement formen part d'un brot; si

hi ha entre 4 i 6 bandes de diferència possiblement formen part d'un brot; i a partir de 7 bandes de diferència es consideren aïllats diferents. La comparació dels patrons va ser visual si el nombre de soques a comparar era petit o mitjançant el software d'anàlisi d'imatges FingerPrinting II Informatix (versió 3.0) de BioRad, quan el nombre de soques a comparar era superior a 20.

Figura 28. Exemple dels resultats d'un gel de PFGE.



Carrils 1 i 9: marcador de pes molecular λ -ladder PFGE
Carrils 2 i 8: marcador Low Range PFGE; **Carrils 3 a 7:** diferents soques de *K. oxytoca*; **Carrils 4 i 5:** dues soques de *K. oxytoca* amb patrons de PFGE idèntics.

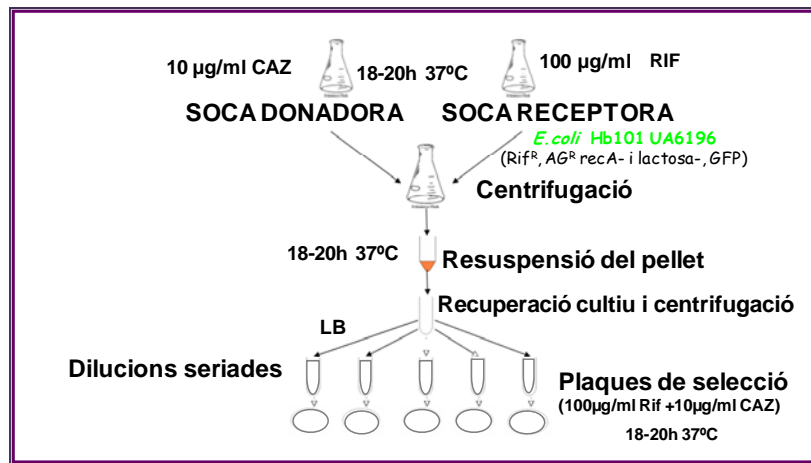
3.2.5. TRANSFERIBILITAT DELS GENS DE RESISTÈNCIA (Annexos II, IV i V)

L'estudi de transferència dels gens *bla* i *qnr* en les soques de la present col·lecció es va realitzar mitjançant conjugació en medi líquid a 37°C, utilitzant com a soca receptora l'*E. coli* HB101 modificada (UA6190). Aquesta soca es caracteritza per ser una soca *recA* negativa i lactosa negativa i que presenta com a marcadors de selecció gens de resistència a rifampicina i a diferents aminoglucòsids com estreptomycin, gentamicina, kanamicina, tobramicina i neomicina. La particularitat d'aquesta soca és la presència d'un marcador de fluorescència expressat de forma estable i constitutiva (la proteïna GFP o *green*

fluorescence protein). La introducció del marcador de fluorescència es va dur a terme mitjançant un mini-transposó suïcida localitzat en un plasmidi pAG408 integrat al cromosoma. Aquesta estructura conté dos gens de resistència a aminoglucòsids, el gen 3' fosfotransferasa [APH (3')-III], que confereix resistència a kanamicina i neomicina, i un altre gen de resistència a aminoglucòsids (Gm^R) que confereix resistència a gentamicina entre altres (242).

Procediment:

1. Cultiu *overnight* de la soca donadora i receptora a 37°C, en agitació, en 10 ml de medi Luria-Bertani (LB) estèril amb antibiòtics de selecció (donadores: 10 µl d'una solució mare de 100 mg/ml de ceftazidima; receptora: 10 µl de 100 mg/ml de rifampicina).
2. Creixement exponencial de les soca donadora i receptora durant 3h a 37°C, en agitació, en 2 ml de medi LB estèril fresc sense antibiòtic.
3. Mescla de la soca donadora i receptora en una proporció 1:1 en 2 ml d' LB estèril fresc i incubació *overnight* a 37°C.
4. Centrifugació del cultiu i preparació d'un banc de dilucions seriades tant per als transconjugants com per a la receptora (per a poder calcular posteriorment la freqüència de conjugació).
5. Sembrar les dilucions seriades en plaques d'LB agar suplementades amb els antibiòtics de selecció. Per a seleccionar els transconjugants s'utilitzaren plaques amb 100 µg/ml de RIF + 10µg/ml de CAZ, mentre que per a seleccionar la receptora s'utilitzaren plaques amb 100 µg/ml de RIF.
6. La comprovació de les colònies transconjugants es va realitzar afegint colònies aïllades de les plaques de selecció i ressemblant-les en plaques d'agar McConkey, en el cas que les donadores foren soques d'*E. coli*, o en medi CPS per a la resta d'enterobacteris de l'estudi i exposant-les a llum UV. Es col·locaren també discs d'ampicil·lina i cefoxitina. Posteriorment es va realitzar l'antibiograma del transconjugant per a comprovar que realment s'havia transferit la resistència d'estudi en qüestió.
7. La freqüència d'autotransferència es va expressar en relació al nombre de cèl·lules receptores.

Figura 29. Esquema del mètode de conjugació en medi líquid.

