



Universitat Autònoma de Barcelona

**Estudi de les β -lactamases
plasmídiques d'espectre
ampliat, cefamicinases i
carbapenemases en diferents
ecosistemes. Anàlisi del seu
entorn genètic.**

**Raúl Jesús Mesa González
2007**

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

CERTIFIQUEN:

Que la present Tesi Doctoral que porta per títol “Estudi de les β -lactamases plasmídiques d'espectre ampliat, cefamicinases i carbapenemases en diferents ecosistemes. Anàlisi del seu entorn genètic” i que presenta En Raúl Jesús Mesa i González per optar al grau de Doctor en Biologia, ha estat elaborada sota la nostra direcció i compleix els requisits necessaris per a la seva tramitació i posterior defensa davant del tribunal corresponent.

Per tant, per tal que així consti, i per els efectes oportuns, firmem aquest certificat a Barcelona, 27 de febrer de 2007.



Dra. Beatriz Mirelis i Otero



Dra. Elisenda Miró i Cardona

“Nunca vayas por el camino trazado, porque conduce hacia donde otros han ido ya.” Alexander Graham Bell

Agraïments

En primer lloc voldria donar les gràcies al doctor Pere Coll, cap de la Unitat de Microbiologia del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, per confiar en mi des de la primera entrevista que vam tenir pel setembre del 2002, quan tot just començava a endinsar-me en aquesta investigació que toca a la fi amb aquesta tesi doctoral.

En segon lloc voldria agrair al responsable de la secció de recerca, el doctor Ferran Navarro, que va ser el primer en apropar-me cap al món de les betalactamases, antibiogrames, patrons de resistències, i de més conceptes que resultaven gairebé nous per a mi. També haig d'agrar-li la seva visió a l'hora de resoldre els problemes que han anat sorgint pel camí així com a l'hora de posar en comú quin havia d'ésser el següent pas.

Cal que agreixi amb molt énfasi la feina feta per les meves directores de Tesi. En primer lloc la doctora Beatriz Mirelis, amb la qual vaig passar el primer període d'investigació, la recollida de mostres, que va ser una feina molt més fàcil gràcies a ella, a l'hora de llegir els resultats dels antibiogrames i classificar els microorganismes. Quan ja estaven totes les mostres recollides va començar la feina molecular, i es a partir d'aquí on va començar la meua convivència amb la doctora Elisenda Miró. A la que haig d'agrar l'apropament cap a l'estudi microbiològic molecular de les resistències dels microorganismes, amb l'isoelectroenfoc, PCR i de més, però sobretot he d'agrar-li el fer molt més agradable la meua estada amb la seva manera de ser. No hem puc oblidar d'agrar les meves directores la feina de correcció d'aquesta tesi doctoral que ha estat àrdua però que per fi a donat els seus fruits.

He d'agrair també a totes les persones que han format part del projecte de col·laboració que engloba aquesta tesi doctoral, a la gent de la UB que va aconseguir les mostres d'aigües residuals, els del CRESA i UAB que van aconseguir les mostres de granges d'animals i la gent del Hospital Vall d'Hebron que a més de malalts i portadors fecals va aconseguir les mostres de brots i aliments.

Es torn d'agrair a tota la gent que treballa a la Unitat de Microbiologia i que d'una manera o un altre han format part d'aquesta tesi doctoral. Haig de fer una menció a part però de la gent que estava a la rotonda quan es va dur a terme la recollida de mostra, l'Alba Rivera i la Carmen Roig que van fer-me l'estada molt més divertida amb les converses sobre qualsevol tema que sorgís.

Un agraïment especial haig de fer als companys de la secció de recerca, amb els quals he passat uns moments memorables, sobretot a l'hora d'esmorzar quan començava també l'hora del debat, moltes gràcies Aurora, Montse Español, Montse Rebollo, Oscar, Paquita i Zoraida. Vull fer un agraïment especial a la Laura que més que una companya s'ha convertit en una amiga, vull agrair-li la seva dedicació a l'hora d'introduir-me en les tècniques moleculars, però sobretot vull agrair-li el ser com és, el suportar el meu humor, una mica negre, les converses mentre treballàvem i les que encara ens queden per fer.

Es torn de agrair a les persones més properes, els meus pares i els meus germans, que sempre m'han fet costat d'una manera o un altre i han fet possible que aquest llarg camí per fi arribi a bon port.

L'últim agraïment es per mi el més especial, haig d'agrair a la meva dóna, la Sílvia, el seu recolzament infatigable, tant en els bons com en els no tan bons moments que han hagut en aquest camí, la seva paciència infinita a l'hora d'escoltar els meus monòlegs sobre BLEA, resistència i de més termes que per a ella eren desconeguts, però sobretot he d'agrair-li el seu amor incondicional, perquè només amb això ja puc tirar endavant amb qualsevol cosa. Testimo Sílvia.

	Pàgina
1. Introducció	3
1.1 Família <i>Enterobacteriaceae</i>	5
1.1.1 Implicacions clíniques dels enterobacteris	7
1.2 Els Betalactàmics	10
1.2.1 Classificació i espectre d'acció	10
1.2.2 Mecanisme d'acció	16
1.2.3 Farmacocinètica i farmacodinàmica	18
1.3 Resistència antimicrobiana	19
1.3.1 Resistència natural i adquirida	19
1.3.2 Mecanismes de resistència als betalactàmics	20
1.4 Betalactamases	22
1.4.1 Classificació	22
1.4.2 Mecanisme d'acció	25
1.5 Betalactamases naturals d'espècie en enterobacteris	26
1.6 Betalactamases plasmídiques. Betalactamases d'espectre ampliat (BLEA)	28
1.6.1 Epidemiologia de les BLEA	31
1.7 Cefamicinases plasmídiques	34
1.8 Carbapenemases	36
1.9 Transmissió de la resistència	37
2. Cronologia	51
3. Resultats i Discussió	55
3.1 Estudi de prevalença i caracterització de les BLEA presents en soques aïllades de mostres clíniques i de portadors fecals a l'hospital de la Santa Creu i Sant Pau durant el període 2001-2002 (Article I)	57
3.2 Estudi de prevalença i caracterització de les BLEA, cefamicinases i carbapenemases presents en soques aïllades en diferents ecosistemes (Articles II i III)	63
3.2.1 Prevalença i caracterització de BLEA, cefamicinases plasmídiques i carbapenemases en mostres clíniques als Hospitals de Vall d'Hebron i de la Santa Creu i Sant Pau	63
3.2.2 Prevalença i caracterització de BLEA, cefamicinases plasmídiques i carbapenemases en portadors fecals	71
3.2.3 Prevalença de BLEA, cefamicinases plasmídiques i carbapenemases en portadors fecals afectats per un brot alimentari	78
3.2.4 Prevalença i caracterització de les betalactamases aïllades als aliments	80
3.2.5 Prevalença i caracterització de BLEA, cefamicinases plasmídiques i carbapenemases en granges d'animals	81
3.2.6 Prevalença i caracterització de BLEA, cefamicinases plasmídiques i carbapenemases en aigües residuals	85
3.2.7 Resum dels resultats de prevalença i caracterització de BLEA, cefamicinases plasmídiques i carbapenemases	88
3.2.8 Resistències associades	91
4. Conclusions	95
5. Bibliografia	99
6. Articles	121

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Família *Enterobacteriaceae*

Aquesta família està formada per nombroses espècies de bacils gramnegatius, heterogenis en el seu hàbitat i la seva capacitat patogènica però, que estan inclosos en ella per la seva similitud en els seus caràcters estructurals i fisiològics. Pel que fa a les característiques genotípiques, s'ha de dir que aquesta família té un contingut en el DNA de G+C d'entre el 39% i el 59%. El seu nom es deu a Rahn¹, que la va descriure al 1937.

Els enterobacteris es defineixen com bacils gramnegatius que tenen un tamany del voltant de 0,3 a 3 µm, aerobis i anaerobis facultatius, fermenten la glucosa i són oxidasa negativa; les espècies mòbils tenen flagels de localització períttrica. Els seus components estructurals; citoplasma, membrana cel·lular, genoma, ribosomes, paret amb la seva membrana externa i apèndix, com flagels i pilis, tenen les característiques típiques dels bacteris gramnegatius².

Els enterobacteris tenen una notable activitat metabòlica, donat que fan servir nombrosos substrats com a font energètica per via fermentativa i oxidativa i obtenen els àtoms orgànics (C, N, O, H) de compostos molt diversos i senzills. Per això aquests bacteris creixen en medis usuals en el laboratori.

L'estructura antigènica és important en la classificació immunològica o serològica³⁻⁵. L'antígen O es troba en el lipopolisacàrid situat a la membrana externa de la paret dels enterobacteris. En efecte, a la capa externa d'aquesta membrana pròpia del bacteris gramnegatiu, en comptes dels fosfolípids propis de les membranes biològiques, es troben lipopolisacàrids (LPS) (Figura 1). Aquests LPS tenen estructuralment tres zones, la més interna és el lípid A, a la zona mitja es troba un nombre limitat de sucres (5 a 7) i a l'externa una llarga cadena de sucres (un polisacàrid), que constitueix l'antígen O. La fracció lipídica (lípid A) és l'endotoxina

amb activitat tòxica intensa que pot resultar letal (xoc sèptic) en determinades infeccions. Els membres d'aquesta família tenen un antígen comú, denominat antígen de Kunin, situat a la paret, la seva localització precisa no es coneix. Els flagels de les soques mòbils estan formats per subunitats protèiques (flagel·lina), altament antigèniques, que constitueixen l'antígen H. Algunes espècies produeixen quantitats variables de polisacàrid capsular immunògen que constitueix, quan està present, l'antígen K. Les fimbries, també d'estructura protèica, en algunes soques són molt abundants i envolten, com una densa cabellera, a la cèl·lula; durant algun temps aquestes fimbries es van considerar com antígens K atípics per ser protèics.

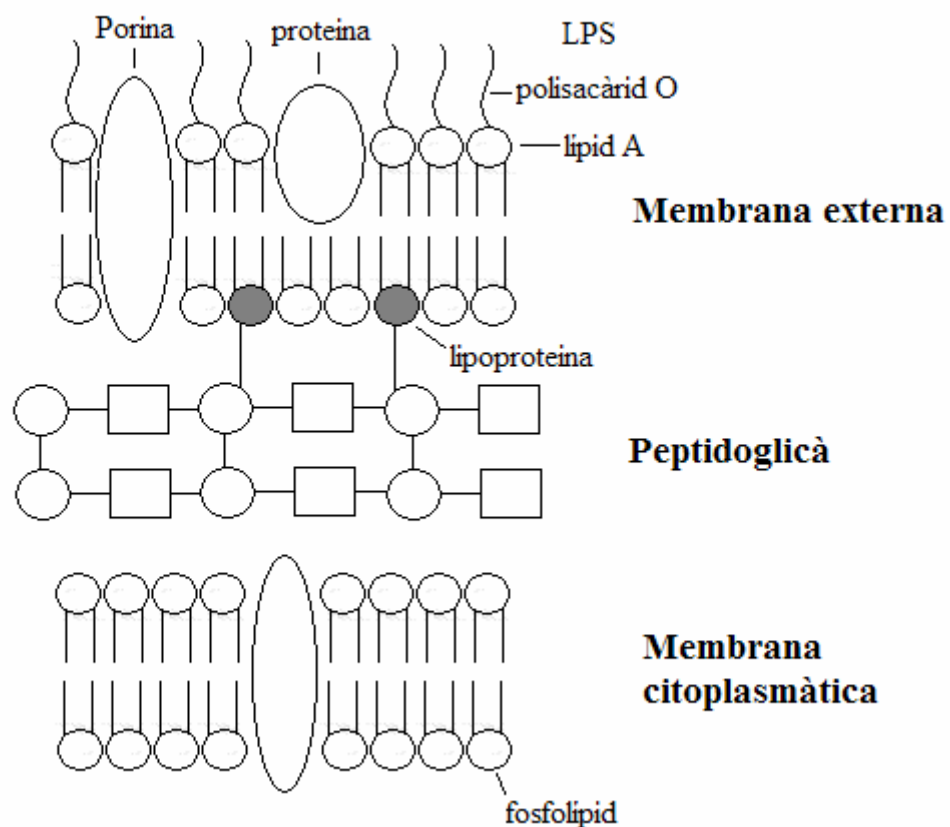


Figura 1: Paret cel·lular dels bacteris gramnegatius.

1.1.1 Implicacions clíniques dels enterobacteris

En l'actualitat la família *Enterobacteriaceae* es compon de 30 gèneres, que inclouen un total de més de 110 espècies, així com varis grups no nomenats. Els enterobacteris d'interès en medicina, inclouen totes aquelles espècies comensals que poden viure de mode estable o molt prolongat en el tub digestiu de l'home, en el que porten a terme funcions fisiològiques; no obstant, quan apareixen factors afavoridors poden causar infeccions oportunistes³⁻⁵. També són de gran interès, òbviament, les espècies patògenes primàries per a l'home³⁻⁵.

Entre les espècies comensals, que són potencialment oportunistes, es troben *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* i *Morganella morganii*, juntament amb d'altres menys freqüents⁴.

Entre els enterobacteris patògens es troben algunes soques d'*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, les quatre espècies del gènere *Shigella*, així com *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis*.

Encara que els enterobacteris tenen la sensibilitat característica dels bacteris gramnegatius, essent per tant sensibles a betalactàmics, aminoglicòsids, tetraciclins, cloramfenicol, colistina, sulfamides, trimetoprim i quinolones, existeixen resistències naturals d'un gènere o una espècie a alguns antibiòtics i altres adquirides per mutació o per recombinació genètica, seguides de selecció^{6,7}. El fet que els enterobacteris es trobin normalment en el tub digestiu humà fa que pateixin la pressió selectiva de qualsevol tractament antibiòtic, persistint les soques resistents que hagin pogut adquirir alguna resistència. Aquesta selecció de soques resistents també és molt important en els animals, on s'administra antimicrobians barrejats amb els aliments pel seu engreix. Aquestes soques resistents poden passar després a l'home. El tipus i freqüència de les

resistències adquirides en els enterobacteris varia d'un país a l'altre, d'una ciutat a l'altra, d'un hospital a altre, i inclus d'una sala d'hospitalització a una altra, com a conseqüència de la diferent recombinació i selecció.

Els enterobacteris oportunistes com *E. coli*, *Proteus*, *Morganella* i *Citrobacter*, entre d'altres, es troben normalment com comensals en el tub digestiu de l'home, formant part de la flora intestinal normal que inclou a més els enterococs i, sobre tot, una abundant i variada flora anaeròbia estricta que es quantitativa i qualitativament dominant. Les infeccions causades per aquests i altres enterobacteris es produeixen per l'aparició de factors patològics predisposants⁴. La localització i característiques d'aquestes infeccions depèn dels factors predisposants. Els factors predisposants locals, encara que variats, en general actuen facilitant la penetració microbiana pel trencament físic o fisiològic de les barreres i conductes cutaneomucosos. Els factors predisposants generals els constitueixen la disminució de les defenses globals inespecífiques, principalment la fagocitosi i la resposta immune de l'hoste.

Una característica d'aquestes infeccions és que no poden definir-se pel microorganisme, sinó fonamentalment pel factor que les facilita. El fet que sigui una o altra espècie bacteriana qui produeix una determinada infecció (urinària, de ferida quirúrgica o d'altres) depèn més de la seva abundància i proximitat a la porta d'entrada, que de factors patogènics propis del microorganisme dels que, per definició, manca. Per això aquestes infeccions són molt polimòrfiques⁴.

Les soques enteropatògenes d'*E. coli* poden dividir-se en sis patogrupos segons el mecanisme patogènic pel que produeixen la malaltia⁸⁻¹⁰. *E. coli* enteroinvasora, *E. coli* enterotoxigènica, *E. coli* enterohemorràgica, *E. coli* enteropatògena, *E. coli* enteroagregativa i *E. coli* amb adherència difusa. S'han relacionat alguns serogrupos d'*E. coli* amb cada un dels grups de patogenicitat assenyalats, encara que aquesta correlació

no és absoluta i en molts casos només algun serotip de cada serogrup té potencial patogen.

El gènere *Salmonella* està format per dues espècies, *S. enterica*, que es subdivideix en sis subespècies (I, II, IIIa, IIIb, IV i VI) i *S. bongori*. A les dues espècies s'inclouen múltiples serovarietats. La serotipificació del gènere *Salmonella* és realitza mitjançant la identificació dels antígens: somàtic O, flagel·lar H i capsular K. Els diferents serotips de *Salmonella* es poden diferenciar en tres grups segons si estan adaptats o no a mostres específiques. Els serotips adaptats a l'home, Typhi, Paratyphi A, B i C tenen un reservori exclusivament humà i produeixen les febres tifoides i paratífoides¹⁰⁻¹². Un gran nombre de serotips es troben al tub digestiu de nombrosos animals de sang calenta, que constitueix el seu reservori natural i per als que poden ser innòcues o causar patologia. Aquests serotips pertanyen a la subespècies I i són els responsables d'aproximadament el 99% de les infeccions per *Salmonella* en humans, els més freqüents són els serotips Enteritidis i Typhimurium. Existeix un tercer grup de serotips de les subespècies II, IIIa, IIIb, IV i VI que s'aïllen normalment d'animals de sang freda o de l'ambient i rarament es troben en humans i la seva capacitat patogènica prèviament nul·la.

El gènere *Shigella*, agent causal de la shigel·losi, està constituït per quatre subgrups que històricament han estat considerats espècies^{5,11}. El subgrup A correspon a l'espècie *S. dysenteriae*, que es troba en països menys desenvolupats i produeix les formes més severes de shigel·losi. Els altres subgrups, auctòctons del nostre país, són el subgrup B que correspon a *S. flexneri*, subgrup C a *S. boydii* i el subgrup D a *S. sonnei*. El reservori és estrictament humà i la via de transmissió és la feco-oral.

De les 10 espècies del gènere *Yersinia* només tres, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis*, són patògens per a l'ésser humà^{11,13}. Aquestes espècies

tenen el seu reservori en diferents animals; les dues primeres causen fonamentalment enteritis i adenitis mesentèrica, i *Y. pestis* causa, des del seu reservori en els rosegadors, la peste; les altres espècies són d'origen ambiental i no són patògenes. Les espècies de *Y. enterocolitica* es poden subdividir en biotips que es correlacionen amb la patogenicitat. Les soques enteropatògenes de *Y. enterocolitica* pertanyen a un número limitat de serogrupos que s'associen a diferents biotips. És interessant destacar que dels més de 60 serogrupos en que es divideix *Y. enterocolitica*, segons l'antigen somàtic O, només alguns com el O3, O8, O9, O5,27, entre d'altres, causen malaltia a l'home, generalment una enteritis produïda per mecanisme invasor.

1.2 Els betalactàmics

Els betalactàmics són un ampli grup d'antibacterians bactericides que tenen en comú en la seva estructura química, l'anomenat anell betalactàmic¹⁴⁻¹⁶; el qual els hi confereix les seves característiques més importants: el mecanisme d'acció i l'escassa toxicitat. Aquest grup d'antimicrobians inclou les penicil·lines, les cefalosporines, els monobactams, els carbapenems i els inhibidors de betalactamases. Són els antimicrobians més prescrits tant en atenció primària com en l'àmbit hospitalari.

1.2.1 Classificació i espectre d'acció.

Penicil·lines

Són agents betalactàmics derivats de l'àcid 6-aminopenicil·lànic. Estructuralment estan formades per la fusió de dos anells: l'anell betalactàmic, principal responsable de l'acció antibacteriana i altament làbil, substrat de les diverses betalactamases produïdes pels bacteris (principal mecanisme de resistència de la major part de bacteris enfront els

betalactàmics), i l'anell tiazolínic (Figura 2). Es poden distingir varis grups segons la seva activitat antibacteriana i el seu espectre d'acció⁶.

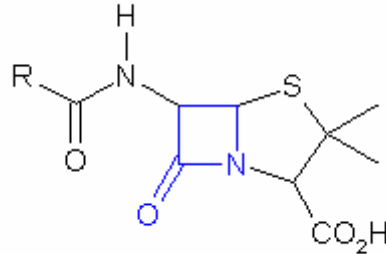


Figura 2: Estructura química de les penicil·lines.

Penicil·lines naturals. Inclouen la bencilpenicil·lina o penicil·lina G que s'utilitza de forma parenteral (penicil·lina G sòdica, penicil·lina procaina o penicil·lina benzatina) o oral (penicil·lina V). La penicil·lina G és molt activa enfront estreptococs betahemolítics (*Streptococcus pyogenes* y *S. agalactiae*), pneumococ, encara que a l'actualitat existeix un alt percentatge de soques resistents, meningococ, gonococ (excepte les soques productores de betalactamasa), bacil diftèric, *Pasteurella multocida*, *Actinomices israeli*, *Bacillus anthracis*, *Treponema pallidum* i bacteris anaerobis excepte els productors de betalactamases.

Aminopenicil·lines o aminobenzilpenicil·lines: Inclouen l'ampicil·lina o l'amoxicil·lina. Són actives davant la major part dels bacteris sensibles a penicil·lina i presenta a més una marcada activitat front enterococ, hemòfils, listèries i alguns enterobacteris incloent *E. coli*, *P. mirabilis*, salmonel·les i shigel·les. L'amoxicil·lina és un dels derivats sintètics de la ampicil·lina, amb el mateix espectre però amb millors característiques farmacocinètiques.

Carboxipenicil·lines: La carbenicil·lina i la ticarcil·lina. El seu espectre d'acció és similar al de les aminopenicil·lines però ampliat a *Pseudomonas aeruginosa* i alguns enterobacteris resistents a aminopenicil·lines.

Acilureidopenicil·lines: Essent la representant la piperacil·lina. El seu espectre d'acció és molt similar al de les carboxipenicil·lines, encara que presenten més activitat enfront bacteris anaerobis, incloent-hi el grup *Bacteroides fragilis*.

Penicil·lines semisintètiques resistents a penicil·linases. Són penicil·lines que resisteixen l'acció de les betalactamases estafilocòciques. Constitueixen encara un element important en el tractament de les infeccions produïdes per estafilococs. Entre elles destaquen la meticil·lina i les penicil·lines isoxazòliques: l'oxacil·lina i la cloxacil·lina. Són menys actives enfront els altres cocs grampositius.

Penicil·lines i inhibidors de les betalactamases. L'àcid clavulànic¹⁷ (Figura 3), el sulbactam i el tazobactam són agents betalactàmics sense acció antibacteriana franca però capaços d'inhibir l'acció enzimàtica d'algunes de les betalactamases. Aquests inhibidors s'utilitzen associats a una penicil·lina, d'aquesta manera el betalactàmic queda protegit de l'acció hidrolítica. Els més utilitzats en clínica són les combinacions amoxicil·lina-àcid clavulànic, ampicil·lina-sulbactam, ticarcil·lina-àcid clavulànic i piperacil·lina-tazobactam.

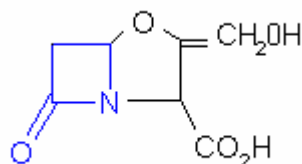


Figura 3: Estructura química de l'àcid clavulànic.

Cefalosporines

Contenen el nucli d'àcid 7-amino cefalosporànic^{6,14-16}, format per la fusió de dos anells, un betalactàmic i l'anell de dihidrotiazina que és intrínsecament més resistent a algunes betalactamases (Figura 4). Diferents substitucions en posició 3 i 7 modifiquen les propietats antibacterianes i farmacocinètiques. L'addició d'un grup metoxi a la posició 7 de l'anell betalactàmic dóna lloc a un nou grup de compostos anomenats cefamicines. Tradicionalment les cefalosporines s'han agrupat en generacions segons l'espectre d'activitat enfront els bacteris gramnegatius.

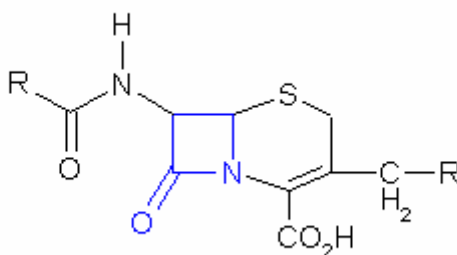


Figura 4: Estructura química de les cefalosporines.

Cefalosporines de 1^a generació: Tots els components d'aquesta generació tenen un espectre similar, però presenten diferències en relació als nivells d'activitat en front algun microorganisme i a la via d'administració. Són actives front cocs grampositius, incloent-hi els estafilococs productors de betalactamasa, estreptococs, excepte enterococ i bacils gramnegatius, com *E. coli*, *Klebsiella* i *Proteus*. Són cefalosporines de primera generació la cefalotina, cefazolina, cefalexina i cefadroxil entre d'altres.

Cefalosporines de 2^a generació: La segona generació de cefalosporines constitueix un grup heterogeni. Els components d'aquesta generació presenten espectres d'activitat variable, en general presenten una major activitat davant els bacils gramnegatius com *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis*, així com alguns enterobacteris per ésser resistents a l'acció de la majoria de betalactamases. En general l'activitat davant els bacteris grampositius és menor que la de les cefalosporines de primera generació. Pertanyen a aquesta generació la cefuroxima, cefamandol i cefonicid.

Cal destacar la gran activitat contra alguns bacteris anaerobis, de les cefamicines. Pertanyen a aquest grup la cefoxitina, el cefotetan i el cefmetazol.

Cefalosporines de 3^a generació: Presenten un ampli espectre d'activitat¹⁸, tenen una gran activitat enfront la majoria dels bacils gramnegatius (incloent-hi *Pseudomonas*, en alguns casos). Pertanyen a aquesta generació un número important de molècules: essent les més utilitzades en clínica cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima i cefixima.

Cefotaxima i ceftriaxona són actives front estreptococs incloent pneumococ, neissèries, hemòfils i enterobacteris. Ceftazidima presenta menor activitat front grampositius però per contra incrementa l'espectre dels gramnegatius com *Pseudomonas* i d'altres bacils gramnegatius no fermentadors. Són molt estables a la majoria de betalactamases dels bacteris gramnegatius.

Cefalosporines de 4^a generació: Els únics representants són cefepima i cefpiroma. Presenta una estructura similar a les cefalosporines de tercera generació, però les modificacions realitzades en el nucli li confereixen major estabilitat davant les betalactamases¹⁹.

Cefepima no és hidrolitzada per les betalactamases estafilocòciques ni per la majoria de les betalactamases cromosòmiques dels gramnegatius, donada la baixa afinitat, en relació a les cefalosporines de tercera generació.

Carbapenems

Els carbapenems estan formats per l'anell betalactàmic unit a un anell insaturat de 5 àtoms (Figura 5). Els representants són imipenem, meropenem i ertapenem.

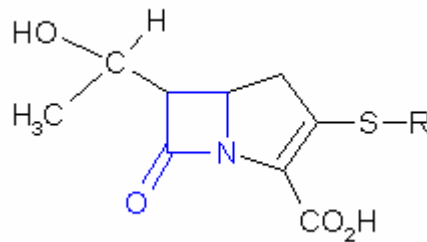


Figura 5: Estructura química dels carbapenems.

Presenten un ampli espectre d'activitat, són actius enfront enterobacteris productors i no productors de betalactamases^{20,21}, *P. aeruginosa* i d'altres bacils gramnegatius no fermentadors com *Acinetobacter*, hemòfils productors i no productors de betalactamasa. No presenten activitat enfront estafilococs resistents a la meticil·lina, als enterococs resistents a l'ampicil·lina i *Stenotrophomonas maltophilia*.

Monobactams

Són betalactàmics monocíclics i l'únic amb ús en clínica és l'aztreonam (Figura 6). No presenta activitat contra bacteris grampositius ni anaerobis²².

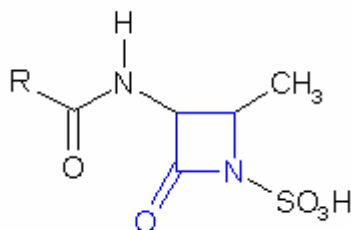


Figura 6: Estructura química dels monobactams.

1.2.2 Mecanisme d'acció

Els antibiòtics betalactàmics són agents bactericides que inhibeixen la síntesi de la paret bacteriana, concretament actuen en la darrera etapa de la síntesi del peptidoglicà.

El peptidoglicà està format per llargues cadenes d'oligosacàrids formats aquests, al seu torn, per la repetició de l'àcid N-acetilmuràmic i N-acetilglucosamina. L'àcid muràmic fixa cadenes de tetrapèptids que s'uneixen entre sí per formar una xarxa, bé directament en gramnegatius o mitjançant un pentapèptid en grampositius¹⁴ (Figura 7). Els betalactàmics inhibeixen precisament aquesta unió o transpeptidació. D'aquesta manera la paret bacteriana queda debilitada i pot trencar-se per la pressió osmòtica intracel·lular. Per tal que actuïn els betalactàmics és necessari doncs, que el bacteri es trobi en fase de multiplicació, donat que és quan es sintetitza la paret cel·lular.

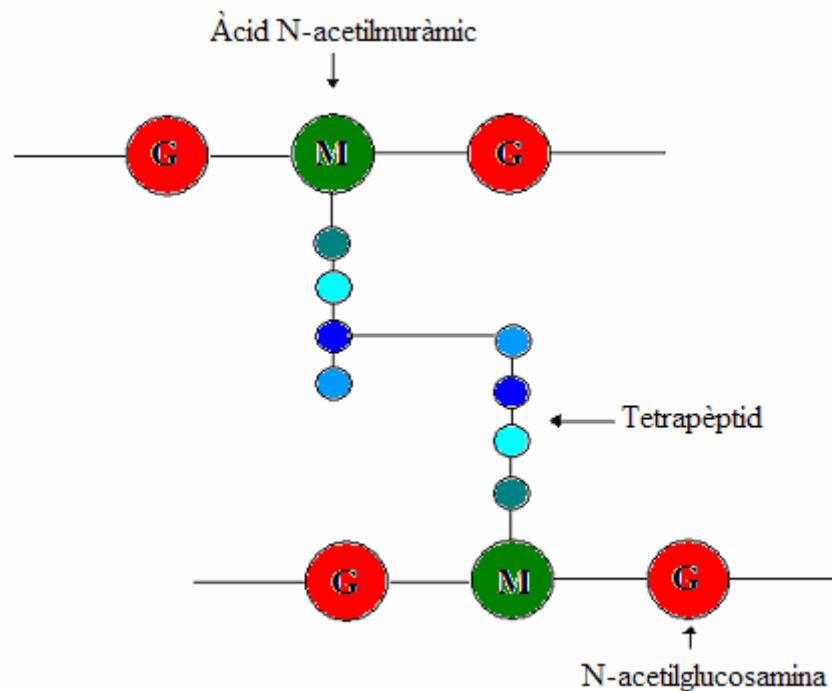


Figura 7: Peptidoglicà dels bacteris gramnegatius.

Els components del peptidoglicà es sintetitzen en el citoplasma i són transportats a través de la membrana a l'espai que hi ha entre aquesta i la paret cel·lular. En aquest espai hi ha unes proteïnes amb activitat enzimàtica, transpeptidases i carboxipeptidases, que són les encarregades de formar els tetrapèptids. Aquests enzims fixen la penicil·lina i altres betalactàmics pel que s'anomenen proteïnes fixadores de penicil·lina, PBP (*Penicillin Binding Protein*). L'anell betalactàmic té una estructura similar als dos últims aminoàcids del tetrapèptid, D-alanina-D-alanina, i això permet una unió covalent amb el centre actiu de la transpeptidasa⁶. També pot inhibir les carboxipeptidases i algunes endopeptidases. Els betalactàmics també actuen activant una autolisina bacteriana endògena que destrueix el peptidoglicà (Figura 8). Els bacteris que no tenen autolisines són inhibits pels betalactàmics però no lisats, pel que es diu que són tolerants.

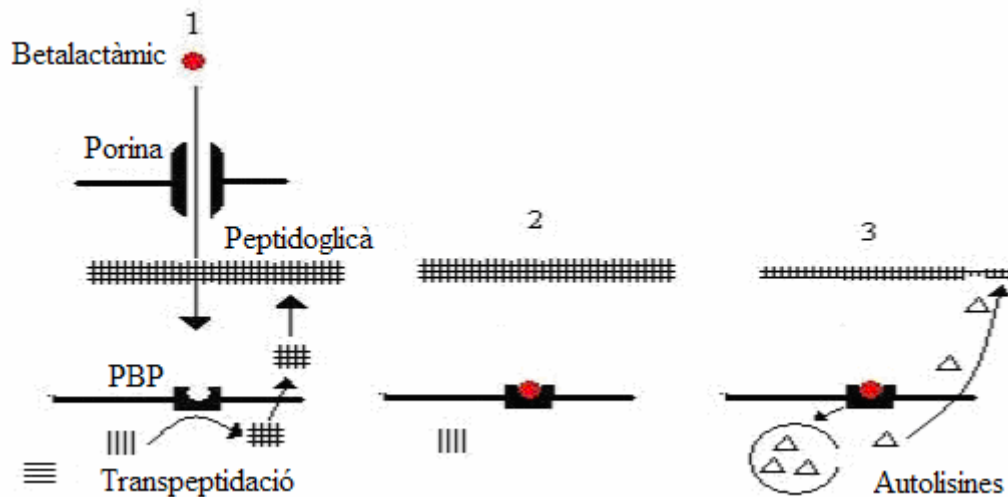


Figura 8: Mecanisme d'acció dels antibiòtics betalactàmics. 1. Formació dels precursors de peptidoglicà mitjançant les PBP i entrada del betalactàmic a través de les porines. 2. Unió del betalactàmic amb les PBP. La unió del betalactàmic a les PBP impedeix continuar la síntesi de peptidoglicà. 3. Alliberament d'autolisines que degradaran la paret. La paret cel·lular perd integritat i no pot resistir la pressió osmòtica.

1.2.3 Farmacocinètica i farmacodinàmica

Els betalactàmics assoleixen ràpidament concentracions plasmàtiques elevades per via parenteral, essent l'absorció a través del tracte gastrointestinal variable pels diferents compostos. En general s'obtenen pics sèrics 1 o 2 hores després de la seva ingesta. La unió a proteïnes plasmàtiques presenta valors compresos entre el 10% i el 98%. La semivida compren valors d'entre 0,5 i 2 hores. Presenten una bona distribució en teixits i fluids corporals, la penetració de la barrera hemato-encefàlica s'afavoreix quan existeix inflamació meníngea, obtenint-se concentracions terapèutiques. La penetració intracel·lular és escassa degut a que són substàncies poc liposolubles. La major part de compostos no es metabolitzen. L'excreció es produeix majoritàriament per via renal, encara que en alguns preparats predomina l'excreció biliar.

Els betalactàmics són antibiòtics d'activitat bactericida lenta, relativament independent de la concentració plasmàtica aconseguida, sempre i quan aquesta sigui

superior a la concentració inhibitoria mínima (CIM). L'activitat bactericida i probablement l'eficàcia clínica es relaciona millor amb el temps durant el qual l'esmentada concentració sobrepassa la CIM²³. Per a la majoria d'infeccions es considera adequat que el temps que supera la CIM sigui com a mínim del 40% de l'interval entre dosis. En pacients neutropènics o amb meningitis, però, és probable que sigui millor estar tot el temps per sobre els nivells de la CIM. L'efecte postantibiòtic consisteix en l'acció residual de l'antibiòtic contra el bacteri després que les concentracions terapèutiques a la sang i als teixits baixin per sota de la CIM. En el cas dels betalactàmics, l'efecte postantibiòtic és de curta durada, amb excepció dels carbapenems²⁴. Aquests paràmetres indiquen que allargar els intervals entre dosis pot portar a fracassos terapèutics.

