

Proyecto Fin del Máster Iniciación a la Investigación en Medicina



**Epidemiología y caracterización de β -lactamasas
plasmídicas (BLEES, AmpC y carbapenemasas)
presentes en Enterobacterias de portadores fecales
de origen hospitalario y ambulatorio**

Ana Garrido Buenache

Dirigido por: F. J. Castillo García

C. Seral García

Universidad de Zaragoza - Curso 2011-2012

ÍNDICE

1	Introducción	3
1.1	Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	3
1.2	Antibióticos β -lactámicos.....	7
1.2.1	Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos	7
1.2.2	Estructura y clasificación de los antibióticos β -lactámicos.....	9
1.3	Mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos.....	17
1.3.1	β -lactamasas.....	19
1.3.2	Clasificación de las β -lactamasas	20
1.3.3	β -lactamasas cromosómicas.....	25
1.3.4	β -lactamasas plasmídicas	27
1.3.5	β -lactamasas de espectro extendido CTX-M	33
2	Objetivos	39
3	Material y métodos	41
3.1	Detección fenotípica de mecanismos de resistencia	41
3.1.1	Test de sinergia de doble disco.....	41
3.1.2	Prueba de Epsilon-test (ϵ -test [®])	43
3.2	Detección molecular de las β -lactamasas plasmídicas	44
3.2.1	Reacción en cadena de la polimerasa.....	44
4	Resultados	52
4.1	Selección de los aislamientos.....	52

4.2	Detección de los fenotipos de resistencia	52
4.3	Presencia de BLEES	55
4.3.1	Confirmación de BLEEs mediante métodos moleculares	55
4.3.2	Caracterización de las BLEEs.....	59
4.3.3	características de los portadores fecales de BLEEs.....	61
4.4	Presencia de AmpC	64
4.4.1	Confirmación de las ampc plasmídicas mediante métodos moleculares.....	64
4.4.2	Características de los portadores fecales de Ampc	65
4.5	Prevalencia de las β -lactamasas plasmídicas	66
5	Discusión.....	67
5.1	Epidemiología de las β -lactamasas de espectro extendido	67
5.1.1	Epidemiología de las BLEEs en nuestra región	67
5.1.2	Epidemiología de las BLEEs en España	68
5.1.3	Epidemiología de las BLEEs en europa	70
5.1.4	Epidemiología de las BLEEs en asia.....	71
5.1.5	Epidemiología de las BLEEs en África	72
5.2	Epidemiología de las AmpC.....	73
5.3	Interés del estudio	73
6	Conclusiones.....	74
7	Limitaciones del estudio	75
8	Bibliografía.....	76

1 INTRODUCCIÓN

1.1 FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE*

La familia *Enterobacteriaceae*, denominada así por Rahn en 1937 (1), está formada por un conjunto de bacilos gramnegativos, heterogéneos en cuanto a su hábitat y capacidad patógena, pero incluidos en ella por la semejanza en sus caracteres estructurales y fisiológicos y su homología genética. En la actualidad conforman un grupo de más de 157 especies (2) incluidas en 66 géneros, englobando además a todo un conjunto de enterobacterias no clasificadas con un elevado grado de homología estructural y fisiológica (3).

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos. Muchos miembros de esta familia forman parte de la microbiota comensal estable o transitoria del tracto intestinal de los humanos y de los animales, aunque también pueden colonizar otros nichos ecológicos como el agua, el suelo o ser parásitos de vegetales (4, 5). Son resistentes a agentes externos, de ahí su amplia distribución.

Fisiológicamente, su tamaño oscila entre 2-6 μm por 0,3-0,6 μm , no esporulados. Estos organismos crecen bien en medios convencionales simples, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, ya que son anaerobias facultativas. En medio sólido (agar sangre o chocolate), suelen presentar una morfología de las colonias muy similar, en forma de cúpula, lisa y amarillenta. Son catalasa positiva (con la excepción de *Shigella dysenteriae*), oxidasa negativa (menos *Plesiomonas shigelloides*), reducen los nitratos a nitritos y fermentan la glucosa por la vía ácidomixta o del butanodiol. Degradan también a un amplio conjunto de otros carbohidratos y las diferencias metabólicas han servido clásicamente para establecer los criterios para la identificación de las especies (identificación bioquímica).

Pueden ser móviles (con flagelos peritricos) o inmóviles (como *Shigella*, *Klebsiella*, y *Yersinia pestis* a 37°C).

Además de los flagelos, muchas especies producen fimbrias (pili). Las fimbrias están presentes en casi todas las especies y son responsables de la fijación de las células bacterianas a otras bacterias, a las células huéspedes o actúan como receptores de bacteriófagos. También pueden poseer una cápsula bien definida o una cubierta laxa y mal definida, de estructura polisacárida, o sin cubierta (5).

La pared celular de las enterobacterias está formada por una bicapa lipídica, conocida como membrana externa, que contiene proteínas, tales como las porinas, formadoras de canales que permiten el paso de moléculas hidrofílicas no mayores de 1.000 daltons (Da). También se localizan en esta membrana

externa los fosfolípidos y el lipopolisacárido (LPS), cuya región más interna, conocida como lípido A, es una endotoxina formada por ácidos grasos insaturados (Figura 1). Dicha región es la principal responsable de la menor fluidez de la membrana externa y de la poca permeabilidad a muchas moléculas hidrofílicas, incluyendo a muchos antibióticos. La región de polisacáridos del LPS la forman el núcleo o core al cual se ancla la región más distal, denominada polisacárido específico O, cuya especificidad viene determinada por una secuencia repetitiva de azúcares, a menudo ramificados. Las variaciones en las ramificaciones constituyen el antígeno somático O. Esta porción condiciona la virulencia de las bacterias gramnegativas patógenas, por lo que debe ser esencial en la interacción hospedador-huésped. Además, en la parte interna de la membrana externa se localiza un complejo denominado lipoproteína, con funciones de anclaje entre la membrana externa y el péptidoglicano.

El péptidoglicano es otro componente importante de la pared celular y se encuentra inmerso en un compartimento llamado espacio periplásmico, comprendido entre la membrana citoplásmica y la membrana externa. Está constituido por una o varias monocapas formadas por repeticiones de una unidad disacárida, N-acetilglucosamina (NAG) unidas, por un enlace β -1,4, al ácido N-acetilmurámico (NAM). Las uniones cruzadas entre las monocapas refuerzan la estructura, dotándola de una estabilidad química y una resistencia mecánica que, junto con la membrana externa, impide la lisis en medios especialmente hipotónicos y contribuye a mantener la forma celular (6).

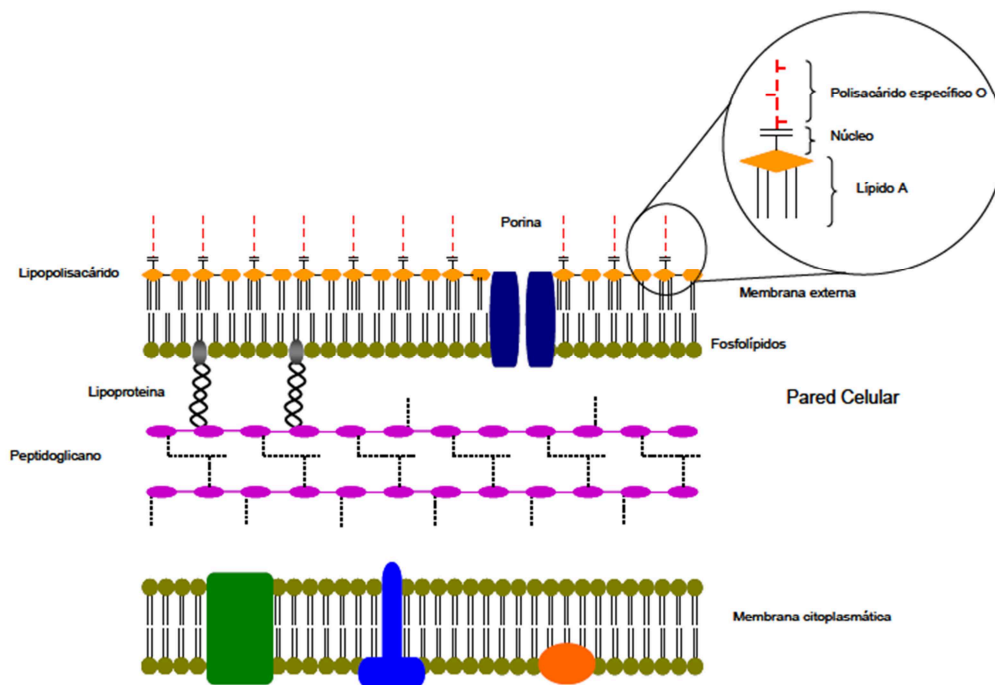


Figura 1. Representación esquemática de las envolturas de *E. coli*

Además de las características inmunogénicas del antígeno O del LPS, las proteínas formadoras de los flagelos en las cepas móviles (flagelinas) y la cápsula de las cepas que la producen son, entre otros, elementos altamente antigénicos conocidos como el antígeno H y el antígeno K, respectivamente. La determinación de estos tres tipos de antígenos es un método de clasificación serotípica muy importante (7).

La mayoría de las especies son capaces de ocupar indistintamente hábitats muy variados en el medio ambiente, las plantas y el tubo digestivo de los animales; otras ocupan hábitats más restringidos, como los sistemas acuáticos, vegetales o el tubo digestivo de ciertos animales. Algunas se hallan adaptadas estrictamente al hombre. La familia incluye especies comensales y patógenas para las plantas y los animales. Con respecto al hombre, existen especies que son primariamente patógenas y otras comensales estables o transitorias del tubo digestivo que pueden producir infecciones oportunistas.

Existe un tercer grupo de enterobacterias: normalmente son microorganismos comensales, pero se pueden convertir en patógenos cuando adquieren genes con factores de virulencia presentes en plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad (*E. coli* asociada a gastroenteritis). Las infecciones por enterobacterias se pueden originar de un reservorio animal, portador humano o de la diseminación endógena de los microorganismos en un paciente vulnerable (ej. *E. coli*) y pueden afectar virtualmente a todas las zonas corporales.

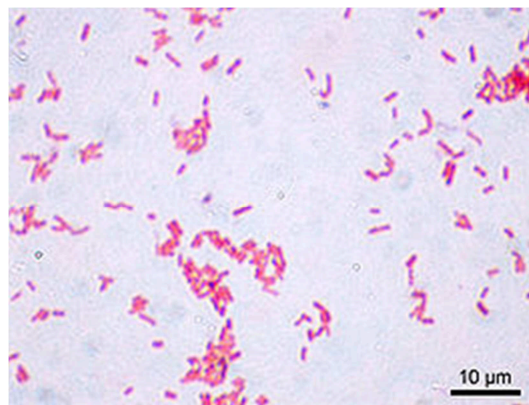


Figura 2. *E. coli* teñido en tinción de Gram

Los organismos entéricos han sido siempre los agentes más comunes de las infecciones del tracto urinario, pero ahora son también los agentes etiológicos predominantes en diversas infecciones sistémicas de origen endógeno e infecciones nosocomiales que se observan en la actualidad. Mientras que las infecciones entéricas graves han disminuido en los países desarrollados, organismos entéricos ordinariamente inofensivos se encuentran cada vez más relacionados con diversas formas de enfermedad extraintestinal, como resultado de su selección por el uso de antibióticos por la existencia de enfermos con disminución de su respuesta inmune por su enfermedad o como consecuencia de la administración de agentes inmunosupresores y citotóxicos. Las implicaciones médicas y económicas de

las infecciones nosocomiales se tornan evidentes cuando se considera que en España la prevalencia de este tipo de infecciones se aproxima al 10%, lo que incrementa la morbimortalidad y los costes para el sistema sanitario (8).

Desde su descubrimiento, los antibióticos han sido el tratamiento más eficaz contra las infecciones causadas por las enterobacterias tanto patógenas como oportunistas. Su utilización masiva ha generado una fuerte presión selectiva que ha conducido, desde la década de los 40, a la selección de bacterias resistentes a toda clase de antibacterianos naturales y sintéticos. Esto supone un gran problema clínico para el tratamiento de estas infecciones.

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

Alguno de los microorganismos de esta familia que causan infecciones oportunistas con más frecuencia son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, y *Morganella morganii* entre otras. Otras especies de enterobacterias poseen capacidad patógena primaria (factores moleculares de patogenicidad), pudiendo causar infecciones en personas previamente sanas sin factores predisponentes, como *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Escherichia coli* (variedades patógenas) (9).

E. coli es el principal habitante anaerobio facultativo del intestino grueso y es único entre los microorganismos que integran la flora normal por cuanto también es el microorganismo aislado, con mayor frecuencia como agente causal de infecciones de las vías urinarias, de heridas, de neumonía, de meningitis y de septicemia, tanto en las infecciones comunitarias como en las adquiridas en el hospital (10).

La especie del género *Klebsiella* que se aísla con mayor frecuencia es *K. pneumoniae*. Se encuentra en las heces de los individuos sanos (del 5 al 10%) y es con frecuencia un invasor secundario del aparato respiratorio de enfermos con enfermedad pulmonar crónica. Como otras enterobacterias oportunistas, *K. pneumoniae* puede ocasionar infecciones en aproximadamente el 3% de todas las neumonías bacterianas agudas y es el segundo patógeno más común del tracto urinario. También pueden causar infecciones de heridas. Es la segunda especie después tras *E. coli* causante de bacteriemia por gramnegativos. Producen una cápsula y por esta razón se desarrollan en forma de colonias grandes y húmedas, frecuentemente muy mucosas. *K. oxytoca* se parece morfológicamente a *K. pneumoniae* y desde el punto de vista clínico pueden considerarse semejantes (10).

1.2 ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

La familia de antibióticos mayoritariamente empleada en el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por enterobacterias es la de los β -lactámicos. Cabe destacar que la existencia de metabolitos antagonistas del crecimiento bacteriano en hongos pertenecientes al género *Penicillium*, fue ya descrita por científicos como Tyndall, Lister, Huxley y Duchesne durante la segunda mitad del siglo XIX. La importancia del descubrimiento de Alexander Fleming en 1928 del primer antibiótico de éxito terapéutico, producido por el hongo *Penicillium notatum*, significó el inicio de la edad de oro de los antimicrobianos.