3.2.6. ESTUDI DELS ELEMENTS GENÈTICS MÒBILS (Annexos II, IV, V i VI)

3.2.6.1. Anàlisi plasmídica

L'anàlisi plasmídica es va dur a terme mitjançant i) caracterització del grups d'incompatibilitat (Inc); ii) caracterització de la regió MOB; iii) extracció plasmídica mitjançant el mètode de Barton; iv) *Southern blot*; i v) hibridació del DNA plasmídica amb sondes intragèniques per als gens *bla* i *qnr* i per al grup d'Inc/MOB específics.

▪ Caracterització dels grups Inc

Els grups Inc dels plasmidis portadors dels gens *bla* i *qnr* es varen determinar mitjançant la tècnica de PCR descrita per Carattoli *et al.* (53) anomenada PBRT, on s'inclouen 18 parells d'iniciadors per a la identificació específica dels replicons més representatius en enterobacteris. Aquests grups Inc corresponen als descrits inicialment per Couturier *et al.* (64). Aquesta tècnica de PCR està basada en un esquema que inclou cinc PCR múltiples per a l'amplificació de 3 replicons cadascuna (**M1**: HI1, HI2, I1/I7; **M2**: X, L/M, N;

M3: FIA, FIB, W; **M4:** Y, P, FIC i **M5:** A/C, T, FII; i tres PCR simples per a l'amplificació dels grups K, B/O i F). La identificació dels grups Inc ColE, U i R també es va determinar mitjançant PBRT utilitzant els iniciadors descrits per García-Fernández *et al.* (98).

Procediment:

1. Extracció del DNA per calor exceptuant aquells casos on els resultats de la PCR eren dubtosos, i realització de la PCR, separació dels amplificats obtinguts i visualització d'aquests fragments tal i com es detalla als apartats 3.2.3.1, 3.2.3.2 i 3.2.3.3.
2. Les condicions utilitzades per a la preparació de la *master-mix* estan detallades a la Taula 22. El V_F serà de 25 μl , barrejant 23 μl de *master-mix* amb 2 μl de mostra.
3. Les condicions utilitzades per a totes les amplificacions excepte a la corresponent per al replicó F foren: 1 cicle de 5' a 94°C, 30 cicles de desnaturalització a 94°C durant 1', hibridació a 60°C durant 30" i extensió a 72°C durant 1', seguits d'un pas final de 5' a 72°C. Les condicions utilitzades per a l'amplificació del grup F foren anàlogues a les anteriors utilitzant una temperatura d'hibridació de 52°C.

Taula 22. Preparació de la *master-mix* per a les PCR múltiples i simples (per mostra).

| PCR MÚLTIPLES | | PCR SIMPLS | |
|----------------|--|----------------|--|
| REACTIUS | VOLUM/MOSTRA ($V_F=25 \mu\text{l}$) | REACTIUS | VOLUM/MOSTRA ($V_F=25 \mu\text{l}$) |
| Mix iniciadors | 2,5 μl | Iniciador A | 2,5 μl |
| dNTPs | 2,5 μl | Iniciador B | 2,5 μl |
| Tampó | 2,5 μl | dNTPs | 2,5 μl |
| Aigua estèril | 15,2 μl | Tampó | 2,5 μl |
| Taq polimerasa | 0,3 μl | Aigua estèril | 12,7 μl |
| | | Taq polimerasa | 0,3 μl |

▪ **Caracterització de la regió MOB**

La caracterització plasmídica també es va dur a terme mitjançant la tipificació de la regió *mob* per PCR (5). Aquesta metodologia utilitza les similituds de les seqüències aminoacídiques i les propietats de les relaxases classificant els plasmidis en 6 famílies: MOB_F, MOB_H, MOB_O, MOB_C, MOB_P i MOB_V (100).

Es varen realitzar 19 PCR englobant diferents subfamílies de relaxases dels principals plasmidis presents en γ -proteobacteris i diferents MGE (Taula 23). Els iniciadors i les condicions de PCR utilitzades estan detallades en la Taula 24.

Taula 23. Subfamílies de relaxases analitzades i la diversitat inclosa en aquestes.