1.3 Resistència antimicrobiana

1.3.1 Resistència natural i adquirida

La resistència als antimicrobians pot ser natural o adquirida. La resistència natural a un antimicrobià és aquella que de manera intrínseca tenen algunes espècies bacterianes. Aquests mecanismes de resistència intrínseca depenen de funcions o estructures codificades generalment al cromosoma bacterià.

La resistència adquirida, en canvi, és aquella que el bacteri obté de manera vertical, és a dir, es produeix una mutació en el cromosoma (responsable de la resistència) que posteriorment serà transferida a la descendència; bé mitjançant una transferència horitzontal, és a dir, per adquisició de DNA forani.

1.3.2 Mecanismes de resistència als betalactàmics

Com en d'altres famílies d'antimicrobians són varis els mecanismes de resistència que han desenvolupat els bacteris per esdevenir resistents als betalactàmics (Figura 9). Aquests mecanismes poden presentar-se sols, però cada vegada pren més força la hipòtesi que són diversos els mecanismes implicats en una mateixa resistència.

Un primer mecanisme de resistència són les **alteracions gèniques de les molècules diana, proteïnes fixadores de la penicil·lina o PBP**, per mutacions puntuals. El bacteri esdevé resistent perquè, per una banda disminueix l'afinitat de la PBP per l'antibiòtic i, per l'altre pot mantenir, en part, la seva funció fisiològica²⁵. Aquest mecanisme es dona tant en grampositius com *Staphylococcus aureus*²⁶, *Streptococcus pneumoniae*²⁷ o *Enterococcus*²⁸, com en gramnegatius com *H. influenzae*²⁹, neissèries³⁰ o *P. mirabilis*³¹.

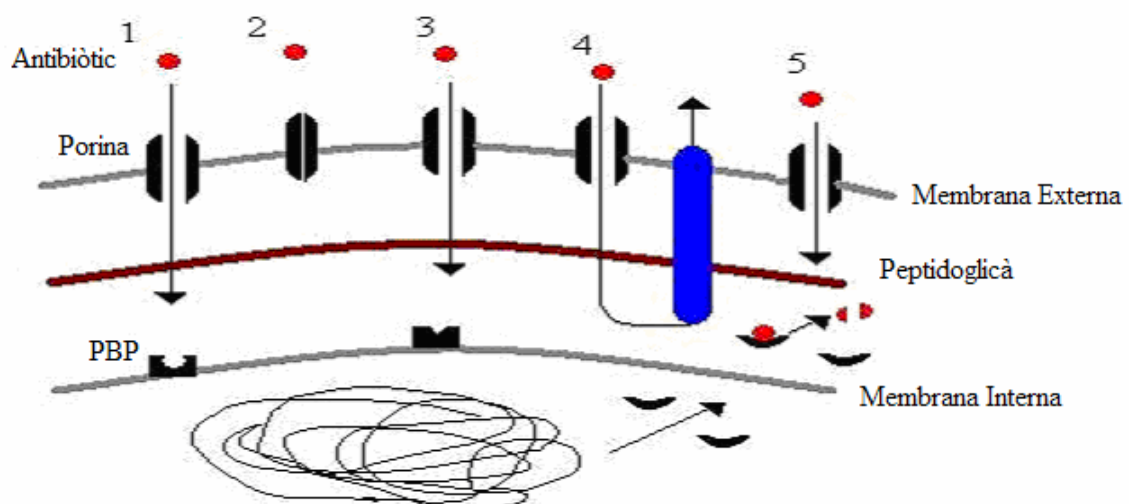


Figura 9: Mecanismes de resistència als betalactàmics en bacteris gramnegatius. 1. Per tal que els betalactàmics arribin a les PBP, cal que travessin la membrana externa, mitjançant un transport específic, les porines, i el peptidoglicà. 2. Degut a una alteració en la porina, el betalactàmic no pot travessar la membrana externa, **resistència per alteracions de la permeabilitat**. 3. La proteïna diana, PBP, està modificada i no es pot unir a l'antibiòtic, **resistència per alteració de la molècula diana**. 4. L'antibiòtic és expulsat cap a fora del bacteri per complexos proteïcs, **resistència per mecanismes d'expulsió activa**. 5. El bacteri produeix uns enzims que hidrolitzen l'antibiòtic, **resistència per inactivació enzimàtica**.

La membrana externa de la paret cel·lular dels bacteris gramnegatius suposa una barrera per a molts antimicrobians. **Alteracions en aquesta membrana externa** confereixen resistència als betalactàmics, en general de baix nivell³². Hi ha bacteris gramnegatius no fermentadors de la glucosa que presenten una resistència intrínseca a la major part de betalactàmics degut a la composició de la seva membrana cel·lular. Donat que els betalactàmics són poc liposolubles necessiten d'un canal, d'origen protèic, per a travessar la membrana externa. Aquests canals, anomenats genèricament OMP (Quter Membrane Protein), s'agrupen en diferents famílies, però de manera genèrica se les classifica en funció de l'especificitat que tenen pel substrat^{33,34}. Així, tenim les proteïnes mínimament selectives, les selectives que tenen un lloc de reconeixement en el canal, i les altament específiques. Les proteïnes implicades en la resistència als antimicrobians, acostumen a pertànyer a les mínimament selectives. Una excepció és la resistència a imipenem en *P. aeruginosa* que té lloc per alteració de la porina OprD³⁵, que pertany a les proteïnes altament específiques.

Els **sistemes d'expulsió activa** estan formats per proteïnes de transport implicades en l'expulsió de substàncies tòxiques. Es troben tant en bacteris grampositius com gramnegatius. Els gens que codifiquen per a aquestes proteïnes poden formar part d'un operó, amb un sistema de regulació gènica on un increment de l'expressió comporta un increment en la resistència. També s'han descrit en plasmidis, l'expansió dels quals comporta l'expansió de la resistència³⁶⁻³⁸.

El principal mecanisme de resistència als betalactàmics és, però, la **inactivació enzimàtica** per la producció dels enzims anomenats **betalactamases**, que poden ser naturals o adquirides. La majoria d'enterobacteris, a excepció de *Salmonella* i probablement *P. mirabilis*, codifiquen en el seu cromosoma una betalactamasa.

1.4 Betalactamases

Les betalactamases són enzims que es postula deriven de les PBP, amb les que tenen similituds seqüencials i estructurals. La seva funció original podria haver estat participar en la síntesi de la paret bacteriana³⁹ o fer de protector en aquells microorganismes que produeixen betalactàmics⁴⁰.

Els gens que codifiquen les betalactamases poden trobar-se en el cromosoma o en plasmidis. S'han descrit enzims de localització plasmídica que en segons quina espècie tenen una localització cromosòmica, com és el cas de la betalactamasa plasmídica SHV-1, que es troba al cromosoma de la majoria de *K. pneumoniae*, o a l'inrevés, enzims de localització cromosòmica que s'han incorporat a diferents elements mòbils, com és el cas de les cefamicinases plasmídiques que deriven de les betalactamases cromosòmiques d'alguns enterobacteris, o algunes betalactamases d'espectre ampliat (veure posteriorment).

1.4.1 Classificació

Des de la seva aparició hi ha hagut múltiples classificacions de betalactamases. En l'actualitat les més usades són dues, la classificació d'Ambler⁴¹ basada en la seqüenciació a nivell proteic, i la classificació de Bush, Jacoby i Medeiros⁴², basada en els caràcters funcionals d'aquests enzims. Ambdues classificacions estan correlacionades i donen lloc a 4 grups (Taula 1).

En el **grup 1** de Bush, s'inclouen les betalactamases de classe C d'Ambler caracteritzades per hidrolitzar la majoria de betalactàmics excepte l'imipenem, remarcant el fet diferencial que són capaces d'hidrolitzar les cefamicines i no s'inhibeixen per l'àcid clavulànic. S'inclouen les betalactamases cromosòmiques pròpies d'espècie (AmpC) i les cefamicinases plasmídiques.

El **grup 2** està format per 6 subgrups (2a, 2b, 2c, 2d, 2e i 2f), tots ells de la classe A d'Ambler excepte el 2d que pertany a la classe D. En el subgrup 2a s'engloben les penicil·lases de bacteris grampositius. El 2b compren la majoria de betalactamases d'ampli espectre, que hidrolitzen les penicil·lines i, si la seva expressió és elevada poden conferir resistència a cefalosporines de primera generació. Són inhibides per l'àcid clavulànic. Les més freqüents són les de tipus TEM i SHV. D'aquestes deriven, per mutacions puntuals que comporten un canvi aminoacídic, per una part el subgrup 2be, les betalactamases d'espectre ampliat (BLEA) (veure apartat 1.6) i per l'altra el 2br, les betalactamases resistents als inhibidors, les quals deriven majoritàriament de les tipus TEM, i per això inicialment reberen el nom de IRT (*Inhibitor Resistant TEM-Type*). Les BLEA hidrolitzen tant penicil·lines, cefalosporines de primera, segona (però no les cefamicines), tercera i quarta generació a més dels monobactams, i són sensibles a la inhibició per l'àcid clavulànic. Les IRT es caracteritzen per presentar el mateix perfil d'hidròlisi que les betalactamases d'ampli espectre, però essent resistents als inhibidors de betalactamases com l'àcid clavulànic, el tazobactam o el sulbactam. En el subgrup 2c i 2d tenim les anomenades carbenicil·lases i oxacil·linases, respectivament. El seu perfil d'acció és similar al de les betalactamases d'ampli espectre però són més resistents a l'acció de l'àcid clavulànic. Una mutació en el gen estructural els hi confereix patró de BLEA. Algunes oxacil·linases, a més, poden arribar a hidrolitzar els carbapenems. En el subgrup 2e hi ha les cefalosporinases cromosòmiques d'algunes espècies com *Proteus vulgaris*, *P. penneri*, *Citrobacter koseri* i *C. sedlakii*, que pertanyen a la classe A d'Ambler a diferència de les cefalosporinases del grup 1 que pertanyen a la classe C, són inhibides per l'àcid clavulànic i una hiperproducció els hi confereix el fenotip de BLEA. En el subgrup 2f es troben les noves carbapenemases plasmídiques de la classe A d'Ambler, descrites puntualment en alguns enterobacteris.

Classe Molecular	Grup Funcional	Centre actiu	Perfil de Substrats preferents	Inhibició		Enzims representatius
				AC ^a	EDTA	
A	2a	Serina	Penicil·lines	+	-	<u>Penicil·linases</u> de bacteris grampositius que poden ser cromosòmiques o plasmídiques
A	2b	Serina	Penicil·lines cefalosporines	i +	-	<u>Penicil·linases-cefalosporinases</u> . Plasmídiques : TEM-1/2, SHV-1, OHIO-1 i ROB-1 Cromosòmica : SHV-1 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
A	2be	serina	Penicil·lines, cefalosporines monobactams	+ i	-	<u>Penicil·linases-cefalosporinases d'espectre ampliat</u> Plasmídiques : TEM-2/3, TEM-42/43, TEM-46 a 50, TEM-52 a 58, TEM 60 a 64, TEM 66 a 72, TEM-75, TEM 109 a 102, TEM 104 a 139; SHV-2 a 63 (excepte SHV-10); CTX-M-1 a 40; TOHO-1/2; UOE-1/2; SFO-1, FEC-1, VEB-1 a 3, PER-1/2, GES-1 a 4, IBC-1/2 i TLA-1. Cromosòmica : K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i> , KLUA-1 a 12 de <i>Kluyvera ascorbata</i> , KLUC-1 de <i>K. cryocrescens</i> i KLUG-1 de <i>K. georgiana</i> .
A	2br	Serina	Penicil·lines	-	-	Penicil·linases resistents als inhibidors derivades de TEM (IRT). Plasmídiques : TEM-30 a 41, TEM-44/45, TEM-51, TEM-54, TEM-59, TEM-65, TEM-67, TEM-73/74, TEM-76 a 78, TEM-81 a 84, TEM-103 i SHV-10.
A	2c	Serina	Penicil·lines carbenicil·lines	i +	-	<u>Penicil·linases-carbenicil·linases</u> Plasmídiques : PSE-1 (CARB-2), PSE-3, PSE-4 (CARB-1), PSE-5 (CARB-7), CARB-3 a CARB-9
A	2e	Serina	Penicil·lines cefalosporines	i +	-	<u>Cefalosporinasa cromosòmica induïble</u> : Sed-1 de <i>C. sedlakii</i> , CKO de <i>Citrobacter koseri</i> , L2 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .
A	2f	Serina	Penicil·lines, cefalosporines carbapenems	+ i	-	<u>Carbapenemases cromosòmiques no naturals</u> d'espècie: NMC-A i IMI-1 d' <i>Enterobacter cloacae</i> , SME-1 a SME-3 de <i>Serratia marcescens</i> . <u>Carbapenemases plasmídiques</u> : GES-2 a 4, KPC-1 a 4.
B1	3a	Zinc	Penicil·lines, cefalosporines carbapenems monobactams	-	+	<u>Carbapenemases cromosòmiques</u> : BLAB-1a, BLAB-3 en <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> , IND-1 a IND-3 <i>C. indologenes</i> , BC11 en <i>Bacillus cereus</i> i CrrA en <i>Bacteroides fragilis</i> . <u>Carbapenemases plasmídiques</u> : IMP-1 a 17, VIM-1 a 12 i MET-1.
B2	3b	Zinc		-	+	<u>Carbapenemases cromosòmiques</u> : CphA i Sfh-1 d' <i>Aeromonas hydrophila</i>
B3	3a	Zinc		-	+	<u>Carbapenemasa cromosòmica induïble</u> : L1 THIN-B de <i>S. maltophilia</i> i <i>Janthinobacterium lividum</i> .
B3	3c	Zinc		-	+	<u>Carbapenemasa cromosòmica</u> : FEZ-1 de <i>Legionella gormanii</i> .
C	1	Serina	Penicil·lines, cefalosporines monobactams	-	-	<u>AmpC</u> d'enterobacteris i <i>Pseudomonas</i> , tant cromosòmiques com plasmídiques : FOX-1 a 6, MIR-1 a 3, MOX-1/2, LAT-1 a 4, CMY-1 a 19, BUT-1, BIL-1, ABA-1, ACT-1, ACC-1/2, DHA-1/2,...
D	2d	Serina	Penicil·lines isoxazòliques +/- carbapenems	+/-	-	<u>Penicil·linases-oxacil·linases plasmídiques</u> : OXA-1 a 80 (OXA-10, OXA-23 a 27 i OXA-40 amb activitat carbapenemàsica).
? ^b	4	Serina	Penicil·lines	-	-	Penicil·linasa cromosòmica o plasmídica de <i>Burkholderia cepacia</i> .

Taula 1: Classificació de les betalactamases basada en el grup funcional⁴¹ i en les característiques moleculars⁴². a, àcid clavulànic; b, desconegut.

El **grup 3** es divideix en 3 subgrups que es diferencien tant en el perfil d'hidròlisi com per l'estructura molecular. Tots pertanyen a la classe B d'Ambler, també anomenats metal·loenzims donat que necessiten els ions de Zn^{2+} com a cofactor per a ser actius, s'inactiven per EDTA i no per l'àcid clavulànic. Aquests metal·loenzims es caracteritzen per hidrolitzar tots els betalactàmics a excepció de l'aztreonam. Inicialment es troben en el cromosoma de certes espècies com *Aeromonas hydrophila* o *Bacillus* spp. Actualment se n'han descrit de plasmídiques que s'han trobat principalment en bacils gramnegatius no fermentadors.

Per últim el **grup 4** que només inclou la penicil·linasa de *Burkholderia cepacia*, que no es pot incloure en cap classe d'Ambler.

1.4.2 Mecanisme d'acció

Les betalactamases de les classes A, C i D tenen com a centre actiu una serina. Els enzims de la classe B en canvi, es caracteritzen per necessitar els ions de zinc. En les classes A, C i D, les betalactamases s'uneixen a l'antibiòtic formant un complex reversible no covalent. El grup éster de l'anell betalactàmic és aleshores acil·lat pel grup hidroxil lliure del residu de serina del centre actiu de l'enzim¹⁴. Finalment, hi ha un procés d'hidròlisi pel qual es reactiva l'enzim i s'allibera l'antibiòtic inactiu (Figura 10).

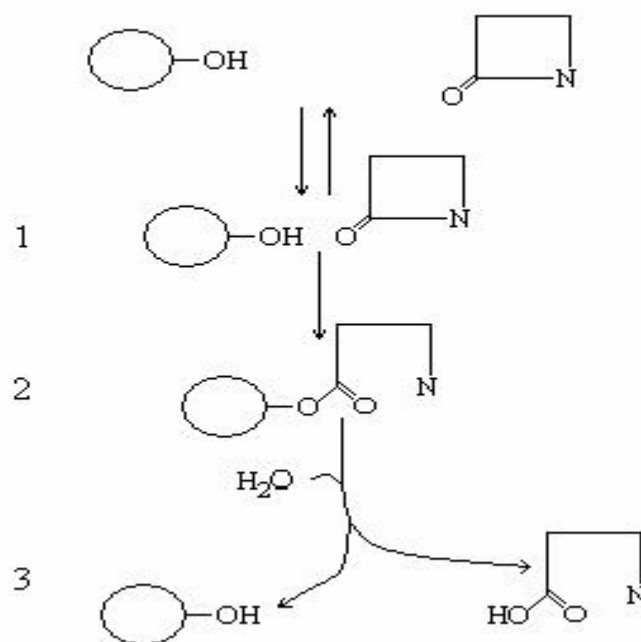


Figura 10: Mecanisme d'acció de les betalactamases de classe A, C i D. 1. Unió no covalent entre antibiòtic i enzim. 2. Es produeix un enllaç acil-éster. 3. Hidròlisi de l'enllaç éster, alliberant-se l'enzim actiu i l'antibiòtic inactiu.

1.5 Betalactamases naturals d'espècie en enterobacteris

Tots els enterobacteris d'interès clínic, amb l'única excepció de *Salmonella* i probablement *P. mirabilis*, són portadors d'una betalactamasa cromosòmica natural i pròpia de cada espècie⁴³. *E. coli* i *Shigella*, són portadors d'una betalactamasa cromosòmica de la classe C d'Ambler, que en la seva forma natural s'expressa a un nivell basal baix, i per tant, no confereix una resistència significativa a nivell clínic⁴⁴. Una mutació en el promotor^{45,46} del gen d'aquestes betalactamases o en l'atenuador present a l'inici del gen, pot fer que l'enzim s'hiperprodueixi, conferint resistència a aminopenicil·lines, carboxipenicil·lines, cefalosporines de primera i segona generació, cefamicines i en funció del grau d'hiperproducció, poden afectar a ureidopenicil·lines, cefalosporines de tercera generació i monobactams, també confereixen resistència als inhibidors de betalactamases com l'àcid clavulànic.

En *K. pneumoniae* i *K. oxytoca*, *C. koseri* i *C. amalonaticus*, la resistència ve donada per una betalactamasa de classe A, que confereix resistència de baix nivell a aminopenicil·lines i carboxipenicil·lines i són sensibles als inhibidors de betalactamases. En *K. pneumoniae* s'han descrit tres famílies de betalactamases cromosòmiques, la SHV (on hi ha la SHV-1 i la SHV-11), la LEN i la OKP⁴⁷, que confereixen resistència a les penicil·lines i cefalosporines de primera generació. En *K. oxytoca* trobem la Koxy; de la qual s'han descrit 4 subtipus (K1 a K4)⁴⁸. La hiperproducció de la Koxy dóna lloc a un patró de resistència a penicil·lines i cefalosporines de primera generació, i, en funció del nivell de producció, ens trobem que confereixen un fenotip de BLEA, sensible a ceftazidima i amb una elevada resistència a aztreonam.

C. freundii, *Enterobacter*, *Providencia*, *M. morganii*, *Serratia* i *Hafnia alvei*, presenten una betalactamasa cromosòmica induïble de classe C, que confereix resistència a aminopenicil·lines, carboxipenicil·lines, cefalosporines de primera generació i als inhibidors de betalactamases, i una sensibilitat variable a cefoxitina. *Enterobacter* i *C. freundii* són resistents a cefoxitina i presenten sensibilitat disminuïda a cefuroxima. *M. morganii*, *Providencia* i *Serratia* són resistents a cefuroxima i moderadament resistents a cefoxitina. I, per mutacions en els gens que regulen aquestes betalactamases es pot produir una desrepressió del sistema que provoca la producció de gran quantitat de l'enzim, esdevenint aleshores resistents a cefalosporines de tercera generació i monobactams, mantenint certa activitat les de quarta generació.

Proteus vulgaris, *P. penneri*, *C. koseri* i *C. sedlakii* tenen una betalactamasa cromosòmica induïble de la classe A. Són resistents a penicil·lines, cefalosporines de primera generació i cefuroxima, i sensibles a cefoxitina i als inhibidors de betalactamases. La desrepressió de la betalactamasa comporta resistència a

cefalosporines de tercera generació, presentant sensibilitat disminuïda a les de quarta. Aleshores el seu fenotip és compatible amb la presència d'una BLEA.

Yersinia enterocolitica, presenta una betalactamasa de classe A més una de classe C⁴⁹, aquest fet li confereix un fenotip de cefalosporinasa induïble i penicil·linasa. Es resistent a aminopenicil·lines, carboxipenicil·lines, cefalosporines de primera i de segona generació.

Finalment, com ja s'ha citat anteriorment, no s'han trobat betalactamasa cromosòmica pròpia d'espècie en *P. mirabilis* i *S. enterica*.

1.6 Betalactamases plasmídiques. Betalactamases d'espectre ampliat (BLEA)

La betalactamasa plasmídica d'ampli espectre més aïllada en enterobacteris és TEM-1, que ha estat descrita en un 75-80% de les soques resistents a aminopenicil·lines⁵⁰⁻⁵³. L'enzim TEM-1 va ser descrit per primer cop en una soca d'*E. coli* aïllada a Grècia al 1965 d'un hemocultiu d'un pacient anomenat Temoniera, d'aquí ve el nom de TEM⁵⁴. Posteriorment difongué arreu, expandint-se a través de la família *Enterobacteriaceae* primer i posteriorment a *H. influenzae*⁵⁵ i *Neisseria gonorrhoeae*⁵⁶. Un enzim relacionat amb TEM-1, el TEM-2 va ser descrit per primer cop en *P. aeruginosa* al 1969⁵⁷.

Una altre betalactamasa d'ampli espectre extensament descrita en *Enterobacteriaceae*, i concretament en *K. pneumoniae* i en *E. coli*, és SHV-1. El nom ve pel fet de ser sulfhidril variable. Aquest enzim és de codificació plasmídica en la majoria dels casos, a excepció de *K. pneumoniae* que es troba en el cromosoma.

De les betalactamases TEM-1 i SHV-1 és on provenien la majoria de BLEA fins a la posterior aparició de la família CTX-M.

Com ja hem comentat, les betalactamases d'espectre ampliat (BLEA) clàssiques són betalactamases que majoritàriament pertanyen a la classe molecular A d'Ambler i a la 2be de Bush. Es caracteritzen per presentar com a centre actiu una serina i una massa molecular aproximada de 29 KDa. Són enzims que poden hidrolitzar penicil·lines, cefalosporines, incloses les de tercera i quarta generació així com monobactams.

La primera soca productora de BLEA tingué lloc a la República Federal Alemanya al 1983⁵⁸ amb la descripció de l'enzim SHV-2, present en una soca de *Klebsiella ozaenae* aïllada d'una mostra clínica. Tot just un any després es descriu la primera soca portadora d'una BLEA tipus TEM, en una soca de *K. pneumoniae*^{59,60}. Actualment, hi ha més de 150 BLEA, descrites arreu del món i en diferents gèneres d'*Enterobacteriaceae* i *P. aeruginosa* (<http://www.lahey.org/studies/webt.asp>)^{42,43,50}.

Les BLEA tipus TEM han estat descrites majoritàriament en soques de *K. pneumoniae* i *E. coli*^{43,50} i han estat causa de brots nosocomials severos. També s'han observat en altres gèneres d'enterobacteris com *Enterobacter aerogenes*, *M. morganii*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri* i *S. enterica*⁶¹⁻⁶⁵.

La majoria de BLEA tipus SHV s'han trobat en soques de *K. pneumoniae*, encara que aquests enzims també s'han descrit en *E. coli*, *C. koseri* i *P. aeruginosa*^{43,47,66-69}.

Una nova família de BLEA són les CTX-M, han estat descrites principalment en *E. coli*, encara que s'han trobat en altres gèneres d'enterobacteris^{69,70}. Es van començar a descriure cap a la segona meitat de la dècada dels 80, i han estat, sens dubte, la família d'enzims amb el ratio de disseminació més gran, sobretot a partir del 1995⁷¹. L'origen d'aquests enzims sembla estar relacionat amb les betalactamases cromosòmiques d'altres espècies. La betalactamasa cromosòmica de *Kluyvera ascorbata* KLUA es considera el progenitor de les CTX-M-2t amb les que té més del 99% d'homologia⁷².

Rodríguez *et al*⁷³ van trobar una soca de *K. ascorbata*, amb la betalactamasa cromosòmica KLUA-9, que era idèntica a CTX-M-3, i per tant aquesta espècie podria ser la progenitora de les CTX-M-1t. KLUG, betalactamasa cromosòmica de *K. georgiana*, té un únic canvi respecte la CTX-M-8⁷⁴. Una soca de *K. georgiana* aïllada a Guayana podria considerar-se el progenitor de les CTX-M-9t donat que la seva betalactamasa cromosòmica presenta un 100% d'homologia amb la CTX-M-14⁷⁵. La betalactamasa cromosòmica de *K. cryocrescens* podria ser el progenitor d'un grup de CTX-M encara no identificat⁷⁶.

Les CTX-M són un grup heterogeni d'enzims que s'han agrupat, segons la seva homologia aminoacídica en cinc famílies o subgrups (Figura 11): les CTX-M-1t (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-15, CTX-M-32 i CTX-M-34), les CTX-M-2t (CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5), la CTX-M-8, les CTX-M-9t (CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-17 i CTX-M-51) i les CTX-M-25t (CTX-M-25, CTX-M-26)⁷¹.

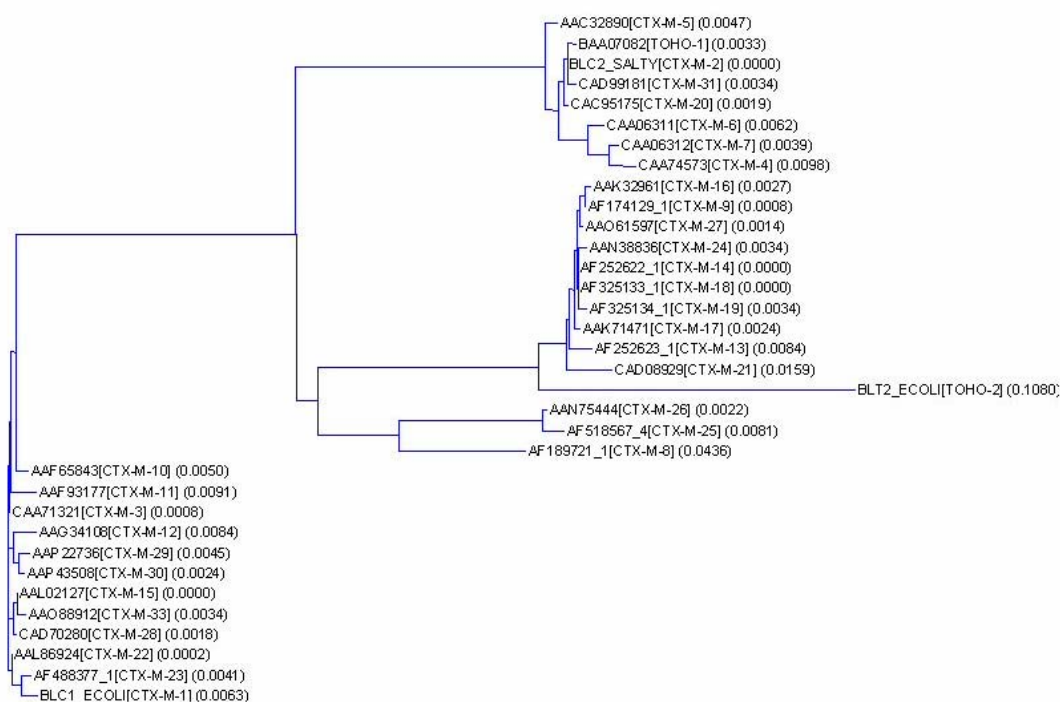


Figura 11: Dendrograma de les BLEA tipus CTX-M.
(www.lahey.org/studies/other.asp#table1)

Finalment, un altre grup important de BLEA són les betalactamases de tipus OXA, que es caracteritzen per una elevada afinitat per l'oxacil·lina i la cloxacil·lina, i que són poc inhibides per l'àcid clavulànic⁷⁷. Normalment les oxacil·linases mantenen un espectre d'activitat reduït, conferint resistència a aminopenicil·lines i ureidopenicil·lines. Tanmateix, s'ha observat una expansió del seu espectre d'activitat cap a les oximinocefalosporines i carbapenems, bé com a conseqüència de mutacions puntuals bé per l'aparició de nous grups^{77,78}.

Altres BLEA poc freqüents no relacionades amb cap de les altres famílies de BLEA més predominants com TEM, SHV i CTX-M són: la betalactamasa PER-1, descrita per primer cop en una soca de *P. aeruginosa* aïllada a Turquia⁷⁹, i en soques de *S. enterica* serovar Tiphymurium i *Acinetobacter baumannii*⁸⁰; PER-2, que té un 86% d'homologia amb PER-1, va ser trobat en *S. enterica* serovar Tiphymurium a l'Argentina⁸¹; VEB-1, descrita per primer cop en una soca d'*E. coli* aïllada d'un pacient del Vietnam, s'ha trobat també descrita en una soca de *P. aeruginosa* aïllada a Tailàndia⁸²; CME-1 va ser aïllada de *Chryseobacterium meningosepticum*⁸³ a Itàlia; TLA-1, en una soca d'*E. coli* a Mèxic⁸⁴; SFO-1 trobada en *Serratia fonticola*⁸⁵; GES-1 descrita en una soca de *K. pneumoniae*⁸⁶ aïllada a França i GES-2 descrita en *P. aeruginosa*⁸⁷ a Sud-Àfrica.

1.6.1 Epidemiologia de les BLEA

Des que es va aïllar la primera soca productora de BLEA, la prevalença de soques productores d'aquests enzims, principalment soques d'*E. coli* i *K. pneumoniae*, no ha cessat d'augmentar a més de ser, aquest, el mecanisme més important implicat en la resistència a cefalosporines de tercera i quarta generació.

En un estudi a nivell internacional, el MYSTIC⁸⁸, es van recollir 17.203 soques d'enterobacteris des del 1997 al 2004 de 41 centres mèdics d'onze països diferents: Bèlgica, Croàcia, República Txeca, Finlàndia, Alemanya, Grècia, Polònia, Rússia, Espanya, Turquia i el Regne Unit, i 6.726 soques d'enterobacteris aïllades entre 1999 i 2004 de 15 centres mèdics dels Estats Units. En aquest estudi es van observar que a Europa la prevalença de BLEA en *E. coli* era d'un 2,1% al 1999 i incrementava a un 10,8% al 2004. Per *K. pneumoniae* s'observà un 9% al 1999 i un 13,6% al 2004. Als Estats Units s'observà que la prevalença de BLEA per *E. coli* era d'un 5,1% al 1999 i disminuïa a un 1,4% al 2004, i per a *K. pneumoniae* s'observà un 7,2% al 1999 a un 4,4% al 2004.

Un estudi del grup GEIH-BLEA 2000⁸⁹ per a determinar la prevalença de BLEA en l'àmbit hospitalari va recollir les soques d'*E. coli* i *K. pneumoniae* portadores de BLEA de març a juny del 2000 de 40 hospitals de l'Estat Espanyol, i van descriure una prevalença d'*E. coli* amb BLEA del 0,5% (amb un rang d'entre 0 i 2,4%) i de *K. pneumoniae* del 2,7% (amb un rang d'entre 0 i 16,7%), els enzims caracteritzats posteriorment⁹⁰, van mostrar que en *E. coli* l'enzim més freqüent va ser la CTX-M-9 (27,3%), seguit per SHV-12 (23,9%) i CTX-M-14 (20,5%), mentre que en *K. pneumoniae* va ser TEM-4 (25%) i TEM-3 (16,7%).

La prevalença de BLEA s'estudia a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau des de 1994. En el primer període d'estudi, que va del 1994 al 1996⁹¹ es va observar una prevalença d'enterobacteris portadors de BLEA del 0,14% en soques d'*E. coli* i del 0,17% en *K. pneumoniae*. En un període posterior, del 1997 al 1999 es va trobar una prevalença del 0,45% en *E. coli* i del 1,45% en *K. pneumoniae*.

L'observació que una bona part de soques portadores de BLEA s'aïllaven de mostres d'origen extra-hospitalari, principalment infeccions urinàries, va fer pensar que

probablement la prevalença d'aquests enzims en persones sanes fos elevada. El problema és que hi ha molts pocs estudis a on es busqui la prevalença de BLEA a la comunitat, i dels pocs que hi ha en molts casos les persones estudiades han tingut contacte amb hospitals o cases de convalescència. Valverde *et al*⁹² del 1991 al 2003 van observar que la prevalença de BLEA a l'Hospital Ramón y Cajal de Madrid en portadors fecals havia pujat del 0,7% al 5,5%, respectivament, i pel que fa al tipus de BLEA trobades, van trobar un predomini de CTX-M, concretament un predomini de CTX-M-9 seguida de CTX-M-14, i SHV-12. Fora de les nostres fronteres trobem dos estudis recents al Regne Unit, duts a terme per Munday *et al*⁹³ on descriuen una prevalença en portadors fecals del 1,9% fruit de la presència de CTX-M-9, CTX-M-14 i CTX-M-15, i per Woodford *et al*⁹⁴ que només estudien la incidència de CTX-M i troben que un 24% provenen de pacients no ingressats, essent l'enzim més estès la CTX-M-15. Pallecchi *et al*⁹⁵ van trobar una prevalença d'*E. coli* portador de BLEA, d'agost a novembre del 2002, en nens sans de Bolívia i Perú del 0,1% (4 de 3.208), els enzims que van trobar van ser CTX-M-2 i CTX-M-15. I, Pitout *et al*⁹⁶ descriuen la expansió clonal d'una soca d'*E. coli*, provinent de la comunitat, portadora de la betalactamasa CTX-M-14 a Canadà. D'aquests articles podem destacar que la prevalença de BLEA està augmentant a nivell comunitari i que la família CTX-M s'està convertint en la predominant.