La Penicilina G (bencilpenicilina) comenzó a utilizarse en clínica en 1942, revolucionando el tratamiento de las enfermedades infecciosas en la primera mitad del siglo XX, como la fiebre escarlata, la neumonía, la gonorrea y las infecciones por estafilococos.

Desde el descubrimiento de las penicilinas hasta la actualidad, se han empleado una gran variedad de antibióticos β -lactámicos naturales y derivados semisintéticos para el control de enfermedades infecciosas. Estas moléculas representan más de la mitad del consumo total de los antibióticos, principalmente por su alta efectividad y baja toxicidad.

1.2.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos) son moléculas químicamente diversas que tienen en común la presencia de un anillo β -lactámico en su estructura.

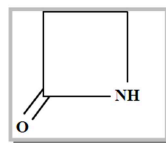


Figura 3. Anillo β -lactámico

La similitud estereoquímica del anillo β -lactámico con el dipéptido d-alanina-d-alanina del pentapéptido que enlaza las cadenas de NAG y NAM del peptidoglicano (11) les permite interactuar con dichas proteínas situadas en la superficie de la membrana plasmática bacteriana.



Figura 4. Semejanza estructural entre la molécula de β -lactámico y D-alanina-D-alanina

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bacteriolíticos ya que provocan la lisis celular. Ejercen su acción a nivel de la pared celular en crecimiento, inhibiendo la última etapa de biosíntesis del péptidoglicano, la formación de las uniones cruzadas entre las cadenas lineales de NAG y NAM, conocida como transpeptidación. Las enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas que participan en esta etapa son también capaces de unirse covalentemente a las penicilinas y a otros antibióticos β -lactámicos. De ahí que se denominen proteínas de unión a la penicilina o PBP (12).

La serina del sitio activo de las PBP ataca al carbonil del anillo β -lactámico generando un intermediario enzimático acilado con el anillo β -lactámico abierto. Este compuesto inactivo se va acumulando en la bacteria ya que es de degradación lenta.

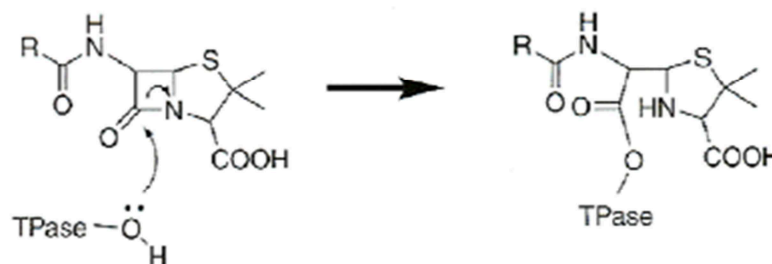


Figura 5. Ataque suicida de las transpeptidasas (TPase) a la penicilina (12)

La inactivación de las PBP impide la formación de uniones cruzadas entre las cadenas de peptidoglicano de la pared celular en crecimiento. Esto se traduce en una mayor laxitud de esta envuelta. Además, este efecto se incrementa también gracias a la acción de las autolisinas que degradan determinadas zonas del péptidoglicano para permitir el crecimiento celular. El resultado de todo ello es la lisis celular fruto de las fuerzas osmóticas y mecánicas que actúan sobre la pared celular (acción bactericida). Las bacterias que carecen de autolisinas son inhibidas pero no destruidas.

Para actuar, por tanto, los β -lactámicos deben llegar a las PBPs. Eso es fácil en los microorganismos grampositivos, pero más difícil en gramnegativos y micobacterias. Por eso, en gramnegativos, deben aprovechar la presencia de poros proteicos (porinas). Además, la acción del β -lactámico no es posible si

la bacteria no se multiplica, porque ese es el momento de síntesis de la pared celular y de actuación de las PBPs. Es decir, actúan en fase de crecimiento exponencial.

1.2.2 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Todos ellos comparten una estructura base común que define químicamente a esta familia de antibióticos: un anillo β -lactámico, que determina el mecanismo de acción (inhibe la síntesis de la pared celular), la escasa toxicidad directa y el principal mecanismo de resistencia (β -lactamasas).

No obstante para que el β -lactámico (anillo principal) sea activo, es preciso que esté unido a otros radicales (habitualmente otros anillos). La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales junto con las características propias de este esqueleto básico, modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos β -lactámicos:

1.2.2.1 Penicilinas.

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo β -lactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), conocido como penamo, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además, tienen una cadena lateral acil (R-CO-), que varía de unas penicilinas a otras, en el grupo amino de la posición 6 del núcleo y que es la que define sus propiedades.

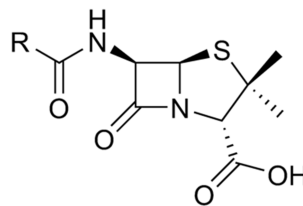


Figura 6. Estructura química de las penicilinas

La identificación de la estructura química de las penicilinas (13) permitió una serie de modificaciones a partir de acilaciones químicas de las cadenas laterales, dando lugar a un número cada vez mayor de penicilinas semisintéticas con un espectro de acción superior como:

- a. penicilinas resistentes a penicilinasas estafilococales, moléculas tremendamente útiles hasta la aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina;

- b. penicilinas con alta capacidad de penetración a través de la membrana externa de gramnegativos, funcionales sobre todo frente a *E. coli* y con mayor capacidad de penetración por ser más hidrofílicas que la penicilina G;
- c. penicilinas con sustituyentes laterales cargados negativamente, desarrolladas para combatir las infecciones nosocomiales cada vez más comunes y especialmente activas frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*
- d. acilampicilinas, moléculas con sustituyentes carboxilo, farmacocinéticamente más estables y resistentes a la degradación por enzimas bacterianas.

1.2.2.2 Cefalosporinas.

En 1955, y a partir de experimentos de purificación de la penicilina N producida por el hongo *Cephalosporium acremonium* (= *Acremonium chrysogenum*), se descubrió la cefalosporina C. Las cefalosporinas son fármacos cuya estructura básica está constituida por el anillo 7-aminocefalosporánico, que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiacínico y un anillo β -lactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales de este anillo origina las diversas cefalosporinas.

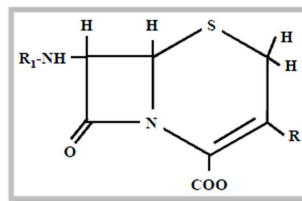


Figura 7. Anillo 7-aminocefalosporánico

A partir de la década de los 60 y con el conocimiento de la ruta de biosíntesis de la cefalosporina C, han ido obteniéndose diversos grupos de cefalosporinas semisintéticas, lo cual ha llevado a ampliar su espectro antibacteriano (*Pseudomonas spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*, etc.), su estabilidad frente a la hidrólisis por enzimas bacterianas y sus propiedades farmacocinéticas.

Clínicamente se han dividido en compuestos de primera, segunda, tercera y cuarta generación, de acuerdo al desarrollo histórico y a sus características estructurales y antibacterianas:

- a. Las cefalosporinas de primera generación presentan una mayor actividad frente a cocos grampositivos como *S. aureus* sensible a meticilina, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, carecen de actividad sobre *Enterococcus spp.* Su

acción frente a los bacilos gramnegativos está limitada a cepas de *E. coli*, *Klebsiella spp* y *Proteus mirabilis* no productoras de β -lactamasas cromosómicas y/o plasmídicas (14).

- b. Las cefalosporinas de segunda generación ejercen su actividad sobre *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*. En el momento de su aplicación representaron el principal mecanismo de acción frente a las β -lactamasas tipo TEM (véase apartado 1.4.3), codificadas en plásmidos R y resistentes a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera generación. En esta generación se incluye a las cefamicinas, producidas por varias especies de *Streptomyces* y *Nocardia*, que químicamente son 7-alfa metoxi-cefalosporinas (15).
- c. Las cefalosporinas de tercera generación son compuestos semisintéticos que se caracterizan por la presencia de un anillo 2-aminotiazolil en el C7 como cadena lateral y por una elevada actividad sobre las enterobacterias, excepto sobre cepas hiperproductoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), *H. influenzae*, *Neisseria spp.*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (16).
- d. Las cefalosporinas de cuarta generación se caracterizan químicamente por la presencia de un grupo metoxi-imino aminotiazolil en la posición R1 del núcleo cefem y por la presencia de un nitrógeno cuaternario en R2. Este grupo se mantiene cargado positivamente tanto en condiciones de pH ácido como básico. La asociación de esta carga neta positiva con una carga negativa en el C4 del núcleo cefem hace de estos antibacterianos moléculas zwitteriónicas, es decir, moléculas con un balance entre sus cargas positivas y negativas en los rangos de pH encontrados in vivo (17). Esta característica químico-estructural explica por qué estas cefalosporinas penetran mucho más a través de las porinas al espacio periplasmático de las bacterias gramnegativas. Estos compuestos tienen una actividad superior sobre bacilos multirresistentes (*Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Providencia*, algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus* y *E. coli* hiperproductores de BLEE). En cambio, sobre *P. aeruginosa*, las moléculas de esta generación tienen una actividad similar a la de las de tercera generación.

1.2.2.3 Monobactam.

Los antibióticos monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura betalactámica sencilla, con una estructura monocíclica en la que el anillo β -lactámico no está fusionado a otro secundario.

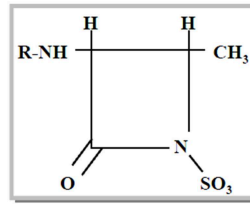


Figura 8. Anillo monobactámico

El fármaco representativo de este grupo es aztreonam.

Aztreonam es muy sensible a la hidrólisis por las β -lactamasas bacterianas, tanto las codificadas por plásmidos tipo TEM-1, TEM-2, OXA-2, OXA-3, PSE-1, PSE-3, PSE-4 y SHV-1, como a las determinadas por el cromosoma. Es poco inductor de β -lactamasas, incluidas las de *Pseudomonas spp.*, lo que es importante desde el punto de vista de la aparición de resistencias.

Aztreonam tiene una excelente actividad, semejante o superior a la de los aminoglucósidos y las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, centrándose específicamente sobre bacterias aerobias gramnegativas. Su espectro de actividad abarca principalmente a *E. coli*, *S. marcescens*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Providencia spp.*, *P. aeruginosa*, *Neisseria spp.* o *H. influenzae*. No tiene actividad sobre las bacterias grampositivas aerobias ni sobre anaerobios, tanto grampositivos como gramnegativos.

La administración conjunta de aztreonam con penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, fosfomicina, clindamicina, eritromicina, vancomicina o metronidazol, ha demostrado que produce un efecto aditivo o sinérgico. Este sinergismo tiene aplicaciones clínicas para tratar infecciones mixtas en las que una parte de los microorganismos causantes no puedan cubrirse con aztreonam, o para tratamientos empíricos iniciales. También hay actividad sinérgica de aztreonam con cefepime, mejorando la actividad de esta cefalosporina frente a *P. aeruginosa* al inhibir a las cefalosporinasas extracelulares. No es aconsejable asociar aztreonam con ceftioxitina ni carbapenémicos debido a la capacidad de éstos para inducir β -lactamasas cromosómicas en *Pseudomonas spp.*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.*, *Enterobacter spp.* y algunos *Proteus spp.*

1.2.2.4 Carbapenems.

En 1979, Kahan y colaboradores descubrieron la producción de un nuevo antibiótico, denominado tienamicina, producido por *Streptomyces cattleya*, (17).

La tienamicina es el antibacteriano natural no tóxico de más amplio espectro y más potente que se ha descrito. Sin embargo, químicamente es muy inestable. Su descubrimiento conllevó el desarrollo de nuevos derivados semisintéticos de carbapenems.

En la actualidad, se conocen más de 50 moléculas con diversos espectros de acción contra los patógenos grampositivos y gramnegativos más importantes. Su estructura molecular, conocida como núcleo penem, es similar a la de las penicilinas en tanto que presentan un anillo β -lactámico fusionado con un anillo tiazolidínico. Sin embargo, difieren en que este último está insaturado y contiene un átomo de carbono sustituyendo al azufre.

El derivado semisintético más utilizado y estable es la N-formimidioiltienamicina, conocido como imipenem. Éste se administra en clínica acompañado de la cilastatina, inhibidor de la dehidropeptidasa renal, enzima que hidroliza al imipenem.

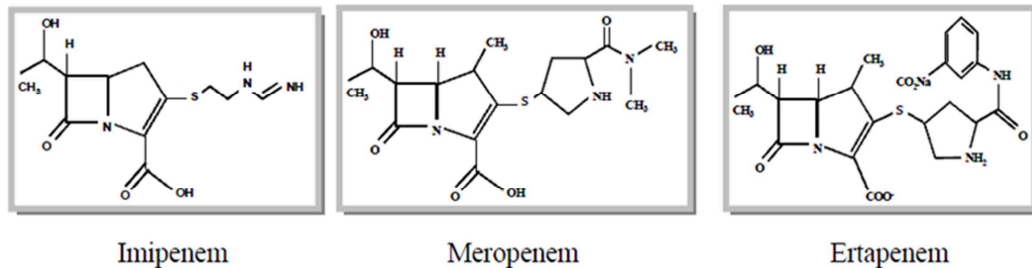


Figura 9. Principales antibióticos carbapenémicos

Los antibióticos carbapenémicos son los antibióticos β -lactámicos que presentan mayor espectro y actividad. Actúan como otros β -lactámicos, uniéndose covalentemente a las PBP_s, inhibiendo la síntesis de la pared celular y activando autolisinas endógenas, con lo cual la célula muere rápidamente.

Debido a su bajo peso molecular y su estructura hidrofílica deben penetrar en las bacterias gramnegativas a través de porinas.