| FAMÍLIES RELAXASES | SUBFAMÍLIES DE RELAXASES | DIVERSITAT QUE INCLOUEN |
|------------------------|--------------------------|--|
| MOB_F | MOB_{F11} | Engloba dues branques de relaxases ben definides, incloent els prototips R388 (IncW) i R46 (IncN) d'enterobacteris i el prototip pWWO (IncP9) de <i>Pseudomonas</i> spp. |
| | MOB_{F12} | Diferencia l'ampli complex filogenètic F, incloent almenys 7 grups Inc |
| MOB_P | MOB_{P11} | Inclou el complex IncP, compost exclusivament de plasmidis conjugatius relacionats amb les relaxases dels prototips RP4 (IncP1 α) i R751 (IncP β) |
| | MOB_{P12} | Inclou el complex IncI (I α , K, B/O, Z) |
| | MOB_{P13} | Inclou relaxases de plasmidis del grup IncL/M |
| | MOB_{P14} | Inclou les relaxases dels plasmidis mobilitzables englobant plasmidis dels grups IncQ2, IncG i IncP6 |
| | MOB_{P3} | Inclou relaxases relacionades amb el complex IncX |
| | MOB_{P4} | Inclou relaxases relacionades amb plasmidis IncU |
| | MOB_{P51} | Inclou relaxases de plasmidis mobilitzables relacionades amb el prototip ColE1 |
| | MOB_{P52} | Inclou relaxases de plasmidis mobilitzables relacionades amb el prototip p9555 (portador de gens de resistència a tetraciclina) |
| | MOB_{P53} | Inclou relaxases de plasmidis mobilitzables relacionades amb el prototip pAsall1, procedent d' <i>Aeromonas salmonicida</i> |
| MOB_Q | MOB_{Q11} | Inclou relaxases de plasmidis mobilitzables d'ampli rang d'hostatger, relacionades amb el prototip RSF1010 (IncQ/IncP4) |
| | MOB_{Q12} | Inclou relaxases relacionades amb el prototip pP aïllat de <i>S. enterica</i> |
| | MOB_{Qu} | Inclou relaxases de plasmidis críptics d'enterobacteris relacionats amb el prototip pIGWZ12 |
| MOB_H | MOB_{H11} | Engloba les relaxases dels plasmidis conjugatius IncHI (ex. R27, pHCM1 i R48) |
| | MOB_{H12} | Inclou relaxases de plasmidis tipus IncA/C, IncJ (ICE de la família SXT/R391), IncT i IncP7 de <i>Pseudomonas</i> spp. |
| | MOB_{H2} | Constitueix per relaxases localitzades al cromosoma, formant part d'ICE i IG |
| MOB_C | MOB_{C11} | Inclou les relaxases dels plasmidis CloDF13 i pCK03 |
| | MOB_{C12} | Inclou MGE àmpliament disseminats en enterobacteris |

Taula 24. Iniciadors i condicions de PCR utilitzades per a la tipificació de la regió *mob*.

| INICIADORS | SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA INICIADORS (5'-3') ¹ | CONDICIONS DE PCR (T ^a) ² | PROTOTIP ³ | MIDA ⁴ | LOCALITZACIÓ |
|-------------------------------|---|--|-----------------------|-------------------|--------------|
| <i>F11_f</i> <i>F11_r</i> | GCAGCGTATTACTTCTCTGCTGCCGAYGAYTAYTA ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC | 25 cicles, 53°C | R388 | 172 | 13876-14047 |
| <i>F12_f</i> <i>F12_r</i> | AGCGACGGCAATTATTACACCGACAAGGAYAAYTAYTA ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC | 25 cicles, 55°C | F | 169 | 92744-92912 |
| <i>P11_f</i> <i>P11_r</i> | CGTGCGAAGGGCGACAARACBTAYCA AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC | 25 cicles, 60°C | RP4 | 124 | 50361-50484 |
| <i>P12_f</i> <i>P12_r</i> | GCACACTATGCAAAAGATGATACTGAYCCYGT AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC | 30 cicles, 53,8°C, 1,5U Taq per reacció | R64 | 124 | 67744-67867 |
| <i>P131_f</i> <i>P13_r</i> | AACCCACGCTGCAARGAYCCVGT AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC | 30 cicles, 59°C, 15" d'extensió per cicle | pCTX-M3 | 127 | 32365-32491 |
| <i>P14_f</i> <i>P14_r</i> | CGCAGCAAGGACACCATCAAYCAYTAYRT AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC | 25 cicles, 50°C | pRAS3.1 | 115 | 11053-11169 |
| <i>P3_f</i> <i>P3_r</i> | CCGTGAGCCAAATCACACAGAATATKRTBTT CGAAAGCCAACATGAACATGHGGATKHTC | 25 cicles, 50°C | R6K | 117 | 38419-39573 |
| <i>P4_f</i> <i>P4_r</i> | GCGTTCAGGATGGTCYBTCSATGCC CGGTTTTGACCGTCAGATGSVMATGCGG | 25 cicles, 64°C | pRA3 | 109 | 10695-10803 |
| <i>P51_f</i> <i>P51_r</i> | TACCACGCCCTATGCGAARAARTAYAC CCCTTGTCTGCTGGTGYTSNACCCA | 30 cicles, 58°C, 20" d'extensió per cicle | ColE1 | 177 | 572-688 |
| <i>P52_f</i> <i>P52_r</i> | GATAGCCTTGATTTTAATAACACCAAYACYTAYAC CCCTTGTCTGCTGGTGYTSNACCCA | 30 cicles, 58°C, 20" d'extensió per cicle | p9555 | 117 | 3536-3652 |
| <i>P53_f</i> <i>P53_r</i> | GGGCTCGCACGAYCAYACNGG GCCAGCCCTTTTCRTGRTTRTG | 30 cicles, 65°C | pAsa11 | 345 | 1136-1480 |
| <i>Q11_f</i> <i>Q11_r</i> | CAATCGTCCAAGGCGAARGCNGAYTA CGCTCGGAGATCATCAYTGYCAYTG | 30 cicles, 50°C | RSF1010 | 282 | 3325-3606 |
| <i>Q12_f</i> <i>Q12_r</i> | CTGGAATATACTGAACACGGNAAYATGCC ATCCTTGGTGTAGCACGTTTAAARWAYTG | 30 cicles, 52°C | pP | 282 | 975-1256 |