Un altre àmbit, on la pressió selectiva per antimicrobians és important és en el món animal, concretament en l'àmbit de la producció. Briñas *et al*⁹⁷, l'any 2003 van publicar un estudi on van trobar una prevalença de soques portadores de BLEA en animals sans del 2,5%, descrivint-hi CTX-M-14 i SHV-12. Posteriorment, els mateixos autors⁹⁸ realitzen un estudi comparatiu entre animals sans i malalts, i descriuen una prevalença del 2,2% en animals malalts, essent la BLEA més freqüent la CTX-M-14; trobant molt més elevada la prevalença en animals sans, del 6,3%, essent l'enzim més

freqüentment aïllat també la CTX-M-14. Shiraki *et al*⁹⁹ troben al Japó una prevalença del 1,5% de CTX-M-2 a partir de mostres fecals de vaques. És important observar que els tipus de BLEA trobats en l'àmbit clínic són les mateixes que les descrites en la comunitat i el món animal.

Finalment, cal pensar que una de les vies d'expansió d'aquests enzims pot ser la dels aliments¹⁰⁰. Un exemple va tenir lloc en uns campaments d'estiu a Girona on hi va haver un brot de salmonel·losi. A l'estudiar les mostres fecals dels afectats s'aïllaren soques clonals d'*E. coli* amb una BLEA (CTX-M-9) i/o amb una cefamicinasa (CMY-2).

1.7 Cefamicinases plasmídiques

Aquests enzims tenen un ampli espectre d'acció, hidrolitzen tots els betalactàmics a excepció dels carbapenems. El seu nom prové del fet que, a diferencia de les BLEA, són capaces d'hidrolitzar les cefamicines com la cefoxitina, pel que han estat anomenades cefamicinases. No són inhibides per l'àcid clavulànic, a excepció de MOX-1 i ACC-1, i presenten una menor activitat hidrolítica davant les cefalosporines de quarta generació¹⁰¹, per tant, l'espectre d'acció d'aquestes betalactamases és molt semblant al de les cromosòmiques de classe C amb les que guarden un grau variable d'homologia, 40-98%. És interessant assenyalar que aquests enzims, a diferència d'algunes cromosòmiques, no són induïbles, s'expressen de manera constitutiva a nivells relativament elevats¹⁰², amb l'excepció de la cefamicinasa DHA-1, descrita per primera vegada en una soca de *S. enterica* serovar Enteritidis¹⁰³.

Al 1989, es va descriure MIR-1¹⁰⁴ la primera cefamicinasa plasmídica, en una soca de *K. pneumoniae*, als Estats Units. Aquest enzim mostrava un 90% d'homologia amb el gen *ampC* d'*E. cloacae*. En aquest mateix any, es va aïllar a Seül (Korea del

Sud), d'una infecció de ferida, una soca de *K. pneumoniae* productora de la cefamicinasa CMY-1, la seqüència nucleotídica de la qual fou presentada al 1996¹⁰⁵. La seqüència aminoacídica mostrà un 57,5% d'homologia amb el gen *ampC* de *P. aeruginosa*, essent aquesta homologia la més propera.

L'any 1990 es descriu la cefamicinasa plasmídica CMY-2¹⁰⁶, descrivint-se la seva seqüència nucleotídica al 1992¹⁰⁷, la qual presentà una homologia del 96,6% amb l'*ampC* de *C. freundii*. En els últims anys s'ha trobat, principalment, en soques de *K. pneumoniae* i d'*E. coli*.

Encara que no s'ha fet una classificació formal d'aquestes betalactamases plasmídiques de classe C, algunes tenen seqüències nucleotídiques i aminoacídiques molt semblants a diferents betalactamases de classe C cromosòmiques¹⁰⁸, com és el cas de CMY-2 a CMY-7, LAT-1 a LAT-4 i BIL-1 que es creu que deriven de l'*ampC* de *C. freundii*¹⁰⁹, MIR-1 i ACT-1 d'*E. cloacae*¹¹⁰, ACC-1 d'*H. alvei*¹¹¹, i DHA-1 i DHA-2 de *M. morganii*¹¹².

Navarro *et al*¹¹³ en un estudi dut a terme en dos hospitals de l'Estat Espanyol, des de l'octubre de 1999 a desembre del 2000 van trobar una prevalença de CMY-2 a l'àmbit hospitalari de diferents espècies d'enterobacteris que va del 0,07% en *P. mirabilis* al 0,41% en *K. oxytoca* essent del 0,18%, 0,14% i 0,21% en *E. coli*, *K. pneumoniae* i *Salmonella* respectivament. Una freqüència molt baixa si es compara amb altres estudis. Álvarez *et al*¹¹⁴ van trobar una prevalença de cefamicinases plasmídiques als Estats Units de 8,5% en *K. pneumoniae*, 6,9% en *K. oxytoca* i 4% en *E. coli*, amb els enzims ACT-1, FOX-5, CMY-2 i DHA-1. Yum *et al*¹¹⁵ van estudiar soques de *K. pneumoniae* aïllades en mostres respiratòries del 2002 al 2003 a Korea, obtenint una prevalença del 10,7%, els enzims trobats van ser CMY-2 i DHA-1. Al igual que en les BLEA, la pressió antibiòtica a fet que es descriguin aquests enzims en altres hàbitats

com els animals. Winokur *et al*¹¹⁶ troben una prevalença de CMY-2 del 15,6% en soques de *Salmonella* aïllades de femtes de vaques i porcs, mentre que la prevalença en portadors humans era del 0,6%. Zhao *et al*¹¹⁷ van aïllar 21 soques de *Salmonella* i 54 d'*E. coli* portadores d'una cefamicinasa plasmídica tipus CMY a partir de vaques, porcs i aus, així com de productes d'origen animal com la carn picada. Briñas *et al*⁹⁷ al 2003 descriuen una soca d'*E. coli* portadora de CMY-2 a partir de femta de pollastres sans. I els mateixos autors al 2005⁹⁸ descriuen una prevalença de CMY-2 en *E. coli* a partir d'animals malalts del 0,2% i a partir de femta de pollastres sans del 1,2%.

Aquests estudis ens posen de manifest que a pesar de trobar-se en una prevalença baixa en humans, aquest tipus de betalactamases poden jugar un paper important, doncs també s'han trobat en diferents hàbitats. I a diferència de les BLEA sembla que hi ha un enzim predominant, la cefamicinasa CMY-2.

1.8 Carbapenemases

Les carbapenemases són enzims que poden hidrolitzar tots els betalactàmics, inclosos l'imipenem i el meropenem. Se n'han descrit de tres classes, uns pertanyen a la classe A d'Ambler, altres a la classe B i altres a la classe D.

Els enzims de classe A descrits en *Enterobacteriaceae* són NMC-A¹¹⁸ i IMI¹¹⁹ en *E. cloacae*, SME-1 a SME-3 en *S. marcescens*¹²⁰, GES-3 a GES-4 en *K. pneumoniae*^{121,122} i *E. coli*¹²², i KPC-1 a KPC-3 en *K. pneumoniae*¹²³⁻¹²⁵, *Salmonella*¹²⁶, *K. oxytoca*¹²⁷, *Enterobacter* spp.¹²⁸ i *E. coli*¹²⁹.

Els enzims de classe B descrits en enterobacteris pertanyen a la classe molecular B1 d'Ambler i 3a de Bush. És el cas de l'enzim IMP-1 descrit per primer cop al 1991¹³⁰ en soques de *S. marcescens* i trobada des d'aleshores, també en una soques de *K. pneumoniae* al Japó¹³¹. Es tracta d'un enzim emparentat amb les betalactamases

cromosòmiques d'*Aeromonas*, *Bacillus* i *Flavobacterium* de les que probablement ha derivat¹³². Un altre metal·loenzim és VIM-1 que va ser descrit per primer cop en una soca de *P. aeruginosa* a Itàlia al 1999¹³³. En l'actualitat hi ha 14 tipus de VIM descrites en diferents enterobacteris i *P. aeruginosa*¹³⁴⁻¹⁴⁴. Casos descrits d'enterobacteris portadors de carbapenemasa de classe B d'Ambler hi ha una soca de *K. pneumoniae* portadora de VIM-1 a Grècia¹⁴⁵, França¹⁴⁶ o Espanya¹⁴⁷. Finalment, les carbapenemases de la classe D, que pertanyen als enzims tipus OXA i de les quals s'han trobat diferents enzims^{79,148}. Aquests enzims s'han trobat sobretot en bacils gram negatius no fermentadors com *A. baumannii* o *P. aeruginosa*. En enterobacteris se n'han descrit en *P. mirabilis*¹⁴⁹ i *K. pneumoniae*¹⁵⁰.

Al principi, la resistència a carbapenems només fou descrita en algunes espècies de bacils gramnegatius no fermentadors, com *P. aeruginosa* o *A. baumannii*, però cada cop es descriuen més en enterobacteris, encara que de manera casual. Tot i aquesta infreqüència en enterobacteris, l'aparició de metal·loenzims és preocupant, donat que aquests enzims generalment estan codificats per gens localitzats en integrons que tenen una gran mobilitat i poden disseminar-se a diferents espècies. Diferents estudis alerten de la creixent incidència d'enterobacteris productors de carbapenemases^{79,150}.

Fora de l'àmbit hospitalari i estudiant aigües de rius dels Estats Units, Aubron *et al*¹⁵¹ descriuen l'expansió d'una clona d'*Enterobacter asburiae*, portador de la carbapenemasa plasmídica de classe A d'Ambler IMI-2.

1.9 Transmissió de la resistència

Un dels aspectes més preocupants de l'adquisició de resistències és la seva difusió en el món microbià. L'adquisició dels diferents mecanismes de resistència pot ser originada pel microorganisme mateix, fruit d'errors en la seva replicació, o per

l'adquisició de material genètic que codifiqui gens de resistència. En el primer cas estariem parlant de mutacions, que només difondran verticalment, és a dir, seran transmeses de cèl·lula mare a cèl·lula filla. L'adquisició de la resistència, en aquest cas, pot aparèixer bé en una sola generació, com és el cas de la resistència a rifampicina, o bé en el transcurs de diverses generacions, com en el cas de la resistència a fluoroquinolones. Les mutacions poden tenir lloc per substitució d'una base nucleotídica o per addició o pèrdua d'una o diverses bases. També poden tenir lloc per amplificació o còpia de múltiples segments de DNA, per inserció o escissió d'un segment mòbil de DNA que codifica o regula la seqüència d'un gen, o per inversió d'un segment.

També, existeixen una sèrie de mecanismes d'adquisició de material genètic mitjançant els quals la resistència pot ser difosa d'una cèl·lula a una altra (de la mateixa espècie o no), cosa que contribueix a la difusió horitzontal de la resistència als antimicrobians. Aquests mecanismes són la transformació, la transducció i la conjugació.

Transformació

Potser el més simple d'aquests mecanismes de transferència de gens és la transformació natural, que es va definir originàriament com l'habilitat d'algunes espècies bacterianes d'absorbir, sota determinades circumstàncies, molècules de DNA nu lliure de l'ambient, DNA provinent d'un bacteri donant. Aquest DNA serà adquirit per un bacteri receptor, que rebrà el nom de *transformador*, serà incorporat a la cèl·lula i, en expressar-se, podrà comportar un canvi fenotípic. Perquè el material genètic s'incorpori al genoma bacterià, després de travessar la membrana citoplasmàtica, i pugui, per tant, comportar un canvi fenotípic, és necessari que existeixin regions de

certa homologia entre el nou DNA incorporat per la cèl·lula i el del bacteri en qüestió. Si no existeix aquesta homologia, el DNA incorporat serà degradat; mentre que si existeix homologia, el nou DNA podrà ser incorporat mitjançant un procés de recombinació. De totes maneres, encara que el DNA exogen internalitzat ha d'integrar-se al cromosoma o a un plasmidi, també pot circularitzar-se (si conté un origen de replicació) i establir-se com un replicó autònom.

Com a resultat dels fenòmens de recombinació, es poden obtenir gens la seqüència dels quals està formada per múltiples fragments de diferents orígens, i es forma el que es denomina un *mosaic*. Un exemple de gen mosaic és el que confereix resistència a penicil·lina i a cefalosporines en *S. pneumoniae*. S'ha descrit, en soques resistents, una gran varietat de gens mosaic codificadors de les *penicillin-binding protein* (PBP), amb el nivell i grau de resistència determinat pel nombre i naturalesa de recombinacions gèniques¹⁵².

Perquè la cèl·lula pugui captar el DNA nu ha de trobar-se en un estat de «competència». Aquest estat de «competència» pot ocórrer naturalment (competència fisiològica) en alguns microorganismes com, per exemple, *B. subtilis*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* i diverses espècies de cianobacteris com el gènere *Synochococcus*¹⁵³, o bé pot ser induït artificialment en altres (competència artificial) per diferents mecanismes (CaCl_2 , polsos elèctrics, etc.). En qualsevol cas, perquè la transformació tingui lloc és necessari disposar de DNA lliure, principalment de doble cadena, que s'unirà a la cèl·lula mitjançant un receptor localitzat a la seva superfície¹⁵⁴.

Existeixen nombrosos exemples d'adquisició de resistències en microorganismes naturalment transformables d'interès clínic com la resistència a betalactàmics en *S. pneumoniae* (*pbp*), *Helicobacter pylori* (*pbp1A*) i neissèries (*penA*), la resistència a tetraciclina en *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma*

urealyticum i altres (*tetM*), la resistència a sulfamides i trimetoprim (*sul* i *dfr*) i potser la resistència a carbapenems en *P. aeruginosa* (*oprD*).

Transducció

Un altre dels mecanismes de difusió horitzontal de gens de resistència és la transducció. En aquest cas, la situació és semblant a l'anterior, però en lloc d'incorporar DNA lliure del medi, aquest DNA prové d'una cèl·lula prèviament infectada i serà transferit per partícules víriques o bacteriòfags a les noves cèl·lules que seran infectades.

Existeixen dos tipus de transducció:

a) **Transducció generalitzada.** Comença en el moment en què té lloc l'empaquetament accidental d'una porció de DNA bacterià en una partícula vírica normal. Encara que s'ha descrit que l'empaquetament del DNA víric comença per llocs específics del concatàmer víric, anomenats *pac*, i que aquests no es troben en el genoma bacterià, el fag pot, aparentment, reconèixer seqüències semblants, i es produeix així l'encapsidació errònia de DNA bacterià¹⁵³. Quan s'indueix la lisi cel·lular, s'allibera aquesta partícula transductora que, tot i que té la totalitat del seu DNA bacterià, és capaç d'adherir-se a una nova cèl·lula i injectar aquest DNA. Si existeixen regions homòlogues, aquest DNA transductor pot ser incorporat al genoma de la cèl·lula receptora. S'ha observat que aquest tipus de transducció pot tenir lloc tant amb fags temperats com pseudotemperats, i també mitjançant fags virulents¹⁵⁵. Aquests últims són els que produeixen el major nombre de partícules transductores. Alguns bacteriòfags que presenten aquest tipus de transducció són el P1 d'*E. coli* i el P22 de *S. enterica* serovar Typhimurium.

b) **Transducció especialitzada.** Es diferencia de la generalitzada en el fet que només poden transferir-se els gens que es troben flanquejant la regió on el fag temperat o lisogènic s'integra al cromosoma bacterià. Aquesta regió d'integració sovint es troba en

punts concrets del genoma i, per tant, els gens transduïts solen ser uns determinats¹⁵⁶. Per exemple, el lloc d'inserció del fag λ es troba, en *E. coli*, entre els gens *gal* i *bio*¹⁵³. No obstant això, la integració d'aquest fag en altres llocs secundaris pot comportar la transducció d'altres marcadors bacterians. L'escissió d'un fag no sempre és «perfecta»: en alguns casos pot tenir lloc una escissió anormal que provoca que part del genoma del fag arrossegui gens bacterians propers al punt on estava, i es formen fags defectius, anomenats fags o partícules *de transducció especialitzada*, que contindran tant DNA víric com bacterià. Una vegada el fag injecta el DNA transductant poden donar-se diferents situacions. En tots els casos, però, després de la injecció es produeix la circularització i superenrotllament del DNA transductor. Després, el DNA víric pot produir la replicació vírica mitjançant un cicle lític, pot mantenir-se inactiu i eliminar-se per segregació, o bé pot recombinar-se, per diferents vies, amb el material genètic bacterià.

Un dels primers exemples de transducció detectat en clínica va ser el de la transferència de gens de resistència a penicil·lina en *S. aureus*. En aquest cas, però, el bacteriòfag contribueix a la difusió de plasmidis de mida petita, que són encapsidats i transferits a altres bacteris. Així, els plasmidis seran autoreplicats i mantinguts sense necessitat de recombinació. El fet que el responsable d'aquesta resistència sigui un gen codificador d'una betalactamasa, que aquest s'hagi identificat freqüentment en plasmidis i que durant molt de temps s'hagin descrit amb detall diversos bacteriòfags en aquest grup de microorganismes, ha permès especular que l'elevada prevalença de producció de betalactamases en estafilococs prové de la transferència d'aquests plasmidis a través de bacteriòfags¹⁵⁷. Altres exemples són la detecció de gens que confereixen resistència a betalactàmics, com són els gens *bla_{OXA}* i *bla_{PSE}*, en DNA fàgic obtingut a partir d'aigües residuals, tant humanes com animals, a la província de

Barcelona¹⁵⁸ o la implicació d'aquests en la transferència de determinants de virulència^{159,160}.

Conjugació

El darrer mecanisme de difusió horitzontal de la resistència és la conjugació, procés de transferència de gens entre dues cèl·lules que estan en contacte. Aquest tipus de transferència de gens és possible gràcies als *plasmidis*. Els plasmidis són molècules circulars de DNA de doble cadena, superenrotllades negativament (tot i que també se'n troben de lineals en *Borrelia* i alguns actinomicets)¹⁵³. Són literalment material genètic accessori. No codifiquen funcions essencials per a la cèl·lula i la seva mida pot variar entre poques i centenars de quilobases, i poden transportar des d'únicament els gens necessaris per la seva replicació fins a centenars de gens addicionals; llavors es consideren com a «mini-cromosomes»¹⁶¹. Els plasmidis es repliquen autònomament (replicons), independentment del cromosoma de la cèl·lula¹⁶². Presenten un origen de replicació (*oriV*) i algunes de les proteïnes necessàries per a iniciar la replicació, tot i que dependran de la cèl·lula hoste per a replicar-se, ja que necessitaran l'aport extern de DNA polimerases, ligases, helicases, etc.

Alguns plasmidis presenten un rang d'hostes força estret, mentre que altres són capaços de transferir-se i replicar-se dins una gran varietat d'espècies bacterianes diferents¹⁶³. Els plasmidis poden també integrar-se dins el cromosoma de la soca receptora (cèl·lules *Hfr*), tot incrementant així l'estabilitat de la informació genètica que transporten¹⁶⁴, replicant-se com qualsevol altre caràcter cromosòmic. Els plasmidis conjugatius són potser més freqüents o, com a mínim, més estudiats, en bacteris gramnegatius (gèneres *Escherichia* i *Pseudomonas*)¹⁵³. El procés de la conjugació s'inicia quan el pili sexual de la cèl·lula donant, format per les proteïnes sintetitzades pels gens *traA* i *traQ*, entra en contacte amb la membrana d'una cèl·lula receptora. El

contacte cèl·lula-cèl·lula s'aconsegueix, presumiblement, bé per la contracció o pel desacoblament del pili sexual. L'aparellament entre les dues cèl·lules és, en un principi, inestable, però després s'estabilitza específicament mitjançant les proteïnes TraG i TraN. Posteriorment, altres gens *tra* s'encarregaran de la transferència del plasmidi a través de les membranes, mitjançant la formació d'un relaxosoma (complex format per DNA i proteïnes) al voltant de l'origen de transferència (*oriT*) del plasmidi. Aquest complex realitzarà un tall i és la cadena simple de DNA, creada pel tall, la que es transferirà. Un altre complex de proteïnes connectarà i estabilitzarà la cèl·lula receptora amb la donant, i el pili col·laborarà en el manteniment de l'aparellament^{153,165}. En bacteris grampositius (*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* i *Streptomyces*) l'agregació de cèl·lules receptores no està mitjançada pel pili sinó per mitjà d'una sèrie de substàncies d'agregació i feromones, ja que aquests microorganismes no tenen l'elaborada membrana externa dels bacteris gramnegatius¹⁵³. Es desconeix com es desestabilitza l'aparellament i com se separen les cèl·lules. La cèl·lula receptora que ha rebut DNA com a resultat d'una conjugació rep el nom de *transconjugant*¹⁵³.

Elements mòbils

El terme *elements mòbils* o *elements genètics mòbils* (*mobile genetic elements*, MGE) fa referència a seqüències de DNA que tenen la capacitat de moure's entre cèl·lules o entre molècules de DNA. Poden ser petits (≈ 1 kb) o grans (centenars de kb). Tradicionalment, els elements genètics mòbils es classificaven en bacteriòfags, plasmidis (ambdós comentats prèviament), transposons, seqüències d'inserció i gens *cassette*. Aquesta classificació s'ha modificat a causa de la identificació d'uns elements quimèrics anomenats *illes genòmiques*. Fer una classificació sistemàtica dels elements mòbils resulta difícil, ja que molts cops és difícil trobar una relació filogenètica entre

aquests. Són elements àmpliament distribuïts, extremadament diversos i en contínua evolució. Un subgrup dintre dels elements mòbils, anomenat *elements transposables*, el formarien les seqüències d'inserció¹⁶⁶, els transposons i els bacteriòfags transposables (p. ex.: el bacteriòfag Mu)¹⁶⁷, ja que tenen la capacitat de moure's d'un replicó a un altre mitjançant la transposició. La transposició és una reacció de recombinació de material genètic que es dona com a resultat de la translocació d'un segment de DNA discret, anomenat *element transposable* o *transposó*, des d'un lloc del genoma a un altre. La transposició és una recombinació no homòloga però sí especialitzada, no necessita una homologia entre l'element transposable o l'antic lloc d'inserció i el nou lloc d'inserció, però es dona en llocs específics, dianes reconegudes per unes recombinases especialitzades, anomenades *transposases*¹⁶⁸. Es poden donar dos tipus de transposició: la replicativa, com en el cas del transposó Tn3 i del fag Mu, i la no replicativa, com en la majoria de seqüències d'inserció i transposons compostos com el Tn5, Tn9 o Tn10¹⁶⁹. La transposició replicativa dona com a resultat una duplicació del transposó i, per tant, un increment del nombre de còpies d'aquest dins la cèl·lula. El resultat d'aquesta acció és una regeneració del replicó donador, amb una còpia del transposó, i l'aparició d'una nova còpia del transposó al replicó receptor. En canvi, en la transposició no replicativa el transposó s'escindeix del DNA d'origen sense deixar cap còpia i s'insereix a la nova diana.

Seqüències d'inserció

Els transposons més petits són les seqüències d'inserció (IS). Oscil·len entre 760 i 2.500 pb. Tenen dues repeticions invertides (IR) curtes (9-41 pb) a cada extrem (amb l'excepció de les famílies IS91, IS110 i la IS200/605) i un o diversos *open reading frames* (ORF) o *pautes obertes de lectura*, que codifiquen la transposasa¹⁷⁰ i, en alguns

casos, també com a funció reguladora de la transcripció d'aquesta¹⁷¹. Normalment es troben múltiples còpies d'una mateixa IS al mateix genoma¹⁷². Una característica pròpia de les IS és la generació de seqüències repetides directes (DR) al lloc diana on s'insereixen¹⁶⁸. La llargada de les DR, entre 4 i 14 pb, és característica de cada IS, tot i que també existeixen excepcions com la IS91, que no forma repeticions directes en inserir-se en la nova diana¹⁷³ o com les IS1549, IS1634 o IS1630, que formen llargues DR amb llargades variables¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. La transposició de les IS normalment és mantinguda en una baixa freqüència, per tal d'evitar un efecte letal per a la cèl·lula¹⁷⁷. En moltes ocasions s'ha vist com una IS pot actuar com a activadora de l'expressió del gen del costat. Alguns exemples serien la IS21¹⁷⁸, la IS30¹⁷⁹ o la IS257¹⁸⁰.

Transposons

Els transposons (Tn) es caracteritzen per la seva capacitat de moure's dins del genoma bacterià mitjançant recombinació no homòloga, i poden saltar d'un lloc a l'altre del cromosoma o del plasmidi. Aquesta activitat transposasa roman molt regulada ja que, igual que passava amb la transposició de les seqüències d'inserció, un elevat índex de transposició seria letal per a la cèl·lula. Els transposons es classifiquen en transposons compostos o de classe 1 i transposons no compostos o de classe 2. Els transposons compostos són segments de DNA flanquejats per dues seqüències d'inserció iguals o molt similars, que poden estar orientades en el mateix sentit o invertides. Perquè es pugui portar a terme la transposició només cal que una de les dues IS codifiqui una transposasa (TnpA). Entre les dues IS es troben diferents gens amb funcions molt variades.

Els transposons no compostos o de classe 2 no tenen seqüències d'inserció als extrems. Es caracteritzen per tenir a banda i banda repeticions invertides (*inverted*

repeats, IR) que oscil·len entre 30 i 50 pb. Entre aquestes es troben una sèrie de gens que codifiquen una o més funcions necessàries per a la transposició (*tnp*), però, a més a més, igual que els transposons compostos, tenen també altres gens addicionals.

També trobem un tipus de transposons capaços de conjuguar. Són *transposons conjugatius*, els quals poden transferir-se per si mateixos d'una cèl·lula a una altra, ja que disposen dels gens necessaris per a dur a terme aquesta funció. Per a transferir-se d'una cèl·lula a una altra primer s'escindeixen i circularitzen, una de les cadenes és transferida a l'altra cèl·lula des de l'*oriT* i un cop allà se sintetitza la cadena complementària, i forma de nou una estructura circular capaç d'integrarse al genoma del nou hoste. Sembla ser que aquesta classe de transposons conjugatius són els principals responsables de la disseminació de resistències a antibiòtics en soques d'estreptococs i en altres bacteris grampositius.

Integrans i gens cassette

Formant part d'estructures mòbils o situats al cromosoma trobem unes altres estructures que tenen un paper molt important en la captació i mobilització gènica: els integrans (In). Els integrans foren descrits a principis dels anys vuitanta, quan la seqüenciació de diferents gens de resistència va revelar una seqüència comuna en la regió 5' que contenia un promotor i un gen codificador d'una integrasa, similar a les descrites en els bacteriòfags. Els integrans s'han disseminat àmpliament entre moltes espècies de microorganismes. Estan formats per tres elements necessaris per a la captura i expressió de gens exògens: un gen que codifica una integrasa (*intI*), un lloc de recombinació específic (*attI*) i un promotor (P_{ant}) per a l'expressió dels gens *cassette* adjacents (Figura 12). A vegades contenen un segon promotor més fort (P2), localitzat adjacentment al primer. Els gens que són incorporats als integrans tenen una estructura particular i han estat denominats *gens cassette*. La integració es produeix per un

mecanisme de recombinació específica de lloc a l'*attI* en el qual els gens capturats són integrats gràcies a l'acció de la integrasa *IntI*.

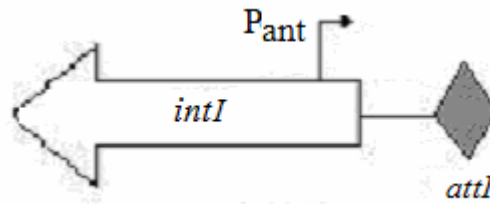


Figura 12: Esquema de l'estructura conservada en tots els integrons. *intI* gen codificador de la integrasa. P_{ant} promotor del integró responsable de l'expressió dels gens casset. *attI* lloc de recombinació específic.

Els gens *cassette* capturats pels integrons són molècules de DNA no replicatives que es troben com a DNA circular lliure, i són, per tant, un altre tipus d'element mòbil, però també es poden trobar integrats, formant part d'una molècula de DNA (plasmidi o cromosoma) com a seqüències lineals. Aquests gens *cassette*, generalment, inclouen un únic gen i en posició posterior presenten una seqüència de recombinació específica, coneguda com a *attC* o element de cinquanta-nou bases (59-be), la qual permet el seu reconeixement i mobilització per part de la integrasa de l'integró¹⁸². Normalment no contenen promotors; per tant, un cop integrats, s'expressen utilitzant el promotor de l'integró. La transcripció dels gens *cassette* inserits en l'integró s'inicia a partir d'un mateix promotor i tots són transcrits en un mateix RNA missatger, i es dona una relativa disminució de la transcripció en els gens més distals. La inserció o escissió dels *cassettes* dins l'integró té un paper important en la disseminació i la formació de noves combinacions de gens de resistència als antibiòtics. El fet que molts integrons posseeixin més d'un gen *cassette* de resistència, juntament amb el fet que molts estan localitzats en elements genètics, com per exemple transposons o plasmidis, que porten determinants de resistència, fa que la selecció a través d'un d'aquests determinants de resistència antimicrobiana seleccioni els altres (selecció en *autostop*)¹⁸³.

La classificació dels integrons es basa en la seqüència codificadora de la integrasa. Actualment se'n coneixen deu classes¹⁸⁴, tot i que la denominació de les integrases a partir de la *IntI4* és confusa¹⁸¹. Els integrons de classe 1 són els que es troben amb major freqüència en soques clíniques. Es caracteritzen per tenir una seqüència 5' conservada (5'-CS) que conté el gen codificador de la integrasa. També tenen una seqüència 3' conservada (3'-CS) que inclou el gen que dona resistència a components d'amoni quaternari (*qacEΔ1*) i el gen de resistència a sulfamida (*sul1*); aquests dos gens de resistència no són *cassettes*, sinó que es troben fixos a l'integró. La longitud d'aquesta regió anomenada 3'-CS és variable en el seu extrem 3', com s'ha descrit en In1, In5 i In10. També s'han caracteritzat integrons de la classe 1 que presenten deleccions en aquesta regió 3'-CS, com per exemple els integrons localitzats en el Tn5086 i en el Tn5090. Així doncs, el contingut i l'extensió del segment 3'-CS pot diferir en cada integró¹⁸⁵.

Mentre que la majoria dels integrons de la classe 1 tenen l'estructura descrita anteriorment, darrerament s'han descrit integrons inusuals: l'In6, In7¹⁸⁶, un integró descrit en el plasmidi pSAL-1 de *S. enterica* serovar Enteritidis que conté el gen de resistència a betalactàmics *bla_{DHA-1}* i el seu regulador *ampR*¹¹², l'In60 portador de la betalactamasa CTX-M-9¹⁸⁷, l'In35 portador de la betalactamasa CTX-M-2¹⁸⁸, l'In36 i l'In37 portadors del gen de resistència a quinolones *qnr* i el gen *bla_{DHA-1}*¹⁸⁹, etc. Aquests integrons són inusuals perquè contenen una segona còpia del segment 3'-CS. Tots aquests integrons tenen un segment comú de 2,1 kb localitzat entre les dues repeticions 3'-CS, que conté l'*orf513* (també anomenat CR1), raó per la qual s'anomenen *integrons compostos de classe 1* o *integrons portadors del CR1*.

Illes genòmiques

A més dels bacteriòfags, els plasmidis, els transposons, les seqüències d'inserció, els integrons i els gens *cassette*, trobem uns altres elements que tenen un paper molt important en el moviment del material genètic: són les illetes genòmiques (< 10 kb) o illes genòmiques (GEI) (> 10 kb). Tots aquests elements mòbils formen part d'un *pool* flexible de gens que es caracteritzen per codificar funcions no essencials per a la cèl·lula però que li confereixen avantatges enfront de condicions particulars. Normalment, tenen un contingut de G+C i una pauta de lectura diferents respecte al cromosoma bacterià. Les illes genòmiques transporten *clusters* de gens amb funcions específiques que són incorporats al nou DNA en bloc. Les illes genòmiques poden subdividir-se en diferents grups segons els avantatges que li confereixen al nou hoste: illes ecològiques en els microorganismes ambientals, illes saprofítics, illes de simbiosi o illes de patogenicitat (PAI) en microorganismes que interaccionen amb el seu hoste. S'han localitzat al cromosoma bacterià, tot i que també s'han descrit casos de localització plasmídica. Es creu que provenen de plasmidis o bacteriòfags que han perdut els gens necessaris per a la replicació autònoma i la transferència¹⁹⁰, encara que també s'ha vist que en moltes ocasions transporten gens que els confereixen activitats de transferència, recombinació i restricció. Les illes genòmiques es caracteritzen per transportar gens que confereixen avantatges adaptatius o de patogenicitat a la cèl·lula on s'insereixen, com poden ser la producció de toxines, factors d'adherència, la degradació de fenols, la resistència a antibiòtics com la meticil·lina (SCC*mec*), la fixació de nitrogen, l'expressió d'adhesines, etc. Tot i que en la majoria de casos es desconeix el mètode exacte de transferència d'aquestes illes, una variant de particular interès és l'illa que conté el gens que codifiquen la toxina del xoc tèrmic en *S. aureus*, que pot ser transferida entre soques mitjançant un fag auxiliador¹⁹¹. Altre exemple en que la

transferència de l'illa genòmica encara és més clara és en el cas de l'element SXT de *Vibrio cholerae* (que confereix la resistència a quatre antibiòtics diferents)¹⁹².

2. CRONOLOGIA

L'expansió de la resistència a múltiples antibiòtics és des de fa dècades un problema en l'àrea de la salut, que s'ha vist agreujat pel sorgiment de bacteris multirresistents.

La família dels betalactàmics és la més àmplia dins l'arsenal terapèutic i la més emprada en clínica. El principal mecanisme de resistència a aquests antimicrobians és l'adquisició d'enzims hidrolítics, les betalactamases. Dins l'àmbit hospitalari les betalactamases que han adquirit més importància han estat les betalactamases d'espectre ampliat (BLEA), les cefamicinases i les carbapenemases. Les BLEA són enzims que hidrolitzen la pràctica totalitat de betalactàmics, a excepció de les cefamicines i carbapenems. Les cefamicinases, incrementen els seu espectre i l'únic que no hidrolitzen són els carbapenems, i, les carbapenemases són capaces d'hidrolitzar la totalitat de betalactàmics. Les BLEA a més, s'han descrit com a causants de diferents brots nosocomials arreu.

El fet que en un hospital s'estableixi una soca que desencadeni un brot epidèmic depèn de molts factors. Factors que faciliten la transmissió (mans i fomites); factors que faciliten l'acció patògena, com malalts amb una patologia de base greu, o amb llargs períodes d'hospitalització. Però també intervé el fet que el pacient estigui colonitzat per aquestes soques. És per això que entre els anys 2001 i 2002 es realitzà un estudi per a determinar la prevalença de BLEA en pacients que acudien al Servei d'Urgències del nostre hospital. Posteriorment vingué la caracterització d'aquests enzims tant per a descartar la presència d'uns tipus determinats de clones com per a determinar quin era l'enzim més freqüent i comparar-ho amb els provinents de malalts ingressats (**ARTICLE I**).

Paral·lelament, en la bibliografia, es començaren a descriure en les femtes, tant d'animals malalts com d'animals sans per al consum humà, BLEA i cefamicinases. El flux de les soques resistents des dels animals a l'home podria tenir lloc per contacte directe, però probablement la via més eficaç de difusió sigui a través dels aliments.

Aquests fets suggerien que és necessari augmentar el coneixement sobre la prevalença de BLEA, cefamicinases plasmídiques i carbapenemases en soques aïllades de clínica y de portadors fecals, així com d'altres hàbitats, amb l'objectiu de localitzar els possibles reservoris d'aquests enzims, i determinar el possible flux existent entre ells (**ARTICLE II**). La caracterització d'aquests enzims es presenta també en aquesta tesi i serà fruit d'una nova publicació.