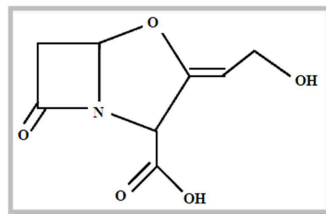
Su acción se facilita por la estabilidad frente a un gran número de β -lactamasas, tanto de microorganismos grampositivos, como de gramnegativos, cromosómicas o plasmídicas, aunque existen bacterias capaces de hidrolizarlos. Son potentes inductores de β -lactamasas de tipo C en enterobacterias y *P. aeruginosa*, aunque habitualmente no producen desrepresión.

Poseen un espectro de actividad muy amplio. In vitro son activos frente a bacterias grampositivas (*S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bacillus spp*), frente a bacterias gramnegativas (*Neisseria spp*, *Moraxella spp*, enterobacterias, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *Haemophilus spp*, *Brucella spp*, *Campylobacter spp*, *Helicobacter pylori*, *L. pneumophila*) y bacterias anaerobias.

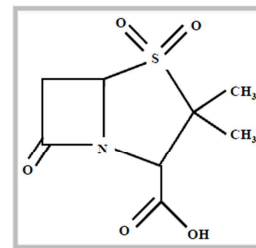
Deben emplearse en infecciones graves y nosocomiales, sobre todo si hay posibilidad de que estén producidas por bacterias multirresistentes o polimicrobianas. No son antibióticos de elección en infecciones leves ni en profilaxis quirúrgica. Pueden usarse como tratamiento empírico en pacientes neutropénicos febriles, siendo más útil meropenem en monoterapia por su mayor actividad frente a *P. aeruginosa*, en bacteriemias y septicemias de origen desconocido, en infecciones intraabdominales, en neumonías nosocomiales, en meningitis (sólo cuando se sospeche la presencia de bacilos gramnegativos resistentes a otros antibióticos), en infecciones de tejidos blandos y osteoarticulares, en infecciones graves y complicadas del tracto urinario. Son especialmente útiles en infecciones por *Acinetobacter spp.*, como endocarditis o neumonía.

1.2.2.5 Inhibidores de β -lactamasas.

En 1976, Brown y colaboradores descubrieron el ácido clavulánico, compuesto con capacidad inhibitoria de las β -lactamasas, (18). Su núcleo consta de un anillo de oxazolidina, análogo al de las penicilinas, pero en el que el azufre está sustituido por un átomo de oxígeno y carece de la cadena lateral en el C6.



Ácido clavulánico



Sulbactam

Figura 10. Inhibidores de β -lactamasas

Su mecanismo de acción radica en que es capaz de unirse irreversiblemente al grupo hidroxilo de la serina del sitio activo de la enzima, produciendo un acilado intermedio muy estable, inhibiendo así su actividad. Por ello, se conocen como inhibidores suicida, ya que el enlace covalente es tan estable que es irreversible. Esta característica hace que sea uno de los antibióticos combinados más importantes en clínica, administrándose junto con penicilinas de amplio espectro.

Otras moléculas, pertenecientes a esta familia y descubiertas con posterioridad al ácido clavulánico, son el sulbactam, con capacidad inhibitoria inferior y el tazobactam, con una actividad similar a la del ácido clavulánico (19).

Aunque son posibles otras combinaciones, el ácido clavulánico se encuentra disponible asociado a amoxicilina, sulbactam asociado a ampicilina y tazobactam a piperacilina.

La asociación con ácido clavulánico supone la recuperación de la actividad de amoxicilina frente a microorganismos de las especies productoras de β -lactamasas y la amplía a bacterias resistentes por producción natural de enzimas (*P. vulgaris*, *Klebsiella spp*, *P. pseudomallei*, *Aeromonas spp*, *B. fragilis*, *C. jejuni*, *H. influenzae*).

La asociación con sulbactam supone las mismas ventajas que para el caso del ácido clavulánico.

Por otra parte, frente a *Acinetobacter spp* únicamente es activa la asociación ampicilina-sulbactam, debido a la mayor afinidad de éste último por PBP-2 (20).

La asociación con tazobactam restablece la actividad de piperacilina frente a especies productoras de β -lactamasas como *E. coli*, *Klebsiella spp*, *M. morgani*, *P. vulgaris*, *C. diversus*, y es la asociación β -lactámico-inhibidor de β -lactamasas más efectiva frente al grupo de *B. fragilis* (21).

Las indicaciones de la combinación amoxicilina-ácido clavulánico incluyen las infecciones del aparato respiratorio, tanto superior como inferior, del tracto urinario, infecciones obstetroginecológicas, infecciones de piel, tejidos blandos y osteoarticulares, infecciones odontógenas y periodontales.

Las indicaciones de ampicilina-sulbactam son similares a las anteriores, además de las infecciones graves por *Acinetobacter spp* multirresistentes, en las que ésta puede ser una de las escasas opciones terapéuticas.

Por su parte, piperacilina-tazobactam está indicada en el tratamiento de infecciones polimicrobianas graves o producidas por microorganismos resistentes a otros antibióticos: bacteriemias, infecciones intraabdominales, ginecológicas y neumonías graves adquiridas en la comunidad, en las que se sospeche la presencia de *P. aeruginosa*, y en las nosocomiales.

Cuadro resumen de los principales antibióticos β -lactámicos de interés clínico:

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos β -lactámicos

Clase	Tipos	Antibióticos
Penicilinas	Bencilpenicilinas	Bencilpenicilina procaina Bencilpenicilina benzatina
	Alquilpenicilinas	Fenoximetilpenicilina benzatina
	Isoxazolpenicilinas	Cloxacilina
	Aminopenicilinas	Ampicilina / amoxicilina
	Ureidopenicilinas	Piperacilina
Inhibidores de betalactamasas	Sulfonas del ácido penicilánico	Sulbactam Tazobactam
	Oxapenamas o clavamas	Ácido clavulánico
Cefalosporinas	Primera generación	Cefazolina Cefalexina
	Segunda generación	Cefonicid Cefuroxima Cefaclor
	Tercera generación	Cefotaxima Ceftriaxona Ceftazidima Ceftizoxima Cefixima Cefpodoxima Ceftibuteno
	Cuarta generación	Cefepime Cefpiroma
Cefamicinas	Cefalosporinas de 2 ^a generación parenterales	Cefoxitina
Monobactámicos o monobactamas		Aztreonam
Carbapenémicos o carbapenemas	Carbapenemas	Imipenem
	4-beta-metilcarbapenema	Meropenem
	1-beta-metilcarbapenema	Ertapenem

1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos.

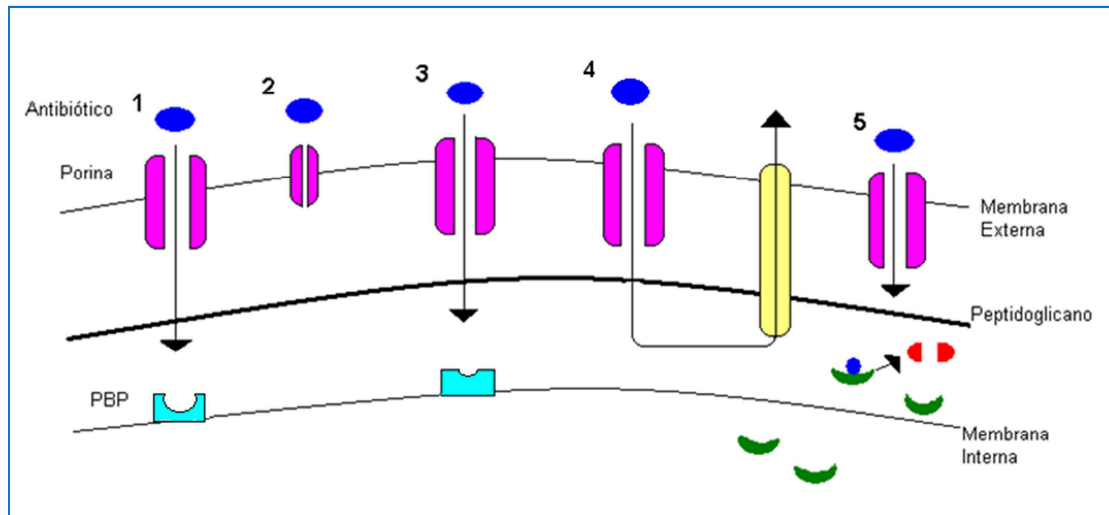


Figura 11. Mecanismo de resistencia a β -lactámicos en gramnegativos. 1. El antibiótico llega a su lugar de acción (PBP) a través de las porinas. 2. Resistencia por alteración de la permeabilidad (alteración en la porina). 3. Modificación de la diana de acción. 4. El antibiótico es expulsado al exterior por unos complejos proteicos (bombas de expulsión). 5. La bacteria produce unos enzimas que hidrolizan el antibiótico, produciendo una resistencia por inactivación bacteriana

La base genética de estos mecanismos puede ser cromosómica, conocida como resistencia natural o intrínseca, la cual es una característica estructural o funcional presentada por algunas cepas bacterianas. Sin embargo, la aparición de mutaciones en el cromosoma o la adquisición de información genética, contenida en plásmidos, transposones o integrones pueden hacer que las bacterias presenten nuevas resistencias a antimicrobianos. Este tipo de resistencias se conoce como resistencia adquirida.

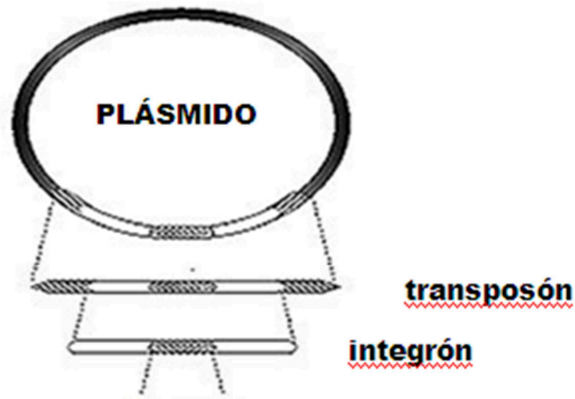


Figura 12. Estructura simplificada de elementos móviles que permiten la transferencia horizontal de genes entre las bacterias

La adquisición de DNA exógeno puede realizarse mediante transformación, transducción y transferencia célula a célula por conjugación (22), siendo este último mecanismo uno de los más importantes, ya que genes de resistencia a los antimicrobianos suelen localizarse en plásmidos o transposones conjugativos.

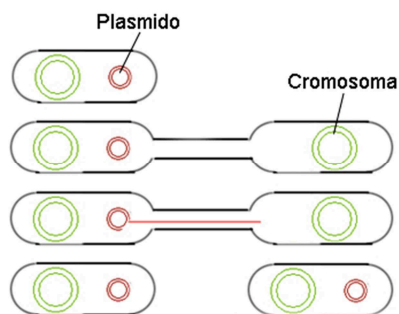


Figura 13. Mecanismo de conjugación: transferencia genética a través del contacto directo entre dos bacterias

En general, en las bacterias gramnegativas causantes de infecciones, el mecanismo de resistencia mayoritario frente a los β -lactámicos es la hidrólisis enzimática, causada por la presencia de β -lactamasas en el espacio periplasmático. El grado de resistencia que generan estas enzimas se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes β -lactámicos y propiedades hidrolíticas.

La síntesis de las β -lactamasas puede ser constitutiva, como ocurre en el caso de algunas de ellas codificadas en el cromosoma o en plásmidos. En este último caso, la concentración de la enzima está en relación al número de copias del plásmido. No obstante, también se conocen β -lactamasas cuya síntesis es inducible, las cuales están típicamente codificadas en el cromosoma. Una característica a resaltar es que los propios antibióticos β -lactámicos pueden ser agentes inductores de la síntesis de β -lactamasas, si bien no todos ellos tienen la misma potencia inductora (23).

Otros mecanismos implicados en la resistencia a los β -lactámicos son:

- a. alteración de la permeabilidad de la membrana externa, debida generalmente a mutaciones en las proteínas formadoras de los canales de membrana
- b. alteraciones de las bombas de eflujo, como consecuencia de mutaciones en las proteínas transmembrana, las cuales amplían su sustrato y bombean al exterior el antimicrobiano
- c. alteración de la diana del antibiótico por mutaciones en las PBP que comportan una pérdida de la afinidad de los β -lactámicos por las mismas, disminuyendo así su actividad (24).

1.3.1 β -LACTAMASAS

La detección de bacterias resistentes al primer antibiótico β -lactámico conocido se describió incluso antes del uso en clínica de la penicilina (25) y ha ido en aumento a raíz de la utilización masiva de estos antibacterianos en el tratamiento de infecciones.

Se cree que las β -lactamasas son fruto de una evolución de las PBP, ya que comparten un alto grado de homología con ellas (26). De hecho, se ha sugerido que la excreción de las proteínas PBP funcionó como un mecanismo de defensa ante la presencia de antibióticos β -lactámicos en el medio. La mejora de este mecanismo de detoxificación habría dado lugar a enzimas específicos sin actividad transpeptidasa, pero capaces de hidrolizar a los β -lactámicos. De esta forma, parece que las proteínas ancestrales de las β -lactamasas estarían involucradas en el metabolismo de la pared celular y en la protección frente a antibióticos segregados por hongos (27) y por ciertos tipos de bacterias.

En la actualidad, las β -lactamasas han ampliado enormemente su espectro de acción, a la vez que los genes que las codifican se han movilizad desde el cromosoma a plásmidos e integrones.

Se sabe que el mecanismo de acción de determinadas β -lactamasas pasa por la actuación de la serina de su sitio activo, mientras que otras requieren un ion zinc en su sitio activo para atacar al anillo β -lactámico (metalobetalactamasas). El resultado es la hidrólisis del anillo β lactámico, generando un antibiótico inactivo y una enzima activa de nuevo.