Continuació Taula 24

| INICIADORS | SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA INICIADORS (5'-3') ¹ | CONDICIONS DE PCR (T ^a) ² | PROTOTIP ³ | MIDA ⁴ | LOCALITZACIÓ |
|----------------|---|---|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Qu_f Qu_r | AGCGCCGTGCTGTCCGCBGCNTAYCG CTCCGCAGCCTCGRCSGCRTTCCA | 30 cicles, 64°C | pIGWZ12 | 129 | 2034-2162 |
| H11_f H11_r | CCGGCGTCGGAGAAAYCAYCAYCA AAGGTCGTATACCTTYCCKGCRTCRTG | PCR <i>Touchdown</i> : inici a 65°C ΔTa= -1°C per cicle, 15 cicles a 55°C | R27 | 157 | 106380- 106536 |
| H12_f H12_r | GCCAGCTTCCGAATCACAYCAYCAYCG GTCGCTTGTGCGCGCCACCGDATRAARTA | 25 cicles, 59°C | pSN254 | 268 | 46714-46981 |
| H2_f H2_r | AGTTCCCAGCCTCAGAAATCCAYCAYCAYKC GCGGACCGTGCCANGGRTGCCA | 25 cicles, 68°C | pKLC102 | 211 | 100218- 100428 |
| C11_f C11_r | GTCAGGTCAGCGTGTGGGGNCTNAC CTCTTCACGGTGCCCTCNACYTCRAA | PCR <i>Touchdown</i> : inici a 65°C ΔTa= -1°C per cicle, 20 cicles a 55°C | CloDF13 | 232 | 2874-3106 |
| C12_f C12_r | GCACGACTGGAAAAATATCGCTATGGGGNATHAC CAACGTGATAATCCCGTCRGGVCGRTG | 30 cicles, 59° | p29930 | 196 | 31594-31789 |

1: S'han utilitzat els símbols de degeneració universals (**S:** nucleòtids C/G; **Y:** nucleòtids C/T; **N:** nucleòtids A/C/G/T; **R:** nucleòtids A/G; **B:** nucleòtids C/G/T).

2: Temperatura d'hibridació utilitzada per a cadascuna de les PCR. Les condicions de PCR utilitzades són les mateixes que les detallades per a les PCR simples de la taula 17.

3: Plasmidis prototip utilitzats per a cada subfamília MOB.

4: Mida d'amplicó esperat en pb utilitzant com a model la relaxasa del plasmidi prototip. No s'ha considerat la mida de la seqüència dels iniciadors.

▪ Extracció plasmídica (S1-PFGE)

L'obtenció del nombre de plasmidis i la seva mida es va dur a terme mitjançant el mètode descrit per Barton *et al.* (18). Consisteix en l'anàlisi de DNA total per PFGE després de digerir amb l'endonucleasa S1, enzim que transforma el DNA plasmídic superenrotllat en DNA lineal, permetent que la seva migració en un gel de camp polsat sigui directament proporcional a la seva mida i comparable amb els marcadors de pes molecular utilitzats. Aquest mètode permet visualitzar plasmidis entre 30 kb a megaplasmidis de 609 kb.

Procediment:

1. La preparació i el rentat dels inserts es va realitzar de la mateixa forma que en l'apartat 3.2.1.2, amb la salvetat que per a realitzar l'extracció de DNA plasmídic s'utilitza una major quantitat de massa bacteriana que quan s'analitza DNA cromosòmic.
2. Abans de digerir amb l'enzim S1 es tallarà 1/3 de l'insert i es dipositarà en un eppendorf amb 1 ml de Tris 10 mM durant 15' (2 cops). S'utilitza aquest pas de rentat per a equilibrar el pH de l'insert.
3. Digerir el terç d'insert amb l'enzim S1. La preparació de la *master-mix* consisteix en l'addició de 200 µl de tampó S1 (acetat de sodi 30 mM; NaCl 50 mM i sulfat de Zn 5 mM) amb 0,24 µl d'una dilució 1/100 de l'enzim S1. Incubar la digestió al bany maria sense agitació a 37°C durant 45'.
4. Aturar la reacció amb 100 µl de tampó ES (EDTA 0,5M, SLS 1%; pH=9,5) i col·locar la digestió 30-45' en gel.
5. Separació i visualització dels plasmidis mitjançant electroforesi en camp polsat tal i com es detalla en l'apartat 3.2.1.2. Les condicions de correguda utilitzades són un primer bloc de 5-25s durant 6h seguit d'una rampa de 30-45s durant 18h.
6. La mida dels plasmidis es va calcular utilitzant el software d'anàlisi d'imatges FingerPrinting II Informatix (versió 3.0) de BioRad.

▪ Southern blot

Consisteix en la transferència dels fragments de DNA, separats electroforèticament, a una membrana de niló, on es quedaran accessibles a la sonda marcada en el procés d'hibridació. La transferència es facilitarà tractant el gel amb àcid clorhídric (HCl), fragmentant el DNA en porcions petites. Amb el tractament àcid es produeix una despurinització parcial en determinats punts, els quals, posteriorment, amb el tractament alcalí es trencaran donant lloc a fragments més petits (≈ 1 kb) que es transferiran amb molta més eficàcia.