Finalment, fruit d'aquests estudis s'ha pogut avaluar diferents mètodes per a la detecció de les cefamicinases adquirides. Aquests enzims podem passar desapercibuts en aquelles espècies que ja presenten una cefalosporinasa cromosòmica, la hiperproducció de la qual confereix el mateix patró de resistència que una cefamicinasa plasmídica. L'observació en l'antibiograma de colònies que salten dins l'halo d'inhibició en soques productores de cefamicinases plasmídiques en pot facilitar la seva detecció (**ARTICLE III**).

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1 Estudi de prevalença i caracterització de les BLEA presents en soques aïllades de mostres clíniques i de portadors fecals a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau durant el període 2001-2002. (Article I)

La presència de soques multirresistents en la flora comensal de persones sanes és un fet descrit, i ho és també quan es parla de betalactàmics i betalactamases^{193,194}. No es coneix però la prevalença de portadors de soques amb BLEA. Per tal de determinar aquesta prevalença i comparar-la amb l'obtinguda de soques aïllades de mostra clínica es van avaluar totes les soques d'origen clínic aïllades durant el bienni 2001-2002 i les soques aïllades de femta de pacients que arribaren al Servei d'Urgències de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, obtingudes en tres períodes dins del mateix bienni.

Provinents de diferents mostres clíniques de malalts es varen estudiar 5.251 soques d'enterobacteris, 2.878 foren aïllades al 2001 i 2.373 al 2002. D'aquestes, 3.177 van ser *E. coli*, 361 *K. pneumoniae*, 113 *K. oxytoca*, 379 *P. mirabilis*, 17 *P. vulgaris*, 3 *P. penneri*, 106 *M. morganii*, 11 *Providencia* spp., 260 *E. cloacae*, 93 *E. aerogenes*, 84 *S. marcescens*, 67 *C. freundii*, 45 *C. koseri*, 498 *S. enterica* i 37 *Shigella* spp..

De les 5.251 soques 89 foren productores de BLEA, 35 s'aïllaren al 2001 i 54 al 2002, el que suposa una prevalença global del 1,7% (1,2% al 2001 i 2,2% al 2002). *E. coli* ha estat l'espècie amb major prevalença, 2,6% (84/3177), seguida de *C. freundii* amb un 1,5% (1/67) i *K. pneumoniae* amb un 1,1% (4/361).

La prevalença de BLEA s'estudia a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau des de 1994. En el primer període d'estudi, que va del 1994 al 1996⁹¹ es va observar una prevalença d'enterobacteris portadors de BLEA del 0,14% en soques d'*E. coli* i del 0,17% en *K. pneumoniae*. En un període posterior, del 1997 al 1999 es va trobar una prevalença del 0,45% en *E. coli* i del 1,45% en *K. pneumoniae*.

Espècie	Enzim	2001	2002
<i>E. coli</i>	CTX-M-1	2 (5,7%)	4 (7,4%)
	CTX-M-2	1 (2,8%)	
	CTX-M-9	15 (42,8%)	16 (29,6%)
	CTX-M-14	6 (17,1%)	17 (31,5%)
	CTX-M-32		1 (1,8%)
	CTX-M-9 + SHV-12	8 (22,8%)	6 (11,1%)
	SHV-2	1 (2,8%)	
	SHV-12		6 (11,1%)
	TEM-19	1 (2,8%)	
	TEM-104	1 (2,8%)	
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-1	1 (2,8%)	
	CTX-M-9	1 (2,8%)	
	SHV-2	1 (2,8%)	
	SHV-12		1 (1,8%)
<i>C. freundii</i>	CTX-M-3		1 (1,8%)

Taula 2: Caracterització de les BLEA per any i per espècie.

Aquest increment entre els períodes 1994-1999 i 2001-2002 es deu a l'augment de prevalença de les CTX-M i a l'aparició de les SHV-12. En el període 2001-2002, la família CTX-M ha estat la més freqüent amb un 87,6%: 75 soques d'*E. coli*, 2 de *K. pneumoniae* i 1 de *C. freundii* (Taula 2). L'enzim més freqüent va ser CTX-M-9, trobat sol en 31 soques i associat amb SHV-12 en 14. La segona BLEA més freqüent va ser CTX-M-14, present en 23 soques. Finalment, també es van trobar set soques productores de CTX-M-1, una de CTX-M-2, una de CTX-M-3 i una de CTX-M-32.

La primera CTX-M descrita al nostre hospital va ser CTX-M-9 produïda per una soca d'*E. coli* aïllada al 1996¹⁹⁵. Aquest ha estat l'enzim prevalent fins al 2003 quan va ser desplaçat per CTX-M-14, que fou descrit per primer cop al nostre hospital al 1999 i des de aleshores hem observat com el número de soques portadores d'aquest enzim s'ha

triplicat, respecte el 2002 (10% *versus* 31,5%). També en aquest període es pot veure un increment en la diversitat d'enzims tipus CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3 i CTX-M-32). Aquesta diversitat no ha estat descrita per Briñas *et al*¹⁹⁶, on en un estudi dut a terme del 2002 al 2003 a l'Hospital Universitari Central d'Astúries, només trobaren una soca productora de CTX-M-32, essent l'enzim més freqüent CTX-M-14. Romero *et al*¹⁹⁷ a l'estudiar les soques productores de BLEA en *E. coli* i *K. pneumoniae* del 1995 al 2003 al sud de l'Estat Espanyol trobaren que la majoria de soques de *K. pneumoniae* produïen SHV (97%), mentre que les soques d'*E. coli* produïen, en una proporció similar, CTX-M i SHV (46% i 44%, respectivament). El 97% dels enzims CTX-M van ser CTX-M-14 i el 3% CTX-M-9. Hernández *et al*⁹⁰ al determinar la prevalença de BLEA a l'àmbit hospitalari van recollir les soques d'*E. coli* i *K. pneumoniae* portadores de BLEA de març a juny del 2000 de 40 hospitals de l'Estat Espanyol, els enzims caracteritzats, van mostrar que en *E. coli* l'enzim més freqüent va ser la CTX-M-9 (27,3%), seguit de SHV-12 (23,9%) i com a tercer la CTX-M-14 (20,5%).

En el nostre estudi les SHV representen un 25,8% dels enzims totals: 21 en *E. coli* i 2 en *K. pneumoniae*. L'enzim principal fou SHV-12, aïllat en solitari en 7 soques i associada amb CTX-M-9 en 14. Totes les soques productores de SHV-12 aïllades al 2001 i el 50% de les aïllades al 2002 també produïen l'enzim CTX-M-9. També es van trobar dues soques productores de SHV-2. Briñas *et al*¹⁹⁶ trobaren tres soques productores de SHV-12 (de 22 soques productores de BLEA) essent el tercer enzim més freqüent. Romero *et al*¹⁹⁷ troben que el 80,5% de les SHV van se SHV-12, el 18% SHV-4 i el 1,5% SHV-2a. Hernández *et al*⁹⁰ van trobar una prevalença de SHV-12 del 23,9%, essent aquest enzim el segon més aïllat després de CTX-M-9. Així doncs, podem veure com la prevalença de SHV-12 respecte de les BLEA tipus SHV clàssiques (SHV-2,

SHV-4, SHV-5) és força elevada, donant idea que aquest enzim sembla el predominant, no només a l'Estat Espanyol sinó també a nivell europeu¹⁹⁸.

En aquest estudi, la presència de BLEA tipus TEM va ser baixa, 2,2%, que correspon a 2 soques d'*E. coli*, ambdues aïllades al 2001, una produïa TEM-19 i l'altre TEM-104. La presència d'aquests enzims ha estat sempre puntual^{196,197}, a excepció de l'estudi de Hernández *et al*⁹⁰ en que els enzims més freqüents en *K. pneumoniae* van ser TEM-4 (25%) i TEM-3 (16,7%).

Per tant, de les soques aïllades de mostra clínica l'enzim predominant ha estat la CTX-M-9 seguida de la CTX-M-14 i la SHV-12, enzims també destacats a la resta de l'Estat. En canvi la prevalença de BLEA tipus TEM és rara a diferència d'altres regions on hi ha un predomini de TEM-3 i TEM-4.

La determinació de la prevalença de portadors fecals d'enterobacteris amb BLEA en pacients que acudien al Servei d'Urgències de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau es feu en tres períodes; de febrer a maig del 2001, d'abril a juny del 2002 i a l'octubre del 2002. En total es varen avaluar 1.321 portadors fecals, 707 al primer període, 454 al segon i 160 al tercer. En cap no es va documentar cap hospitalització en els tres mesos previs a l'obtenció de la mostra. De les 1.321 femtes, en 44 es va aïllar una soca productora de BLEA, el que suposa una prevalença del 3,3% (44/1.321). Desglossat en els diferents períodes trobem una prevalença del 2,1% al primer període (17/707), del 3,8% al segon (17/454) i del 7,5% al tercer (12/160). De les 44 soques productores de BLEA, 42 van ser *E. coli*, una *P. mirabilis* i una *E. cloacae*. No es va aïllar cap soca de *K. pneumoniae* productora de BLEA. Així doncs, la prevalença de soques productores de BLEA en mostres fecals va ser superior a l'observada en les mostres clíniques al mateix període (1,7% versus 3,3%).

El resultat de la caracterització de les BLEA produïdes per les soques aïllades en portadors fecals es pot observar a la taula 3.

	Enzim	Soques	Prevalença
Febrer-Maig 2001	CTX-M-3	1	2,3%
	CTX-M-9	9	20,4%
	CTX-M14	1	2,3%
	CTX-M-15	1	2,3%
	SHV-12	2	4,5%
	PER-1	1	2,3%
Abril-Juny 2002	CTX-M-1	1	2,3%
	CTX-M-9	7	15,9%
	CTX-M-14	1	2,3%
	CTX-M-15	1	2,3%
	CTX-M-29	2	4,5%
	CTX-M-34	1	2,3%
	SHV-2	1	2,3%
	SHV-12	3	6,8%
Octubre 2002	CTX-M-9	2	4,5%
	CTX-M-14	3	6,8%
	CTX-M-15	2	4,5%
	CTX-M-29	1	2,27%
	SHV-12	4	9,1%

Taula 3: Caracterització de les BLEA aïllades en portadors fecals en els tres períodes de temps avaluats.

De les 44 soques productores de BLEA trobades, 33 produïen una CTX-M (75%). La caracterització de les BLEA mostra que el 69,7% pertanyen al grup de la CTX-M-9: 18 CTX-M-9 i cinc CTX-M-14, mentre que la resta d'enzims pertanyia al grup de la CTX-M-1: una CTX-M-1, una CTX-M-3, quatre CTX-M-15, tres CTX-M-29 i una, la nova CTX-M-34 (GenBank AY515297). A part de les CTX-M, la

betalactamasa SHV-12 va ser detectada en 9 soques (20,4%). La soca d'*E. cloacae* expressava una SHV-2 i la soca de *P. mirabilis* una PER-1.

La soca productora de la nova CTX-M-34 va ser aïllada a l'abril del 2002 en una dona de 27 anys. Aquesta soca a més de la resistència als betalactàmics presentava resistència a l'àcid nalidíxic i a diferència de les altres soques productores de BLEA no era multiresistent, es mantenia sensible a fluoroquinolones, aminoglicòsids, tetraciclina i cloramfenicol. L'enzim mostrà un punt isoelèctric proper a 8.2 i preferència per cefotaxima com a substrat. Aquest enzim té un canvi de base G721T amb el gen *bla*_{CTX-M-10} (GenBank AAT68658) que comporta el canvi aminoacídic Glu241Cys.

La soca de *P. mirabilis* productora de PER-1 es va aïllar al primer període i va suposar el primer aïllament d'aquest enzim a l'Estat Espanyol. Pagani *et al*¹⁹⁹ van recollir les soques de *P. mirabilis* productores de betalactamasa durant 1997 a un hospital de Pavia, Itàlia, i van trobar que el 48% eren productores de PER-1. A França, a la regió d'Auvergne, De Champs *et al*²⁰⁰ han trobat aquest enzim com a única BLEA present en soques de *P. aeruginosa* aïllades de mostres clíniques del 2001 al 2002.

La proporció dels diferents tipus de BLEA trobats en clínica i en portadors fecals va ser similar, essent les CTX-M els enzims amb més prevalença en ambdós contextos. També fem èmfasis en l'absència de BLEA tipus TEM en portadors fecals. La ràpida emergència de les CTX-M com les BLEA predominant en portadors fecals no es un fenomen aïllat^{92-94,201}. Ja hem descrit que diferents elements, com plasmidis, seqüències d'inserció, transposons o integrons, poden estar involucrats en la mobilització dels gens CTX-M. Aquests elements poden portar a més, gens de resistència a altres antibiòtics, incloent sulfonamides, trimetoprim, aminoglicòsids, tetraciclina i cloramfenicol. Quan vàrem analitzar la resistència a aquests antimicrobians vàrem observar que totes les soques, excepte la soca d'*E. coli* productora de CTX-M-34, mostraven resistència a

múltiples antibiòtics. Moltes soques productores de CTX-M-9, CTX-M-14 i SHV-12 eren resistents a estreptomicina, sulfonamides, trimetoprim i àcid nalidíxic. (veure punt 3.2.8).

Una possible hipòtesi que expliqués la difusió de les soques portadores de BLEA per la comunitat és a través del consum d'aliments d'origen animal, on hi ha una selecció de la flora comensal i d'enteropatògens zoonòtics fruit d'una pressió antibiòtica selectiva⁹⁹. Prats *et al*¹⁰⁰, descriuen la probable transmissió entre la comunitat, a través de l'aliment, d'una soca d'*E. coli* productora de BLEA i cefamicinasa. Fruit d'aquesta hipòtesi es va plantejar l'estudi de determinar la prevalença de BLEA, cefamicinases i carbapenemases en diferents ecosistemes relacionats amb l'home.

3.2 Estudi de prevalença i caracterització de les BLEA, cefamicinases i carbapenemases presents en soques aïllades en diferents ecosistemes. (Articles II i III)

3.2.1 Prevalença i caracterització de BLEA, cefamicinases i carbapenemases en mostres clíniques als Hospitals de Vall d'Hebron i de la Santa Creu i Sant Pau.

S'han estudiat un total de 8.020 soques d'enterobacteris, provinents de mostres clíniques recollides durant l'any 2003 dels Hospitals Vall d'Hebron i de la Santa Creu i Sant Pau. La prevalença de soques que expressen una BLEA fou del 1,9% (155/8.020); de soques portadores de cefamicinasa fou del 0,04% (3/8.020); i, no es va trobar cap soca d'enterobacteri portadora de carbapenemasa.

De les 155 soques amb BLEA, 127 eren soques d'*E. coli* (2,2%; IC 1,8-2,55%), 14 *K. pneumoniae* (1,9%; IC 1,03-3,14%), 5 *S. enterica* (1,5%; IC 0,48-3,38%), 4 *E. cloacae* (1,5%; IC 0,4-3,84%), 2 *K. oxytoca* (1,4%; IC 0,16-4,93%), 2 *P. mirabilis*

(0,3%; IC 0,04-1,26%), i un *C. freundii* (2,2%; IC 0,05-11,5%) (Figura 13). Com es pot observar en els intervals de confiança, hi ha algunes espècies, com per exemple *C. freundii*, on les dades obtingudes no tenen molta significació estadística, pel baix nombre de soques que s'han aïllat d'aquesta espècie.

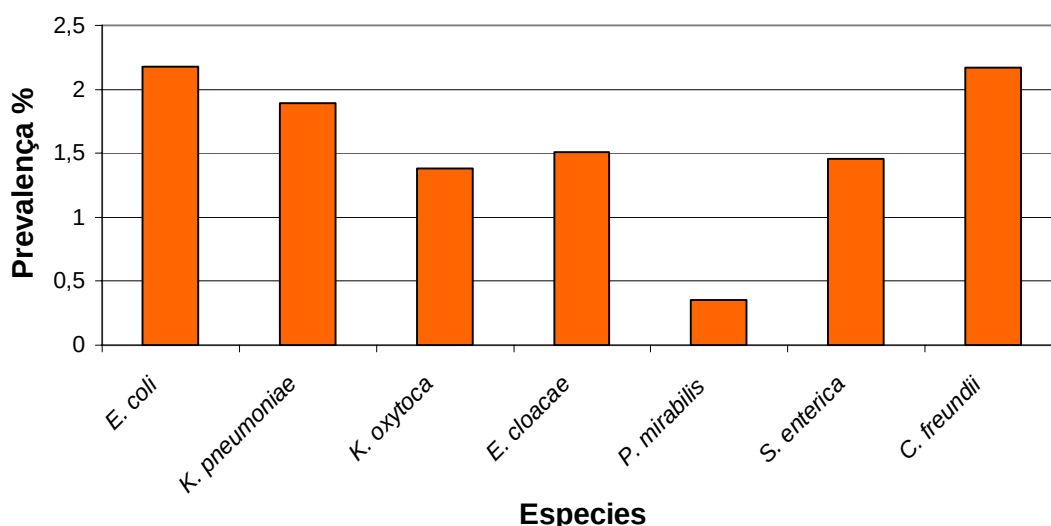


Figura 13: Prevalença de BLEA en relació al total de soques aïllades als dos hospitals.

A l'estudi anterior, que comprenia el període del 2001 al 2002, la prevalença de soques d'*E. coli* portadores de BLEA havia estat del 2,6%, i de *K. pneumoniae* del 1,1%. En el present període, que compren el 2003, la prevalença en *E. coli* baixa al 2,2%, mentre que puja en *K. pneumoniae* fins al 1,9%. Per altre banda, també cal remarcar, fent una comparació amb els períodes anteriors, l'increment d'espècies diferents, com *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *C. freundii* i *S. enterica* portadores de BLEA. Podem dir doncs, que la prevalença de BLEA està augmentant, encara que no fins als nivells descrits en altres estudis, sobretot en *K. pneumoniae*. Hernández *et al*⁸⁹ que tal com s'ha comentat, van recollir les soques d'*E. coli* i *K. pneumoniae* portadores de BLEA de març a juny del 2000 de 40 hospitals de l'Estat Espanyol, van obtenir una prevalença d'*E. coli* amb BLEA del 0,5% (amb un rang d'entre 0 i 2,4%) i de *K. pneumoniae* del 2,7% (amb un rang d'entre 0 i 16,7%). En un estudi multicèntric

europ⁸⁸ es van recollir 17.203 soques d'enterobacteris de 1997 a 2004 de 41 centres mèdics d'onze països diferents, entre ells Bèlgica, Croàcia, República Txeca, Finlàndia, Alemanya, Grècia, Polònia, Rússia, Espanya, Turquia i el Regne Unit, i van observar que la prevalença de BLEA en *E. coli* era d'un 2,1% al 1999 i incrementava a un 10,8% al 2004. Per *K. pneumoniae* observaren un increment del 9,0% al 13,6%.

Per tant, la prevalença de soques productores de BLEA aïllades de mostra clínica incrementa, encara que moderadament, sobretot en soques de *K. pneumoniae*.

Les soques amb BLEA procedien d'orines, sang, mostres respiratòries i genitals, femtes i productes varis entre els que trobem pus d'abscessos i exudats de ferides entre d'altres (Taula 4).

PRODUCTE	Nº Mostres	Nº de soques amb BLEA	PREVALENÇA	IC
Orines	5959	95	1,6%	1,28-1,91
Sang	927	23	2,5%	1,58-3,70
Mostres respiratòries	382	13	3,4%	1,82-5,74
Femta	226	3	1,3%	0,27-3,83
Exudats genitals	201	2	1%	0,11-3,55
Varis	325	19	5,8%	3,56-8,98

Taula 4: Procedència de les mostres a partir de les quals es van aïllar les soques d'enterobacteris productores de BLEA.

Malgrat que és en les orines on més s'han aïllat soques productores de BLEA, la prevalença és major en mostres respiratòries i sang, a diferència del que descriuen Hernández *et al*⁸⁹ on les soques d'*E. coli* productores de BLEA van ser aïllades en un 66% dels casos d'orines, un 11% de sang, 12% de ferides, 3% d'aïllats de mostres respiratòries, 1% de catèters i 6% d'altres mostres. Aquestes dades però poden portar a confusió, i fer pensar que les orines són el producte que tenen, amb diferència, una

major prevalença de soques productores de BLEA, quan, el que si és veritat, és que és el producte on s'aïlla el major nombre de soques, degut a que també es el producte del que més mostres s'estudien. Dandekar *et al*²⁰² en canvi, sí descriuen al 2002, en un hospital dels Estats Units, una major prevalença de BLEA en mostres respiratòries (6,3%), seguida d'orines (1,9%) i de sang (1,3%).

La caracterització de les BLEA aïllades de mostra clínica en ambdós hospitals al 2003, es mostra a la taula 5.

Espècie		Betalactamasa	Nº d'aïllats	Prevalença %
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau				
<i>E. coli</i>	SHV-2		4	4,7
	SHV-12		10	11,9
	CTX-M-9		4	4,7
	CTX-M-14		35 (4b)	41,6(4,7)
	CTX-M-32		2	2,4
	CTX-M-3		1	1,2
	CTX-M-15		4	4,7
	TEM-52		1	1,2
	TEM-10		1	1,2
	SHV-2		2	2,4
<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-1		1	1,2
	CTX-M-14		1	1,2
	CTX-M-32		1	1,2
<i>K. oxytoca</i>	CTX-M-1		1	1,2
<i>P. mirabilis</i>	CTX-M-1		1	1,2
<i>S. enterica</i>	CTX-M-9		2	2,4
Hospital Vall d'Hebron				
<i>E. coli</i>	SHV-2		2	2,4
	SHV-12		15	18,3
	CTX-M-9		11	13,4
	CTX-M-14		33 (4b)	40,2(4,9)
	CTX-M-15		2	2,4
	TEM-12		1	1,2
	SHV-12		3	3,6
<i>K. pneumoniae</i>	SHV-5		2	2,4
	CTX-M-9		2	2,4
	CTX-M-3		1	1,2
	TEM-4		1	1,2
	CTX-M-14		1	1,2
<i>K. oxytoca</i>	SHV-12		1	1,2
<i>P. mirabilis</i>	SHV-12		1	1,2
<i>S. enterica</i>	SHV-12		1	1,2
	CTX-M-15		1	1,2
	CTX-M-9		1	1,2
<i>E. cloacae</i>	SHV-5		3	3,6
	CTX-M-9		1	1,2
<i>C. freundii</i>	CTX-M-3		1	1,2

Taula 5: Caracterització de les BLEA per hospital i per espècie (es van trobar quatre soques d'*E. coli* portadores del gen *bla*_{CTX-M-14b} en cadascun dels hospitals).

Pel que fa als diferents tipus d'enzims trobats, no es van observar diferències entre hospitals. En ambdós, de la mateixa manera que en l'estudi previ, la família CTX-M ha estat la més freqüentment aïllada, i dins d'aquesta l'enzim més freqüent és CTX-M-14 en *E. coli*, no així en les altres espècies on no hi ha un predomini de cap tipus d'enzim, ni de la família CTX-M ni del tipus SHV.

Cal remarcar, que dins les soques productores de CTX-M-14 n'hi havia vuit on l'enzim presentava un 100% d'homologia amb la seqüència aminoacídica de CTX-M-14, però la seqüència nucleotídica del seu gen presentava només un 99,9% d'homologia amb *bla*_{CTX-M-9} (GenBank AF174129). La diferència està en un canvi de base T702C, que confereix el canvi aminoacídic Val231Ala, donant lloc a la mateixa seqüència aminoacídica que CTX-M-14. Aquestes seqüències presentaven un 99,7% d'homologia (tres nucleòtids de diferència) amb la seqüència descrita per a *bla*_{CTX-M-14} (GenBank AF252622). Als enzims amb una seqüència nucleotídica idèntica a AF252622 s'ha proposat anomenar-les CTX-M-14a, mentre que la nova seqüència va ser designada com a *bla*_{CTX-M-14b} (GenBank DQ359215). Les regions que envolten el gen *bla*_{CTX-M-14a} són la seqüència d'inserció *ISEcp1* en l'extrem 5' i *IS903* en l'extrem 3' del gen, tal i com es descriu a la bibliografia^{70,71}, mentre que les regions que envolten el gen *bla*_{CTX-M-14b} són les mateixes que envolten el gen *bla*_{CTX-M-9}, és a dir, l'integró *In60*¹⁸⁷, amb l'*orf513* a l'extrem 5' i la seqüència d'inserció *IS3000* a l'extrem 3'.

A més a més dels enzims CTX-M-9 i CTX-M-14, hem trobat altres enzims de la família CTX-M, encara que amb una prevalença baixa i variable. Dins del grup de les CTX-M-1t la prevalença ha baixat per a CTX-M-1 d'un 7,8% al 2001-2002 a un 1,2% al 2003. En canvi hi ha un increment dels enzims CTX-M-3 i CTX-M-32 d'un 1,1% a un 1,9% (Taula 5). Cal fer constar la presència per primer cop de la betalactamasa CTX-M-15, que en aquest segon estudi es troba amb una prevalença del 4,5%, mentre que en el

període 2001-2002 no se'n trobava cap. Aquest enzim, freqüent en els països asiàtics i nord-africans, ha estat descrit a Europa per Woodford *et al*⁹⁴ on descriuen una prevalença d'*E. coli* portadors de CTX-M en el Regne Unit durant el 2003 al 2004, i troben que la prevalença de la CTX-M-15 fou del 95,1%. Dades recolzades per Mugnaioli *et al*²⁰³ que descriuen l'expansió de les CTX-M en *Enterobacteriaceae* al 2003 a Itàlia, destacant la presència de les CTX-M del grup 1, concretament CTX-M-1 i CTX-M-15, tant en soques d'*E. coli* com de *K. pneumoniae*.

Dins de la família SHV, l'enzim predominant és SHV-12 amb una prevalença del 19,4%, inferior a la descrita en l'estudi previ que era del 23,6%. No hem trobat cap brot clàssic de soques d'*E. coli* o *K. pneumoniae* productores de SHV-2, SHV-3 o SHV-5, enzims predominants en la dècada dels 80 i 90²⁰⁴⁻²⁰⁶. La presència de SHV-2 ha estat d'entre un 2,4% i un 4,7% i curiosament la presència de SHV-5 només s'ha observat en soques de *K. pneumoniae* i *E. cloacae* aïllades a l'hospital Vall d'Hebron. Aquest enzim ha estat descrit per Briñas *et al*²⁰⁷ en diferents brots causats per *K. pneumoniae* en la UCI de neonats-pediatria d'un hospital espanyol, o per Palasubramaniam *et al*²⁰⁸ en la unitat d'oncologia pediàtrica d'un hospital de Malasia.

Les tres soques productores de cefamicinasa plasmídica eren *E. coli* i foren aïllades d'orines. En un estudi dut a terme del 1999 al 2000 entre l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i l'Hospital Virgen de Aranzazu (San Sebastian)¹¹³, es va observar una prevalença del 0,17% de soques d'enterobacteris portadors de la cefamicinasa CMY. Al comparar aquest resultat amb els resultats d'aquest estudi, on la prevalença de cefamicinasa plasmídica és del 0,04%, podem dir que la prevalença d'aquest tipus de betalactamasa, en el nostre àmbit, es manté baixa, i predominant en *E. coli*. Fet que entra en contradicció amb estudis duts a terme en altres països com als Estats Units on

Álvarez *et al*¹¹⁴ van trobar una prevalença de cefamicinases plasmídiques de 1992 al 2000 del 8,5% en *K. pneumoniae*, 6,9% en *K. oxytoca* i 4% en *E. coli*, trobant a més a més una major variabilitat d'enzims, com ACT-1, FOX-5, CMY-2 i DHA-1. Yum *et al*¹¹⁵ van estudiar soques de *K. pneumoniae* aïllades de mostres respiratòries obtingudes del 2002 al 2003 a Korea, i van obtenir una prevalença de cefamicinasa plasmídica del 10,7%, essent els enzims trobats CMY-2 i DHA-1.

La identificació d'organismes productors de cefamicinasa plasmídica és problemàtica degut a la manca de mètodes fenotípics estandarditzats per a la seva detecció específica, i per això s'han proposat varis mètodes de detecció fenotípica. Yagi *et al*²⁰⁹ descriuen un mètode de doble disc en el que usen un derivat de l'àcid borònic, que és un inhibidor de les betalactamases de classe C, amb ceftazidima i cefotaxima. La identificació de les cefamicinases es basa en l'augment de l'halus d'inhibició d'aquests dos antibiòtics en presència de l'àcid borònic. Coudron *et al*²¹⁰ descriuen un mètode tridimensional que es basa en fer créixer per tota la superfície d'una placa de Müller-Hinton una soca sensible a cefoxitina. En el centre de la placa es situa un disc de cefoxitina i es fan estries des del marge del disc fins a la perifèria semblant els microorganismes problemes. Aquells microorganismes que permetin que la soca sensible creixi al voltant de l'estria dins l'halo d'inhibició seran productors de cefamicinasa. Ambdós mètodes però, no permeten diferenciar entre l'*ampC* pròpia d'espècie i l'adquirida.

L'observació en el nostre Servei de la presència de colònies dins dels halus d'inhibició, principalment de cefalosporines, ens feu hipotetitzar si aquesta presència podia anar relacionada amb la presència d'una cefamicinasa adquirida. Per això, vàrem seleccionar 77 soques d'un total de 6.209 (5.081 d'*E. coli*, 607 de *K. pneumoniae* i 521 de *P. mirabilis*) aïllades de diferents mostres clíniques de l'Hospital de la Santa Creu i

Sant Pau recollides des del gener del 2003 al gener del 2005 amb un fenotip de resistència compatible amb la producció d'una betalactamasa de tipus *ampC*. Per mitjà d'una múltiplex PCR i posterior seqüenciació es varen detectar els gens de cefamicinases adquirides. Per altra banda, s'avaluaren dos mètodes fenotípics: l'examen visual de les plaques d'antibiograma per a detectar colònies dins dels halus d'inhibició de cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima i aztreonam, i una prova de sinergia de doble disc usant cloxacil·lina (500µg) com a inhibidor d'enzims de tipus AmpC. De les 77 soques amb fenotip d'AmpC, en 19 (24,7%) (14 *E. coli*, dos *K. pneumoniae* i tres *P. mirabilis*) es van detectar gens de cefamicinasa plasmídica (15 *bla*_{CMY-2}, dos *bla*_{DHA-1}, una *bla*_{CMY-4} i una *bla*_{ACC-1}).

La presència de colònies en l'halus d'inhibició va mostra una sensibilitat i especificitat del 100%. Es va obtenir el mateix resultat amb el test de la cloxacil·lina, en el cas de les soques de *P. mirabilis* i *K. pneumoniae* que no presenten *ampC* en el cromosoma. En canvi en soques d'*E. coli* l'especificitat del test de la cloxacil·lina baixà al 10,3% perquè 52 de les soques testades produïren un lleu creixement (Taula 6).

Especie	Soques estudiades	Soques seleccionades	Resultat múltiplex PCR <i>ampC</i>	Nº d'aïllats	Colònies dins l'halus		Doble disc (cloxacil·lina)	
					Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu
<i>E. coli</i>	5.081	70	Positiu	14	14	0	14	0
			Negatiu ^a	56	0	56	52	4
<i>K. pneumoniae</i>	607	4	Positiu	2	2	0	2	0
			Negatiu ^a	2	0	2	0	2
<i>P. mirabilis</i>	521	3	Positiu	3	3	0	3	0
Total	6.209	77	Positiu	19	19	0	19	0
			Negatiu	58	0	58	52	6

Taula 6: Resultat de l'estudi de cefamicinasa plasmídica per presència de colònies dins l'halus i per doble disc amb cloxacil·lina.

Encara que el nombre de soques productores de cefamicinasa adquirida en el nostre estudi és petit, hem vist que només les soques que presenten colònies en l'halus porten gens *ampC* adquirits. Aquest fet distintiu s'ha de tenir en compte en organismes com *E. coli* en el que la diferenciació entre cefamicinasa adquirida i hiperproducció de l'enzim cromosòmic no es pot fer basant-se en mètodes fenotípics. Aquest pràctic i simple mètode per a la detecció de cefamicinases adquirides podria ser d'ajut en el control i seguiment epidemiològic d'aquestes soques.

3.2.2 Prevalença i caracterització de BLEA, cefamicinases i carbapenemases en portadors fecals

A l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, es van recollir 491 mostres fecals, en 179 de les quals es va obtenir creixement després de sembrar-se en agar MacConkey amb 2mg/L de cefotaxima (MacC-CTX). De cada placa de MacC-CTX es seleccionaren 3 colònies de cadascuna de les distintes morfologies observades. En total es varen aïllar 591 soques, 160 de les quals presentaren un antibiograma compatible amb la producció de BLEA o cefamicinasa. Per descartar la clonalitat, de les tres colònies de cada morfologia, es feu l'ERIC-PCR. De les 160 soques es seleccionaren 54 clones, és a dir, s'han estudiat 2,96 (160/54) soques per cada clon seleccionat. La majoria de les 3 soques seleccionades per cada morfologia pertanyien al mateix clon, i només en 5 casos de les 3 colònies es varen seleccionar més d'un clon. De l'Hospital Vall d'Hebron, seguint la mateixa metodologia, es van seleccionar 26 clones.

Així entre ambdós hospitals es van recollir un total de 948 femtes, cadascuna d'un pacient diferent, estratificades en diferents períodes i edats. En 63 d'elles, es van aïllar soques productores de BLEA, el que suposa una prevalença del 6,6%. La prevalença de soques productores de cefamicinasa fou del 0,63% (6 de 948 femtes). No

s'aïllà cap soca productora de carbapenemasa. Cal dir que després de fer l'ERIC-PCR, en 9 femtes es van aïllar dues clones productores de BLEA, d'una femta s'aïllaren dues clones productores de cefamicinasa plasmídica, i d'una s'aïllà una clona portadora de BLEA i una altre de cefamicinasa. Per tant, es van aïllar 73 soques portadores de BLEA i 7 soques productores de cefamicinasa, totes elles *E. coli*.

Si tenim en compte l'estratificació temporal en que es va dur a terme la recollida de les mostres, podem observar una distribució temporal significativa ($p=0,03$) en la prevalença de BLEA. Anàlisis estadístiques, utilitzant els residus estandarditzats, mostren que aquesta significació es deu a la disminució de la prevalença al maig amb l'augment de la mateixa al juliol (Figura 14).