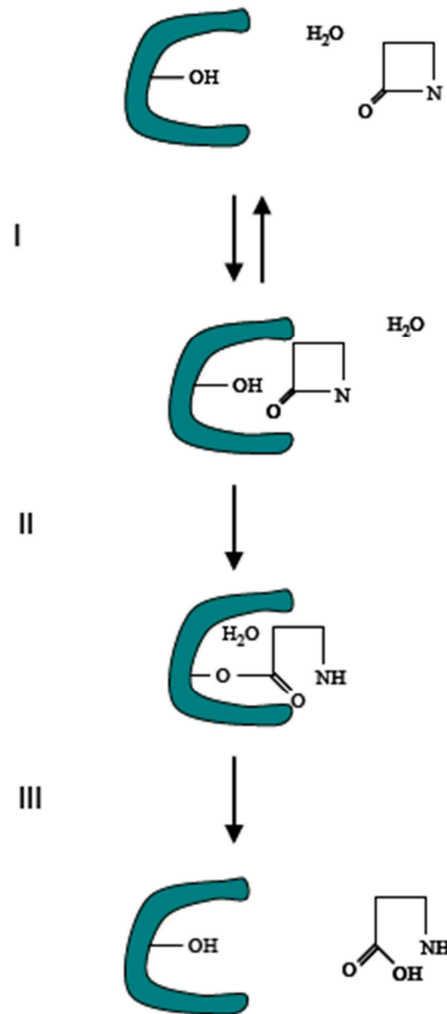


Figura 14. Mecanismo de acción de las β -lactamasas. Las fases de la reacción son: (I) Se produce una unión reversible y no covalente entre la enzima y el anillo β -lactámico. (II) El grupo hidroxilo libre del residuo de serina del sitio activo rompe el anillo β -lactámico, formándose un enlace acil covalente. (III) Hidrólisis del enlace acil mediante la intervención de una molécula de agua, liberándose el antibiótico y la β -lactamasa activa (27)

1.3.2 CLASIFICACIÓN DE LAS β -LACTAMASAS

La necesidad de clasificar a estas enzimas surgió cuando se descubrió que determinadas β -lactamasas eran capaces de degradar a las cefalosporinas, lo cual las diferenciaba del resto de las enzimas conocidas hasta el momento, activas solamente frente a penicilinas.

La primera clasificación, realizada por Sawai y colaboradores en 1968 (28), ordena a las cefalosporinasas y penicilinasas en función de su respuesta al antisuero. El esquema propuesto por Richmond y Sykes en 1973 (29) incluye a todas las β -lactamasas de gramnegativos descritas hasta el momento y se basa en

sus perfiles de sustrato. Posteriormente, se actualizó en 1976 con la inclusión de las β -lactamasas plasmídicas (30).

En 1980, Ambler dividió a estas enzimas en cuatro clases en función de su estructura molecular (clases A, B, C y D), incluyendo en la clase B a todas aquellas β -lactamasas que contenían zinc en su sitio activo (31).

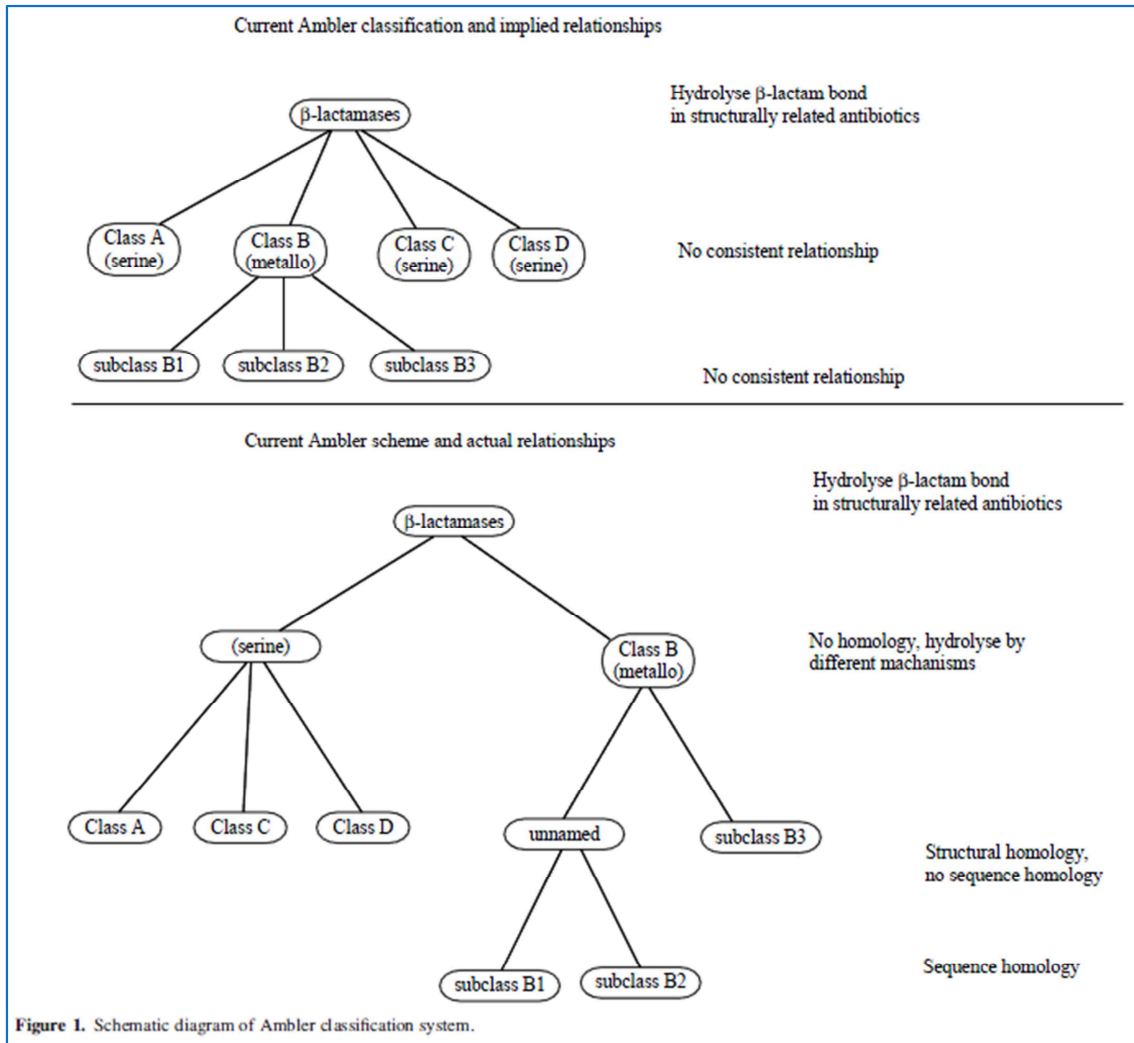


Figura 15. Clasificación molecular de Ambler adaptado por Frere (32)

Más tarde, el esquema propuesto por Bush en 1989 (33, 34) y revisado en 1995 por Bush y colaboradores (35), correlaciona por primera vez el tipo de sustrato, la capacidad inhibitoria y la estructura molecular de las enzimas y engloba a las enzimas en cuatro grupos. En 2010, realizaron una nueva revisión que es la que actualmente se utiliza (36).

Tabla 2. Clasificación esquemática de las β -lactamasas bacterianas (36)

TABLE 1. Classification schemes for bacterial β -lactamases, expanded from Bush et al. (16)							
Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxymino- β -lactams	GCl, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiprome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxymino- β -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxymino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1, CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.
^b NI, not included.

A continuación se exponen las características más importantes de los distintos grupos de β -lactamasas.

- a. Grupo 1: Según su secuencia de aminoácidos pertenecen a la clase C. Presentan un residuo de serina en el centro activo. Hidrolizan a la mayoría de β -lactámicos, incluidas las cefamicinas, pero no a los carbapenems. El sustrato principal son las cefalosporinas, de ahí que se use el término para referirse a este grupo como cefalosporinasas o cefamicinasas. No se inhiben por ácido clavulánico. Incluye:
 - β -lactamasas cromosómicas inducibles (AmpC) de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp., y *P. aeruginosa*.
 - β -lactamasas cromosómicas constitutivas (AmpC) de *E. coli*.
 - β -lactamasas plasmídicas (MIR-1, MOX-1, FOX-1) de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, que son el resultado de la incorporación de genes cromosómicos (AmpC) en plásmidos.
- b. Grupo 2: forman un grupo heterogéneo constituido por seis grupos (2a, 2b, 2c, 2d, 2e y 2f) que según su secuencia de aminoácidos todos pertenecen a la clase A excepto el 2d que pertenece

a la clase D. Todas presentan un residuo de serina en el centro activo. Se inhiben por ácido clavulánico. Incluye:

- Penicilinasas cromosómicas y plasmídicas de bacterias grampositivas (*Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Enterococcus* spp.).
- β -lactamasas plasmídicas clásicas (TEM-1, TEM-2, SHV-1) de *Enterobacteriaceae*.
- β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido u oximiino- β -lactamasas de *Enterobacteriaceae* (por modificación del centro activo de TEM-1, TEM-2 y SHV-1).
- β -lactamasas derivadas de TEM que confieren resistencia a los inhibidores de β -lactamasas o enzimas IRT de *Enterobacteriaceae*.
- β -lactamasas cromosómicas constitutivas de *K. pneumoniae* (SHV-1) y *K. oxytoca* (K1).
- β -lactamasas cromosómicas inducibles de *P. vulgaris* (o cefuroximasas).
- Oxacilinasas clásicas plasmídicas de *P. aeruginosa*.
- Oxacilinasas de espectro extendido plasmídicas de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. (por cambios en el centro activo de OXA 1 a 10).
- Carbapenemasas cromosómicas de *E. cloacae*, *S. marcescens* y *P. aeruginosa*.

El subgrupo 2a engloba las penicilinasas de bacterias grampositivas con capacidad de hidrolizar la penicilina G pero no las penicilinasas semisintéticas. Son inhibidas por el ácido clavulánico. Pueden estar codificadas en el cromosoma o en plásmidos.

El subgrupo 2b engloba la mayoría de las β -lactamasas de amplio espectro, que hidrolizan las penicilinas y si su expresión es elevada, pueden conferir resistencia a las cefalosporinas de 1ª generación. Son inhibidas por el ácido clavulánico. En este grupo se encuentran las enzimas tipo TEM y SHV. De estas derivan, por mutaciones puntuales que comportan un cambio aminoacídico el subgrupo 2be, denominadas β -lactamasas de espectro ampliado (BLEE), descritas por primera vez en Alemania en 1983 (37). Son enzimas capaces de hidrolizar penicilinas, todas las cefalosporinas (excepto las cefamicinas), y los monobactamas (aztreonam) pero mantienen su sensibilidad frente a los carbapenems. Son más sensibles que los de amplio espectro en cuanto a la inhibición por ácido clavulánico.

Actualmente se han descrito más de 150 BLEE descritas en diferentes géneros de enterobacterias y *P. aeruginosa* (38). Predominan tres grandes grupos:

- TEM: derivan de TEM-1 y TEM-2; han sido descritas mayoritariamente en *E. coli* y *K. pneumoniae* y han causado brotes nosocomiales severos.
- SHV: derivan de SHV-1. La mayoría ha sido aislada de cepas de *K. pneumoniae* aunque también se han descrito en *C. koseri*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.
- CTX- M: se han aislado en casi todas las enterobacterias, en particular en *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter*. Son enzimas con una potente actividad hidrolítica frente a cefotaxima.

El subgrupo 2br comprende las β -lactamasas resistentes a los inhibidores (IRT). Los IRT, descritos en Francia en 1993, se caracterizan por presentar el mismo perfil de hidrólisis que las β -lactamasas plasmídicas de amplio espectro pero son resistentes a los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, el tazobactam y el sulbactam. La mayoría deriva de las TEM, de ahí el nombre de IRT (inhibitor resistant TEM-type).

El subgrupo 2c son las carbenicilinasas, CARB o PSE. Estas enzimas hidrolizan preferentemente las carboxipenicilinasas (carbenicilina y ticarcilina) y son menos sensibles al ácido clavulánico.

El subgrupo 2d son las denominadas oxacilinasas, debido a su capacidad para hidrolizar la oxacilina. Su perfil de hidrólisis es similar al de β -lactamasa de amplio espectro pero son más resistentes a la acción del ácido clavulánico. Algunas oxacilinasas pueden hidrolizar a los carbapenems.

El subgrupo 2e incluye cefalosporinasas cromosómicas propias de *P. vulgaris*, *C. koseri* y *C. sedlakii*. A diferencia de las cefalosporinasas de grupo 1, éstas pertenecen a la clase A de Ambler y son inhibidas por el ácido clavulánico.

En el subgrupo 2f se incluyen las serin β -lactamasas de clase A que hidrolizan a los carbapenems y son parcialmente inhibidas por el ácido clavulánico pero no por EDTA.

- c. Grupo 3: Según su secuencia de aminoácidos y la presencia de Zinc (ya que necesita para su acción enzimática la acción de cationes divalentes) pertenecen a la clase B de Ambler (31) (metalobetalactamasas). Son inactivadas por agentes quelantes (EDTA). Hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenems (no al aztreonam). No se inhiben por ácido clavulánico. Inicialmente se aislaron en el cromosoma de ciertas especies como *A. hydrophila* o *Bacillus* spp.

Actualmente se han descrito en plásmidos que se encuentran en principalmente en bacilos gramnegativos no fermentadores.

Incluye:

- β -lactamasas cromosómicas de *S. maltophilia*.
- β -lactamasas plasmídicas IMP de *P. aeruginosa*, *S. marcescens* y *K. pneumoniae*.

- d. Grupo 4: Son penicilinasas no inhibidas por ácido clavulánico y cuya caracterización molecular final está aún por realizar por lo que no se puede incluir en ningún grupo de la clasificación hecha por Ambler (31). Incluye la penicilinasas de *B. cepacea*.

Tabla 3. Interrelaciones entre las dos principales clasificaciones (39)

Clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros	Grupos funcionales	Clasificación de Ambler	Principales características
Grupo 1 Cefalosporinas	-	C	Normalmente cromosómicas. Resistentes a la mayoría de betalactámicos excepto carbapenemas. No inhibidos por el ác.clavulánico
Grupo 2 Penicilinas (Inhibidas por ác. clavulánico)	2a	A	Penicilinas estafilococicas.
	2b	A	Amplio espectro
	2be	A	TEM-1,TEM-2,SHV-1
	2br	A	Espectro extendido
	2c	A	TEM-3-160, SHV-2-101.
	2e	A	IRT
	2f	A	Carbencilinasas
Grupo 3 metalo betalactamasas	2d	D	Cefalosporinas inhibidas por clavulánico
	3 ^a	B (metaloenzimas)	Carbapenemasas inhibidas por clavulánico
	3b	B	OXA
Grupo 4	3c	B	Zinc-dependientes. Carbapenemasas
		No clasificada	La mayoría de ellas no están secuenciadas.