Procediment:**Preparació del gel**

1. Banyar el gel durant 5' en aigua destil·lada en agitació per a eliminar les restes de bromur d'ètidi.
2. Eliminar l'aigua i col·locar el gel amb 500 ml de solució desnaturalitzant (HCl 0,25 M) durant 25' en agitació.
3. Passar el gel a la cubeta de rentat i cobrir-lo amb aigua destil·lada; rentar 5' en agitació.
4. Eliminar l'aigua i cobrir el gel amb la solució de desnaturalització (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) durant 30' en agitació.
5. Rentar el gel amb aigua destil·lada; rentar 5' en agitació.
6. Eliminar l'aigua i cobrir el gel amb la solució de neutralització (NaCl 1,5 M, TRIS/HCl 0,5 M; pH=7,5) durant 30' en agitació.

Preparació de la membrana

7. Tallar la membrana Hybond N+ i el paper Whatmann 3 MM de la mida del gel, afegint 1 cm per cada banda.
8. Humitejar el paper Whatmann amb SSC 2X [dilució 1/10 de la solució SSC 20X (citrat trisòdic 0,3M, NaCl 3 M; pH=7) i col·locar-lo sobre el suport porós de la unitat de transferència (BioRad).
9. Col·locar la membrana Hybond N+ també humitejada amb SSC 2X sobre el paper Whatmann.
10. Col·locar la finestra de plàstic sobre la membrana fent coincidir el forat on es dipositarà el gel, marcant els extrems de la finestra.

Transferència

11. Col·locar el gel de S1-PFGE sobre la membrana, segellar els laterals del gel amb agarosa dissolta per a assegurar que el buit es faça correctament i cobrir-lo amb tampó SSC 10X (dilució ½ de SSC 20X).
12. Connectar la bomba de buit a una pressió de 4 mmHg durant 3h.
12. Rentar la membrana amb SSC 2X durant 2'.
13. Fixar el DNA a la membrana secant la membrana al forn a 80°C durant 30'.

▪ Hibridació i revelat

Per a la hibridació i detecció s'utilitza el kit ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (Amersham), basat en el marcatge de la sonda amb peroxidasa i la detecció per quimioluminescència. Aquest marcatge s'aconsegueix desnaturalitzant completament la sonda i obtenint, per tant, cadenes senzilles de DNA carregades negativament. L'enzim peroxidasa acomplexat amb un polímer carregat positivament s'uneix al DNA per atracció de càrregues i, posteriorment, de forma covalent mitjançant glutaraldehyd. Aquesta sonda marcada, durant la hibridació, s'uneix específicament als fragments de DNA homòlegs fixats a la membrana. Durant el procés de revelat, la peroxidasa catalitza l'oxidació del luminol, que en presència d'un element químic intensificador, emet llum que es pot detectar a través d'una pel·lícula fotogràfica.

Procediment:**Pre-hibridació**

1. Col·locar la membrana en un tub d'hibridació, evitant la formació de bombolles, i rentar la membrana en agitació amb SSC 5X (dilució ¼ de la solució SSC 20X) durant 5' a 42°C.
2. Eliminar el tampó SSC 5X i afegir 15 ml de tampó d'hibridació, almenys 1h a 42°C en agitació.

Hibridació i rentats de la membrana

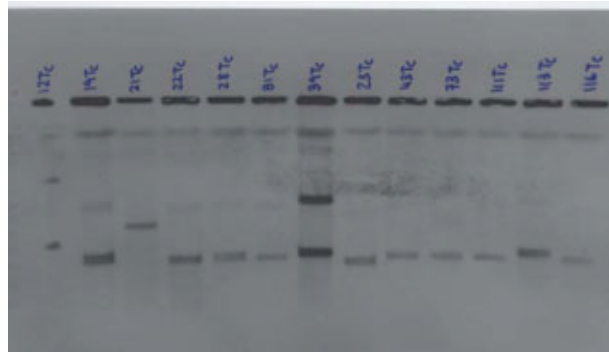
3. Afegir la sonda marcada i deixar-la tota la nit a 42°C en agitació.
4. Rentar la membrana amb SSC 5X durant 5' a 42°C.

5. Rentar la membrana amb solució de rentat I (SSC 0,5X + 0,4% SDS) durant 10' a 55°C.
6. Rentar la membrana amb solució de rentat I durant 5' a 55°C (2 cops).
7. Rentar la membrana amb solució de rentat I durant 10' a 42°C (2 cops).
8. Passar la membrana a una cubeta i cobrir-la amb solució de rentat II (SSC 2X) durant 5' a T^a ambient (2 cops).

Revelat (en obscuritat)

9. Barrejar 10 ml d'*ECL detection reagent 1* amb 10 ml d'*ECL detection reagent 2* en una habitació fosca.
10. Banyar la membrana amb aquesta mescla en una safata durant 1'.
11. Col·locar la membrana en un *cassette* i situar una transparència damunt d'ella que permeti el pas de la llum i impedeixi el contacte directe amb la pel·lícula fotogràfica.
12. El temps que deixarem la membrana a l'interior del *cassette* pot variar entre minuts i hores depenent de la concentració de la sonda i de la intensitat que busquem en el marcatge.
13. Revelar la radiografia amb la solució de revelat (fins a l'aparició de senyal), fixar la senyal amb la solució de fixació i rentar posteriorment amb aigua.

Figura 30. Exemple d'un gel de S1-PFGE hibridat amb *bla*_{CMY-2}.