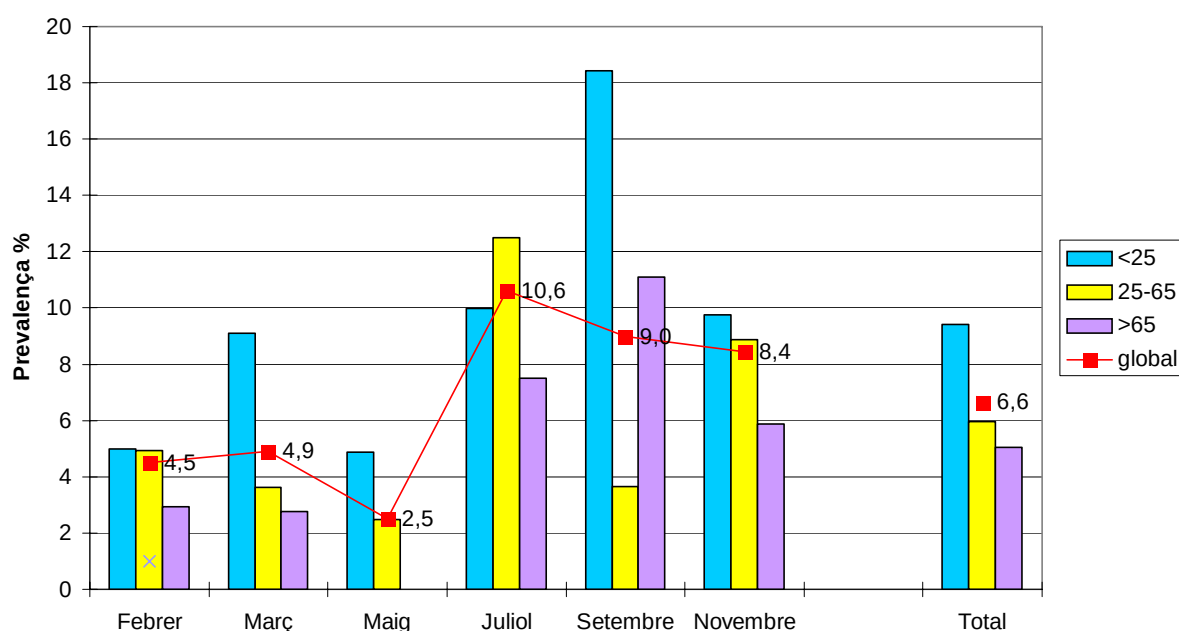


Figura 14: Estratificació temporal i per grups d'edat dels portadors fecals amb BLEA.

Pel que fa als grups d'edat, un 9,4% (23 de 244; IC 95%: 6,1-13,8%) de les mostres provenien de portadors fecals menors de 25 anys; un 5,9% (29 de 486; IC 95%: 4-8,5%) de portadors fecals entre 26 i 65 anys; i un 5% (11 de 218; IC 95%: 2,6-8,8%) de gent gran (>65 anys). Donat que el grup de edat de menors de 25 anys, és molt heterogeni pel que fa a diferents hàbits, com l'alimentació, desenvolupament sexual,

higiene, etc., vàrem estratificar-lo encara més acotant l'edat per veure si obteníem alguna singularitat, però aquesta possible diferència no es va observar (Figura 15).

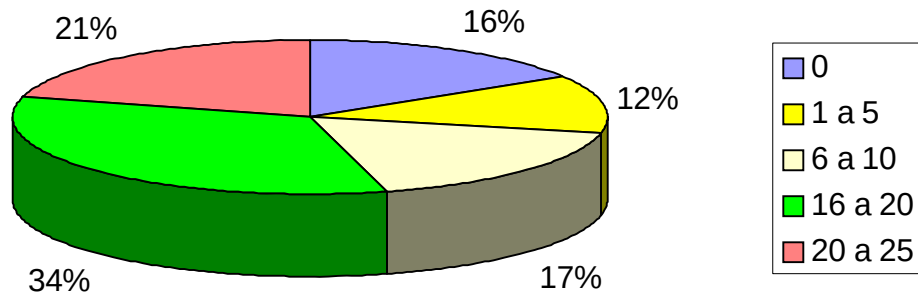


Figura 15: Distribució de la prevalença de BLEA a l'estratificar el grup d'edat de 0 a 25 anys.

Per tal de trobar una possible explicació a la distribució temporal en la prevalença de BLEA es van obtenir a través de l'Institut Català de la Salut les dades sobre el consum antibiòtic dels ambulatoris de l'àrea d'influència del nostre hospital (Figura 16).

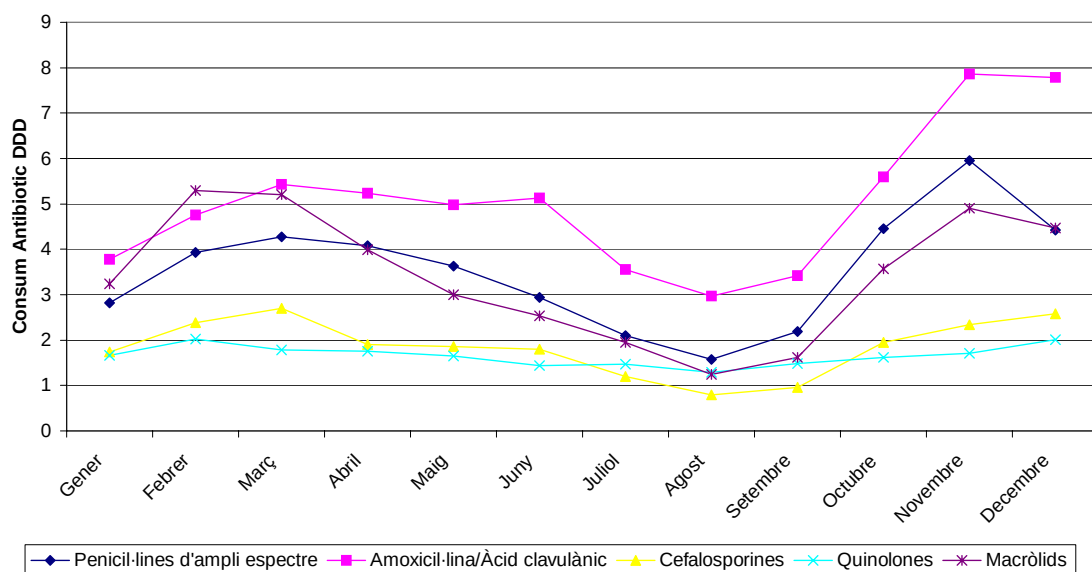


Figura 16: Consum d'antibiòtics als centres d'atenció primària durant el 2003. Dosi definida per 1000 habitants i dia (DDD).

Tots els antibiòtics presenten una distribució temporal de consum al llarg de l'any, que augmenta als mesos freds i disminueix als mesos càlids. L'antibiòtic amb més consum és l'associació amoxicil·lina/àcid clavulànic seguit d'altres penicil·lines i macròlids, que acostumen a ser els antibiòtics de primera elecció en malalties respiratòries pròpies dels mesos freds (novembre, desembre). Si comparem el consum antibiòtic en pediatria (<15 anys) i la resta de la població, l'única diferència que trobem és el fet que en pediatria gairebé no s'administren quinolones.

Si comparem les dades de consum antibiòtic amb la prevalença de BLEA podem observar com tenen una distribució temporal contraposada (Figura 17).

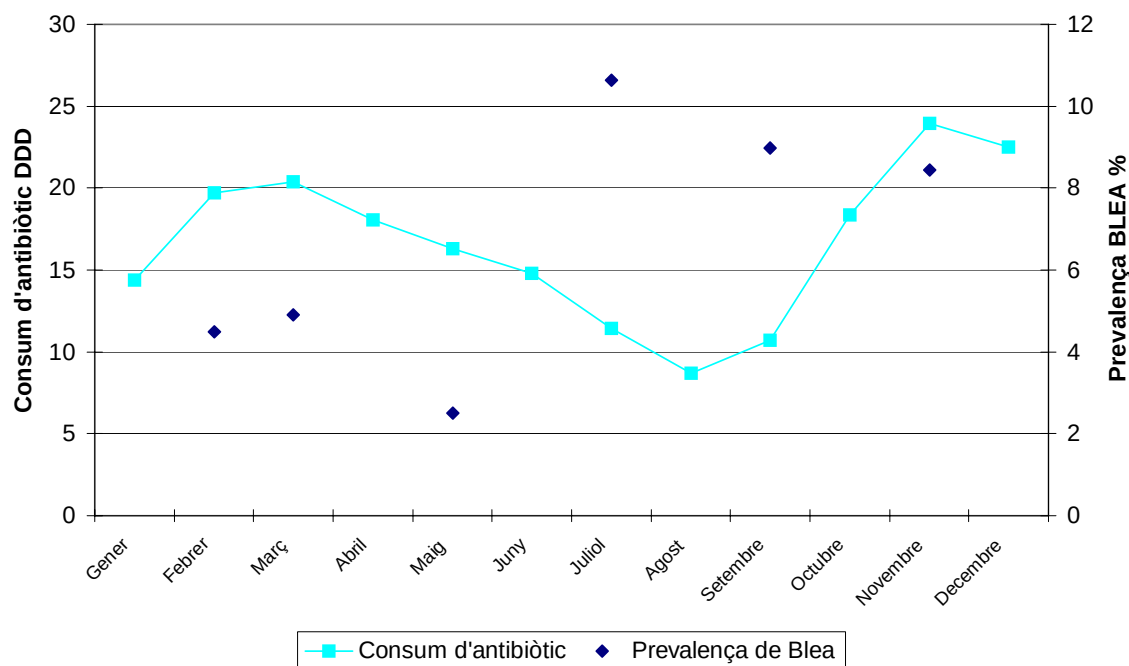


Figura 17: Consum antibiòtic total i prevalença de BLEA l'any 2003.

Als mesos freds la prevalença de BLEA és mínima i el consum d'antibiòtic màxim, i en els mesos càlids la prevalença de BLEA és màxima i el consum mínim. Si tenim en compte que l'antibiòtic amb un consum més elevat és l'associació amoxicil·lina/àcid clavulànic, i que les soques productores de BLEA són sensibles a

aquest antibiòtic, podríem hipotetitzar que la pressió antibiòtica als mesos freds fa caure la prevalença de BLEA, quan aquesta pressió cau als mesos càlids, la prevalença de BLEA augmenta. A aquesta hipòtesi es podria afegir els hàbits alimentaris. Als mesos càlids es mengen més aliments freds i no cuinats i per tant susceptibles d'estar contaminats. Tanmateix és només un apunt, i cal afegir altres paràmetres.

Aquesta distribució temporal obtinguda en la prevalença de BLEA en portadors fecals posa de manifest la importància, a la hora de fer comparacions, de tenir en compte el període de l'any en que es va dur a terme l'estudi. Si comparem els resultats de l'estudi previ, on avaluarem els períodes, de febrer a maig del 2001, d'abril a juny del 2002 i octubre del 2002, on la prevalença fou del 2,1%, 3,8% i 7,5% respectivament, amb els mateixos de l'any 2003, la prevalença observada és del 4%, 5% i 8,7%, respectivament. També podem observar que el fenomen es repeteix i en els mesos càlids la prevalença és major. Així doncs, el mateix que succeeix en l'àmbit hospitalari, succeeix en el context dels portadors fecals, la prevalença de BLEA està augmentant, i aquesta prevalença és superior en portadors fecals que en mostres provinents de malalts ingressats. Aquestes són dades contradictòries, però, amb les publicades per Valverde *et al*⁹², d'un estudi dut a terme a l'hospital Ramón y Cajal de Madrid al 2003, on troben que la prevalença de portadors fecals és menor que la dels malalts hospitalitzats (5,5% i 11,8%, respectivament).

Els resultats de la caracterització de les BLEA de les soques aïllades en portadors fecals es poden observar a la taula 7.

Betalactamasa	Nº D'aïllats	%	IC
CTX-M-9	16	21,9	13,1-33,1
CTX-M-10	1	1,37	0,03-7,4
CTX-M-14	33 (5b)	45,2	33,5-57,3
CTX-M-15	5	6,85	2,26-15,3
CTX-M-32	4	5,48	1,5-13,4
SHV-5	1	1,37	0,03-7,4
SHV-12	10	13,7	6,77-23,7
TEM-52	2	2,74	0,33-9,55
CTX-M-14 + SHV-12	1	1,37	0,03-7,4
TOTAL	73	100	

Taula 7: Caracterització de les BLEA trobades en femtes de portadors (es van aïllar 5 soques productores de CTX-M-14b).

Les soques portadores de BLEA aïllades de la femta de portadors fecals atesos en ambdós hospitals, presenten en un 80,8% BLEA de la família CTX-M, en un 17,8% BLEA de la família SHV i en un 2,7% la BLEA TEM-52.

Dins de la família CTX-M, l'enzim aïllat amb més freqüència és CTX-M-14 (45.2%), seguit de CTX-M-9 (21.9%). Pel que fa a les soques productores de CTX-M-14 cal dir que 29 d'elles presenten el gen *bla*_{CTX-M-14a} i cinc el gen *bla*_{CTX-M-14b}.

El predomini de les BLEA tipus CTX-M en portadors fecals ja l'hem observat en l'estudi previ (període 2001-2002), on el 75% de les soques portadores de BLEA codificaven una CTX-M. En aquell estudi però, la betalactamasa més freqüentment aïllada era CTX-M-9, seguida de SHV-12 i de CTX-M-14. En canvi en poc més d'un any s'ha produït una inversió: l'enzim CTX-M-9 passa d'un 54,5% a un 27%, i la betalactamasa CTX-M-14 passa d'un 15% a un 56%. Aquestes dades concorden amb els resultats obtinguts per Rodríguez-Baño *et al*²¹¹ a Sevilla del 2001 al 2002, que descriuen, en pacients extrahospitalaris, una prevalença d'*E. coli* amb CTX-M-9 del 64%. En canvi Valverde *et al*⁹², que estudien soques del 2003, encara troben una

prevalença en portadors fecals de CTX-M-9 tipus del 62,5%, tanmateix el percentatge de CTX-M-9 i CTX-M-14 és similar amb un 21,4% i 32,1%, respectivament, i de SHV-12 del 31,2%. És de destacar la diversitat d'enzims CTX-M-1t, superior a la trobada en el període anterior (2001-2002), reflex de l'increment trobat també en l'anàlisi de mostres clíniques. Pitout *et al*⁹⁶ a la regió de Calgary, Canadà, del 2000 al 2002 troben que les CTX-M representen un 70% de les BLEA trobades a la comunitat, d'aquestes, un 55% són CTX-M-14 i un 15% pertanyen al grup de les CTX-M-1.

Altres autors han descrit també la presència de soques productores de més d'una BLEA en portadors fecals, Valverde *et al*⁹² descriuen la presència de dues soques productores de CTX-M-9 + SHV-12. En aquest estudi observem la presència d'una soca productora de CTX-M-14 + SHV-12, tot i ser un fet puntual, cal remarcar-lo per què és la suma de les dues BLEA més predominants.

Les soques portadores de cefamicinases plasmídiques, es van aïllar en els sis darrers mesos del 2003, al juliol, octubre i novembre, i d'una forma esporàdica. Que nosaltres tinguem constància aquesta és la primera vegada que es descriu la presència de soques d'*E. coli* productores de cefamicinasa aïllades de femtes humanes. La caracterització de les betalactamases provinents de soques aïllades de portadors fecals ens va mostrar que les set cefamicinases aïllades eren CMY-2.

Per tant, les BLEA aïllades de mostres clíniques són un reflex dels enzims que es poden trobar en portadors fecals. L'anàlisi de la prevalença d'aquests portadors indica un augment de la mateixa, així com la caracterització del enzims implicats mostra la necessitat d'un seguiment doncs el predomini d'un enzim o altre és fluctuant.

3.2.3 Prevalença i caracterització de BLEA, cefamicinases i carbapenemases en portadors fecals afectats per un brot alimentari.

Es van estudiar 61 brots alimentaris en 19 dels quals (31,1%) es van aïllar soques d'enterobacteris productors de BLEA de diferents portadors fecals. La metodologia per a l'estudi dels portadors fecals afectats per un brot alimentari va ser la mateixa que la utilitzada en l'estudi de portadors fecals que arribaren als serveis d'Urgències: es van sembrar les femtes en plaques de MacConkey amb 2mg/L de cefotaxima (MacC-CTX) i es van seleccionar tres colònies de cadascuna de les morfologies distintes observades, després es va fer l'antibiograma, i a aquelles soques que presentaven un antibiograma compatible amb BLEA, cefamicinasa o carbapenemasa se'ls va fer l'ERIC-PCR per descartar clonalitat. D'aquestes mostres es van aïllar 66 soques, totes elles d'*E. coli*. En cap dels portadors fecals (ni manipuladors ni afectats) es va trobar una soca productora de cefamicinasa adquirida o carbapenemasa. El percentatge de persones a qui se'ls aïllà un enterobacteri productor de BLEA, respecte el total de persones estudiades en aquell brot, anà del 4,4% (2 de 45 mostres; IC95%: 0,5-15,2%) al 66,6% (6 de 9 mostres; IC95%: 29,9-92,5%) (Taula 8).

En cap cas hem detectat en una femta més d'una soca productora de BLEA. En la majoria de casos, la prevalença de soques amb BLEA ha estat superior a la obtinguda en portadors fecals (6,6%). Aquest fet, potser quedaria en part explicat si penséssim que l'enterobacteri portador de BLEA a difós conjuntament amb l'agent causal del brot alimentari. La difusió de l'agent causal d'un brot alimentari juntament amb un *E. coli* portador d'una BLEA ja va ser hipotetitzada al 2002 per Prats *et al*¹⁰⁰ on descrivien un brot d'origen desconegut, on l'agent causal era una soca de *Salmonella*. Conjuntament amb la salmonel·la, a la femta dels afectats s'hi aïllà una soca d'*E. coli* portadora d'una

CTX-M-9 i una CMY-2. Aquestes dades reforcen la hipòtesi que l'aliment pot ser un mitjà de transmissió de les resistències a la comunitat^{100,212-215}.

Nº de brot	Nº de mostres	Nº de femtes positives per	Prevalença	IC
1	45	2	4,4%	0,5-15,2
2	5	1	20%	0,5-71,6
3	9	6	66,6%	29,9-92,5
4	4	1	25%	0,62-80,6
5	7	1	14,28%	0,36-57,9
6	18	4	22,2%	6,41-47,6
7	17	2	11,76%	1,46-36,4
8	20	6	30%	11,9-54,3
9	23	4	17,39%	4,95-38,8
10	17	2	11,76%	1,46-36,4
11	3	1	33,3%	0,8-90,6
12	3	2	66,6%	9,43-99,2
13	29	4	13,79%	3,89-31,7
14	9	3	33,3%	7,49-70,1
15	6	4	66,6%	22,3-95,7
16	16	3	18,75%	4,05-45,6
17	19	8	42,1%	20,3-66,5
18	3	1	33,3%	0,8-90,6
19	4	2	50%	6,76-93,2

Taula 8: Prevalença de femtes positives per BLEA en els diferents brots alimentaris.

Els resultats de la caracterització de les betalactamases produïdes per les soques aïllades de la femta de persones afectades per un brot alimentari es pot observar a la taula 9.

Betalactamasa	Nº de soques	%	IC
CTX-M-9	15	22,73	13,3-34,7
CTX-M-14	38 (7b)	57,58	44,8-66,7
CTX-M-32	2	3,03	0,37-10,5
SHV-2	1	1,52	0,04-8,16
SHV-12	7	10,61	4,38-20,6
TEM-52	3	4,55	0,94-12,7
TOTAL	66	100	

Taula 9: Caracterització de les BLEA trobades en soques de portadors fecals afectats per un brot alimentari (Es van trobar 7 soques productores de CTX-M-14b).

Tal com hem anat observant fins ara en els altres hàbitats, la família CTX-M és la més freqüent, amb un 83,3%, després tenim les BLEA de la família SHV amb un 12,1% i, finalment l'enzim TEM-52 amb un 4,5%. La CTX-M més freqüent és CTX-M-14, seguida de CTX-M-9 i SHV-12. Pel que fa a les soques productores de CTX-M-14, es va trobar que 31 d'aquestes tenien el gen *bla*_{CTX-M-14a} i 7 el gen *bla*_{CTX-M-14b}. No hi ha cap estudi a la literatura, excepte el citat anteriorment, que descrigui la presència de soques portadores de BLEA en femta de persones afectades per un brot alimentari.

3.2.4. Prevalença i caracterització de les betalactamases detectades als aliments

De cadascun dels aliments mostrejats es van agafar 25 grams i es van posar en 225 mL d'aigua de peptona. Després d'una incubació de tota la nit a 37°C, es sembraren amb 1 mL de l'aigua peptonada a brou MacC-CTX, que fou incubat tota la nit a 37°C; posteriorment, si s'observava terbolesa es feia un subcultiu en plaques MacC-CTX. A partir d'aquí es va seguir la mateixa metodologia que l'emprada en l'estudi de portadors fecals. En els 738 aliments mostrejats només es van trobar dues soques d'*E. coli* i una de *K. pneumoniae* productores de BLEA, el que suposa una prevalença del 0,4%. No es van trobar ni cefamicinases ni carbapenemases. És la primera vegada que s'ha trobat en

un aliment un enterobacteri productor de BLEA. Aquestes dades poden semblar escasses, però s'ha de tenir en compte que el 78,5% dels aliments mostrejats eren pre-cuïnats. Les dues soques d'*E. coli* foren aïllades en amanides i la de *K. pneumoniae* d'un pit de pollastre cuinat a la planxa.

La caracterització de les tres betalactamases d'espectre ampliat va mostrar que les BLEA produïdes per les dues soques d'*E. coli* eren CTX-M-14 i que la soca de *K. pneumoniae* produïa CTX-M-3 juntament amb CTX-M-14.

3.2.5 Prevalença de BLEA, cefamicinases plasmídiques i carbapenemases en granges d'animals

Es van mostrejar deu granges de conills, deu de porcs i deu de pollastres de diferents comarques de Barcelona. En cadascuna d'aquestes deu granges es van mostrejar deu punts diferents del seu sòl. De cadascun d'aquests punts es va agafar 10 grams de sòl i es va homogeneïtzar amb 90 mL de aigua de peptona. Aliquotes de 0,1 mL es van sembrar en plaques de MacC-CTX incubades 48 hores a 37°C en condicions anaeròbiques per evitar el sobrecreixement dels bacteris aeròbics gramnegatius. A partir d'aquí es va seguir la mateixa metodologia que per als portadors fecals.

De les deu **granges de conills** mostrejades es van obtenir 37 colònies a partir de les plaques de MacC-CTX. Vint-i-una d'aquestes presentaven un antibiograma compatible amb BLEA o cefamicinasa. Donat que s'estudiaren tres colònies de la mateixa morfologia, per a descartar clonalitat, es feu una ERIC-PCR. De les 21 colònies es van seleccionar 4 clones, per tant, hi havia 5,25 (21/4) soques per clon. Tres d'aquestes soques eren productores de BLEA, dues soques d'*E. coli*, ambdues trobades en la mateixa granja, i una d'*E. cloacae*, trobada en un altre granja. La soca restant era una soca d'*E. coli* productora de cefamicinasa, i es va trobar en la mateixa granja que la

soca d'*E. cloacae* productor de BLEA. El fet de trobar enterobacteris productors de betalactamasa en el subsòl de granges de conills és un fet a remarcar, donat que aquests animals són hipersensibles als betalactàmics, i per tant, no estan sotmesos a una pressió antibiòtica, al menys per aquests antimicrobians. No s'hi aïllà cap soca productora de carbapenemasa.

De les deu **granges de porcs** estudiades es van obtenir 132 colònies d'*E. coli* a partir de les plaques de MacC-CTX, totes amb antibiograma compatible amb una BLEA, després de realitzar l'ERIC-PCR es van seleccionar 39 clones, és a dir, trobem que hi havia 3,4 (132/39) soques per clon. Aquestes soques es van aïllar en vuit de les 10 granges estudiades. No es va trobar cap cefamicinasa ni cap carbapenemasa.

En les deu **granges de pollastres** es van obtenir 192 colònies a partir de les plaques de MacC-CTX, 190 d'aquestes presentaven un antibiograma compatible amb BLEA o cefamicinasa; després de realitzar l'ERIC-PCR es van seleccionar 64 clones, és a dir, trobem que hi ha 2,96 (190/64) soques per clon. En totes les granges es van aïllar soques productores de BLEA i en 7 granges es van aïllar soques productores de cefamicinasa. No es va trobar cap soca amb carbapenemasa. Les 64 soques eren *E. coli*, 51 amb fenotip de BLEA i 13 productores de cefamicinasa.

Hi ha diferents estudis on es descriu la presència d'enterobacteris resistents a betalactàmics en animals, tant de producció com domèstics. En el nostre estudi, dut a terme a partir del sòl de les granges d'animals de producció, hem trobat una prevalença de BLEA en conill del 20%, en porcs del 80% i en aus del 100%; pel que fa a les cefamicinases la prevalença en conills ha estat del 10% i en aus del 70%. Briñas *et al*⁹⁹ al 2003, descriuen en animals de producció malalts una prevalença de BLEA del 2,1% (10 de 459) i de cefamicinasa del 0,2% (1 de 459), i per als animals sans una prevalença de BLEA del 5% (8 de 158) i de cefamicinasa del 1,2% (2 de 158). Per tant troben una

prevalença major en animals sans que malalts. En un estudi dut a terme per Carattoli *et al*²¹⁶ on estudien 298 soques d'*E. coli* aïllades a partir de femtes i òrgans de gossos i gats del 2001 al 2003 a Itàlia, descriuen una prevalença de BLEA del 5,3% (16 de 298) i de cefamicinasa del 1% (3 de 298) similar a la trobada per Briñas *et al*⁹⁹ en animals de producció. Resultats similars es descriuen al Japó, Kojima *et al*²¹⁷ estudien la femta de gallines sanes del 1999 al 2002, i troben una prevalença de BLEA del 0,9% (6 de 676) i de cefamicinasa del 1,1% (8 de 676). La major part d'estudis basen la prevalença en la recollida de femta per animal, en canvi en aquest estudi el mostreig es fa del subsòl on hi ha una representació de tots els animals i potser és per això que la prevalença que trobem és més elevada.

Les betalactamases aïllades en les **granges de conills** van ser una CMY-2, pel que fa a la cefamicinasa, dues CTX-M-14 i una CTX-M-9, aquesta última aïllada en una soca d'*E. cloacae*.

En les **granges de porcs** el resultat de la caracterització de les BLEA es pot observar a la taula 10.

Betalactamasa	Nº de soques	%	IC
CTX-M-1	27	69,23	52,4-83
SHV-5	4	10,26	2,86-24,2
SHV-12	8	20,51	9,3-36,5
TOTAL	39	100	

Taula 10: Resultat de la caracterització de les BLEA trobades a partir de les soques d'*E. coli* aïllades en les granges de porcs.

Les BLEA tipus CTX-M han estat les majoritàries; havent-se detectat però únicament CTX-M-1. De les BLEA tipus SHV hem trobat SHV-12 i SHV-5. Briñas *et al*⁹⁹, en cinc porcs malalts van trobar soques portadores de BLEA que van ser tres CTX-M-14, una CTX-M-32 i una SHV-12, el fet de trobar CTX-M-14 en porcs és oposat als resultats obtinguts en el nostre estudi.

En les **granges d'aus** les 13 cefamicinases plasmídiques aïllades van ser caracteritzades com a CMY-2. El resultat de la caracterització de les BLEA es pot observar a la taula 11.

Betalactamasa	Nº de soques	%	IC
CTX-M-1	1	1,96	0,05-10,4
CTX-M-9	10	19,6	8,4-30,9
CTX-M-14	29	56,9	42,2-70,7
CTX-M-32	2	3,92	0,48-13,5
SHV-2 + CTX-M-1	1	1,96	0,05-10,4
SHV-12	5	9,8	3,27-21,4
TEM-52	2	3,92	0,48-13,5
CTX-M-14 + CTX-M-1	1	1,96	0,05-10,4
TOTAL	51	100	

Taula 11: Resultat de la caracterització de les BLEA trobades a partir de les soques d'*E. coli* en granges d'aus.

La família de BLEA majoritària és la CTX-M amb un 86,2%, seguida de la SHV amb un 13,7% i, finalment, l'enzim TEM-52 amb un 3,9%. L'enzim més freqüent és CTX-M-14 seguit de CTX-M-9, després SHV-12, i finalment, la resta amb una freqüència molt més baixa. Pel que fa a les soques productores de CTX-M-14 es van aïllar 23 que codificaven el gen *bla*_{CTX-M-14a} i 7 que codificaven el gen *bla*_{CTX-M-14b}. També cal destacar la presència de dues soques productores de dues BLEA.

Aquests resultats concorden amb els descrits en l'estudi de Briñas *et al*⁹⁹ on van aïllar de la femta de pollastres sans 8 soques d'*E. coli* portadores de BLEA (4 CTX-M-14, 1 CTX-M-9 i 3 SHV-12) i 2 soques d'*E. coli* portadores de CMY-2. En el mateix estudi també es descriu en tres aus malaltes la presència de les mateixes BLEA, però amb un percentatge menor (una CTX-M-14, una CTX-M-9 i una SHV-12). Hasman *et al*²¹⁸ estudien les salmonel·les productores de BLEA aïllades a partir de mostres de femta i carn d'aus recollides als Països Baixos del 2001 al 2002, i troben 5 soques

productores de TEM-52, una soca productora de TEM-20, una de CTX-M-2 i una de SHV-2. A més a més també descriuen cinc soques productores de la cefamicinasa plasmídica ACC-1. Aquests resultats són molt diferents als nostres, potser perquè aquest estudi esta dut a terme en *Salmonella* i l'espècie més freqüent en el nostre estudi és *E. coli*.

Schwarz et al²¹⁹ descriuen que el consum antibiòtic en medicina veterinària de la Unió Europea al 1997, va ser de 3.494 tones. Els principals antibiòtics d'ús són les tetraciclins (2.294 tones), els macròlids (424 tones), les penicil·lins (322 tones), els aminoglucòsids (154 tones), el cotrimoxazol (75 tones) i les fluoroquinolones (43 tones). Donat que les cefalosporines no s'usen gairebé en medicina veterinària i que les soques aïllades presenten resistències a d'altres antibiòtics com els aminoglucòsids o les tetraciclins, fa pensar que l'aparició de BLEA i cefamicinasa plasmídica en enterobacteris aïllats en animals possiblement és multifactorial, deguda a la pressió selectiva d'altres antibiòtics no betalactàmics.

3.2.6 Prevalença i caracterització de BLEA, cefamicinases i carbapenemases en aigües residuals

A partir d'1ml d'aigua residual es van inocular 2 mL de brou de triptona de soja amb 2 mg/L de cefotaxima (TSB-CTX) i es van incubar durant 2 hores a 37°C en condicions aeròbiques. Després del pre-enriquiment, 2 mL de cada tub es van inocular en 10 mL de TSB-CTX. Els tubs van ser incubats 18 hores a 37° C en condicions anaeròbiques per evitar el sobrecreixement dels bacteris aerobis gramnegatius. Es va fer una dilució 1/10 de cada cultiu amb solució de Ringer, i 0,1 mL de cadascuna de les dilucions va ser sembrada per duplicat en plaques de MacC-CTX que van ser incubades seguint les condicions anteriors. A partir d'aquí es va seguir la mateixa metodologia

que per a l'estudi en portadors fecals. De les cinc aigües residuals provinents de dues plantes depuradores, es van treballar 120 colònies, 96 de les quals presentaven un antibiograma compatible amb la producció de BLEA o cefamicinasa. Després de realitzar l'ERIC-PCR es van seleccionar 33 clons, és a dir, trobem que hi ha 2,9 (96/33) soques per clon. En totes les aigües analitzades es van trobar soques productores de BLEA i en una es va trobar una soca productora de cefamicinasa. No es va trobar cap soca productora de carbapenemasa. Es van aïllar un total de 32 soques d'*E. coli* portadores de BLEA i una soca d'*E. coli* portadora de cefamicinasa.

La soca productora de la cefamicinasa plasmídica codificava una CMY-2. La caracterització de les BLEA es pot observar a la taula 12.

Betalactamasa	Nº de soques	%	IC
CTX-M-9	13	40,63	23,7-59,4
CTX-M-14	10	31,25	16,1-50
CTX-M-32	1	3,13	0,07-16,2
CTX-M-51	1	3,13	0,07-16,2
SHV-12	4	12,50	3,51-29
TEM-52	3	9,38	1,97-25
TOTAL	32	100	

Taula 12: Resultat de la caracterització de les BLEA presents en les soques aïllades d'aigües residuals.

Les CTX-M, amb un 78,1%, són els enzims majoritaris, després les SHV amb un 12,5% i finalment les tipus TEM amb un 9,4%. Dins les BLEA tipus CTX-M, l'enzim CTX-M-9 seguit de CTX-M-14, són les més freqüents, després hi hauria SHV-12 i, per últim TEM-52. Cal dir que en aquest ecosistema es va trobar una betalactamasa nova, CTX-M-51 (nombre d'accés GenBank DQ211987), que presenta el 99% d'homologia

amb el gen *bla*_{CTX-M-9} (GenBank AF174129), el canvi nucleotídic que s'observa és C239T, que dóna lloc al canvi aminoacídic Ala80Val.

La presència de betalactamases en aigües ha estat poc estudiada^{151,220}. En un cas analitzen la diversitat d'aquests enzims en aigües de la Ria de Aveiro (Portugal) i troben la presència de betalactamases tipus TEM, IMP i OXA-2-tipus. En l'altre analitzen les aigües de diferents rius dels Estats Units i curiosament troben un clon d'*Enterobacter asburiae* productor de la carbapenemasa IMI-2, enzim relacionat amb la IMI-1 i Nmc-A descrits en soques d'*E. cloacae*.

És doncs el primer treball on en l'anàlisi d'aigües, concretament d'aigües residuals, es descriu la presència de BLEA i cefamicinases. Aquestes dades ens fan pensar que, probablement, el mostrejar les aigües residuals humanes pot ser un mètode de cribatge ràpid i econòmic, que pot ser representatiu de la prevalença d'aquests enzims a la comunitat.

3.2.7 Resum dels resultats de prevalença i caracterització de BLEA, cefamicinases i carbapenemases

La prevalença de BLEA i cefamicinases plasmídiques en els diferents hàbitats d'estudi es pot observar a la taula 13.

	Mostres estudiades	Positius per BLEA	Positius per cefamicinasa
Malalts	8020	155 (1,93%)	3 (0,04%)
Portadors fecals	948	63 (6,6%)	6 (0,63%)
Portadors fecals afectats per un brot alimentari	61	19 (31,1%)	
Aliments	738	3 (0,4%)	
Granges de conills	10	2 (20%)	1 (10%)
Granges de porcs	10	8 (80%)	
Granges d'aus	10	10 (100%)	7 (70%)
Aigües residuals	5	5 (100%)	1 (20%)

Taula 13: Resum de la prevalença de BLEA i cefamicinasa plasmídica en enterobacteris aïllats en diferents ecosistemes.

El fet que s'hagin trobat soques portadores de BLEA en tots els hàbitats, fa pensar que aquests enzims han difós per tot arreu, encara que la seva prevalença es manté a nivells baixos. Pel que fa a les cefamicinases plasmídiques també s'ha vist que la seva distribució és ampla, encara que inferior a la de les BLEA, i la seva prevalença és encara molt més baixa. D'enterobacteris productors de carbapenemases no se n'han trobat en cap dels hàbitats d'estudi.

El resultat de la caracterització de les betalactamases trobades als diferents hàbitats es pot observar a la taula 14 i a la figura 18.

Betalactamasa	Malalts	Portadors fecals	Brots	Aliments	Conills	Porcs	Aus	Aigües	TOTAL
CTX-M-1	2					27	3		32
CTX-M-10	1	1							2
CTX-M-3	3			1					4
CTX-M-15	7	5							12
CTX-M-32	3	4	2				2	1	12
CTX-M-9	20	16	15		1		10	13	75
CTX-M-14	71	34	38	3	2		30	10	188
CTX-M-51								1	1
SHV-2	8		1				1		10
SHV-5	5	1				4	1		11
SHV-12	30	11	7			8	5	4	65
TEM-4	1								1
TEM-10	1								1
TEM-12	1								1
TEM-52	1	2	3				2	3	11
CMY-2	3	7			1		13	1	25
TOTAL	157	81	66	4	4	39	67	33	451

Taula 14: BLEA i cefamicinases presents en els diferents hàbitats.