1.3.3 β -LACTAMASAS CROMOSÓMICAS

Muchas de las bacterias gramnegativas sintetizan una β -lactamasa cromosómica, generalmente en muy poca cantidad, no confiriendo resistencia. Algunas de ellas, como *E. coli*, pueden incrementar de forma constitutiva la síntesis de esta enzima, AmpC, y, según su grado de expresión, se puede producir resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación (incluida ceftazidima), algunas de tercera generación como ceftazidima y pérdida de sensibilidad a las asociaciones con inhibidores de β -lactamasas, mientras que permanecen sensibles las cefalosporinas de cuarta generación y carbapenemas (40).

La expresión de las β -lactamasas cromosómicas AmpC en otras enterobacterias como *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Morganella spp.* y *P. aeruginosa* es, sin embargo, de carácter inducible (41). Este proceso de inducción por el cual se incrementa la síntesis de la enzima cuando la bacteria está en presencia del antibiótico inductor es un fenómeno reversible que desaparece cuando éste no está presente (42).

En este último grupo de microorganismos, además, se pueden producir fenómenos de desrepresión, que también incrementan la cantidad de β -lactamasa. A diferencia de la inducción, la desrepresión es un fenómeno irreversible, que no desaparece cuando la bacteria no está en presencia del antibiótico selector, sino que se seleccionan mutantes establemente desreprimidos que sintetizan gran cantidad de enzima. Este proceso genera resistencia a las carboxi-, acilamino- y ureidopenicilinas y a las cefalosporinas de tercera generación (40).

Las cefalosporinas de tercera generación son buenos antibióticos selectores, pero malos inductores, de la producción de β -lactamasas. Por el contrario, carbapenémicos, cefamicinas e inhibidores de β -lactamasas poseen un fuerte carácter inductor y baja capacidad de selección de mutantes establemente desreprimidos.

Desde un punto de vista clínico el fenómeno de la desrepresión puede suponer un fracaso terapéutico, que puede desarrollarse durante el tratamiento con β -lactámicos (43). Por ello, en el tratamiento de las infecciones producidas por microorganismos con β -lactamasas cromosómicas inducibles se recurre a la administración de antibióticos β -lactámicos poco selectores como carbapenemas o cefalosporinas de cuarta generación, que presentan menor tasa de hidrólisis por estas enzimas, y un bajo carácter selector, o a la administración simultánea de un antibiótico β -lactámico con un aminoglucósido.

El carácter inducible de estas enzimas es fácilmente detectable en los antibiogramas realizados mediante la técnica de difusión: cuando se disponen los discos de cefoxitina o imipenem próximos a los de las cefalosporinas de tercera o cuarta generación puede observarse un antagonismo entre ambos antibióticos, resultado de la inducción en la producción de β -lactamasas que ejercen los primeros (44).

Sin embargo, ambos procesos son complejos y requieren la presencia del β -lactámico y de, al menos, cinco genes en la bacteria: ampC, ampR, ampD, ampG y ampE (41).

El mecanismo de inducción de la β -lactamasa AmpC depende del gen ampR que actúa como activador durante el proceso de inducción y como represor en condiciones normales. Los genes ampG y ampE determinan la formación de proteínas de membrana (AmpG y AmpE, respectivamente) y ampD da lugar a una proteína soluble (AmpD) que se libera en el citoplasma, donde favorece el reciclado de la pared celular y la síntesis del peptidoglucano a partir de los productos de degradación de la pared. En presencia de un antibiótico β -lactámico inductor, AmpG actúa como permeasa y facilita la entrada en el

citoplasma de los productos de degradación del peptidoglucano que se están produciendo como consecuencia del proceso de actuación del antibiótico β -lactámico. Estos productos participan en la conversión de ampR de represor a activador de ampC. En ausencia del β -lactámico inductor no se liberan grandes cantidades de productos de degradación del peptidoglucano, circunstancia que impide finalmente la activación de AmpR. La participación de AmpE en todo este proceso no está claramente demostrada.

Por su parte, los mutantes establemente desreprimidos no expresan el gen ampD, por lo que todo producto de degradación del peptidoglucano que se produce actúa como activador de ampR, liberándose siempre gran cantidad de β -lactamasa AmpC.

Como se ha indicado con anterioridad, AmpC de *E. coli* se expresa de forma constitutiva. Esta peculiaridad se debe a la ausencia de ampR en la dotación genética, por lo que tampoco se produce activación en presencia de antibióticos inductores.

En ningún caso la enzima cromosómica AmpC es sensible a la acción de los inhibidores clásicos de β -lactamasas.

Por el contrario, las β -lactamasas de *Klebsiella spp.* y *P. vulgaris* son sensibles al ácido clavulánico y otros inhibidores de β -lactamasas como sulbactam y tazobactam (40). Las primeras, representadas por LEN-1 o SHV-1 en *K. pneumoniae* o K1 en *K. oxytoca*, se expresan de forma constitutiva; sin embargo, la β -lactamasa cromosómica de *P. vulgaris*, cefuroximasa, es de carácter inducible y, al igual que AmpC de *E. cloacae* o *P. aeruginosa*, pero con menor frecuencia, se pueden seleccionar durante el tratamiento mutantes que hiperproducen la enzima.

Además de estas β -lactamasas cromosómicas existen otras de clase B, metaloenzimas, con un perfil hidrolítico muy amplio, que afectan a penicilinas, cefalosporinas y carbapenems y no son inhibidas por ácido clavulánico. Reciben el sobrenombre de carbapenemasas (40). Algunas se producen en microorganismos multirresistentes considerados como patógenos de interés creciente: *S. maltophilia* (enzima L1), *Flavobacterium odoratum* y *B. cepacia*.

1.3.4 β -LACTAMASAS PLASMÍDICAS

La bacteria porta elementos genéticos autorreplicativos y extracromosómicos llamados plásmidos. Son moléculas de doble cadena de DNA circular que por definición, no codifican proteínas que intervengan en el desarrollo de la bacteria. La mayoría de los plásmidos contiene genes de resistencia a antibióticos, como es el caso de las β -lactamasas plasmídicas, que son fácilmente intercambiables con otras bacterias de diferente género por conjugación (45).

Además, algunas de las β -lactamasas plasmídicas son de origen cromosómico, como es el caso de la SHV-1 en *K. pneumoniae*.

Las β -lactamasas plasmídicas incluyen las β -lactamasas de amplio espectro, las β -lactamasas de espectro extendido (que se desarrollan en su mayoría en el punto 1.3.5), las β -lactamasas resistentes a los inhibidores, las cefamicinasas AmpC y las Carbapenemasas.

1.3.4.1 β -lactamasas de amplio espectro y de espectro extendido

Dentro del grupo de las β -lactamasas de amplio espectro están incluidas TEM-1, TEM-2, SHV-1 y las de tipo OXA.

La expresión de una β -lactamasa tipo TEM-1 es el mecanismo más común de resistencia a los β -lactámicos entre las bacterias gramnegativas (46). La enzima TEM-1, fue descrita a principios de la década de los 60 (47). Fue encontrada en un aislamiento de *E. coli* procedente de un hemocultivo de una paciente llamada “Temoniera” en Grecia, de ahí la designación de la enzima como TEM.

Esta enzima confiere resistencia a ampicilina, penicilina y a la primera generación de cefalosporinas, como la cefalotina (48). Por encima del 90% de la resistencia a ampicilina en *E. coli* es debida a la producción de una TEM-1 (41). Este mecanismo de resistencia ha sido habitualmente descrito entre *Enterobacteriaceae*, pero no está confinado sólo a este grupo de bacterias.

El gen responsable se localiza en un transposón cuya transposición hace que este gen también se haya descrito en otras especies bacterianas como *H. influenzae*, *Vibrio* spp. y *N. gonorrhoeae*.

TEM-2, la primera enzima derivada de TEM-1, presenta una única sustitución, la de glutamina en la posición 39 a lisina respecto a la secuencia de TEM-1 (49). Esta mutación puntual genera un cambio del punto isoelectrico (pI) de 5,4 de TEM-1 a 5,6 en TEM-2, pero no se modifica el perfil de sustrato. La prevalencia de TEM-2 entre plásmidos en enterobacterias resistentes a β -lactámicos no supera el 4%.

La primera β -lactamasa cuyo patrón fenotípico fue distintivo de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) es la enzima TEM-3, descrita en 1989 (50), fruto de una mutación puntual de la enzima TEM-1.

Hoy en día se sabe que las mutaciones puntuales en el gen parental *bla*TEM-1 que han dado lugar a las enzimas caracterizadas como BLEE, tienen un número limitado de posiciones. Cada una de estas enzimas presenta una especificidad de sustrato y un punto isoelectrico concreto. Cabe destacar los cambios de aminoácidos de lisina por glutamato en las posiciones 104 y 240, serina o histidina por arginina en la posición 164 y serina por glicina en la posición 238.

Estas enzimas se encuentran preferentemente en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* y, también, en otras especies de enterobacterias como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *P. mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Salmonella spp.* y otros microorganismos.

El gen *blaSHV-1* que codifica la enzima SHV-1, la cual confiere resistencia a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera generación, fue identificado por primera vez en el cromosoma de *K. pneumoniae*. Posteriormente, este gen se ha descrito en más de un 20% de los plásmidos que confieren resistencia a ampicilina en esta especie (51). Sin embargo, en muchas cepas de *K. pneumoniae* el gen *blaSHV* se encuentra integrado en el cromosoma bacteriano.

El gen que codifica SHV-1 comparte un 65% de identidad con el de TEM-1. No está claro por qué TEM-1 es más prevalente que SHV-1, con un 80% de plásmidos que codifican resistencia a β -lactámicos en enterobacterias frente a un 5% para SHV-1, posiblemente se deba a que el transposón que contiene a TEM-1 es más móvil.

Varias mutaciones puntuales del gen *blaSHV-1* han dado lugar a las BLEE tipo SHV. La mayoría de estas variantes se caracterizan por tener una sustitución de una serina por una glicina en la posición 238. El residuo de serina en esta posición parece ser crítico para la hidrólisis de la ceftazidima y el residuo de lisina para la hidrólisis de la cefotaxima (52). La mayoría de BLEE del tipo SHV se han encontrado en cepas de *K. pneumoniae*, aunque también se han descrito en *C. diversus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Las β -lactamasas tipo OXA son otro creciente grupo. Estas enzimas están codificadas tanto en cromosomas como en plásmidos y los estudios de filogenia muestran que al menos han ocurrido tres sucesos de movilización de los genes cromosómicos a plásmidos durante los últimos 500 millones de años, lo cual sugiere que la evolución de estas enzimas no ha sido causada por la presión selectiva propiciada por el uso de antibióticos en el último siglo (53).

La similitud entre las enzimas de este grupo no superan, en algunos casos, el 20%, por lo que su clasificación se ha realizado en función de los sustratos comunes que hidrolizan más que en atención a sus estructuras primarias (54). Pertenecen a la clase molecular D y a la clase funcional 2d. Las BLEEs tipo OXA (activas contra oxacilina) han sido descritas principalmente en *P. aeruginosa*.

Todas estas enzimas confieren resistencia a la ampicilina y a la cefalotina, aunque se caracterizan por su alta actividad hidrolítica frente a la oxacilina y a la cloxacilina y por el hecho de que son poco inhibidas por el ácido clavulánico (35); sin embargo, se ha descrito inhibición por éste en OXA-18.

En general, las OXA, clasificadas como BLEE, derivan de la enzima OXA-10 (OXA-11, 14, 16, 17) por mutaciones puntuales en una o dos posiciones; una asparragina por una serina en la posición la 73 y un aspartato por una glicina en la posición 157, siendo particularmente importante esta última sustitución ya que está implicada en la resistencia a la ceftazidima.

1.3.4.2 Cefamicinasas AmpC plasmídicas

Las cepas productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido tradicionales no confieren resistencia a las cefamicinas. En los últimos años, sin embargo, se han descrito β -lactamasas plasmídicas que confieren resistencia no solo a cefalosporinas de tercera generación sino también a cefamicinas, por lo que se conocen como cefamicinasas plasmídicas.

Este tipo de enzimas suelen tener un pI básico, incluso superior a 10, y confieren resistencia a cefamicinas y cefalosporinas (incluidas las de tercera generación), pero no a carbapenems. No se inhiben por ácido clavulánico pero sí por aztreonam, excepto FEC-1 y MOX-1 que constituyen una excepción (40).

La primera prueba de la existencia de una β -lactamasa plasmídica de clase C fue aportada por Papanicolau y cols., los cuales describieron la transmisión de resistencia a cefamicinas mediada por una enzima denominada MIR-1, que presenta propiedades bioquímicas de β -lactamasa clase 1 y el gen que codifica esta enzima presenta una analogía de un 90% con el gen AmpC de *E. cloacae*. (55).

Desde entonces hasta ahora se han descrito numerosas β -lactamasas plasmídicas AmpC (en el GenBank (56) hay descritas 72 variantes de CMY, 8 variantes de MOX, 8 variantes de DHA, 9 variantes de ACT, 4 variantes de ACC, 10 variantes de FOX, 1 variante de LAT y 5 variantes de MIR) (57).

Estudios de la secuencia nucleotídica sugieren que los genes que codifican estas enzimas plasmídicas derivan de genes AmpC cromosómicos que poseen algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae y el género *Aeromonas spp*, los cuales han sido integrados en elementos genéticos transferibles facilitando su difusión a diferentes microorganismos.

Pequeñas diferencias en la secuencia aminoacídica de estas enzimas plasmídicas han dado lugar a 6 familias (57):

- CIT, derivadas de *blaAmpC* de *Citrobacter freundii*, que incluye los grupos CMY y LAT
- DHA, derivadas de *blaAmpC* de *Morganella morganii*
- ACC, derivada de *blaAmpC* de *Hafnia alvei*
- FOX, derivada de *blaAmpC* de *Aeromonas media*
- MOX, se cree que son derivadas de AmpC cromosómica de *Aeromonas caviae*
- EBC, derivadas de *blaAmpC* de *E. cloacae* y/o *Enterobacter asburiae*, que incluye ACT y MIR.