3.2.6.2. Localització dels gens *bla* al cromosoma

La localització dels gens *bla* al cromosoma es va determinar per hibridació del DNA genòmic digerit amb l'enzim de restricció I-Ceu-I i posterior separació del fragments per PFGE amb sondes intragèniques per als gens *ampC* i el 16S rDNA específiques (157).

L'enzim I-Ceu-I reconeix seqüències de 26 pb de DNA presents als gens *rrl* (gens que codifiquen per a l'RNA ribosomal). Aquests gens *rrl* estan fortament conservats en nombre i en localització als genomes bacterians de forma que la digestió amb I-Ceu-1 divideix el cromosoma en pocs fragments que poden ser comparats entre soques o espècies bacterianes. La sonda de 16S rDNA hibrida exclusivament en fragments de cromosoma. Una hibridació positiva de DNA genòmic digerit amb I-Ceu-I amb la sonda problema però negativa amb la sonda 16S rDNA indica la localització plasmídica del gen. Una hibridació positiva de DNA genòmic digerit amb I-Ceu-I amb la sonda problema i amb la sonda 16S rDNA indica la localització cromosòmica del gen d'estudi.

Procediment:

1. El procediment a seguir és el mateix que el descrit per al PFGE (apartat 3.2.4.2). L'única diferència radica en l'enzim de restricció utilitzat, les condicions de digestió i el temps de correguda. Aquestes variacions estan detallades en la taula 25.
2. Transferir el gel per *Southern blot* i hibridar amb sondes específiques per al 16S DNA i els gens *ampC* detallats en l'apartat 3.2.6.1 (veure el subapartats referents a les tècniques de *Southern blot* i hibridació).

Taula 25. Condicions de la digestió amb I-Ceu-I i temps de correguda.

| CONDICIONS DIGESTIÓ (1/3 D'INSERT) | | CONDICIONS DE LA CARRERA | |
|------------------------------------|---|--------------------------|-------------|
| REACTIUS | VOLUM/1/3 d'insert ($V_r=200 \mu\text{l}$) | BLOCS | RAMPA/TEMPS |
| Aigua estèril | 176,4 μl | BLOC 1 | 20-120s/12h |
| Tampó 4 | 20 μl | BLOC 2 | 60-100s/12h |
| BSA (opcional) | 2 μl | | |
| Enzim I-Ceu-I | 1,6 μl | | |

Incubar la digestió 3h a 37°C

Refredar el CHEF-DRII a 14°C, programar un voltatge de 6V/cm i un angle de 120°.

3.2.6.3. Localització dels gens de *bla*_{CMY-2} en ICE de la família SXT/R391

La detecció d'ICE de la família SXT/R391 es va dur a terme explorant mitjançant PCR els gens *int* (que codifiquen per a la integrasa) i *TA* (que codifiquen per al sistema toxina/antitoxina), ambdós altament conservats en aquesta família. Els iniciadors i les condicions de PCR estan detallades en la taula 26. Es va realitzar l'anàlisi amb I-Ceu-I de les soques donadores, dels transconjugants obtinguts i de la soca receptora, digerint el DNA total amb l'enzim I-Ceu-I seguit de PFGE (veure apartat 3.2.6.2), hibridant posteriorment el gel amb les sondes de *bla*_{CMY-2}, *int* (integrasa) i *prfC* (lloc d'integració de l'ICE al DNA bacterià) (veure apartat 3.2.3.1).

3.2.6.4. Estudi dels entorns genètics dels gens *ampC*

L'estudi dels entorns genètics es va dur a terme mitjançant PCR solapades de les regions adjacents als gens *ampC* prèviament descrites a la literatura (83, 129, 139, 188, 204, 241, 260, 261, 271).

▪ Entorns genètics dels gens *ampC* vehiculats per plasmidis

Els entorns explorats per als gens *bla*_{CMY-2,-4,-25,-27} i ₋₄₀ foren l'*ISEcp1*, *blc* i *sugE*. Com que l'element *ISEcp1* s'ha descrit truncat tant en la posició 5' com en la 3', es varen utilitzar diferents iniciadors per explorar aquest element. Per a estudiar l'entorn de *bla*_{DHA-1}, les regions explorades foren l'*ISCR1* (*orf513*), *IS26*, *orf2* (regió homòloga al cromosoma de *M. morgani*), *ampR*, *qacEΔ1* i *sull*. Finalment, les regions explorades per a estudiar l'entorn de *bla*_{ACC-1} foren *IS26*, *ISEcp1* i *gdha*. Els iniciadors, les PCR solapades i la temperatura d'hibridació utilitzades per a l'amplificació d'aquestes regions estan descrites en la taula 27.

▪ Entorns genètics dels gens *bla*_{CMY-2} vehiculats per ICE

Es va explorar una regió de 16.460 pb mitjançant PCR solapades utilitzant com a model l'ICE*PmiJpan1* (116). S'analitzaren quatre fragments, cobrint la major part de la regió que va des de *rumA*, gen conservat de l'ICE, fins a la còpia dreta de l'*IS10* al final del transposó *Tn10*. Els gens explorats presents en aquesta regió foren *rumA*, *orf12*, *orf13*, Δ *orf14*, *IS10L*, Δ *ISEcp1*, *blc*, *sugE*, *ecnR*, *jpn01*, *dsbC*, Δ *traC* i *IS10R*. Els amplicons dels quatre fragments explorats obtinguts dels transconjugants foren enviats a seqüenciar. Els iniciadors i les condicions de PCR utilitzades estan descrites en la taula 27.