En tots els hàbitats es van trobar cefamicinases plasmídiques encara que com s'ha esmentat, en una baixa freqüència, i totes elles van ser caracteritzades com a CMY-2. Les BLEA han estat trobades en tots els hàbitats, essent la família predominant la tipus CTX-M, seguida de la tipus SHV i finalment la tipus TEM, que és aïllada de forma ocasional en alguns ecosistemes. L'enzim CTX-M-14, seguit de CTX-M-9 són les betalactamases més freqüents, amb excepció de les granges de porcs on la predominant és CTX-M-1 i les aigües residuals on predomina CTX-M-9. Després trobem SHV-12, i finalment hi ha les altres BLEA descrites de manera esporàdica.

El fet de que a les aigües residuals la betalactamasa més freqüentment aïllada sigui CTX-M-9, seguida de CTX-M-14 i SHV-12, es podria deure a que les mostres

d'aigües van ser recollides l'any 2002, mentre que la recollida de la resta de mostres es realitzà al 2003. Aquesta hipòtesi ve recolzada per els resultats obtinguts en el primer estudi d'aquesta tesi, on la betalactamasa més freqüent present tant en portadors fecals com en malalts al 2002 és l'enzim CTX-M-9.

Finalment, cal remarcar la presència gairebé exclusiva en el sòl de les granges de porc de l'enzim CTX-M-1, que es troba de forma esporàdica en alguns dels altres ecosistemes i, per altra que les CTX-M predominants en els altres hàbitats, CTX-M-14 i CTX-M-9, no es troben en les granges de porcs.

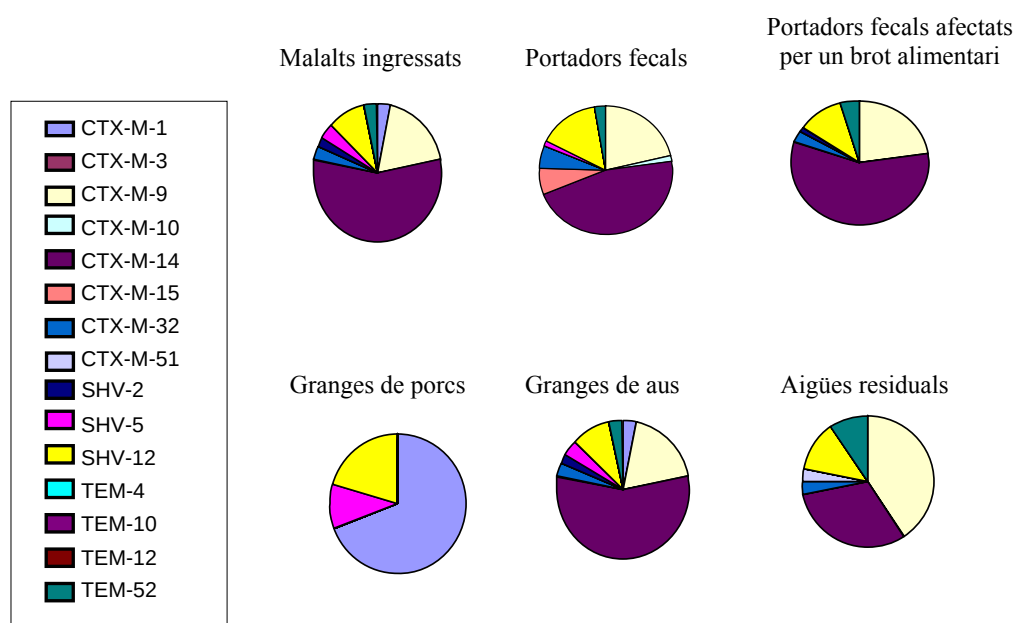


Figura 18: Prevalença de cada tipus de BLEA en els diferents ecosistemes d'estudi.

3.2.8 Resistències associades

Una de les característiques del mecanisme de resistència per producció de BLEA o cefamicinasa és que va associat a d'altres mecanismes que confereixen resistència a altres antibiòtics²²¹. Mitjançant la tècnica de disc-difusió es va determinar el patró de resistències associades que presentaven les soques productores de BLEA o cefamicinasa. Els antimicrobians testats van ser: kanamicina (KM), gentamicina (GM), tobramicina (TM), amicacina (AK), fosfomicina (FOS), sulfonamides (S3), trimetoprim (TP), cotrimoxazol (SXT), cloramfenicol (CHL), àcid nalidíxic (NAL), ciprofloxacina (CIP), nitrofurantoïna (FUR) i tetraciclina (TET).

Com que les resistències associades de les soques productores de BLEA o cefamicinasa no mostraven cap diferència entre els diferents ecosistemes d'estudi, s'han agrupat els diferents patrons de resistències associades en funció del tipus de betalactamasa que es va caracteritzar independentment de l'hàbitat d'on s'aïllaren. La taula 15 recull les resistències associades observades en les diferents betalactamases.

En les soques productores de BLEA es va observar que el 19% eren resistents a kanamicina, el 5,6% a gentamicina, 6,8% a tobramicina, el 0,7% a amicacina, el 66,2% a sulfonamides, el 53,5 % a cotrimoxazol, el 54,7% a trimetoprim, el 22,3% a cloramfenicol, el 25,1% a ciprofloxacina, el 55,1% a àcid nalidíxic, el 12,7% a nitrofurantoïna, el 73,5% a tetraciclina i no es va trobar cap soca resistent a fosfomicina. Aquestes dades contrasten amb les obtingudes per Rodríguez-Baño *et al*²¹¹ que descriuen soques d'*E. coli* portadores de BLEA (aïllades del 2001 al 2002) a Sevilla en malalts no hospitalitzats, amb uns percentatges de resistència molt més elevats: a ciprofloxacina del 78%, a gentamicina del 26%, a amicacina del 4% i a cotrimoxazol del 71%. També Brigante *et al*²²², descriuen la presència de soques d'*E. coli* productores de BLEA de 1999 a 2003 en un hospital italià, i troben que un 77,3% de les soques són

resistents a tetraciclina, 62,3% a cotrimoxazol, 49% a ciprofloxacina, 18,9% a gentamicina i 1,8% a ampicacina.

En el cas de les soques productores de cefamicinases es va trobar que el 56% eren resistents a kanamicina, gentamicina, i tobramicina, el 96% a sulfonamides, el 36% a cotrimoxazol, el 40% a trimetoprim, el 80% a cloramfenicol, el 36% a ciprofloxacina, el 64% a àcid nalidíxic, el 96% a tetraciclina i no es va trobar cap soca resistent a ampicacina, fosfomicina ni nitrofurantoïna. Si comparem aquestes dades amb les de les soques productores de BLEA, les soques productores de cefamicinasa presenten una major multiresistència, principalment als aminoglucòsids. Podem comparar aquestes dades amb les trobades per Yan *et al*²²³, que descriuen la presència de soques d'*E. coli* productores de CMY-2 en animals, carn picada i humans al sud de Taiwan al 2002, amb una resistència a cotrimoxazol del 92,5%, a gentamicina del 70%, a tobramicina del 40,7%, a cloramfenicol del 77,7%, a àcid nalidíxic del 70%, a ciprofloxacina del 59,2% i tampoc no troben cap soca resistent a ampicacina.

Quan analitzem els múltiples patrons de multiresistència associada a la producció de BLEA o cefamicinasa no trobem cap patró destacable, només es podria destacar la presència del patró sulfonamides, trimetoprim i cotrimoxazol associat a tetraciclina o cloramfenicol en les betalactamases del grup de la CTX-M-9. Aquest fenotip ve donat per la presència de l'integró In60¹⁸⁷ que conté el gen *bla*_{CTX-M-9} o el *bla*_{CTX-M-14b}, però no explica el patró de les soques amb CTX-M-14a. El fet de que no totes les soques que codifiquen CTX-M-9 o CTX-M-14b portin associades aquestes resistències també es podria explicar per les dades trobades per García *et al*²²⁴ que descriuen una gran variabilitat en l'estructura de l'In60, amb deleccions i insercions en diferents fragments de l'integró. La resistència conjunta a sulfonamides, trimetoprim i cotrimoxazol en l'enzim CTX-M-14a podria venir marcada per integrons *sul1*-type²²⁵,

que són integrons que tenen gens de resistència a aminoglicòsids, a sulfonamides i a trimetoprim. Tot i que el gen *bla*_{CTX-M-14a} no es troba codificat dins d'un integrò, si que és possible que la soca que produeix aquesta betalactamasa porti un integrò d'aquest tipus, bé sigui en el seu genoma o en algun plasmidi.

Per altra banda, el 60% dels patrons de multirresistència contenen la resistència als aminoglucòsids, principalment a kanamicina seguit per gentamicina. La resistència a aquests antimicrobians es deu en enterobacteris, majoritàriament, a la presència de dos enzims, l'AAC(6) que confereix resistència a kanamicina, tobramicina i netilmicina, el qual normalment va associat amb l'AAC(3) que afegeix la resistència a la gentamicina. L'entorn genètic d'aquests enzims mostra la presència d'integrons i transposons^{226,227}.

Finalment, pel que fa a la resistència a quinolones comentar que el principal mecanisme és degut a mutacions cromosòmiques, encara que han estat descrits gens de resistències a quinolones codificats en plasmidis²²⁸⁻²³⁰. Aquests gens codifiquen per els enzims Qnr, que protegeixen la DNAgirasa, primera diana de les quinolones en enterobacteris. Per mitjà dels iniciadors QNRup (5'-ATGGATATTATTGATAAAGTT-3') i QNRdn (5'-CTAATCCGGCAGCACTATTA-3') es va determinar la prevalença del gen *qnr* en totes les soques amb BLEA o cefamicinasa, i en cap cas vàrem obtenir amplificat. Aquests resultats poden deure's al fet que els iniciadors emprats només amplifiquen pel gen *qnrA* i no pels gens *qnrB* o *qnrS*, essent el gen *qnrB* el més descrit en soques productores de BLEA i/o cefamicinasa²³¹. Encara que aquest estudi és contradictori amb el realitzat per Lavigne *et al*²³² que troben que el 7,7% de les soques d'*E. coli* productores de CTX-M codifiquen el gen *qnrA*.

	CTX-M-11	CTX-M-31	CTX-M-9	CTX-M-14a	CTX-M-14b	SHV-12	SHV1	TEM1	CMY-2
KM,GM,TP,S3,TP,SXT,AK,FUR		1							
KM,GM,TP,S3,TP,SXT,CHL,FUR,TET						1			
KM,GM,TP,S3,TP,SXT,CHL,TET				4		2			4
KM,GM,TP,S3,TP,SXT,TET				1					2
KM,GM,TP,S3,TP,CHL,TET									1
KM,GM,TP,S3,CHL,TET									7
KM,GM,S3,TP,SXT,CHL,FUR						1			
KM,GM,S3,TP,SXT,TET				1		1			
KM,GM,S3,TP,SXT									
KM,GM,S3,TP,SXT,CHL,TET			2				1		
KM,TP,S3,TP,SXT,CHL,FUR,TET			1			1			
KM,TP,S3,TP,SXT,TET	2		1			2			
KM,TP,S3,TP,SXT,CHL,AK,FUR,TET						1			
KM,TP,TP,SXT,TET	1								
KM,TP	1								
KM,TP,S3,AK							1		
KM,TP,S3							2		
KM,S3,TP,SXT,CHL,TET		1	2	3	7	2		1	
KM,S3,TP,SXT,CHL,FUR,TET	2								
KM,S3,TP,SXT,TET	1		3	3	1			2	
KM,S3,TP,SXT,FUR,TET			2	1	3				
KM,S3,TP,SXT,FUR			3						
KM,S3,TP,SXT			2	1	2		1		
KM,S3,TET				1		2			
KM,S3				1					
KM,TP,SXT,TET			1						
KM,FUR,TET						1			
KM,TET				1		1			
GM,TP,S3,TP,SXT,CHL,TET				1		2			
GM,TP,S3,TP,SXT,TET						1			
GM,S3,TP,SXT,CHL,TET	1					1			
GM,S3,TP,SXT,TET				1					
GM,S3,TP,SXT					1				
GM,S3,TET						1			
GM						1		1	
TP,S3,TP,SXT,CHL,TET						1			
S3,TP,SXT,CHL,FUR,TET	2			2	1	1			
S3,TP,SXT,CHL,FUR	1	1							
S3,TP,SXT,CHL,TET	4	1	7	9	1	5	2		1
S3,TP,SXT,TET	2		32	18	5	4	3	3	2
S3,TP,SXT,CHL			1	1	1	1	1		
S3,TP,SXT,FUR,TET	4		1	1		2		1	
S3,TP,SXT	2		7	3	3	2	2		
S3,SXT,TE				1					
S3,SXT,CHL,TET	1								
S3,CHL,TET	4			4		1	1		7
S3,CHL				2		1			
S3,FUR,TET	1			1					
S3,TET	4		1	8		3	3		
S3	1		5	3					
TP,SXT,FUR				2					
TP,SXT,TET				3		1			
TP,FUR,TE	1								
TP,FUR	1								
TP,CHL,TET							2		
TP,TET	1			1					
TP			1			1			
CHL,TET	1			1					
FUR,TET	2			1		3			
FUR	1			3		2			
TET	5		1	59	1	9	1	1	
TOTAL	49	5	73	149	26	59	20	10	24
Sense resistència associada	9	1	0	14	1	5	1	5	1
% RESISTENTS	89	100	100	95	96	93	95	71	96

Taula 15: Patrons de resistències associats observats en les diferents betalactamases trobades (KN: kanamicina, GM: gentamicina, TP: tobramicina, S3: sulfonamides, TP: trimetoprim, SXT: cotrimoxazol, AK: amicacina, FUR: nitrofurantoina, CHL: cloramfenicol, TET: tetraciclina)

4. CONCLUSIONS

1. Les betalactamases d'espectre ampliat i les cefamicinases han estat trobades en tots els ecosistemes estudiats (humans, animals, aliments i aigües residuals). No s'han detectat carbapenemases en cap dels ecosistemes citats.
2. La prevalença de BLEA i cefamicinases ha estat més elevada en els ecosistemes d'àmbit extrahospitalari (portadors fecals, sòl de granges d'animals i aigües residuals humanes) que en mostres clíniques, fet que recolza la hipòtesi que la comunitat pot fer de reservori d'aquest mecanisme de resistència.
3. *Escherichia coli* ha estat l'única espècie que s'ha aïllat en tots els ecosistemes excepte en el subsòl de les granges de conills on s'aïlla una soca d'*E. cloacae* productora de BLEA. En el grup de mostres clíniques s'han aïllat a més a més soques de *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *C. freundii* i *Salmonella*.
4. En l'estudi de portadors fecals atesos als Serveis d'Urgències s'ha observat una distribució temporal significativa de la prevalença de BLEA, essent major en el període d'estiu i menor en el d'hivern. Distribució inversa a l'obtinguda pel consum d'antibiòtic dels ambulatoris de l'àrea d'influència. La major prevalença s'ha observat en la població de menors de 25 anys. Aquest fet pot reflectir la importància de la pressió selectiva a la comunitat.
5. Les prevalences trobades en els portadors fecals afectats per un brot alimentari, que en molts d'ells són superiors a les trobades en els portadors fecals, fa pensar que l'aliment és un vector de les soques productores de BLEA, que en aquest cas concret difonen juntament amb l'agent causal del brot, però que no en són la causa.
6. S'han aïllat tres soques d'enterobacteris productors de BLEA en aliments, una *K. pneumoniae* i 2 *E. coli*. Alertant així del possible paper que els aliments poden jugar en la difusió d'aquests enzims.

7. L'estudi de la femta del subsòl de les granges, en comptes de l'estudi individualitzat de la femta de cada animal, sembla ser una eina útil per a determinar la prevalença de BLEA o cefamicinases en els portadors animals.
8. De la mateixa manera, l'estudi de les aigües residuals humanes és un reflex del que es pot trobar a la comunitat i, per tant, poden utilitzar-se com a mètode de cribatge per a avaluar la prevalença i el tipus d'enzims presents, en els portadors humans.
9. Les BLEA de la família CTX-M han estat les més aïllades en tots els ecosistemes, i concretament la CTX-M-14, excepte en la femta del subsòl de les granges de porcs on l'enzim predominant ha estat CTX-M-1. També cal destacar l'elevada presència de l'enzim SHV-12.
10. La única cefamicinasa trobada en els diferents ecosistemes ha estat CMY-2.
11. Un 66% de les soques productores de BLEA porten associada la resistència a algun altre antimicrobià, principalment les sulfonamides, el trimetoprim i a l'àcid nalidíxic.
12. El 96% de les soques productores de CMY-2 porten associada la resistència a algun altre antimicrobia, principalment sulfonamides, tetraciclina, i cloramfenicol, essent la meitat d'elles resistents també a aminoglucòsids i quinolones.
13. Ni en les soques amb BLEA, ni en les soques amb CMY-2 s'ha trobat un patró majoritari de resistències associades, amb l'excepció de les BLEA tipus CTX-M-9 que presenten el patró sulfonamides, trimetoprim, cotrimoxazol, associat moltes vegades a cloramfenicol o tetraciclina.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Rahn, O. New principles for the classification of bacteria Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg., Abt. II, 1937; vol. 96, 273-286
2. Madigan, M. T. Martinko, J. M. y Parker, J. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed. Prentice Hall Iberia. Madrid. 2003
3. Prats, G. Mirelis, B. *Enterobacteriaceae*. A: Evelio Perea. Editor. Microbiología Médica. Madrid: Mosby /Doyma. 1992; 624-640
4. Prats, G. Mirelis, B. Enterobacterias. Características generales. Enterobacterias oportunistas. *Escherichia coli*. A: García Rodríguez, J. A. Picazo, J. J. Editores. Microbiología Médica. Madrid: Mosby /Doyma. 1996; 223-238
5. Bopp, C. A. Brenner, F. W. Fields, P. I. Wells, J. G. Strockbine, N. A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. A: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. Washington DC: ASM Press, 2003; 654-671
6. Yao, J. D. C. Moellering, R. C. Antibacterial agents. A: Murray, P. R. Baron, E. J. Jorgensen, J. H. Pfaller, M. A. Tenover, R. H. editors. Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. Washington DC: ASM Press, 2003; 1039-1073
7. Rice, L. B. Sham, D. Bonomo, R. A. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. A: Murray, P. R. Baron, E. J. Jorgensen, J. H. Pfaller, M. A. Tenover, R. H. editors. Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. Washington DC: ASM Press, 2003; 654-671
8. Nataro, J. P. Kaper, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1):142-201.
9. Kaper, J. B. Nataro, J. P. Mobley, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004; 2:123-140
10. Ewing, W. H. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*, 4ª ed. New York: Elsevier Science Publishing Co., 1986
11. Prats, G. Coll, P. Géneros *Shigella, Salmonella y Yersinia*. A: García Rodríguez, J. A. Picazo, J. J. Editores. Microbiología Médica. Madrid: Mosby /Doyma. 1996; 239-252
12. Pegues, D. A. Ohl, M. Miller, S. L. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. A: Mandell, G. L. Bennett, J. E. Dolin, R. Editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 6ª ed. Filadèlfia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005; 2636-2654
13. Bockemuhl, J. Wong, J. D. *Yersinia*. A: Murray, P. R. Baron, E. J. Jorgensen, J. H. Pfaller, M. A. Tenover, R. H. editors. Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. Washington DC: ASM Press, 2003; 672-683
14. Miró, E. Rivera, A. Mesa, R. J. Els β -lactàmics. A: Ruiz, J. editor. Atimicrobians. Societat Catalana de Biologia. 2005; 91-106

15. Mirelis, B. Gurgui, M. Medicamentos antibacterianos. A: Ausina Ruiz, V. Moreno Guillén, S. editors. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid. Ed. Médica Panamericana. 2006; 97-116.
16. Marín, M. Gudiol, F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21:42-55.
17. Neu, H. C. Fu, K. P. Clavulanic acid, a novel inhibitor of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1978; 14:650-655
18. Neu, H. C. The new beta-lactamase-stable cephalosporines. Ann Intern Med. 1982; 97: 408-419
19. Fung Tomc, J. C. Fourth generation cephalosporins. Clin Microbiol Newsl. 1997; 19:129-136
20. Neu, H. C. Carbapenems: special properties contributing to their activity. Am J Med 1985; 78 (Supl 6^a): 33-40
21. Barza, M. Imipenem: First of a new class of beta-lactam antibiotics. Ann Intern Med 1985; 103: 552-560
22. Barry, A. L. Thornsberry, C. Jones, R. N. Gavan, T. L. Aztreonam: antibacterial activity, betalactamase stability, and interpretative standards and quality control guidelines for disk-diffusion susceptibility testing. Rev Infect Dis 1985; 7 (Supl 4): S594-S604.
23. Vogelmann, B. Gudmundsson, S. Leggett, J. Turnidge, J. Ebert, S. Craig, W. A. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. J Infect Dis. 2004; 158(4): 831-47
24. Spivey, J. M. The postantibiotic effect. Clin Pharm. 1992; 11(10): 865-75.
25. Waxman, D. J. Strominger, J. L. Penicillin-binding proteins and the mechanisms of action of betalactam antibiotics. Ann Rev Biochem. 1983; 52: 825-869
26. Hartman, B. J. Tomasz, A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 1984; 158(2): 513-6.
27. Hakenbeck, R. Tarpay, M. Tomasz, A. Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 1980; 17(3): 364-71.
28. Williamson, R. le Bouguenec, C. Gutmann, L. Horaud, T. One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. J Gen Microbiol. 1985; 131(8):1933-40.
29. Mendelman, P. M. Chaffin, D. O. Stull, T. L. Rubens, C. E. Mack, K. D. Smith, A. L. Characterization of non- β -lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother. 1984; 26(2): 235-44.

30. Dougherty, T. J. Koller, A. E. Tomasz, A. Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and intrinsically resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980; 18(5): 730-7.
31. Neuwirth, C. Siebor, E. Duez, J. M. Pechinot, A. Kazmierczak, A. Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J Antimicrob Chemother.* 1995; 36(2): 335-42.
32. Scudamore, R. A. Beveridge, T. J. Goldner, M. Outer-membrane penetration barriers as components of intrinsic resistance to β -lactam and other antibiotics in *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979; 15(2): 182-9.
33. Livermore, D. M. Epidemiology of antibiotic resistance. *Intensive Care Med.* 2000; 26 (Suppl. 1): S14-S21.
34. Nikaido, H. The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access? *Drug Resist Updat.* 1998; 1(2): 93-8.
35. Fukuoka, T. Ohya, S. Narita, T. Katsuta, M. Iijima, M. Masuda, N. Yasuda, H. Trias, J. Nikaido, H. Activity of the carbapenem panipenem and role of the OprD (D2) protein in its diffusion through the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(2): 322-7.
36. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): 20-51.
37. Piddock, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(2): 382-402.
38. Zgurskaya, H. L. Nikaido, H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* 2000; 37: 219-225.
39. Pollock, M. R. Origin and function of penicillinase: a problem in biochemical evolution. *Br Med J.* 1967; 14;4(571): 71-7.
40. Vining, L. C. Antibiotic tolerance in producer organisms. *Adv Appl Microbiol.* 1979, 25: 147-68.
41. Ambler, R. P. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 16;289(1036): 321-31.
42. Bush, K. Jacoby, G. A. Medeiros, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39:1211-1233
43. Livermore, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8: 557-84.

44. Bergstrom, S. Normark, S. β -lactam resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* caused by elevated production of the ampC-mediated chromosomal β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979; 16(4): 427-33.
45. Tracz, D. M. Boyd, D. A. Bryden, L. Hizon, R. Giercke, S. Van Caesele, P. Mulvey, M. R. Increase in ampC promoter strength due to mutations and deletion of the attenuator in a clinical isolate of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* as determined by RT-PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55(5): 768-72.
46. Corvec, S. Caroff, N. Espaze, E. Marraillac, J. Reynaud, A. Mutation in the ampC promoter increasing resistance to β -lactams in a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(10): 3265-7.
47. Haeggman, S. Lofdahl, S. Paauw, A. Verhoef, J. Brisse, S. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(7): 2400-8.
48. Gheorghiu, R. Yuan, M. Hall, L. M. Livermore, D. M. Bases of variation in resistance to β -lactams in *Klebsiella oxytoca* isolates hyperproducing K1 β -lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 1997; 40(4): 533-41.
49. Pham, J. N. Bell, S. M. Martín, L. Carniel, E. The β -lactamases and β -lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46: 951-7.
50. Bradford, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 933-51.
51. Jeong, Y. S. Lee, J. C. Kang, H. Y. Yu, H. S. Lee, E. Y. Choi, C. H. Tae, S. H. Lee, Y. C. Cho, D. T. Seol, S. Y. Epidemiology of nalidixic acid resistance and TEM-1- and TEM-52-mediated ampicillin resistance of *Shigella sonnei* isolates obtained in Korea between 1980 and 2000. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(12): 3719-23.
52. Mlynarczyk, G. Mlynarczyk, A. Jeljaszewicz, J. Epidemiological aspects of antibiotic resistance in respiratory pathogens. *Int J Antimicrob Agents.* 2001; 18(6): 497-502.
53. Thomson, C. J. Amyes, S. G. Molecular epidemiology of the plasmid-encoded TEM-1 β -lactamase in Scotland. *Epidemiol Infect.* 1993; 110(1): 117-25.
54. Datta, N. Kontomichalou, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature.* 1965; 16;208(7): 239-41.
55. Farrell, D. J. Morrissey, I. Bakker, S. Buckridge, S. Felmingham, D. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 beta-lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(4): 773-6.

56. van Embden, J. D. van Klingeren, B. Dessens-Kroon, M. van Wijngaarden, L. J. Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in the Netherlands: epidemiology and genetic and molecular characterization of their plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980; 18(5): 789-97.
57. Barthélémy, M. Péduzzi, J. Labia, R. Distinction entre les structures primaires des β -lactamases TEM-1 et TEM-2. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 1985; 136A: 311–321.
58. Kliebe, C. Nies, B. A. Meyer, J. F. Tolxdorff-Neutzling, R. M. Wiedemann, B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 28(2): 302-7.
59. Sirot, D. Sirot, J. Labia, R. Morand, A. Courvalin, P. Darfeuille-Michaud, A. Perroux, R. Cluzel, R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 1987; 20(3): 323-34.
60. Sougakoff, W. Goussard, S. Courvalin, P. The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol. Lett.* 1988; 56: 343-348.
61. Tessier, F. Arpin, C. Allery, A. Quentin, C. Molecular characterization of a TEM-21 β -lactamase in a clinical isolate of *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42: 2125–2127.
62. Perilli, M. Segatore, B. Massis, M. R. D. Riccio, M. L. Bianchi, C. Zollo, A. Rossolini, G. M. Amicosante, G. TEM-72, a new extended-spectrum β -lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 2537–2539.
63. Bonnet, R. Champs, C. D. Sirot, D. Chanal, C. Labia, R. Sirot, J. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2671–2677.
64. Marchandin, H. Carriere, C. Sirot, D. Jean-Pierre, H. Darbas, H. TEM-24 produced by four different species of *Enterobacteriaceae*, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2069–2073.
65. Morosini, M. I. Cantón, R. Martínez-Beltran, J. Negri, M. C. Pérez-Díaz, J. C. Baquero, F. Blázquez, J. New extended spectrum TEM-type β -lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 458–461.
66. Bradford, P. A. Urban, C. Jaiswal, A. Mariano, N. Rasmussen, B. A. Projan, S. J. Rahal, J. J. Bush, K. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(4): 899-905.
67. El Harrif-Heraud, Z. Arpin, C. Benliman, S. Quentin, C. Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to SHV-4-producing strains of *Citrobacter diversus*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(10): 2561-7.

68. Naas, T. Philippon, L. Poirel, L. Ronco, E. Nordmann, P. An SHV-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(5): 1281-4.
69. Tzouvelekis, L. S. Tzelepi, E. Tassios, P. T. Legakis, N. J. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 14(2): 137-42.
70. Navarro, F. Miró, E. Update on CTX-M-type β -lactamases. *Rev Med Microbiol.* 2002; 13(2): 63-73.
71. Bonnet, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(1): 1-14.
72. Humeniuk, C. Arlet, G. Gautier, V. Grimont, P. Labia, R. Philippon, A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(9): 3045-9.
73. Rodríguez, M. M. Power, P. Radice, M. Vay, C. Famiglietti, A. Galleni, M. Ayala, J. A. Gutkind, G. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12): 4895-7.
74. Poirel, L. Kampfer, P. Nordmann, P. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(12): 4038-40.
75. Olson, A. B. Silverman, M. Boyd, D. A. McGeer, A. Willey, B. M. Pong-Porter, V. Daneman, N. Mulvey, M. R. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(5): 2112-5.
76. Decousser, J. W. Poirel, L. Nordmann, P. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(12): 3595-8.
77. Naas, T. Nordmann, P. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999; 5(11): 865-79.
78. Walther-Rasmussen, J. Hoiby, N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(3): 373-83.
79. Nordmann, P. Ronco, E. Naas, T. Duport, C. Michel-Briand, Y. Labia, R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(5): 962-9.

80. Vahaboglu, H. Dodanli, S. Eroglu, C. Ozturk, R. Soyletir, G. Yildirim, I. Avkan, V. Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(12): 2942-6.
81. Vahaboglu, H. Ozturk, R. Aygun, G. Coskuncan, F. Yaman, A. Kaygusuz, A. Leblebicioglu, H. Balik, I. Aydin, K. Otkun, M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(2): 484.
82. Naas, T. Poirel, L. Karim, A. Nordmann, P. Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 1999; 15;176(2): 411-9.
83. Rossolini, G. M. Franceschini, N. Lauretti, L. Caravelli, B. Riccio, M. L. Galleni, M. Frere, J. M Amicosante, G. Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (blaA(CME)) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(9): 2193-9.
84. Silva, J. Aguilar, C. Ayala, G. Estrada, M. A Garza-Ramos, U. Lara-Lemus, R. Ledezma, L. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(4): 997-1003.
85. Matsumoto, Y. Inoue, M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(2): 307-13.
86. Poirel, L. Le Thomas, I. Naas, T. Karim, A. Nordmann, P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(3): 622-32.
87. Poirel, L. Weldhagen, G. F. Naas, T. De Champs, C. Dove, M. G. Nordmann, P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(9): 2598-603.
88. Goossens, H. Grabein, B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; 53(4): 257-64.
89. Hernández, J. R. Pascual, A. Cantón, R. Martínez-Martínez, L. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21: 77-82.

90. Hernández, J. R. Martínez-Martínez, L. Cantón, R. Coque, T. M. Pascual, A. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(5): 2122-5.
91. Sabatè, M. Miró, E. Navarro, F. Vergés, C. Aliaga, R. Mirelis, B. Prats, G. β -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49(6): 989-97.
92. Valverde, A. Coque, T. M. Sánchez-Moreno, M. P. Rollan, A. Baquero, F. Cantón, R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 4769-75.
93. Munday, C. J. Whitehead, G. M. Todd, N. J. Campbell, M. Hawkey, P. M. Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(3): 628-33.
94. Woodford, N. Ward, M. E. Kaufmann, M. E. Turton, J. Fagan, E. J. James, D. Johnson, A. P. Pike, R. Warner, M. Cheasty, T. Pearson, A. Harry, S. Leach, J. B. Loughrey A, Lowes JA, Warren RE, Livermore DM. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(4): 735-43.
95. Pallecchi, L. Malossi, M. Mantella, A. Gotuzzo, E. Trigos, C. Bartoloni, A. Paradisi, F. Kronvall, G. Rossolini, G. M. Detection of CTX-M-type β -lactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12): 4556-61.
96. Pitout, J. D. Gregson, D. B. Church, D. L. Elsayed, S. Laupland, K. B. Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in the Calgary health region. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(6): 2844-9.
97. Briñas, L. Moreno, M. A. Zarazaga, M. Porrero, C. Sáenz, Y. García, M. Domínguez, L. Torres, C. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2056-8.
98. Briñas, L. Moreno, M. A. Teshager, T. Sáenz, Y. Porrero, M. C. Domínguez, L. Torres, C. Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(3): 1262-4.
99. Shiraki, Y. Shibata, N. Doi, Y. Arakawa, Y. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 β -lactamase in cattle, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 69-75.
100. Prats, G. Mirelis, B. Miró, E. Navarro, F. Llovet, T. Johnson, J. R. Camps, N. Domínguez, A. Salleras, L. Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among summer camp attendees with salmonellosis. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(10): 1273-80.

101. Philippon, A. Arlet, G. Jacoby, G. A. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(1): 1-11.
102. Tzouvelekis, L. S. Tzelepi, E. Mentis, A. F. Tsakris, A. Identification of a novel plasmid-mediated β -lactamase with chromosomal cephalosporinase characteristics from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 1993; 31(5): 645-54.
103. Barnaud, G. Arlet, G. Verdet, C. Gaillot, O. Lagrange, P. H. Philippon, A. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible β -lactamase (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(9): 2352-8.
104. Papanicolaou, G. A. Medeiros, A. A. Jacoby, G. A. Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34(11): 2200-9.
105. Bauernfeind, A. Stemplinger, I. Jungwirth, R. Wilhelm, R. Chong, Y. Comparative characterization of the cephamycinase bla_{CMY-1} gene and its relationship with other β -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(8): 1926-30.
106. Bauernfeind, A. Jungwirth, R. Schweighart, S. Theopold, M. Antibacterial activity and β -lactamase stability of eleven oral cephalosporins. *Infection.* 1990; 18 (Suppl 3): S155-67.
107. Bauernfeind, A. P. Mangold, S. Schweighart, G. H. Miller, K. Shaw, H. Giamarellou, Dornbusch, K. Molecular analysis of a transferable cephamycinase in *Klebsiella pneumoniae*, abstr. C 120. In Program and abstracts of the 2nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992.
108. Pérez-Pérez, F. J. Hanson, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(6): 2153-62.
109. Bauernfeind, A. Stemplinger, I. Jungwirth, R. Giamarellou, H. Characterization of the plasmidic β -lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(1): 221-4.
110. Bradford, P. A. Urban, C. Mariano, N. Projan, S. J. Rahal, J. J. Bush, K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(3): 563-9.
111. Girlich, D. Naas, T. Bellais, S. Poirel, L. Karim, A. Nordmann, P. Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(6): 1470-8.