Nakano et al. describen posteriormente una nueva variante, CFE-1, derivada de *blaAmpC* de *C. freundii* (58, 59).

La expresión de todos los genes AmpC es constitutiva con la excepción de las tipo DHA-1, -2, CMY-13 Y ACT-1 que es inducible. (60-62).

La nomenclatura de estas enzimas es en función de su perfil de resistencia a cefamicinas (CMY), cefoxitina (FOX), moxalactam (MOX), latamoxef (LAT); el lugar donde se descubrió Hospital Miriam en Providence (MIR-1) o el nombre del paciente donde se aisló por primera vez BIL-1. (62).

Las representantes mejor caracterizadas son MIR-1, MOX-1, CMY-1, CMY-2, BIL-1, LAT-1 y FOX-1.

En algunos casos se conocen la secuencia de nucleótidos de los genes que controlan la producción de estas enzimas. Barnaud y cols secuenciaron la β -lactamasa DHA-1 y demostraron una alta similitud con la cefalosporinasa cromosómica de *Morganella morganii* (63). En el año 2001, Fortineau y cols describen una nueva cefalosporinasa inducible DHA-2 en *K.pneumoniae* (64).

Actualmente, estas enzimas se han descrito con mayor frecuencia en *E. coli*, principalmente del tipo CMY-2, seguida de DHA-1, pero también en *C. freundii*, *Enterobacter spp* o *K. pneumoniae*.

En un estudio multicéntrico realizado en España en 2009 por Navarro et al. se obtuvo una prevalencia de AmpC plasmídicas entorno al 0,6%.

En la actualidad disponemos de test fenotípicos que permiten diferenciar las β -lactamasas AmpC plasmídicas de las cromosómicas, alguno de ellos descrito en el apartado de Material y métodos. (65).

1.3.4.3 Carbapenemasas

Los carbapenems, son el grupo de antibióticos β -lactámicos más estables a la hidrólisis por las β -lactamasas. Dentro de este grupo se encuentran imipenem, meropenem y ertapenem. Son resistentes a la acción de la mayoría de las enzimas, incluso a AmpC y β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido de tipo TEM, SHV, CTX-M y OXA.

Las carbapenemasas son activas frente a las oximino-cefalosporinas, cefamicinas y carbapenems. (66).

La primera carbapenemasa conocida fue descrita en *Bacillus cereus* (β -lactamasa II). Posteriormente se describió en *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium odoratum*, *Legionella gormanii* y *Bacteroides fragilis*.

Recientemente se han identificado y caracterizado carbapenemasas plasmídicas en *Pseudomonas aeruginosa*, en diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae* y en *Acinetobacter* lo que ha generado un mayor interés por su estudio y puede suponer un nuevo reto para la antibioterapia.

La resistencia a los carbapenems no sólo es debida a la producción de carbapenemasas, ya que existen otros mecanismos que pueden afectar a su actividad, como son: pérdida de porinas específicas, bombeo o expulsión del antibiótico y modificaciones en las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) (67).

Atendiendo a la clasificación molecular de Ambler (31), las carbapenemasas pueden clasificarse en tres grupos:

- Carbapenemasas clase A.
Pertenece al grupo 2f de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Son inhibidas débilmente por el ácido clavulánico pero no por el EDTA (35).
Puede ser de producción cromosómica (NMC-A, Sme-1, Sme-3 y IMI-1) en *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens*, o codificadas por plásmidos, como KPC-1 en *K. pneumoniae* y GES-2 en *Pseudomonas aeruginosa* (66).
Los primeros aislamientos se produjeron en Japón en 1990 tanto en especies de enterobacterias como en *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Más tarde han sido informados aislamientos en otras partes del mundo como Europa, Canadá y Brasil (68). En la actualidad se ha informado en un aislamiento de *Enterobacter asburiae* (con IMI-2) la primera carbapenemasa codificada por plásmidos e inducible (69).
- Carbapenemasas clase B.
Son las carbapenemasas más significativas desde el punto de vista clínico. Pertenece al grupo 3 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, son metaloenzimas, requieren zinc para su actuación y son generalmente de naturaleza cromosómica, aunque recientemente se han asociados a plásmidos conjugativos e integrones. (70).
Son inhibidas por EDTA, pero no por ácido clavulánico. Estas enzimas hidrolizan a las penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas pero no al aztreonam. (40).
- Carbapenemasas clase D.
A este grupo pertenecen algunas β -lactamasas tipo OXA que presentan una débil actividad carbapenemasa. (67, 71).
Han sido descritas en *Acinetobacter baumannii* y disminuyen la sensibilidad a imipenem y meropenem (66).

1.3.4.4 β -lactamasas resistentes a inhibidores de β -lactamasas (IRT)

Aunque las IRT no son propiamente dichas BLEEs, también derivan de las enzimas clásicas TEM y SHV.

En los primeros años de la década de los 90 se describieron β -lactamasas plasmídicas resistentes a la inhibición por ácido clavulánico. Se caracterizan por conferir resistencia a amino-, carboxi- y ureidopenicilinas, son insensibles a la acción de los inhibidores de β -lactamasa, y no tienen actividad sobre el resto de β -lactámicos. Como consecuencia de que las IRT son resistentes a la inhibición por

ácido clavulánico y sulbactam, muestran resistencia clínica al uso de las combinaciones de antibióticos β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas como amoxicilina-ácido clavulánico, ticarcilina-ácido clavulánico y ampicilina-sulbactam. La mayoría de los aislamientos presentan escasa sensibilidad a cefalosporinas de amplio espectro, cefamicinas y carbapenemas.

1.3.5 β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO CTX-M

Este grupo de enzimas es una nueva familia de β -lactamasas con un espectro ampliado de sustrato que hidrolizan preferentemente a la cefotaxima.

A principios de 1989, en Alemania, Bauernfeind y cols informan de un aislamiento clínico de una cepa de *E.coli* resistente a cefotaxima, la cual es productora de una BLEE no TEM, no SHV denominada CTX-M-1, en referencia a su mayor actividad frente a cefotaxima. (72).

El nombre CTX refleja la potente actividad hidrolítica de estas β -lactamasas frente a cefotaxima (activas frente a la cefotaxima, aislada en Munich y de ahí su nombre). Estas enzimas presentan mayor actividad hidrolítica frente a cefotaxima y ceftriaxona que frente a ceftazidima. Los microorganismos productores de estas β -lactamasas suelen tener unas CMI para cefotaxima $> 64 \mu\text{g/ml}$ y para ceftazidima en el rango de sensibilidad $2-8 \mu\text{g/ml}$; pero en algunos casos las CMI para ceftazidima alcanzan valores de $256 \mu\text{g/ml}$ (73), como por ejemplo las β -lactamasas

CTX-M-15 y CTX-M-32 difieren de CTX-M-3 en la sustitución de Asp-240 \rightarrow Gly lo que hace que estas enzimas presenten actividad frente a ceftazidima. (74, 75).

Las CMIs para aztreonam son variables. Estas β -lactamasas son más activas frente a cefepime que el resto de las BLEE, presentando CMIs para cefepime más altas. Por último, tazobactam presenta mayor actividad frente a las BLEE tipo CTX que el ácido clavulánico.

No hay que olvidar que un mismo organismo puede contener BLEE tipo CTX junto con SHV o junto β -lactamasa tipo AmpC, lo que implica un cambio en su fenotipo de resistencia. (73).

Se reconocen más de 65 variantes de β -lactamasas CTX-M (su número sigue creciendo), las cuales se clasifican filogenéticamente en cinco grupos en función de la homología en la secuencia de aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25. Se encuentran distanciados evolutivamente unos de otros ya que no comparten más de un 94% de identidad (76). Esto lleva a pensar que la divergencia a partir de un antecesor común ocurrió en los primeros estadios.

Estas enzimas muestran tan sólo un 40% de similitud con las β -lactamasas tipo TEM y SHV, sin embargo, los genes *bla*CTX-M poseen un alto grado de similitud con los genes cromosómicos *bla*KLUA que

codifican las β -lactamasas del género *Kluyvera*. El grupo 1 y 2 derivarían de β -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera ascorbata* (77) mientras que el grupo 8 y 9 derivarían de β -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera georgiana* (78). Las enzimas KLUA de *K. ascorbata* se incluyen en el grupo CTX-M-2, mostrando la KLUA-2 un 100% de similitud con la CTX-M-5. La KLUG-1, enzima codificada en el cromosoma de *K. georgiana*, difiere de la CTX-M-8 tan sólo en tres aminoácidos.

Por otra parte, la β -lactamasa cromosómica de *K. cryocrescens* (KLUC-1) comparte aproximadamente un 85% de similitud con las enzimas del grupo CTX-M-1, por lo cual se ha sugerido que la KLUC-1 podría formar un sexto grupo de CTX-M.

Las enzimas cromosómicas presentan grados de similitud en sus regiones flanqueantes de entre un 83-88%, característica también descrita entre las β -lactamasas CTX-M plasmídicas (74, 76).

Sin embargo, se han expresado una alta variedad de variantes de las enzimas CTX-M, por lo que otros autores opinan que es muy improbable que estas enzimas tengan un mismo origen filogenético (79).

El grupo CTX-M-1 incluye 10 enzimas mediadas por plásmidos (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-28, CTX-M-32 y CTX-M-117), el grupo CTX-M-2 incluye 8 (CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 y Toho-1), el grupo CTX-M-8 incluye un sólo enzima, CTX-M-8, el grupo CTX-M-9 incluye 10 (CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-24, CTX-M-27 y Toho-2) y por último, el grupo CTX-M-25 incluye CTX-M-25 y CTX-M-26 (68, 76, 80).

Toho 1 y Toho 2 son β -lactamasas relacionadas estructuralmente con las β -lactamasas tipo CTX y como estas presentan una actividad más potente frente a cefotaxima. La denominación de Toho se refiere al nombre del hospital en Japón donde fue aislada una cepa de *E.coli* portadora de esta β -lactamasa. En la actualidad son CTX-M-44 y 45 respectivamente. (73).

Las β -lactamasas CTX-M excepto Toho-2 poseen 291 residuos aminoácidos. El rango de pI es de 7.4-9 (76).

Al igual que ocurre con las β -lactamasas SHV y TEM existe una relación importante entre estructura y función. Los aminoácidos en posición 240 y 267 juegan un papel importante en la evolución de estas β -lactamasas. Las enzimas CTX-M-15, CTX-M-27, CTX-M-16, derivan de CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-14 respectivamente, por sustitución de Gly-240→Asp presentando una potente acción frente a ceftazidima (74). La β -lactamasa CTX-M-19 deriva de CTX-M-18 por sustitución de Pro-167→Ser lo que le proporciona mayor actividad frente a ceftazidima. (81).

Otros residuos aminoácidos juegan también un papel importante como son Arg-276. La sustitución de asparragina por arginina confiere bajo nivel de resistencia a cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam. Estos

resultados indican que la Arg-276 podría estar implicada en la hidrólisis de los oximino β -lactámicos, por otra parte el residuo Arg-276 ocupa el mismo lugar que el residuo Arg-244 en otras β -lactamasas de la clase A (82).

Todas estas enzimas presentan un residuo de serina en la posición 237, el cual juega un papel muy importante en su espectro ampliado de sustrato (83). La sustitución Ser-237→Ala induce a una disminución de la actividad hidrolítica frente a cefotaxima (84).

Los residuos Asn104, Asn132, y Asp240 establecen puentes de hidrogeno con los grupos amido de la cadena de la cefotaxima, lo que facilitaría su hidrólisis. La sustitución Asp-240→Gly en CTX-M-1 da lugar a CTX-M-32 aumentando la capacidad de hidrolítica frente a ceftazidima. (75).

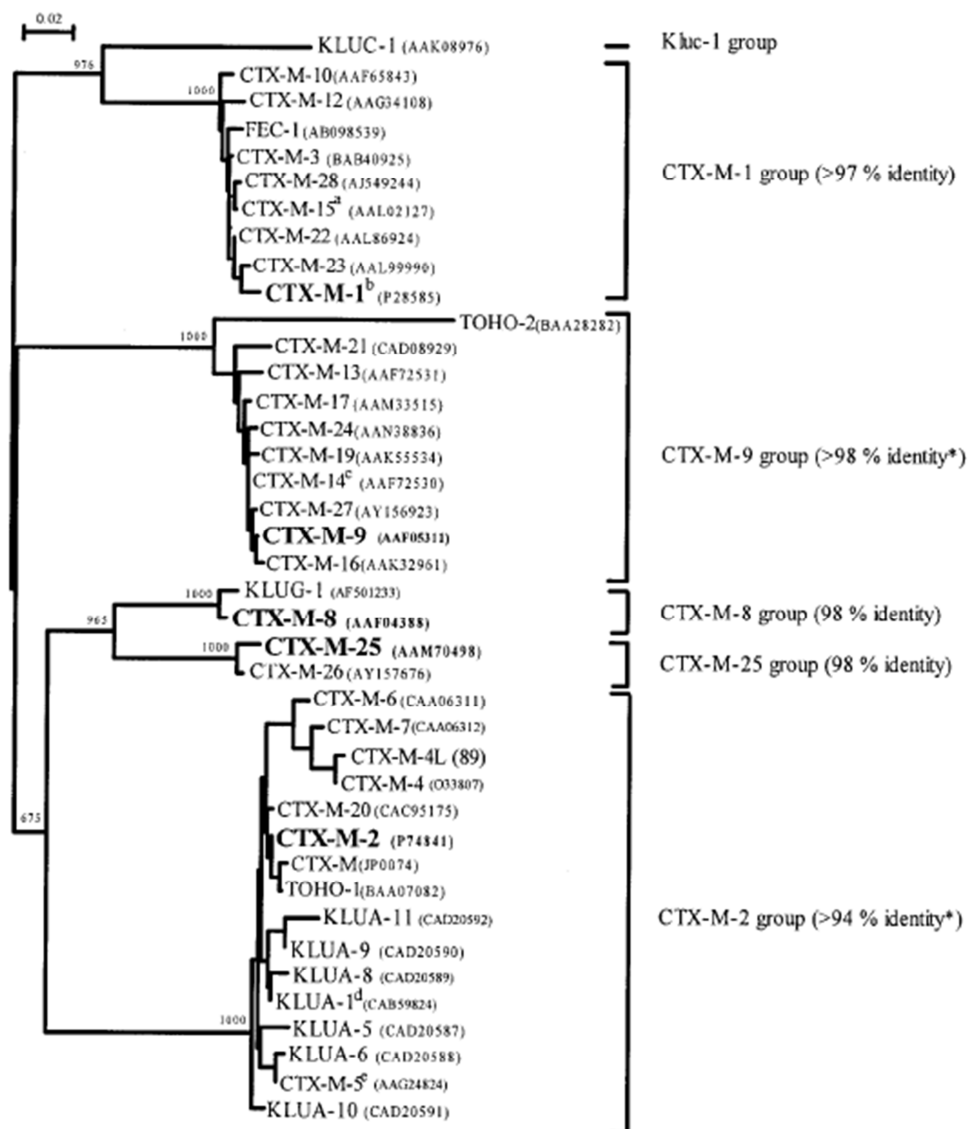


Figura 16. Dendrograma de la familia CTX-M (74)