3.2.6.5. Estudi dels entorns genètics dels gens *qnr*

Per a estudiar l'entorn genètic dels gens *qnr* es va seleccionar al·leatòriament una de les soques portadores del gen *bla*_{DHA-1} i es va procedir a l'extracció mitjançant el kit comercial "QIAfilter Plasmid Purification Maxi kit" de Qiagen. L'extracció es realitzà seguint les recomanacions del fabricant (http://www.google.es/search?source=ig&hl=ca&rlz=1G1ACAW_ESUK383&q=QIAfilter+Plasmid+Purification+handbook&btnG=Cerca+amb+Google&aq=f&aq=i&aql=&oq=). El plasmidis purificats varen ser enviats a seqüenciar per la casa comercial Eurofins MWG Operon. L'anàlisi parcial i l'ensamblatge dels diferents fragments obtinguts es va dur a terme mitjançant el software Vector NTI (versió 9.0). La comparació amb altres seqüències prèviament dipositades en la base de dades de l'EMBL/NCBI es va dur a terme mitjançant el software Geneious Basic (Versió 5.1.7). La identificació dels ORF (*open reading frames*) i l'anotació de seqüències per al dipòsit en les bases de dades del NCBI es va dur a terme utilitzant el programa Sequin (versió 10.3).

Taula 26. Iniciadors i condicions de PCR utilitzades per a l'amplificació dels entorns genètics de *bla_{CMY-2}* en el context d'un ICE.

| PARELLA D'INICIADORS | SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA DELS INICIADORS (5' to 3') | T ^a * | POSICIÓ DELS INICIADORS | MIDA ESPERADA (bp) | DIANA | Nº GENBANK |
|--|---|------------------|--|--------------------|---|------------|
| SXTINT F SXTINT R | TCGATGATGGTCTCTAGCTG TCAGTTAGCTGGCTCGATGC | 55 | 2867-2886 4040-4059 | 1200 | Amplificació de la integrasa de la família SXT | GQ463143 |
| SXTTA F SXTTA R | GCGACGCCACATTAACGAAC CTG GTGATCGTAGTATCGAC | 55 | 52248-52267 53001-53020 | 772 | Amplificació del sistema TA de la família dels ICE SXT | GQ463142 |
| ECPRFC F ECPRFC R | GGTCTGGTGGAACTGAACGT TGACCGTTTCGCACGTTGAAG | 55 | 3902038-3902057 3902544-3902563 | 525 | Amplificació del gen <i>prfC</i> (lloc d'integració específic dels ICE SXT) | CP001637 |
| rumA 5'R IS10 3'F | GAATACGAAGGCGCTTGGCT GGAAGACTCACTCGTGGCTG | 55 | 8058-8077 10012-10031 | 1973 | Fragment 1: unió entre <i>rumA</i> i <i>Tn10L</i> | AB525688 |
| ORF12 F ORF13 F | TGCTCAGTCGAACTCAGTTC CTGCTCAGCGGATTGTGTCG | 55 | 8508-8527 9008-9027 | | Usats per a seqüenciar el fragment 1 | AB525688 |
| IS10 5'R CMY-2 5'R | GTAATGCGTGGCAAGCCAAC GCAGCAGAGCGCAGCATAAC | 55 | 11065-11084 12279-12298 | 1233 | Fragment 2: unió entre <i>Tn10L</i> i <i>bla_{CMY-2}</i> | AB525688 |
| ISEcp1 F | GAGTCATTATCAAATACGAGG | | 11316-11336 | | Usat per a seqüenciar el fragment 2 | AY581207 |
| ISEcp1 up (a) ISEcp1 low (b) | CAA AATGATCCCCTCGTC TCTTGCGTTTTGATTATT | 50 | 506-523 1465-1483 | 977 | Screening d'ISEcp1 | AY581207 |
| ISEcp1 up (a) CIT-MR (d) | CAAAATGATCCCCTCGTC TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC | 54 | 506-523 2650-2670 | 2164 | Unió entre ISEcp1 i <i>bla_{CMY-2}</i> | AY581207 |
| ISEcp1 3'F (c) CIT-MR (d) | AAAAATGATTGAAAGGTGGT TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC | 49 | 1645-1664 2650-2670 | 1025 | Unió entre 5'ΔISEcp1 i <i>bla_{CMY-2}</i> | AY581207 |
| CMY-2 5'F Jpn01 5'R | AAATCGTTATGCTGCGCTCT TGAGCAGCACCAGCGGTAAG | 55 | 12274-12293 15130-15149 | 2875 | Fragment 3: unió entre <i>bla_{CMY-2}</i> i <i>jpn01</i> | AB525688 |
| CMY-2 3'F blc F sugE 3'F ecn 5'R | CATCAACGGCAGCGACAGCA TTCGAGCGCGGATTGGATAA GCCTGATATGCTCCTGGATCG GCTGTCTGTCTGCTGATTGC | | 13173-13192 13660-13679 14339-14358 14865-14884 | | Usats per a seqüenciar el fragment 3 | AB525688 |
| Jpn01 3'F IS10 5'F | TCGAGTGAATATCAGCAAGG TTAACGTTGGCTTGCACGC | 55 | 20463-20482 24045-24059 | 3563 | Fragment 4: unió entre <i>jpn01</i> i <i>Tn10R</i> | AB525688 |
| dsbC F traC 5'F traC 3'F IS10 3'F | GACCTGTGGAGCAAGAAGCC TGCTCCGGATGGTCGTGTCA CCACACGACAGATCGCATAT GGAAGACTCACTCGTGGCTG | | 20927-20946 21352-21793 21774-21793 22982-23001 | | Usats per a seqüenciar el fragment 4 | AB525688 |