112. Verdet, C. Arlet, G. Barnaud, G. Lagrange, P. H. Philippon, A. A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*_{DHA-1} gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(1): 222-5.
113. Navarro, F. Pérez-Trallero, E. Marimón, J. M. Aliaga, R. Gomariz, M. Mirelis, B. CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999-December 2000). *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48(3): 383-9.
114. Álvarez, M. Tran, J. H. Chow, N. Jacoby, G. A. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(2): 533-7.
115. Yum, J. H. Kim, S. Lee, H. Yong, D. Lee, K. Cho, S. N. Chong, Y. Emergence and wide dissemination of CTX-M-type ESBLs, and CMY-2- and DHA-1-type AmpC β -lactamases in Korean respiratory isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Korean Med Sci.* 2005; 20(6): 961-5.
116. Winokur, P. L. Brueggemann, A. De Salvo, D. L. Hoffmann, L. Apley, M. D. Uhlenhopp, E. K. Pfaller, M. A. Doern, G. V. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 2777-83.
117. Zhao, S. White, D. G. McDermott, P. F. Friedman, S. English, L. Ayers, S. Meng, J. Maurer, J. J. Holland, R. Walker, R. D. Identification and expression of cephamycinase *bla*_{CMY} genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 3647-50.
118. Boyer-Mariotte, S. Enzymatic resistance to imipenem in gram-negative bacilli: NMC-A, an original carbapenemase. *Ann Pharm Fr.* 1998; 56(6): 244-9.
119. Rasmussen, B. A. Bush, K. Keeney, D. Yang, Y. Hare, R. O'Gara, C. Medeiros, A. A. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(9): 2080-6.
120. Queenan, A. M. Torres-Viera, C. Gold, H. S. Carmeli, Y. Eliopoulos, G. M. Moellering, R. C. Jr. Quinn, J. P. Hindler, J. Medeiros, A. A. Bush, K. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(11): 3035-9.
121. Wachino, J. Doi, Y. Yamane, K. Shibata, N. Yagi, T. Kubota, T. Ito, H. Arakawa, Y. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A β -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(6): 1960-7.
122. Vourli, S. Giakkoupi, P. Miriagou, V. Tzelepi, E. Vatopoulos, A. C. Tzouvelekis, L. S. Novel GES/IBC extended-spectrum β -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 234(2): 209-13.

123. Yigit, H. Queenan, A. M. Anderson, G. J. Domenech-Sanchez, A. Biddle, J. W. Steward, C. D. Alberti, S. Bush, K. Tenover, F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(4): 1151-61.
124. Smith Moland, E. Hanson, N. D. Herrera, V. L. Black, J. A. Lockhart, T. J. Hossain, A. Johnson, J. A. Goering, R. V. Thomson, K. S. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51(3): 711-4.
125. Woodford, N. Tierno, P. M. Jr. Young, K. Tysall, L. Palepou, M. F. Ward, E. Painter, R. E. Suber, D. F. Shungu, D. Silver, L. L. Inglima, K. Kornblum, J. Livermore, D. M. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12): 4793-9.
126. Miriagou, V. Tzouvelekis, L. S. Rossiter, S. Tzelepi, E. Angulo, F. J. Whichard, J. M. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(4): 1297-300.
127. Yigit, H. Queenan, A. M. Rasheed, J. K. Biddle, J. W. Domenech-Sánchez, A. Alberti, S. Bush, K. Tenover, F. C. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(12): 3881-9.
128. Radice, M. Power, P. Gutkind, G. Fernández, K. Vay, C. Famiglietti, A. Ricover, N. Ayala, J. A. First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(3): 1068-9.
129. Navon-Venezia, S. Chmelnitsky, I. Leavitt, A. Schwaber, M. J. Schwartz, D. Carmeli, Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(9): 3098-101.
130. Yigit, H. Queenan, A. M. Anderson, G. J. Domenech-Sánchez, A. Biddle, J. W. Steward, C. D. Alberti, S. Bush, K. Tenover, F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(4): 1151-61.
131. Osano, E. Arakawa, Y. Wacharotayankun, R. Ohta, M. Horii, T. Ito, H. Yoshimura, F. Kato, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(1): 71-8.
132. Thompson, J. S. Malamy, M. H. Sequencing the gene for an imipenem-cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* beta-lactamase II. *J Bacteriol.* 1990; 172(5): 2584-93.

133. Lauretti, L. Riccio, M. L. Mazzariol, A. Cornaglia, G. Amicosante, G. Fontana, R. Rossolini, G. M. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(7): 1584-90.
134. Poirel, L. Naas, T. Nicolas, D. Collet, L. Bellais, S. Cavallo, J. D. Nordmann, P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44 (4): 891-897
135. Yan, J. J. Hsueh, P. R. Ko, W. C. Luh, K. T. Tsai, S. H. Wu, H. M. Wu, J. J. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45 (8): 2224-2228
136. Pournaras, S. Tsakris, A. Maniati, M. Tzouveleakis, L. S. Maniatis, A. N. Novel Variant (*bla*(VIM-4)) of the Metallo-beta-Lactamase Gene *bla*(VIM-1) in a Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46 (12): 4026-4028
137. Bahar, G. Mazzariol, A. Koncan, R. Mert, A. Fontana, R. Rossolini, G. M. Cornaglia, G. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(1): 282-3.
138. Gacar, G. G. Midilli, K. Kolayli, F. Ergen, K. Gundes, S. Hosoglu, S. Karadenizli, A. Vahaboglu, H. Genetic and enzymatic properties of metallo-beta-lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(10): 4400-3.
139. Koh, T. H. Wang, G. C. Sng, L. H. IMP-1 and a novel metallo-beta-lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(6): 2334-6.
140. Toleman, M. A. Rolston, K. Jones, R. N. Walsh, T. R. *bla*_{VIM-7}, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48 (1): 329-332
141. Crespo, M. P. Woodford, N. Sinclair, A. Kaufmann, M. E. Turton, J. Velez, J. D. Castaneda, C. R. Recalde, M. Livermore, D. M. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (11): 5094-5101
142. Pasteran, F. Faccone, D. Petroni, A. Rapoport, M. Galas, M. Vázquez, M. Procopio, A. Novel variant (*bla*(VIM-11)) of the metallo- β -lactamase *bla*(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49 (1): 474-475

143. Pournaras, S. Ikonomidis, A. Tzouvelekis, L. S. Tokatlidou, D. Spanakis, N. Maniatis, A. N. Legakis, N. J. Tsakris, A. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49 (12): 5153-5156.
144. Luzzaro, F. Docquier, J. D. Colinon, C. Endimiani, A. Lombardi, G. Amicosante, G. Rossolini, G. M. Toniolo, A. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-beta-lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(2): 648-50.
145. Miriagou, V. Tzelepi, E. Gianneli, D. Tzouvelekis, L. S. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo- β -lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(1): 395-7.
146. Lartigue, M. F. Poirel, L. Nordmann, P. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in an *Enterobacteriaceae* isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12): 4929-30.
147. Tórtola, M. T\$. Lavilla, S. Miró, E. Gonzalez, J. J. Larrosa, N. Sabatè, M. Navarro, F. Prats, G. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(8): 3492-4.
148. Livermore, D. M. Woodford, N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006; 14(9): 413-20.
149. Bonnet, R. Marchandin, H. Chanal, C. Sirot, D. Labia, R. De Champs, C. Jumas-Bilak, E. Sirot, J. Chromosome-encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(6): 2004-6.
150. Jones, R. N. Biedenbach, D. J. Gales, A. C. Sustained activity and spectrum of selected extended-spectrum β -lactams (carbapenems and cefepime) against *Enterobacter* spp. and ESBL-producing *Klebsiella* spp.: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (USA, 1997-2000). *Int J Antimicrob Agents.* 2003; 21(1): 1-7
151. Aubron, C. Poirel, L. Ash, R. J. Nordmann, P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(2): 260-4.
152. Hakenbeck, R. Coyette, J. Resistant penicillin-binding proteins. *Cell. Mol. LifeSci.* 1998; 54: 332-340.
153. Snyder, L. Champness, W. *Molecular Genetics of Bacteria*. Washington, DC: ASM Press. 1997.
154. Averhoff, B. Friedrich, A. Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria. *Arch. Microbiol.* 2003; 180: 385-393.

155. García, A. Rebollo, M. Navarro, F. Difusió de la resistència als antimicrobians. A: J Ruiz editor. Atimicrobians. Societat Catalana de Biologia. 2005; 29-48.
156. Canchaya, C. Fournous, G. Chibani-Chennoufi, S. Dillmann, M. L. Brussow, H. Phage as agents of lateral gen transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003; 6: 417-424.
157. Lyon, B. R. Skurray, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol. Rev.* 1987; 51: 88-134.
158. Muniesa, M. Garcia, A. Mirò, E. Mirelis, B. Prats, G. Jofre, J. Navarro, F. Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10: 1134-1137.
159. Cheetham, B. F. Katz, M. E. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.* 1995; 18: 201-208.
160. Ferretti, J. J. McShan, W. M. Ajdic, D. Savic, D. J. Savic, G. Lyon, K. Primeaux, C. Sezate, S. Suvorov, A. N. Kenton, S. Lai, H. S. Lin, S. P. Qian, Y. Jia, H. G. Najar, F. Z. Ren, Q. Zhu, H. Song, L. White, J. Yuan, X. Clifton, S. W. Roe, B. A. McLaughlin, R. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 4658-4663.
161. Cole, S. Saint-Girons, I. Bacterial genomes: all shapes and sizes. A: Cherlebois, L.R. ed. Organization of the Prokaryotic Genome. Washington, DC: ASM Press. 1999; 35-62
162. Grinsted, J. Bennet, P. M. Plasmid Technology. Londres: Academic Press. 1988.
163. Rice, L. B. Sahm, D. Bonomo, R. A. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. A: Murray, P. R. Baron, E. J. Jorgensen, J. A. Pfaller, M. A. Tenover, R. H. ed. Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC. ASM Press. 2003; 1: 1074-1101.
164. Rice, L. B. Carias, L. L. Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 1998; 180: 714-721.
165. Waters, V. L. Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front. Biosci.* 1999; 4: 433-456.
166. Mahillon, J. Chandler, M. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62: 725-774.
167. Pato, M. Bacteriophage Mu. A: Berg, D. Howe, M. M ed. Mobile DNA. Washington, DC. ASM Press. 1989; 23-52.
168. Craig, N. L. Target site selection in transposition. *Annu. Rev. Biochem.* 1997; 66: 437-474.
169. Bennet, P. Transposable elements. A: Lederberg, J. Ed. Encyclopedia of Microbiology. San Diego, Ca: Academic Press. 2000; 4: 704-724.

170. Chalmers, R. M. Kleckner, N. Tn10/IS10 transposase purification, activation, and in vitro reaction. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 8029-8035.
171. Reznikoff, W. S. The Tn5 transposon. *Annu. Rev. Microbiol.* 1993; 47 : 945-963.
172. Galas, D. J. Chandler, M. Bacterial insertion sequences. A: Berg, D. Howe, M. M. ed. *Mobile DNA*. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1989; 109-162.
173. Mendiola, M. V. Bernales, I. De la Cruz, F. Differential roles of the transposon termini in IS91 transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 1922-1926.
174. Plikaytis, B. B. Crawford, J. T. Shinnick, T. M. IS1549 from *Mycobacterium smegmatis* forms long direct repeats upon insertion. *J. Bacteriol.* 1998; 180: 1037-1043.
175. Calcutt, M. J. Lavrrar, J. L. Wise, K. S. IS1630 of *Mycoplasma fermentans*, a novel IS30-type insertion element that targets and duplicates inverted repeats of variable lenght and sequence during insertion. *J. Bacteriol.* 1999; 181: 7597-7607.
176. Vilei, E. M. Nicolet, J. Frey, J. IS1634, a novel insertion element creating long, variable-length direct repeats which is specific for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type. *J. Bacteriol.* 1999; 181: 1319-1323.
177. Doolittle, W. F. Kirkwood, T. B. Dempster, M. A. Selfish DNAs with self-restraint. *Nature.* 1984; 307: 501-502.
178. Reimmann, C. Moore, R. Little, S. Savioz, A. Willetts, N. S. Hass, D. Genetic structure, function and regulation of the transposable element IS21. *Mol. Gen. Genet.* 1989; 215: 416-424.
179. Dalrymple, B. Novel rearrangements of IS30 carrying plasmids leading to the reactivation of gene expression. *Mol. Gen. Genet.* 1987; 207: 413-420.
180. Leelaporn, A. Firth, N. Byrne, M. E. Roper, E. Skurray, R. A. Possible role of insertion sequence IS257 in dissemination and expression of high- and low-level trimethoprim resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38: 2238-2344.
181. Fluit, A. C. Schmitz, F. J. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10: 272-288.
182. Stokes, H. W. O’Gorman, D. B. Recchia, G. D. Parsekhian, M. Hall, R. M. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol. Microbiol.* 1997; 26: 731-745.
183. Eliasson, I. Kamme, C. Prellner, K. Beta-lactamase production in the upper respiratory tract flora. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1986; 5: 507-512.

184. Correia, M. Boavida, F. Grosso, F. Salgado, M. J. Lito, L. M. Cristino, J. M. Mendo, S. Duarte, A. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 2003; 47: 2838-2843.
185. Hall, R. M. Brown, H. J. Brookes, D. E. Stokes, H. W. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J. Bacteriol.* 1994; 176: 6286-6294.
186. Stokes, H. W. Tomaras, C. Parsons, Y. Hall, R. M. The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. *Plasmid.* 1993; 30: 39-50.
187. Sabaté, M. Navarro, F. Miró, E. Campoy, S. Mirelis, B. Barbe, J. Prats, G. Novel complex *sul1*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 2656-2666
188. Arduino, S. M. Roy, P. H. Jacoby, G. A. Orman, B. E. Pineiro, S. A. Centron, D. *bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 2303-2306.
189. Wang, M. Tran, J. H. Jacoby, G. A. Zhang, Y. Wang, F. Hooper, D.C. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 2242-2248.
190. Dobrindt, U. Hochhut, B. Hentschel, U. Hacker, J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2: 414-424.
191. Lindsay, J. A. Ruzin, A. Ross, H. F. Kurepina, N. Novick, R. P. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 1998; 29: 527-543.
192. Hochhut, B. Waldor, M. K. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol. Microbiol.* 1999; 32: 99-110.
193. Briñas, L. Zarazaga, M. Sáenz, Y. Ruiz-Larrea, F. Torres, C. Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(10): 3156-63.
194. Osterblad, M. Hakanen, A. Manninen, R. Leistevuo, T. Peltonen, R. Meurman, O. Huovinen, P. Kotilainen, P. A between-species comparison of antimicrobial resistance in enterobacteria in fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(6): 1479-84.
195. Sabaté, M. Tarrago, R. Navarro, F. Miró, E. Vergés, C. Barbé, J. Prats, G. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(7): 1970-3.

196. Briñas, L. Lantero, M. de Diego, I. Álvarez, M. Zarazaga, M. Torres, C. Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(6): 1107-10.
197. Romero, L. López, L. Rodríguez-Baño, J. Ramón Hernández, J. Martínez-Martínez, L. Pascual, A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11(8): 625-31.
198. Caccamo, M. Perilli, M. Celenza, G. Bonfiglio, G. Tempera, G. Amicosante, G. Occurrence of extended spectrum beta-lactamases among isolates of Enterobacteriaceae from urinary tract infections in southern Italy. *Microb Drug Resist.* 2006; 12(4): 257-64.
199. Pagani, L. Migliavacca, R. Pallecchi, L. Matti, C. Giacobone, E. Amicosante, G. Romero, E. Rossolini, G. M. Emerging extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(4): 1549-52.
200. De Champs, C. Chanal, C. Sirot, D. Baraduc, R. Romaszko, J. P. Bonnet, R. Plaidy, A. Boyer, M. Carroy, E. Gbadamassi, M. C. Laluque, S. Oules, O. Poupert, M. C. Villemain, M. Sirot, J. Frequency and diversity of Class A extended-spectrum beta-lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(3): 634-9.
201. Mirelis, B. Navarro, F. Miró, E. Mesa, R. J. Coll, P. Prats, G. Community transmission of extended-spectrum β -lactamase. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 1024-5.
202. Dandekar, P. K. Tetreault, J. Quinn, J. P. Nightingale, C. H. Nicolau, D. P. Prevalence of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates in a large community teaching hospital in Connecticut. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 49(1): 37-9.
203. Mugnaioli, C. Luzzaro, F. De Luca, F. Brigante, G. Perilli, M. Amicosante, G. Stefani, S. Toniolo, A. Rossolini, G. M. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(8): 2700-6.
204. Hammami, A. Arlet, G. Ben Redjeb, S. Grimont, F. Ben Hassen, A. Rekik, A. Philippon, A. Nosocomial outbreak of acute gastroenteritis in a neonatal intensive care unit in Tunisia caused by multiply drug resistant *Salmonella* wien producing SHV-2 β -lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1991; 10(8): 641-6.
205. Nicolas, M. H. Jarlier, V. Honore, N. Philippon, A. Cole, S. T. Molecular characterization of the gene encoding SHV-3 β -lactamase responsible for transferable cefotaxime resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(12): 2096-100.
206. Bauernfeind, A. Rosenthal, E. Eberlein, E. Holley, M. Schweighart, S. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase among hospitalized patients. *Infection.* 1993; 21(1): 18-22.

207. Briñas, L. Lantero, M. Zarazaga, M. Pérez, F. Torres, C. Outbreak of SHV-5 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal-pediatric intensive care unit in Spain. *Microb Drug Resist.* 2004; 10(4): 354-8.
208. Palasubramaniam, S. Subramaniam, G. Muniandy, S. Parasakthi, N. SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* associated with a nosocomial outbreak in a paediatric oncology unit in Malaysia. *Int J Infect Dis.* 2005; 9(3): 170-2.
209. Yagi, T. Wachino, J. Kurokawa, H. Suzuki, S. Yamane, K. Doi, Y. Shibata, N. Kato, H. Shibayama, K. Arakawa, Y. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(6): 2551-8.
210. Coudron, P. E. Moland, E. S. Thomson, K. S. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(5): 1791-6.
211. Rodríguez-Baño, J. Navarro, M. D. Romero, L. Martínez-Martínez, L. Muniain, M. A. Perea, E. J. Pérez-Cano, R. Pascual, A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(3): 1089-94.
212. Linton, A. H. Animal to man transmission of *Enterobacteriaceae*. *R Soc Health J.* 1977; 97: 115-8.
213. Corpet, D. E. Antibiotic resistance from food. *N Engl J Med.* 1988; 318: 1206-7.
214. Garau, J. Xercavins, M. Rodríguez-Carballeira, M. Gómez-Vera, J. R. Coll, I. Vidal, D. Llovet, T. Ruíz-Bremon, A. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2736-41.
215. Shooter, R. A. Cooke, E. M. Faiers, M. C. Breaden, A. L. O'Farrell, S. M. Isolation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* from food in hospitals, canteens, and schools. *Lancet.* 1971; 2: 390-2.
216. Carattoli, A. Lovari, S. Franco, A. Cordaro, G. Di Matteo, P. Battisti, A. Extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(2): 833-5.
217. Kojima, A. Ishii, Y. Ishihara, K. Esaki, H. Asai, T. Oda, C. Tamura, Y. Takahashi, T. Yamaguchi, K. Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(8): 3533-7.

218. Hasman, H. Mevius, D. Veldman, K. Olesen, I. Aarestrup, F. M. Beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): 115-21.
219. Schwarz, S. Kehrenberg, C. Walsh, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents.* 2001; 17(6): 431-7.
220. Henriques, I. Moura, A. Alves, A. Saavedra, M. J. Correia, A. Analysing diversity among beta-lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006; 56(3): 418-29.
221. Shah, A. A. Hasan, F. Ahmed, S. Hameed, A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Res Microbiol.* 2004; 155(6): 409-21.
222. Brigante, G. Luzzaro, F. Perilli, M. Lombardi, G. Coli, A. Rossolini, G. M. Amicosante, G. Toniolo, A. Evolution of CTX-M-type β -lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25(2): 157-62.
223. Yan, J. J. Hong, C. Y. Ko, W. C. Chen, Y. J. Tsai, S. H. Chuang, C. L. Wu, J. J. Dissemination of blaCMY-2 among *Escherichia coli* isolates from food animals, retail ground meats, and humans in southern Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(4): 1353-6.
224. García, A. Navarro, F. Miró, E. Mirelis, B. Campoy, S. Coll, P. Characterization of the highly variable region surrounding the bla(CTX-M-9) gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(5): 819-26.
225. Villa, L. Pezzella, C. Tosini, F. Visca, P. Petrucca, A. Carattoli, A. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum β -lactamase gene and a class 1 integron. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(10): 2911-4.
226. Fernández-Rodríguez, A. Cantón, R. Pérez-Díaz, J. C. Martínez-Beltran, J. Picazo, J. J. Baquero, F. Aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates harboring extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(11): 2536-8.
227. Davies, J. Wright, G. D. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* 1997; 5(6): 234-40.
228. Martínez-Martínez, L. Pascual, A. Jacoby, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998; 351(9105): 797-9.
229. Jacoby, G. A. Walsh, K. E. Mills, D. M. Walker, V. J. Oh, H. Robicsek, A. Hooper, D. C. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(4): 1178-82.

230. Nordmann, P. Poirel, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(3): 463-9.
231. Pai, H. Seo, M. R. Choi, T. Y. Association of QnrB determinants and production of extended-spectrum betalactamase or plasmid-mediated AmpC betalactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 1(1): 366-8.
232. Lavigne, J. P. Marchandin, H. Delmas, J. Bouziges, N. Lecaillon, E. Cavalie, L. Jean-Pierre, H. Bonnet, R. Sotto, A. *qnrA* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from France. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(12): 4224-8.

6. ARTICLES

ARTICLE I

Surveillance of extended-spectrum β -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain

Elisenda Miró¹, Beatriz Mirelis^{1,2}, Ferran Navarro^{1,2*}, Alba Rivera^{1,2}, Raúl Jesús Mesa²,
M^a Carme Roig^{1,2}, Laura Gómez¹ and Pere Coll^{1,2}

¹*Servei de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain;* ²*Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain*

Received 29 July 2005; returned 19 August 2005; revised 21 September 2005; accepted 3 October 2005

Objectives: The aim of the present study was to characterize and compare the extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing organisms isolated from clinical samples and faecal carriers in 2001 and 2002.

Methods: A total of 5251 Enterobacteriaceae isolated from clinical samples and 1321 stool samples were evaluated for the presence of ESBLs. The stool samples were spread onto plates of MacConkey agar containing 2 mg/L cefotaxime for selection of ESBL-producing strains. These strains were defined as those showing synergism between amoxicillin/clavulanic acid and third-generation cephalosporins. The β -lactamases involved were characterized by isoelectric focusing, PCR assays and DNA sequencing.

Results: The prevalence of ESBL-producing strains among clinical Enterobacteriaceae was 1.7%. Of these, 87.6% produced CTX-M, 25.8% produced SHV and 2.2% were TEM-type-producing strains. All clinical ESBL-producing strains were *Escherichia coli*, with the exception of four *Klebsiella pneumoniae* and one *Citrobacter freundii*. The prevalence of faecal carriage of ESBL-producing organisms was 3.3%. Of these, 75% produced CTX-M-type enzymes followed by 22.7% SHV-producing strains. All faecal ESBL-producing strains were *E. coli* except for one *Enterobacter cloacae* and one *Proteus mirabilis*. This latter strain produced the PER-1 enzyme reported for the first time in Spain.

Conclusions: The prevalence of ESBL-producing strains in stool samples was higher than that observed in clinical samples from the same period. The different types of ESBLs found were similar in both contexts. The most prevalent ESBLs were the CTX-M-related enzymes, with nine different types, followed by SHV-12.

Keywords: ESBLs, CTX-M, SHV, PER-1

Introduction

Enterobacteriaceae carrying extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) or plasmid-mediated cephamycins have emerged as significant pathogens. Such strains, usually resistant to multiple antimicrobial agents, can be challenging to treat, as therapeutic options are few.¹ Infections due to such strains are associated with prolonged hospital stays, increased healthcare costs and, in the setting of bloodstream involvement, increased mortality if appropriate therapy is delayed.¹

Several papers have recently described the prevalence of ESBLs in the community, mainly in patients with urinary tract infections or ambulatory patients with chronic conditions.^{1–3} This marks a serious problem, as infections with ESBL-containing bacteria have

mostly been described as nosocomially-acquired or nursing-home-related.¹

Since 1994, a low prevalence of ESBL-producing strains has been observed at our hospital.⁴ This finding differs from the higher prevalence (3.3%) observed among faecal carriers between 2001 and 2002.⁵ At this point, the aim of the present study was to characterize and compare the ESBLs found in clinical and stool samples between 2001 and 2002.

Materials and methods

Bacterial isolates

A total of 5251 Enterobacteriaceae strains, 3177 *Escherichia coli*, 361 *Klebsiella pneumoniae*, 113 *Klebsiella oxytoca*, 379 *Proteus mirabilis*,

*Corresponding author. Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Av. Sant Antoni M. Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain.
Tel: +34-932-919-071; Fax: +34-932-919-070; E-mail: fnavarrr@santpau.es

17 *Proteus vulgaris*, 3 *Proteus penneri*, 106 *Morganella morganii*, 11 *Providencia* spp., 260 *Enterobacter cloacae*, 93 *Enterobacter aerogenes*, 84 *Serratia marcescens*, 67 *Citrobacter freundii*, 45 *Citrobacter koseri*, 498 *Salmonella enterica* and 37 *Shigella* spp., were isolated in 2001 and 2002. All strains were from non-duplicate clinically relevant samples of patients who attended the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and all of them were evaluated for the presence of ESBLs.

Forty-four ESBL-producing strains isolated from 1321 stool samples collected from patients who attended the emergency room from February to May 2001, from April to June 2002 and in October 2002⁵ were also characterized.

Susceptibility test

Susceptibility to β -lactam antibiotics was determined by the disc diffusion test on Mueller–Hinton agar (Maim, Vic, Spain), following NCCLS recommendations.⁶ The discs were purchased from Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France. The antibiotics tested were amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, cefepime and imipenem. The MICs of cefotaxime and ceftazidime, with and without clavulanic acid, were later determined by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden). Strains producing ESBL were defined as strains showing synergism between amoxicillin/clavulanic acid and cefotaxime, ceftazidime, aztreonam or cefepime.

Isoelectric focusing

Isoelectric focusing was carried out as described previously.⁴ Enzyme activities in the revealed gel were detected by the iodometric method.

PCR assays

Specific primers for *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M-9}-related and *bla*_{TEM} were used as described previously.⁴ The following primers were respectively used for *bla*_{CTX-M-1}-related, *bla*_{CTX-M-2}-related, *bla*_{CTX-M-3}-related and *bla*_{PER}: CTX-M-1up (5'-AAGGCGTTTTGACAGACTAT-3') and CTX-M-1dn (5'-CCGTTTCCGCTATTACAA-3'), CTX-M-2up (5'-TAGGTGGTAATGGAGGAT-3') and CTX-M-2dn (5'-GTT-CAGGAGCACATTTTAA-3'), CTX-M-3up (5'-ATGGTTAAA-AAATCACTGCG-3') and CTX-M-3dn (5'-CTATTACAAACCGTC-GGTG-3'), and PER-1-A (5'-TGACGATCTGGAACCTTT-3') and PER-1-B (5'-AACTGCATAACTACTCC-3') in standard conditions.

DNA sequencing

DNA sequencing of PCR products was done by the dideoxy method with primers mentioned above, the Thermo Sequenase™ Cy™₅ Dye Terminator Sequencing kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) and the Automatic Laser Fluorescent DNA Sequencer (ALF, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Nucleotide and deduced protein sequences were analysed using the DNASTar Lasergene software package and using the Internet at the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Results

Eighty-nine clinically relevant ESBL-producing strains out of 5251 Enterobacteriaceae (1.7%) were isolated during 2001–2002 (Table 1). Of these, 84 were *E. coli*, 4 *K. pneumoniae* and 1 *C. freundii*.

The *bla*_{CTX-M} type was the most frequent ESBL, representing 87.6% out of 89 ESBL-producing strains (75 *E. coli*,

2 *K. pneumoniae* and 1 *C. freundii*). Of these, CTX-M-9 was the most frequent enzyme, found alone in 31 strains and associated with SHV-12 in 14. The second most frequent ESBL was CTX-M-14 with 23 strains. Finally, we also found seven CTX-M-1, one CTX-M-2, one CTX-M-3 and one CTX-M-32 (Table 1).

The SHV-type represented 25.8% of the 89 ESBL-producing strains detected (21 *E. coli*, and 2 *K. pneumoniae*). The main enzyme present was SHV-12, isolated alone in seven strains and associated with CTX-M-9 in 14. Thus, all strains with SHV-12 enzyme isolated in 2001 and 50% of these isolates in 2002 also produced the CTX-M-9 enzyme. Finally, we also found two SHV-2-producing strains.

The presence of TEM-type ESBLs was low, 2.2%; recovered from two *E. coli* strains (both in 2001), one carrying *bla*_{TEM-19} and one *bla*_{TEM-104}.

A total of 44 ESBL-producing strains (including 42 *E. coli*, 1 *P. mirabilis* and 1 *E. cloacae*) from the 1321 stool samples were isolated (3.3%) (Table 1). We did not isolate any ESBL-producing *K. pneumoniae* during the three periods evaluated. No previous hospitalization was documented in faecal carriers in the 3 months prior to sample collection. From the 44 ESBL-producing strains, 33 produced a CTX-M enzyme (75%). Of these, 69.7% belonged to the CTX-M-9 group (18 CTX-M-9 and 5 CTX-M-14), whereas the remaining enzymes belonged to the CTX-M-1 group [one CTX-M-1, one CTX-M-3, four CTX-M-15, three CTX-M-29, and one the new CTX-M-34 enzyme (AY515297)]. Apart from CTX-M types, the SHV-12 enzyme was detected in nine strains (20.4%). One strain expressed SHV-2 and another PER-1.

The CTX-M-34-carrying strain was isolated in April 2002 from a 27-year-old female. It was resistant only to nalidixic acid and remained susceptible to fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracycline and chloramphenicol. The enzyme showed a pI near 8.2 and preference for cefotaxime substrate, like most of the CTX-M enzymes.

Discussion

Although the prevalence of ESBL in our hospital is low, an increase in ESBL-producing clinical *E. coli* strains was observed between 1994 (0.08%) and 2003 (2.6%). This was due to an increase in the prevalence of CTX-M-related enzymes and the appearance of SHV-12. This situation has been also observed around Spain.^{2,7} The first CTX-M enzyme described in our hospital was the CTX-M-9 from an *E. coli* isolated in 1996;⁴ it was the most prevalent enzyme until 2003 when it was displaced by CTX-M-14. CTX-M-14 appeared in our hospital in 1999 and we observed a 3-fold increase between 2001 and 2002. Since 2001, we have also observed an increase in the diversity of CTX-M enzymes (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3 and CTX-M-32).

The prevalence of ESBL-producing strains in stool samples was higher than that observed in clinical samples from the same period. The proportion of the different ESBL-types found in both environments was similar, with the CTX-M-type being the most prevalent enzyme found. We also emphasize the absence of the TEM-type enzymes in faecal samples, the first description to our knowledge of PER-1 enzyme in Spain in one *P. mirabilis* strain and the detection of the new enzyme CTX-M-34, not described in clinical samples to date. The rapid emergence of the CTX-M-type enzymes as the predominant ESBLs in faecal carriers is not an isolated phenomenon.^{2,3,5,7} Several elements, such as plasmids,

Table 1. Prevalence of ESBLs in Enterobacteriaceae clinical samples and faecal carriers in 2001 and 2002, by time periods

	Clinical strains*			Faecal carriers*			
	Total	2001	2002	Total	February–May 2001	April–June 2002	October 2002
<i>n</i>	5251	2878	2373	1321	707	454	160
ESBL-producers (%)	89 (1.7)	35 (1.2)	54 (2.2)	44 (3.3)	15 (2.1)	17 (3.8)	12 (7.5)
CTX-M (%)	78 (87.6)	33 (94.2)	45 (83.3)	33 (75)	12 (80)	13 (76.5)	8 (66.6)
CTX-M-1	7 (7.8)	3 ^a	4	1 (2.3)	–	1	–
CTX-M-2	1 (1.1)	1	–	–	–	–	–
CTX-M-3	1 (1.1)	–	1 ^b	1 (2.3)	1	–	–
CTX-M-9	45 (50.5)	23 ^{a,c}	22 ^c	18 (40.9)	9	7	2
CTX-M-14	23 (25.8)	6	17	5 (11.3)	1	1	3
CTX-M-15	–	–	–	4 (9.0)	1	1	2
CTX-M-29	–	–	–	3 (6.8)	–	2	1
CTX-M-32	1 (1.1)	–	1	–	–	–	–
CTX-M-34	–	–	–	1 (2.3)	–	1	–
SHV (%)	23 (25.8)	10 (28.6)	13 (24)	10 (22.7)	2 (13.3)	4 (23.5)	4 (33.4)
SHV-2	2 (2.2)	2 ^a	–	1 (2.3)	–	1	–
SHV-12	21 (23.6)	8 ^c	13 ^{a,c}	9 (20.4)	2	3	4 ^d
TEM (%)	2 (2.2)	2 (5.7)	–	–	–	–	–
TEM-19	1 (1.1)	1	–	–	–	–	–
TEM-104	1 (1.1)	1	–	–	–	–	–
PER (%)	–	–	–	1 (2.3)	1 ^e	–	–

*All were *E. coli* strains except for those indicated by superscript letters.

^aOne of these isolates was a *K. pneumoniae* strain.

^bOne *C. freundii* strain.

^cEight strains in 2001 and six in 2002 presented CTX-M-9 and SHV-12.

^dOne *E. cloacae* strain.

^eOne *P. mirabilis* strain.

insertion sequences, transposons or integrons, may be involved in the mobilization of CTX-M genes.^{3,7} These elements can also carry genes for resistance to multiple other antibiotics, including sulphonamides, trimethoprim, aminoglycosides, tetracycline and chloramphenicol. When we analysed the resistance to the other antimicrobial agents tested we observed that all the strains, except CTX-M-34-producing *E. coli*, showed multi-antibiotic resistance. CTX-M-9-, CTX-M-14- and SHV-12-producing strains were mostly resistant to streptomycin, sulphonamides, trimethoprim and nalidixic acid (data not shown).

One hypothesis concerning the possible diffusion of ESBLs among the community is through animal food products where the selection in commensal and in zoonotic enteropathogens for antimicrobial resistance is possible.⁸ Nevertheless, non-animal food stuffs could also contribute to this diffusion (ESBLs have been detected in animal food; data not shown). In a previous paper, we documented ESBL and plasmid-mediated cephamycinase-producing *E. coli*, probably transmitted within the community through the food supply.⁹ Moreover, other factors, such as mobile genetic elements like plasmids, transposons, integrons or bacteriophages, could also contribute.^{1,3,7,10}

Although we do not have data on the previous administration of antibacterial drugs in all the studied patients, it is possible that healthy people could act as a reservoir of these ESBLs as a consequence of antibiotic use in the community. Further studies should be undertaken to determine the diffusion mechanisms of

these enzymes, as well as the length of time an ESBL strain may be carried in the digestive tract.

Nucleotide sequence accession number

The accession number of the nucleotide sequence of the *bla*_{CTX-M-34} gene in the GenBank database is AY515297.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants FIS 97/1522 and FIS PI 020372 from the 'Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social de España' and from 'Red Española de Investigación en Patología Infecciosa' (REIPI C03/14).

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 933–51.
2. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L *et al.* Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-

producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1089–94.

3. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME *et al.* Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 735–43.

4. Sabaté M, Miró E, Navarro F *et al.* β -Lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**: 989–97.

5. Mirelis B, Navarro F, Miró E *et al.* Community transmission of extended-spectrum β -lactamase. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**: 1024–5.

6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twelfth Informational Supplement M100-S12*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.

7. Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP *et al.* Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microb* 2004; **42**: 4769–75.