Finalmente, en la actividad cefotaximasa de CTX-M interviene no solo los ajustes producidos en el centro activo de la enzima sino también la situación global del giro ω y la lamina β 3. (76)

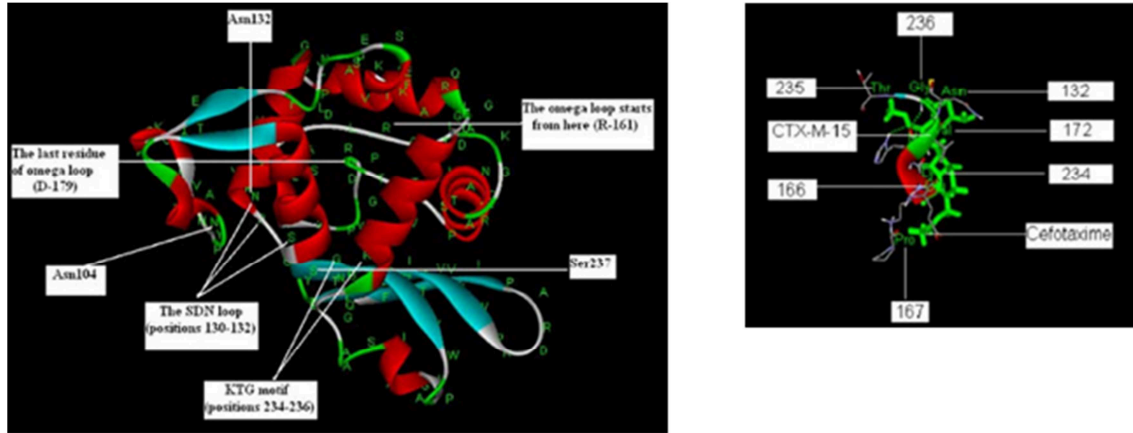


Figura 17. Secuencia aminoacídica de la enzima CTX-M-15 de la cepa de *E. coli* D253

1.3.5.1 Epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEEs.

Las enterobacterias productoras de BLEEs se han aislado tanto en muestras procedentes de pacientes hospitalizados, como en muestras de origen comunitario. Estos aislamientos pueden aparecer de forma esporádica, sin relación epidemiológica, o dar lugar a brotes nosocomiales.

La localización plasmídica de estas β -lactamasas, su fácil transferencia por conjugación y su localización entre secuencias de inserción y en integrones (85, 86) ha facilitado su diseminación entre diversas especies bacterianas por varias zonas del mundo. Así, podemos detectar brotes debidos a la diseminación de un plásmido (diferentes especies de enterobacterias con un plásmido común), o bien a la diseminación de una cepa resistente (epidemia clonal). Además, estos plásmidos pueden llevar asociada resistencia a otros grupos de antimicrobianos (aminoglucósidos, tetraciclinas, trimetoprim-sulfametoxazol...) por lo que nos encontramos con microorganismos multirresistentes. Todo ello determina que las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por bacterias que producen BLEEs sean muy limitadas.

Hasta finales de 1990s las BLEEs más frecuentemente encontradas eran derivadas de TEM y SHV principalmente en *K. pneumoniae* y en pacientes hospitalizados (87). En la actualidad las enzimas CTX-M han reemplazado a las TEM y SHV y está aumentando el porcentaje de aislamientos en *E. coli* y en pacientes comunitarios. En España la CTX-M predominante es el grupo CTX-M-9 (80).

La expansión de estas enzimas ha estado más focalizada en brotes e infecciones nosocomiales en el este de Europa, Sudamérica y Asia (76). Cabe destacar, sin embargo, la existencia de ciertas enzimas que se

han identificado inicialmente en zonas concretas de Europa occidental como la CTX-M-9 y CTX-M-14 (88-90) y la CTX-M-10 (91). Actualmente, las enzimas CTX-M-14, CTXM-3 y CTX-M-2 son las que tienen una mayor dispersión geográfica localizándose, incluso, en cepas aisladas de animales sanos, lo cual sugiere que éstos podrían comportarse como reservorio de cepas productoras de estas β -lactamasas (76).

El microorganismo en el que más frecuentemente se han descrito brotes nosocomiales de BLEEs es *K. pneumoniae*. Probablemente está relacionado con el hecho de que esta especie forma parte de la flora normal, sobrevive durante bastante tiempo sobre la piel y los fómites y acepta con cierta facilidad plásmidos conjugativos. Las primeras epidemias de infección hospitalaria por *K. pneumoniae* productora de BLEEs fueron descritas en Francia a finales de los ochenta (92). Desde entonces se han documentado por todo el mundo, incluida España, numerosos brotes nosocomiales causados por enterobacterias productoras de BLEEs.

Es un hecho reconocido la relación existente entre la observación de estos brotes epidémicos y un amplio consumo de antibióticos, especialmente de cefalosporinas de tercera generación. El consumo elevado de estos antibióticos favorecería la aparición de estos clones de *K. pneumoniae* productores de BLEEs, que se diseminarían con particular facilidad en centros o unidades con factores predisponentes para la transmisión cruzada entre pacientes sometidos a múltiples manipulaciones (93).

Los brotes, tanto nosocomiales como de aparente adquisición en la comunidad, se han extendido de forma muy notable a *E. coli*, y en menor medida a otras enterobacterias.

1.3.5.2 Colonización fecal por enterobacterias productoras de BLEES

El tubo digestivo actúa como reservorio de estos microorganismos multirresistentes; además es el nicho ecológico adecuado para que la resistencia se transmita a otras especies bacterianas. Diversos estudios han demostrado que las personas sanas actúan como portadores fecales.

En algunos casos de epidemia la colonización fecal de los pacientes ingresados en unidades de riesgo ha llegado a más del 40%. Algunos factores de riesgo asociados a la colonización fecal por *K. pneumoniae* productor de BLEEs son la gravedad del proceso clínico al ingreso, la cateterización arterial, la nutrición parenteral, el sondaje vesical, la ventilación mecánica o la terapia antibiótica previa. Todos estos factores están relacionados con el tiempo de estancia en UCI y la posibilidad de contacto horizontal a través del personal sanitario.

El incremento en la proporción de portadores en la comunidad aumenta el riesgo de que otras personas se conviertan en portadores como consecuencia de la transmisión de persona a persona o a través del medio ambiente de bacterias resistentes (94), enriqueciendo el gen de resistencia y facilitando la adquisición de mecanismos de resistencia por bacterias susceptibles (95, 96).

El aumento de la prevalencia de portadores fecales de cepas productoras de BLEE en situaciones de ausencia de un brote en pacientes hospitalizados y el establecimiento de estas cepas en la comunidad con coresistencia a los antibióticos no β -lactámicos, incluyendo quinolonas, representan una oportunidad para que estos aislados puedan convertirse en endémicos (96).

La colonización con aislados multirresistentes, incluyendo los aislamientos productores de BLEEs, es considerado un prerrequisito para la infección. Se ha destacado la importancia de la detección de portadores de estas bacterias multirresistentes no sólo para los pacientes sino también para la población sana (96, 97).

El estudio de los portadores fecales sería útil para el seguimiento de las tendencias de BLEE (98-100) ya que según señalan algunos estudios, las BLEEs caracterizadas producidas por aislados de portadores fecales fueron similares a las obtenidas en la práctica clínica en España en el momento de realizar dicho estudio.

Otros dos estudios españoles demostraron que la tasa de portadores fecales de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en los pacientes de la comunidad que tenían infecciones urinarias causadas por este patógeno fue de alrededor de 70%, que es mucho más alto que el de las personas con infecciones no asociadas con BLEE (100-102). Curiosamente, la colonización fecal en los contactos familiares de los pacientes con una infección por *E. coli* productoras de BLEE oscilaron entre el 16,7% a 27,4% en estos dos estudios. Esto llevó a la sugerencia de que la colonización fecal con bacterias productoras de BLEE es un factor de riesgo para la adquisición de infección del tracto urinario causadas por estos patógenos y una fuente potencial de transmisión entre los hogares (96, 100).

No hay muchos estudios realizados en la investigación de la colonización fecal por enterobacterias productoras de BLEEs pero todos los que se han realizado están demostrando que los portadores actúan como vehículo de bacterias cada vez más resistentes a los antibióticos de uso habitual y que su propagación va en aumento. Esto se demuestra en un estudio que se realizó en Madrid en 2003, donde se observó un aumento importante de portadores fecales de *Enterobacteriaceae* productoras de BLEEs respecto a un estudio anterior en 1991 (96).

2 OBJETIVOS

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos, y en particular la producción de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido (BLEE), ha sido uno de los principales problemas de resistencia a los antibióticos β -lactámicos durante las dos últimas décadas.

La codificación plasmídica de este tipo de resistencia otorga a estas enzimas algunas características importantes como la facilidad de transmisión por conjugación entre diversas especies bacterianas o la asociación de resistencia a otros grupos de antibióticos, por lo que nos encontramos con microorganismos multirresistentes.

El fracaso en la detección de los productores de BLEE repercute en un informe clínico que lleva a tratamientos inadecuados y una proliferación incontrolada de estas cepas.

Cada vez es más importante conocer la distribución y el tipo de β -lactamasas de espectro extendido presentes en nuestro medio, para así poder utilizar el mejor procedimiento diagnóstico.

Los cultivos de heces para detectar a los portadores fecales de bacterias productoras de BLEEs han demostrado ser un instrumento útil como herramienta para el control de brotes nosocomiales así como para el control epidemiológico de la población portadora de cepas de enterobacterias portadoras de BLEEs.

En la actualidad, no existen muchos datos sobre la prevalencia y la capacidad de difusión de estas resistencias en otros ambientes que no sea el hospitalario.

Por tanto, el objetivo de este proyecto serán el estudio de la prevalencia de β -lactamasas plasmídicas (BLEEs, AmpC y carbapenemasas) en pacientes portadores de enterobacterias productoras de dichas β -lactamasas en el tracto intestinal del sector III de Zaragoza (muestras de heces recibidas en el H. C. U. Lozano Blesa), la caracterización de los genes que codifican dichas enzimas y el estudio de su epidemiología.

En este marco, los objetivos de este proyecto son los siguientes:

- Detección de enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas (AmpC, BLEEs y carbapenemasas) presentes en muestras fecales de pacientes del sector III de Zaragoza.
- Estudio de la sensibilidad antibiótica de las cepas bacterianas que posean una β -lactamasa plasmídica procedentes de los portadores fecales.
- Determinación de los diversos fenotipos de resistencia en las cepas estudiadas.

2. Objetivos

- Caracterización de las β -lactamasas plasmídicas encontradas en los portadores fecales.
- Determinación de la prevalencia de enterobacterias portadoras de β -lactamasas plasmídicas en portadores fecales.
- Estudio de la epidemiología de las resistencias de las β -lactamasas plasmídicas objeto de la investigación.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

Se procesaron 3965 muestras de heces pertenecientes a 2685 pacientes (75,83 % de origen ambulatorio) entre el 1 de enero y el 30 de junio de 2010 en la sección de Coprocultivos del servicio de Microbiología del Hospital Clínico Lozano Blesa.

Los coprocultivos se siembran en cuatro medios de cultivo diferentes, uno de ellos es el medio selectivo CCDA (charcoal-cefazolin-deoxicholate agar) (Oxoid), que se usa habitualmente para la detección del *Campylobacter spp.* Dicho medio contiene 32 mg/L de cefoperazona (cefalosporina de 3ª generación). Las enterobacterias que crecieron en él fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas ya que presumiblemente tenían algún mecanismo de resistencia.

Se sembraron tres tubos para su identificación:

- Medio Kligler o KIA (Kligler Iron Agar). Se utiliza para realizar la prueba de la lactosa, glucosa, gas y SH₂. La fermentación de la lactosa y la glucosa se detectan mediante un cambio de color de naranja a amarillo (la primera se observa en la parte superior del tubo y la segunda en la parte inferior).
- Medio SIM. Se usa para determinar la producción de SH₂, de indol (se revela con el reactivo de Ehrlich) y la movilidad (se manifiesta como una turbidez en el tubo).
- Medio lisina. Este medio se basa en la capacidad de utilización de la bacteria del aminoácido Lisina, según posea las enzimas lisina Descarboxilasa (se observa en la parte superior del tubo) y lisina-desaminasa o deshidrogenasa (en la parte inferior). El viraje a color morado será positivo, y si es a amarillo, negativo.

3.1 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA

3.1.1 TEST DE SINERGIA DE DOBLE DISCO

Una vez que fueron identificadas las enterobacterias se les realizó un estudio de los fenotipos BLEES, pAmpC y carbapenemasas A y B mediante test de sinergia de doble disco o disco-placa.