* **T^a**: Temperatura d'hibridació utilitzada per a cada PCR. La resta de condicions són idèntiques a les utilitzades en les PCR simples detallades en la taula 17, utilitzant 35 cicles en compte de 30.

Taula 27. Iniciadors i condicions de PCR utilitzades per a l'amplificació dels entorns genètics dels gens *ampC*.

| PARELLA D'INICIADORS | SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA DELS INICIADORS (5' to 3') | T ^a * | POSICIÓ DELS INICIADORS | MIDA ESPERADA (bp) | DIANA | Nº GENBANK |
|---------------------------------|---|------------------|----------------------------|--------------------|---|------------|
| ISEcp1 up (a) ISEcp1 low (b) | CAAAATGATCCCCTCGTC TCTTGCGGTTTTGATTATT | 50 | 506-523 1465-1483 | 977 | Screening d'ISEcp1 | AY581207 |
| ISEcp1 up (a) CIT-MR (d) | CAAAATGATCCCCTCGTC TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC | 54 | 506-523 2650-2670 | 2164 | Unió entre ISEcp1 i bla _{CMY-2} -tipus | AY581207 |
| ISEcp1 3' F (c) CIT-MR (d) | AAAAATGAT TGAAAGGTGGT TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC | 49 | 1645-1664 2650-2670 | 1025 | Unió entre 5' ΔISEcp1 i bla _{CMY-2} -tipus | AY581207 |
| cmy-2 mig SugE 3' F | GACGTTAGGGATAAAGCCGC GCCTGATATGTCCTGGATCGT | 58 | 2302-2321 3946-3966 | 1664 | Unió entre bla _{CMY-2} -tipus i sugE | AY581207 |
| Orf513 A Orf513 B | CGCCCACTCAAACAAACG GAGGCTTTGGTGTAACCG | 58 | 3605-3622 4056-4073 | 468 | Screening d'ISCR1 (<i>orf513</i>) | L06418 |
| Orf513 F DHA-MF | GATCCATCACAGAGTCGTCTCT AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT | 58 | 4311-4332 5604-5626 | 1315 | Unió entre ISCR1 i bla _{DHA-1} | AJ237702 |
| DHA-MR ampR 5' R | CCGTACGCATACTGGCTT TGT CATGGGTGACATTCAGCTCAAT | 58 | 12203-12224 13056-13077 | 874 | Unió bla _{DHA-1} i ampR | FJ943500 |
| ampR 3'F qacEA1 R | CGTGAGCGGGTGAAAGTCG CAAGCTTTTGCCCATGAAGC | 58 | 13251-13268 14330-14349 | 1098 | Unió entre ampR i qacEA1 | FJ943500 |
| IS26 up IS26 dw | GGCCACAGAATGAT GTCACG GGCCTTTGCGTAGTGCACG | 58 | 351-371 936-954 | 603 | Screening d'IS26 | FJ943500 |
| ampR 3'F IS26 up R | CGTGAGCGGGTGAAAGTCG GGCCACAGAATGATGTCACG | 58 | 7438-7456 10201-10221 | 2783 | Unió entre ampR i IS26 | AJ971345 |
| IS26 up R DHA-MF | GGCCACAGAATGATGTCACG AACTTTCACAGGTGT GCTGGGT | 58 | 996-1016 3629-3651 | 2655 | Unió entre bla _{DHA-1} i IS26 | AY705809 |
| Orf2 5' F DHA-MF | TAAAAGGTAAGCGGAGGATA AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT | 53 | 2538-2557 3629-3651 | 1113 | Unió entre <i>orf2</i> i bla _{DHA-1} | AY705809 |
| ACC-MR ISEcp1 up | TTCGCCGCAATCATCCCTAGC CAAAATGATCCCCTCGTC | 54 | 4944-4964 6617-6634 | 1690 | Unió entre ISEcp1 i bla _{ACC-1} | AY856832 |
| ACC-MR ISEcp1 3' F | TTCGCCGCAATCATCCCTAGC AAAAATGAT TGAAAGGTGGT | 49 | 4944-4964 5679-5698 | 754 | Unió entre 5' ΔISEcp1 i bla _{ACC-1} | AY856832 |
| gdha 3' F ACC-MF | GCTCGTATGGGCTGGAAAG AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA | 54 | 4098-4116 5269-5289 | 1191 | Unió entre <i>gdha</i> i bla _{ACC-1} | AY856832 |

*T^a: Temperatura d'hibridació (°C) utilitzada per a cada PCR. La resta de condicions són idèntiques a les utilitzades en les PCR simples detallades en la taula 17.

4. RESULTATS