8. Briñas L, Zarazaga M, Saenz Y *et al.* β -Lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 3156–63.

9. Prats G, Mirelis B, Miró E *et al.* Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among summer camp attendees with salmonellosis. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**: 1273–80.

10. Muniesa M, Garcia A, Miró E *et al.* Bacteriophages and diffusion of β -lactamase genes. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**: 1134–7.

ARTICLE II

Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage)

Raúl Jesús Mesa^{1,2}, Vanessa Blanc², Anicet R. Blanch³, Pilar Cortés², Juan José González⁴, Susana Lavilla⁴, Elisenda Miró¹, Maite Muniesa³, Montserrat Saco⁵, M^aTeresa Tórtola^{2,4}, Beatriz Mirelis^{1,2}, Pere Coll^{1,2}, Montserrat Llagostera^{2,6}, Guillem Prats^{2,4} and Ferran Navarro^{1,2*}

¹*Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain;*

²*Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain;* ³*Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain;* ⁴*Servei de Microbiologia, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain;*

⁵*Laboratori de Sanitat Ramadera (DARP-Generalitat de Catalunya), Spain;*

⁶*Centre de Recerca en Sanitat Animal, Cerdanyola del Vallès, Bellaterra, Spain*

Received 20 December 2005; returned 3 February 2006; revised and accepted 2 May 2006

Objectives: This study aimed to determine the presence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in different environments.

Methods: Clinical samples and stool samples from animal farms, sewage, human faecal carriers attending the emergency room and faecal carriers in the context of food-borne disease outbreaks were subcultured onto MacConkey agar supplemented with cefotaxime for the detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae. Identification, susceptibility pattern and ERIC-PCR were used for clone delineation in each sample. Community consumption of antibiotics was also recorded.

Results: An ESBL-producing Enterobacteriaceae prevalence of 1.9% was observed in human infections. A cross-sectional survey of human faecal carriers in the community showed a general prevalence of 6.6% with a temporal distribution. High use of antibiotics in winter coincided with a lower prevalence in carriers. ESBL-producing Enterobacteriaceae were detected in the five samples of human sewage, in samples from 8 of 10 pig farms, 2 of 10 rabbit farms, from all 10 poultry farms and in 3 of 738 food samples studied. Faecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae was detected in samples from 19 of 61 food-borne outbreaks evaluated. All food-borne outbreaks were due to enteropathogens. The prevalence of carriers in these outbreaks ranged from 4.4% to 66.6%.

Conclusions: This widespread occurrence of ESBL-producing Enterobacteriaceae suggests that the community could act as a reservoir and that food could contribute to the spread of these strains.

Keywords: β -lactamases, drug resistance, ESBLs, food outbreaks, farms, sewage

Introduction

Strains of Enterobacteriaceae that produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) have emerged as significant pathogens. First reported in the mid-1980s, they were mainly found in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* although they can now be found in many other species.¹

Reports of infection or colonization with ESBL-producing Enterobacteriaceae strains have focused mainly on hospitalized

patients or nursing home residents.¹ However, ESBL-producing Enterobacteriaceae have also been described in animals and in patients in the community, with and without chronic conditions.^{2,3} As little is known about ESBL dissemination mechanisms, we undertook an extensive epidemiological analysis to determine the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae strains in different environments: human infections and faecal carriers, human faecal carriers in the context of food-borne outbreaks, cooked and uncooked food, animal

*Correspondence address. Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.
Tel: +34-932919071; Fax: +34-932919070; E-mail: fnavarroz@santpau.es

farms for food production, and human sewage in Barcelona (Spain).

Materials and methods

Samples

Human infections. All clinical samples from patients attending the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSP) and Hospital de la Vall d'Hebron (HVV) in Barcelona during 2003 were included. A total of 8020 Enterobacteriaceae were isolated and screened for the presence of ESBLs. Only one isolate per patient was included.

Human faecal carriers. According to our previous data,^{2,4} (assuming a prevalence of 7%, a precision of 2% and adding 50% for lost samples), to obtain a final sample of 950, we tested 160 stool samples each month from patients attending the emergency room for the presence of ESBL producers; none of these patients was from a nursing home or a healthcare centre or was involved in a food-borne outbreak. A cross-sectional survey was conducted over 6 months in 2003 (February, March, May, July, September and November). Census data for Barcelona city were used to stratify the population according to age. Subjects were divided into younger than 26 years (25%), between 25 and 65 (50%) and older than 65 (25%). Each month, 40 stools from people under 26 years of age, 80 from people 26–65, and 40 stools from people over 65 were collected. Once these figures were reached for a group, collection for that group was stopped for that month. Statistical methods included analysis of the contingency table (χ^2 test) and calculation of 95% confidence interval (CI) for the parameters. Analyses were performed using the SPSS (V14) and Epi Info (V6) software.

Human faecal carriers in the context of food-borne disease outbreaks. A total of 544 stool samples (one per patient) from people involved in 61 food-borne disease outbreaks were evaluated in 2003. The number of stools available for study in each outbreak ranged between 3 and 45.

Food. A total of 155 salads (containing lettuce and tomatoes) and 583 cooked foods from the HVV catering service were evaluated.

Animal farms. A total of 10 pig, 10 rabbit and 10 poultry farms in Catalonia (Spain) were evaluated. Ten samples of 10 g of floor samples of faecal material were collected and processed independently for each farm.

Sewage. Five samples were collected from the influent raw urban sewage at two wastewater treatment plants from August 2000 to April 2003. Treatment plant 1 is a physicochemical plant serving a large conurbation of ~1 400 000 inhabitants, while plant 2 is an aerated activated sludge-treatment plant receiving sewage from a population of ~400 000.

Microbiological studies

Stool samples. Stool samples from faecal carriers and faecal carriers affected by food-borne outbreaks were inoculated onto MacConkey agar plates containing 2 mg/L cefotaxime (MacC-CTX) and incubated at 37°C for 48 h under aerobic conditions. These plates were controlled by growing: a SHV-2-producing *K. pneumoniae* strain; TEM-3 and TEM-24-producing *K. pneumoniae* strains; a CTX-M-9-producing *E. coli* strain; and *E. coli* ATCC 25922 as a susceptible control strain.

Food samples. Each food sample (25 g) was placed in 225 mL of peptone water. After overnight incubation at 37°C, an aliquot of 1 mL was inoculated in MacC-CTX broth and incubated overnight at 37°C. In case of turbidity or bacterial growth, a subculture was

made on MacC-CTX agar and incubated overnight at 37°C under aerobic conditions.

Farm samples. Floor samples of faecal material (10 g) were homogenized in 90 mL of peptone water. Aliquots of 0.1 mL were plated on MacC-CTX agar and incubated for 48 h at 37°C under anaerobic conditions to avoid overgrowth of aerobic Gram-negative bacteria.

Sewage samples. A sample (1 mL) was inoculated in 2 mL of trypticase soy broth with cefotaxime (2 mg/L) (TSB-CTX) and incubated at 37°C for 2 h under aerobic conditions. After the pre-enrichment procedure, 2 mL from each tube was inoculated in 10 mL of TSB-CTX. Tubes were further incubated for 18 h at 37°C under anaerobic conditions to avoid overgrowth of aerobic Gram-negative bacteria. Each culture was diluted 10-fold with Ringer solution and 0.1 mL of each dilution was plated in duplicate onto MacC-CTX. Plates were incubated using the conditions described above.

Strain selection

Except for clinical samples, whenever possible, three colonies representing each morphological type on the MacC-CTX plates were subcultured for subsequent characterization. Identification, susceptibility pattern and ERIC-PCR were used for clone delineation. One representative per clone was included.

ERIC-PCR

ERIC-PCR was performed with the oligonucleotide ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') as described previously.⁵

Susceptibility testing

Susceptibility to β -lactam antibiotics was determined as described previously.⁶ ESBL-producing isolates were defined by synergy between amoxicillin/clavulanic acid and any of cefotaxime, ceftazidime, aztreonam or cefepime, and confirmed by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden). The breakpoints used were those defined by CLSI for Enterobacteriaceae. For *Klebsiella oxytoca*, only those isolates showing resistance to ceftazidime were included; those susceptible to ceftazidime, but resistant to aztreonam, were considered hyperproducers of chromosomal K1 β -lactamase.

Antibiotic consumption

Community antibiotic use was based on ambulatory care centre data provided by the Catalan Health Institute. Antibiotics were classified in the following groups: broad-spectrum penicillins, cephalosporins, amoxicillin/clavulanic acid, quinolones, macrolides and telithromycin.

Results

Table 1 shows the prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in the different environments.

Human infections

The prevalence of ESBL-producing isolates (155 out of 8020 Enterobacteriaceae isolates) was 1.9%. The prevalence of ESBL per species was 127 of 5836 *E. coli* (2.2%), 1 of 46 *Citrobacter freundii* (2.2%), 14 of 742 *K. pneumoniae* (1.9%), 5 of 342 *Salmonella enterica* (1.5%), 4 of 264 *Enterobacter cloacae* (1.5%), 2 of 144 *K. oxytoca* (1.4%) and 2 of 570 *Proteus mirabilis* isolates (0.3%). These isolates were isolated from 5957

Table 1. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in the different environments evaluated

	Number of samples	Positive for ESBL	Prevalence (%)	CI (95%)
Infections	8020	155 127 <i>E. coli</i> 14 <i>K. pneumoniae</i> 5 <i>S. enterica</i> 4 <i>E. cloacae</i> 2 <i>K. oxytoca</i> 2 <i>P. mirabilis</i> 1 <i>C. freundii</i>	1.9	1.63–2.23
Faecal carriers	948	63 73 <i>E. coli</i> 1 <i>K. pneumoniae</i> 1 <i>C. koseri</i>	6.6	6.26–9.8
Human sewage	5	5 ^c	100	47.8–100
Poultry farms	10 ^a	10 ^{a,c}	100	69.2–100
Pig farms	10 ^a	8 ^{a,c}	80	44.4–97.5
Rabbit farms	10 ^a	2 ^a 2 <i>E. coli</i> 1 <i>E. cloacae</i>	20	2.5–55.6
Foods	738	3 2 <i>E. coli</i> 1 <i>K. pneumoniae</i>	0.4	0.08–1.2
Food-borne outbreaks	61 ^b	19 ^c	31.1	19.4–44.3

CI, confidence interval.

^aNumber of farms studied. Ten floor samples of faecal material of each farm were evaluated.^bAll patients affected by each food-borne outbreak were evaluated.^cAll were *E. coli* isolates.

samples of urine, 927 of blood, 382 from the respiratory tract, 226 from stools and 528 from other samples.

Human faecal carriers

The prevalence of ESBL-producing isolates was 6.6% (63 of 948 stool samples). A statistically significant difference was observed ($P < 0.03$) in the cross-sectional survey. A detailed analysis using standard residuum showed that this difference was mainly due to a decrease in positivity in May and an increase in July (Figure 1). According to age, 9.4% (23 of 244; 95% CI: 6.1–13.8) of stool samples from younger people, 5.9% (29 of 486; 95% CI: 4–8.5) from people aged 26–65 years and 5% (11 of 218; 95% CI: 2.6–8.8) from older people were positive for ESBL producers. Eleven of these faecal carriers had more than one ESBL-producing isolate. Seventy-three out of 75 ESBL-producing strains were *E. coli* (97.3%), one *K. pneumoniae* and one *Citrobacter koseri*.

Human faecal carriers in the context of food-borne disease outbreaks

We found ESBL-producing strains in samples from 19 of the 61 outbreaks evaluated (31.1%). The prevalence of ESBL carriers in each of these outbreaks ranged from 4.4% (2 of 45 stools

samples; CI 0.5–15.2) to 66.6% (6 of 9 stools samples; CI 29.9–92.5). A total of 66 clones of *E. coli* were isolated.

Food samples

Three of 738 (0.4%) studied foods harboured ESBL-producing strains. Two *E. coli* strains were isolated from salads and one *K. pneumoniae* strain was isolated from a cooked chicken, all consumed in September.

Animal farms

ESBL-producing isolates were isolated from floor samples of faecal material from 10 poultry, 8 pig and 2 rabbit farms. A total of 51 *E. coli* ESBL-producing strains were identified on the poultry farms, 39 *E. coli* on pig farms, and 2 *E. coli* and 1 *E. cloacae* on rabbit farms.

Sewage

A total of 32 ESBL-producing *E. coli* clones were identified from the five human sewage samples.

Antibiotic consumption

Antibiotic consumption for β -lactams and macrolides was highest between October and December 2003 and lowest in August 2003

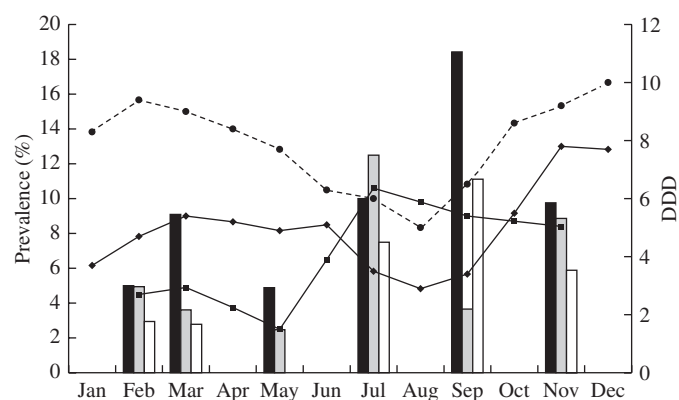


Figure 1. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in faecal carriers during 2003, compared with antibiotic consumption (including β -lactams, macrolides and fluoroquinolones). Black bars, 0–25 years old; grey bars, 26–65 years old; white bars, >65 years old; filled diamonds, amoxicillin/clavulanic acid; filled circles, total consumption; filled squares, overall prevalence.

(Figure 1). Amoxicillin/clavulanic acid was the most frequently prescribed antibiotic, followed by broad-spectrum penicillins and macrolides (Figure 1).

Discussion

ESBL-producing Enterobacteriaceae are infrequently reported in human-related environments other than the clinical setting.^{1,2,7} The present study aimed to evaluate the prevalence of these strains in human-related environments within a single geographic area.

The prevalence of ESBLs in clinically relevant strains varies from year to year, from region to region and even from hospital to hospital.⁸ In the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in 1994, the prevalence of ESBL-producing strains was 0.08% in *E. coli* and 0.6% in *K. pneumoniae*.⁹ In 2003, however, this prevalence increased to 2.6% and 1.7%, respectively. Hospital Vall d'Hebron, in the same city, serves a different population and the prevalence in 2003 was similar: 1.8% in *E. coli*, 2% in *K. pneumoniae*. These figures are comparable to those from other studies in Spain.¹⁰ The appearance of species such as *C. freundii*, *E. cloacae*, *K. oxytoca* or *S. enterica* spp. in both hospitals is of particular note.

Regarding human faecal carriers in the community, there was a temporal distribution of ESBL-producing Enterobacteriaceae. Prevalence was highest between July and November and lowest between February and May. The same fluctuation was observed in a previous study^{2,4} performed in the same area. It thus seems realistic to take the time of year into account when comparing ESBL prevalence in faecal carriers. The prevalence was 2.1% (95% CI: 1.2–3.5) in winter–spring 2001, whereas during the same period in 2003 it increased to 4% (95% CI: 2.4–6.1). Likewise, in autumn, the prevalence increased from 7.5% (95% CI: 3.9–12.7) in 2002 to 8.7% (95% CI: 5.82–12.4) in 2003.² This increasing prevalence in faecal carriers has also been observed in other studies from Spain.¹¹

Human sewage could probably be used as a rapid screening method to detect resistant strains that are representative of those present in the community. Indeed, the five human sewage samples screened contained ESBL-producing Enterobacteriaceae,

suggesting that the community acts as a reservoir for these strains.

Animals, including food animals and pets, are increasingly recognized as a reservoir for ESBL-producing strains. A number of reports discuss the isolation of ESBL-producing *E. coli*^{3,12} and *S. enterica*¹³ from animals, but most have used faeces from individual animals. When studying faeces, ESBL-producing Enterobacteriaceae represent only a low percentage of the total number of strains isolated.^{12,13} Nevertheless, the prevalence and variety of species have increased.³ We evaluated the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in floor samples of faecal material as representative of a particular farm's animal community. Results showed that these strains were present in most poultry and pig farms but in few rabbit farms. Therefore, although ESBL-producing Enterobacteriaceae appear to have a low prevalence in animals, they can be found if an appropriate number of floor faecal samples are analysed. The low prevalence of these strains in floor samples of faecal material from rabbit farms stands out.

Available data suggest that food can contribute to the dissemination of resistant Enterobacteriaceae in the community.^{7,14} The incidence was low in the present study but it should be noted that 79% of the studied foods were cooked. To our knowledge, this is the first report of an ESBL-producing *K. pneumoniae* strain isolated from food. This species was not isolated in the other non-human environments. The prevalence of these strains among food outbreaks (31.1%) and the prevalence of carriers within each outbreak (from 4.4% to 66.6%) reinforce the hypothesis that ESBL-

producing Enterobacteriaceae could be transmitted via the food supply. All food-borne outbreaks were due to enteropathogens. The role of the ESBL-producing Enterobacteriaceae in these persons was considered as commensal flora.

Several studies correlate third-generation cephalosporins with a higher prevalence of ESBL-producing *K. pneumoniae* strains in hospitals.¹⁵ However, there are no data about ambulatory antibiotic prescriptions and community ESBL-producing Enterobacteriaceae. During our study we observed that the higher use of antibiotics between October and December coincided with a lower prevalence of ESBL. This could be due to the higher administration of amoxicillin/clavulanic acid, an antibiotic that is active against some ESBL-producing strains. Similarly, between July and September when use of amoxicillin/clavulanic acid fell, the prevalence of ESBL strains increased. However, other variables, such as cross-selection or summer dietary habits (a greater consumption of uncooked food), should also be taken into consideration.

In summary, the prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae was notable in all the environments studied, suggesting a global expansion of these enzymes. This prevalence is likely to increase among humans worldwide in the future, as occurred with ampicillin resistance mediated by the TEM-1 enzyme.

Acknowledgements

We thank M^a Antonia Mangués and Ester Amado for data about antibiotic consumption and critical review of the manuscript, and I. Gich and T. Puig for epidemiological support. This study was partially supported by grants PI020372, PI020358 and PI020918 from the 'Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social de España' and 'Red Española de Investigación en Patología

Infeciosa' (REIPI C03/14). V. B. was a recipient of a predoctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain).

Transparency declarations

None to declare.

References

1. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 933–51.
2. Mirelis B, Navarro F, Miró E *et al.* Community transmission of extended-spectrum β -lactamase. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**: 1024–5.
3. Briñas L, Moreno MA, Teshager T *et al.* Monitoring and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1262–4.
4. Miró E, Mirelis B, Navarro F *et al.* Surveillance of extended-spectrum β -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 1152–5.
5. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 6823–31.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests—Eighth Informational Supplement: Approved Standard M2-A8*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.
7. Prats G, Mirelis B, Miró E *et al.* Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among summer camp attendees with salmonellosis. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**: 1273–80.
8. DiPersio JR, Deshpande LM, Biedenbach DJ *et al.* Evolution and dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2003). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; **51**: 1–7.
9. Sabaté M, Miró E, Navarro F *et al.* β -Lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**: 989–97.
10. Hernandez JR, Pascual A, Cantón R *et al.* *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; **21**: 77–82.
11. Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP *et al.* Dramatic increase in prevalence of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during non-outbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 4769–75.
12. Carattoli A, Lovari S, Franco A *et al.* Extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 833–5.
13. Gray JT, Hungerford LL, Fedorka-Cray PJ *et al.* Extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* isolates of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 3179–81.
14. Shooter RA, Cooke EM, Faiers MC *et al.* Isolation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* from food in hospitals, canteens, and schools. *Lancet* 1971; **ii**: 390–2.
15. Patterson JE. Antibiotic utilization: is there an effect on antimicrobial resistance? *Chest* 2001; **119**: 426–30S.

ARTICLE III

A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*

Beatriz Mirelis^{a,b}, Alba Rivera^{a,b}, Elisenda Miró^a, Raúl J. Mesa^{a,b}, Ferran Navarro^{a,b} y Pere Coll^{a,b}

^aServicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. ^bDepartamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

BACKGROUND. Screening methods for the detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases are technically demanding. The purpose of this study was to assess screening methods for the detection of these enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*.

METHODS. Isolates were selected according to a resistance phenotype consistent with production of an AmpC-type β -lactamase. Detection of acquired *ampC* genes was done with a multiplex *ampC*-PCR and sequencing. The phenotypic detection methods evaluated included visual examination of antibiogram plates to identify the presence of scattered colonies located near the edge of the inhibition halo of cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime and aztreonam, and a double-disc synergy test using cloxacillin (500 μ g) to inhibit AmpC enzymes.

RESULTS. Seventy-seven isolates were selected from among 6,209 isolates recovered. Acquired *ampC* genes (*bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{CMY-4} and *bla*_{ACC-1}) were found in 19 (24.7%) of these isolates, including 14 *E. coli*, two *K. pneumoniae* and three *P. mirabilis* isolates. The differential trait for the presence of colonies in the inhibition halo was 100% sensitive and specific. Similar results were obtained for the cloxacillin test, except for the *E. coli* isolates in which specificity was 10.3%.

CONCLUSION. The phenotypic trait described here can be considered useful for suspecting the presence of these enzymes. The cloxacillin test was only useful in isolates lacking a natural AmpC β -lactamase.

Key words: AmpC β -lactamase. CMY. ACC. DHA. Phenotypic detection.

de gran utilidad. El objetivo del presente estudio ha sido el de valorar métodos de cribado para la detección de β -lactamasas AmpC plasmídicas en cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*.

MÉTODOS. Se seleccionaron las cepas en función del fenotipo de resistencia compatible con la producción de una β -lactamasa de tipo AmpC. La detección de genes *ampC* adquiridos se realizó mediante una técnica de multiplex PCR y secuenciación. Los métodos fenotípicos evaluados fueron el examen visual de las placas de antibiograma para detectar colonias en la proximidad del borde de los halos de inhibición de cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, y una prueba de sinergia con doble disco usando cloxacilina (500 μ g) como inhibidor de enzimas AmpC.

RESULTADOS. Se seleccionaron 77 cepas de las 6.209 aisladas. En 19 (24,7%) cepas que incluyeron 14 *E. coli*, dos *K. pneumoniae* y tres *P. mirabilis* se detectaron genes *ampC* adquiridos (*bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{CMY-4} y *bla*_{ACC-1}). La característica diferencial de la presencia de colonias en el halo de inhibición mostró una sensibilidad y especificidad del 100%. Se obtuvieron resultados similares con el test de cloxacilina, excepto en cepas de *E. coli* en las que la especificidad fue del 10,3%.

CONCLUSIÓN. La característica fenotípica aquí descrita puede considerarse útil para la sospecha de la presencia de estas enzimas. El test de cloxacilina sólo resulta de utilidad en cepas carentes de una β -lactamasa AmpC cromosómica.

Palabras clave: β -lactamasa AmpC. CMY. ACC. DHA. Detección fenotípica.

A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*

ANTECEDENTES. El disponer de métodos fenotípicos para la detección de β -lactamasas AmpC plasmídicas sería

Correspondencia: Dra. B. Mirelis.
Departamento de Microbiología.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Avda. Sant Antoni M^o Claret, 167. 08025 Barcelona, España.
Correo electrónico: bmirelis@santpau.es

Manuscrito recibido el 21-9-2005; aceptado el 21-2-2006.

370 Enferm Infecc Microbiol Clin 2006;24(6):370-2

Introduction

Plasmid-mediated AmpC β -lactamases constitute an emerging therapeutic problem. Most of these enzymes confer a resistance pattern similar to the overproduction of chromosomal AmpC β -lactamases, which may involve all β -lactam antibiotics except for carbapenems and cepime¹.

Evidence from the nucleotide sequence suggests that genes encoding these enzymes derive from chromosomal *ampC* genes of several *Enterobacteriaceae* which have been integrated into transferable genetic elements facilitating the spread to different microorganisms¹.

Surveillance of plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing organisms is problematic due to the lack of standardized phenotypic methods for its specific detection. Several phenotypic detection methods have been proposed^{2,3}, but none are able to discriminate between acquired and chromosomal AmpC enzymes in organisms that produce endogenous AmpC enzymes.

During a routine surveillance study on β -lactam resistance, we observed that some isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*, with a pattern of resistance compatible with AmpC production, displayed a phenotypical differential trait on antibiogram plates. This consisted in the presence of scattered colonies located near the edge of inhibition around cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime and aztreonam discs. The β -lactamases of three randomly selected strains exhibiting this phenotypical feature were characterized and in all cases the plasmidic AmpC β -lactamase CMY-2 was found.

For this reason, a prospective study was performed to investigate whether this phenotype was related to the presence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases. The usefulness of a screening test using cloxacillin as inhibitor of AmpC enzymes was also evaluated.

Materials and methods

The isolates included in the study were all clinically relevant isolates of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* recovered from routine cultures at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) from January 2003 to January 2005.

The susceptibility test was performed by the disc diffusion method according to CLSI (formerly NCCLS) guidelines⁴ with commercial discs (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France). The inducible AmpC β -lactamases were detected on primary antibiogram plates by the presence of D-shaped zone of inhibition of aztreonam, ceftazidime or cefepime disc adjacent (2.5–3 cm) to the imipenem or cefoxitin discs. The production of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) was assessed by the double-disc synergy method⁵ and by Etest ESBL (AB Biodisk, Solna, Sweden) following the manufacturer's instructions.

Classically, strains expressing AmpC enzymes are resistant to cefoxitin. Nevertheless, as some plasmid-mediated AmpC enzymes (ACC) do not confer resistance to cefoxitin, the selected strains for this study were those showing intermediate resistance or resistance to amoxicillin-clavulanic acid, as well as to cefotaxime or ceftazidime according to CLSI breakpoints, and negative results for ESBL production. The isolates positive for ESBL production that showed intermediate resistance or resistance to cefoxitin were also included.

All selected isolates were tested by a double-disc synergy test based on the utilisation of cloxacillin as inhibitor of AmpC enzymes. Each isolate was inoculated on a Mueller Hinton agar plate, according to CLSI guidelines for disc diffusion susceptibility testing⁴. A disc of cloxacillin (500 μ g) (Neo-Sensitabs, Rosco Diagnostica S/A, Taastrup, Denmark) was placed 2.5 cm (center to center) from ceftazidime (30 μ g) and cefotaxime (30 μ g) discs. After incubation at 37 °C overnight, an enhanced zone of inhibition between any cephalosporin disc and cloxacillin disc was interpreted as evidence of AmpC production.

The presence of acquired *ampC* genes was assessed in all isolates selected according to the above-mentioned phenotype of resistance by a multiplex PCR with six sets of *ampC* family-specific primers as described previously⁶. This method allows to distinguish six groups of AmpC enzymes that include ACC, FOX, MOX (including MOX and CMY-1 related enzymes), DHA, CIT (including LAT, BIL and CMY-2 related enzymes) and EBC (including ACT and MIR enzymes⁶). Clinical isolates of *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* and *Hafnia alvei* were used as control strains, as well as previously characterised strains carrying CMY-2 or ACC-1^{7,8}. Direct DNA sequencing of PCR products was carried out on both strands by the dideoxy method with fluorescent primers using the Automatic Laser Fluorescent DNA Sequencer (ALF, Pharmacia, Upsala, Sweden). Nucleotide and amino acid sequences were analysed via Internet using the BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov). Similarly, the full sequences of the *bla_{CMY}*, *bla_{ACC}* and *bla_{DHA}* genes were determined as previously described^{7,8}. The multiplex *ampC*-PCR was considered the reference method to compare the results obtained from the phenotypical detection methods used.

Results and discussion

Among the 6,209 isolates tested, 70 *E. coli*, four *K. pneumoniae* and three *P. mirabilis* met the inclusion criteria and were selected for further analysis.

As shown in table 1, multiplex *ampC*-PCR gave amplification products for 19 (24.7%) isolates, encompassing 14 *E. coli*, two *K. pneumoniae* and three *P. mirabilis* isolates. Sequence analyses showed a 100% identity with *bla_{CMY-2}* (15 isolates), *bla_{DHA-1}* (two isolates; both showed induction on antibiogram plates), *bla_{CMY-4}* (one isolate) and *bla_{ACC-1}* (one isolate). ESBL production was found in 12 (10 *E. coli* and two *K. pneumoniae*) of the 77 isolates selected. None of these isolates yielded a positive multiplex *ampC*-PCR result.

Visual examination of antibiogram plates revealed a differential phenotypical trait manifested by the presence of scattered colonies located near to the edge of inhibition of

TABLE 1. Correlation between genotypes and results obtained from phenotypic detection methods

Organism	No. studied	No. selected	Multiplex <i>ampC</i> PCR results	No. isolates (genes)	Presence of scattered colonies		Cloxacillin double-disk result	
					Positive	Negative	Positive	Negative
<i>E. coli</i>	5,081	70	Positive	14 (11 <i>bla_{CMY-2}</i> , 1 <i>bla_{CMY-4}</i> , 1 <i>bla_{ACC-1}</i> , 1 <i>bla_{DHA-1}</i>)	14	0	14	0
			Negative*	56	0	56	52	4
<i>K. pneumoniae</i>	607	4	Positive	2 (1 <i>bla_{CMY-2}</i> , 1 <i>bla_{DHA-1}</i>)	2	0	2	0
			Negative*	2	0	2	0	2
<i>P. mirabilis</i>	521	3	Positive	3 (3 <i>bla_{CMY-2}</i>)	3	0	3	0
Total No.	6,209	77	Positive	19	19	0	19	0
			Negative	58	0	58	52	6

*Ten *E. coli* and two *K. pneumoniae* carried ESBL.

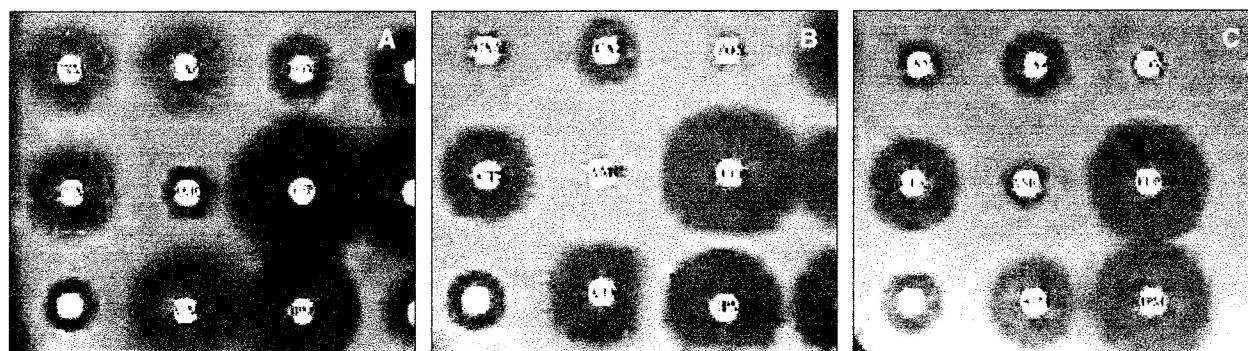


Figure 1. Disk diffusion test. A) *E. coli* isolate carrying *bla*_{CMY-2} as representative of strains carrying CMY-4 or ACC-1. B) *E. coli* isolate carrying DHA-1. C) *E. coli* isolate multiplex *ampC*-PCR negative hyperproducing the chromosomal mediated AmpC β -lactamase. CXM: cefuroxime; CAZ: ceftazidime; FOX: cefoxitin; CTX: cefotaxime; AMC: amoxicillin-clavulanic acid; FEP: cefepime; ATM: aztreonam; IPM: imipenem.

cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime and aztreonam discs in all 19 isolates carrying plasmid mediated AmpC β -lactamases. The remaining isolates showed a well-delimited edge of inhibition (fig. 1). This phenotypic trait therefore exhibited 100% sensitivity and specificity.

Results from the cloxacillin test correlated with the presence or absence of *ampC* genes in all *K. pneumoniae* and *P. mirabilis*, species without a natural AmpC. Of the 70 *E. coli* tested, this method correctly detected the 14 isolates carrying acquired *ampC* genes, but positive results were obtained also in 52 *E. coli* isolates (including six ESBL producers). No differences were found between the use of cefotaxime or ceftazidime in the cloxacillin double-disc synergy test. Based on these findings, the cloxacillin test exhibited 100% sensitivity and 10.3% specificity in *E. coli* isolates. Although additional testing is required, the positive result of the cloxacillin test in the 52 *E. coli* isolates could be explained by the hyperproduction of chromosomal AmpC β -lactamase.

The isolates negative for the cloxacillin tests (four *E. coli* and two *K. pneumoniae* isolates) were all ESBL producers, in which reduced susceptibility to cefoxitin could probably be due to non-enzymatic resistance mechanisms such as altered permeability.

In this study, CMY-2 was the most prevalent acquired AmpC β -lactamase found and inducible DHA-1, CMY-4, and cefoxitin susceptible ACC-1 were less common. Most plasmid-mediated AmpC β -lactamases identified up to 1998 in the Mediterranean area belonged to the groups CMY-2 to CMY-5 and LAT-1 to LAT-4, but other types, such as FOX-3, FOX-4, ACC-1 and DHA-1, have also recently been reported^{1,8,10,11}. To our knowledge, this is the first time that DHA-1 and CMY-4 have been reported in Spain.

Although the number of isolates carrying plasmid-mediated AmpC β -lactamases in our study was small, we have shown that only isolates exhibiting scattered colonies carried acquired *ampC* genes. This distinctive trait should therefore be considered in organisms such as *E. coli* in which the differentiation between plasmidic AmpC and hyperproduction of the chromosomal enzyme is not available based on phenotypic tests. The cloxacillin double-disc synergy test is a simple and reliable method, particularly in isolates lacking a natural AmpC β -lactamase. Further study is required to determine whether this

differential phenotypic trait is also present in isolates carrying AmpC β -lactamases other than CMY-2, CMY-4, DHA-1 and ACC-1. These practical and simple methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases may be useful for enhanced infection control.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Guillem Prats for his valuable advice and suggestions during the development of this study.

References

- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):1-11.
- Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2551-8.
- Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1791-6.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests-Eighth informational supplement. NCCLS, Wayne, Pa, USA: Approved standard M2-A8.; 2003.
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988;10:867-78.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2153-62.
- Miró E, Mirelis B, Navarro F, Matas L, Giménez M, Rabaza C. *Escherichia coli* producing an ACC-1 class C β -lactamase isolated in Barcelona, Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:866-7.
- Navarro F, Pérez-Trallero E, Marimón JM, Aliaga R, Gomáriz M, Mirelis B. CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999-December 2000). *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:383-9.
- Yan JJ, Ko WC, Jung YC, Chuang CL, Wu JJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 β -lactamase in a university hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3121-6.
- Bidet P, Verdet C, Gautier V, Bingen E, Arlet G. First description of DHA-1 ampC β -lactamase in *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:591-2.
- Rhimi-Mahjoubi F, Bernier M, Arlet G, Jemaa ZB, Jouve P, Hammami A, et al. Mise en évidence de la céphalosporinase plasmidique ACC-1 dans différentes entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*) isolées dans un hôpital tunisien (Sfax 1997-2000). *Pathol Biol (Paris).* 2002;50:7-11.