Permite determinar el grado de sensibilidad de una cepa bacteriana a una serie de antimicrobianos y así orientar al posible tratamiento de los pacientes de los que proceda la muestra, evitando o minimizando

el riesgo de fracaso terapéutico. La detección de estas enzimas se basa en su capacidad de hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactámicos, disminuyendo por tanto la sensibilidad de la bacteria a estos antibacterianos.

Se prepara un inóculo de la cepa a estudio a 0.5 McFarland y se siembra de forma homogénea en una placa de agar Mueller-Hinton (Biomérieux). A continuación se colocan los discos de los antibióticos a estudio cargados con una concentración conocida con una distancia de centro a centro de 30 mm. El antibiótico difundirá en un gradiente radial alrededor del disco. La placa se incuba a 37°C durante 18 horas. El microorganismo crecerá en la placa y si es sensible al antibiótico se formará un halo de inhibición o sin crecimiento alrededor del disco. Esa distancia se mide en mm y nos da su concentración mínima inhibitoria (CMI). Si la bacteria a estudio es resistente, se pone de manifiesto en una disminución de los halos de inhibición.

Esta técnica, además, nos permite observar el efecto sinérgico producido entre las cefalosporinas de espectro ampliado o los monobactámicos y el ácido clavulánico. El principal inconveniente es que los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI.

Para la detección de BLEEs se utilizaron los siguientes discos:

- Cefotaxima: 30 µg
- Ceftazidima: 30 µg
- Aztreonam: : 30 µg
- Amoxicilina- ác. clavulánico: 20 µg/10µg

Se situará el disco de amoxicilina/ácido clavulánico en el centro y en torno a él, se colocarán el resto de los discos. Consideramos sinergia positiva cuando se observó una ampliación o distorsión del halo de inhibición de cefotaxima y/o ceftazidima en la zona de intersección con amoxicilina/ác. clavulánico.

Se confirma la presencia de una BLEE cuando la sensibilidad a cualquiera de los dos antibióticos en presencia de ácido clavulánico aumenta más de 5 mm el diámetro de inhibición en la CMI.

Para la detección de cefamicinasas, la técnica es la misma pero poniendo el disco amoxicilina/ác. clavulánico y alrededor los discos de cefotaxima, cefoxitina (con un halo de inhibición < ó igual a 14 mm) y cefepime:

- Cefoxitina: 30 µg
- Cefepime: 30 µg

Se pueden combinar ambas técnicas para poder detectar en la misma placa una BLEE y/o una cefamicinasa poniendo los discos de cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina, cefepime y amoxicilina/ác. clavulánico.

La sensibilidad a la amoxicilina/ácido clavulánico descarta, en principio, la β -lactamasa de tipo AmpC, y apunta, más bien, a una BLEE como causa de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Si bien la resistencia a esta combinación también puede deberse a una elevada producción de BLEE, o a la existencia de BLEE resistentes a inhibidores, además de otros múltiples mecanismos de resistencia que pueden coexistir o no con la BLEE, como IRTs, enzimas OXA, hiperproducción de SHV-1, TEM-1, K1, etc.

Además, hay que considerar la investigación de BLEE ante una CIM ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para cefepime (103).

Tabla 4. Puntos de corte propuestos por el CLSI (104) (Clinical and Laboratory Standards Institute) y EUCAST (105) (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) para los antibióticos que permiten la caracterización de las cepas portadoras de BLEE

Antimicrobiano	EUCAST (2011)*		CLSI (2011)*		CLSI (2012)*	
	R (mm)	R ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	R (mm)	R ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	R (mm)	R ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Cefotaxima	<17	>2	<27	≥ 2	<27	≥ 2
Ceftazidima	<19	>4	<22	≥ 2	<22	≥ 2
Aztreonam	<24	>4	<27	≥ 2	<27	≥ 2
Cefepime	<21	>4	<14	>32	<14	≥ 32

* Los valores son respecto a discos de 10 μg mientras que los que recomienda CLSI son de 30 μg .

Para la detección de carbapenemasas seguimos utilizando el mismo procedimiento que para la detección de BLEES pero utilizamos los discos de aztreonam, ceftazidima, imipenem y amoxicilina/clavulánico

3.1.2 PRUEBA DE EPSILON-TEST (ϵ -TEST®)

Posteriormente, las BLEEs fueron confirmadas mediante ϵ -test. Se basa en el mismo fundamento de la difusión con disco, pero en este caso se utilizan tiras de plástico no poroso de 5 cm de largo y 5 mm de ancho en lugar de discos. La tira contiene un gradiente de concentraciones de un antibiótico (una de las superficies de la tira tiene marcadas las distintas concentraciones del gradiente). Tras aplicar la tira a una placa previamente inoculada e incubar ésta adecuadamente, la intersección de la elipse de crecimiento del microorganismo con la tira permite una determinación directa de la CMI.

Para detectar BLEE se utilizan un conjunto de tiras de E-test® (CT/CTL, TZ/TZL, PM/ PML) que contienen una concentración creciente de la cefalosporina correspondiente (cefotaxima, ceftazidima y cefepime, respectivamente), por un lado, y una concentración creciente de la misma cefalosporina asociada a una concentración constante de ácido clavulánico (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), por el otro.

En el caso de que se sospeche una doble presencia de BLEE junto con una AmpC plasmídica se recomienda la utilización de las mismas tiras que para la detección de BLEEs y además una tira de cefotetán/cloxacilina (CN/CNI).

El €-test para carbapenemasa se realiza con una tira de imipenem/EDTA (IP/IPI).

Cuando se produce una reducción de más de 3 diluciones en la CMI de cualquiera de los antibióticos se confirma la presencia de la enzima a estudio (BLEE, cefamicinasa o carbapenemasa).

Si se observan colonias en los halos de inhibición, el valor de la CMI deberá determinarse observando cuál es la CMI a la que todas las mutantes han sido inhibidas.

3.2 DETECCIÓN MOLECULAR DE LAS β -LACTAMASAS PLASMÍDICAS

A las cepas bacterianas que se les confirmó el fenotipo de resistencia, se les realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar los genes que codifican las enzimas que proporcionan dicha resistencia.

3.2.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico) de forma in vitro.

El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores o primers para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde.

El proceso se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación.

Desnaturalización. En primer lugar es necesario que el DNA se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de DNA se separen. Se lleva a cabo elevando la temperatura.

Hibridación. El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde.

Elongación o extensión. En esta fase, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores en dirección 5'→3'. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72°C.

Estas tres fases constituyen un ciclo, y durante la PCR, se repetirán los ciclos entre 25 y 35 veces.

Debido a que los productos de un ciclo completo sirven como moldes para el segundo, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad de producto de DNA, obteniendo al final del proceso un número de moléculas de ADN de 2^x , siendo X el número de ciclos realizados.

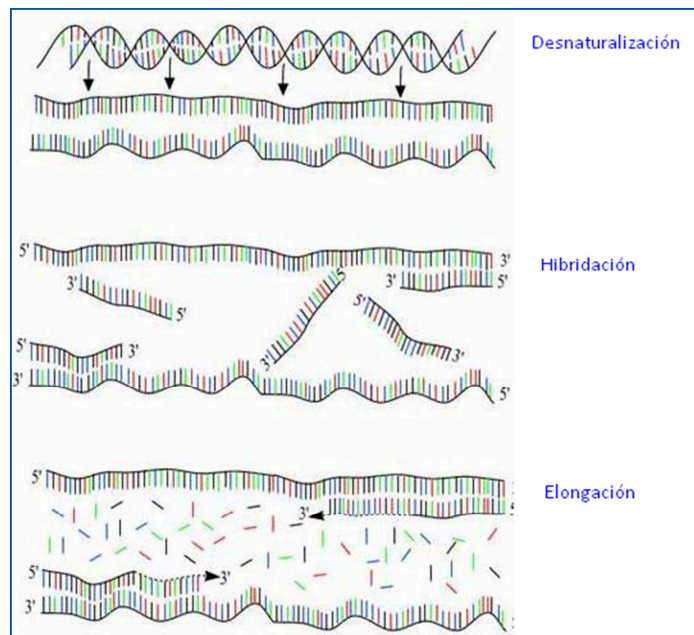


Figura 18. Fases de la PCR

Componentes necesarios para llevar a cabo la PCR:

- El DNA a partir del cual queremos amplificar. Este DNA se conoce como DNA molde. la muestra no debe llevar agentes quelantes (EDTA) que reducen la concentración de iones de Mg. en la disolución u otros compuestos que puedan inhibir la reacción y debe haber una cantidad mínima para poder amplificar la muestra.
- Iniciadores de la reacción, cebadores o primers. Son moléculas cortas (entre 10 y 30 bases) de DNA de cadena sencilla que van a delimitar el fragmento a amplificar. Deben ser complementarios a la región que se quiere amplificar. Cada cebador hibrida con una cadena diferente y con los extremos 3' orientados de tal manera que cuando la polimerasa actúe en dirección 5'-3' copie la región situada entre ellos.

- DNA polimerasa. Es una enzima que cataliza la síntesis de DNA a partir de desoxirribonucleótidos generando una copia de DNA a partir de DNA molde. En los procesos de PCR se requiere la utilización de polimerasas termoestables, como la Taq DNA polimerasa, debido a que es necesario aplicar altas temperaturas para desnaturalizar la molécula de DNA.
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs): Son necesarios en la etapa de elongación de la cadena. Se van a incorporar al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde por la acción de la DNA polimerasa creando una cadena complementaria.
- Cloruro de magnesio (MgCl₂). Se añade como cofactor de la polimerasa.
- Tampón de la reacción: Proporciona el pH y la fuerza iónica necesaria para que la reacción tenga lugar.

Este proceso se lleva a cabo en un equipo llamado termociclador. Este aparato realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta.

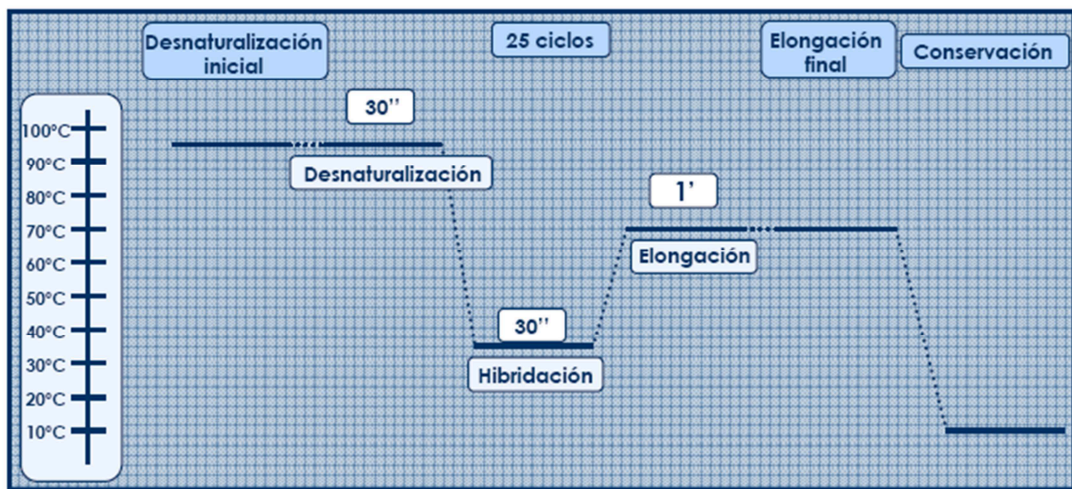


Figura 19. Perfil térmico típico de una PCR. Los tiempos de cada fase son orientativos. La T^ª de hibridación puede variar en función de la especificidad de la reacción

La duración y temperatura de los ciclos debe permitir la desnaturalización completa, una hibridación estable de los cebadores, que depende de su composición en GC (guanina y citosina), y debe ser suficiente para una amplificación completa del fragmento de DNA que se pretende amplificar.

La técnica de PCR se lleva a cabo siguiendo los siguientes pasos:

1. Extracción del DNA.

Una colonia de cultivo fresco de Mueller-Hinton se resuspende en un eppendorf de 0.2 con 200 μ l de agua bidestilada estéril. Estos eppendorf se introducen en un Termoblock a una Tª de 90-95°C durante 20 minutos para lisar las células.

Transcurridos los 20 minutos, se centrifuga durante 5 minutos y nos quedamos con el sobrenadante que es el que contiene el DNA.

2. Preparación de los primers.

La solución de los cebadores siempre es de 100 μ M. Para la PCR se suelen utilizar a una concentración de 10 μ M. Así, en un eppendorff añadiremos 90 μ l de agua bidestilada y 10 μ l de la solución madre para obtener la concentración deseada (dilución 1/10).

Tabla 5. Primers utilizados en las distintas PCR realizadas

Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	Referencia
CTX-M-3G F	GTTACAATGTGTGAGAAGCAG	1017	Pagani et al, 2003 (106)
CTX-M-3G R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC	1017	Pagani et al, 2003 (106)
CTX-M-9 F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	856	Weill et al, 2004 (107)
CTX-M-9 R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	856	Weill et al, 2004 (107)
CTX-M-10 F	CCGCGCTACACTTTGTGGC	962	Coque et al, 2002 (108)
CTX-M-10 R	TTACAAACCGTTGGTGACG	962	Coque et al, 2002 (108)
CTX-M uni F	CGATGTGCAGTACCAGTAA	540	Weill et al, 2004 (107)
CTX-M uni R	TTAGTGACCAGAATCAGCGG	540	Weill et al, 2004 (107)
TEM F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1080	Weill et al, 2004 (107)
TEM R	GACAGTTACCAATGCTTAATC	1080	Weill et al, 2004 (107)
SHV F	GGGTTATTCTTATTTGTGCGC	930	Díaz et al, 2010 (109)
SHV R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC	930	Díaz et al, 2010 (109)
MOX F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	Pérez-Pérez, 2002 (110)
MOX R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520	Pérez-Pérez, 2002 (110)
CIT F	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	Pérez-Pérez, 2002 (110)
CIT R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462	Pérez-Pérez, 2002 (110)
DHA F	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405	Pérez-Pérez, 2002 (110)
DHA R	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	405	Pérez-Pérez, 2002 (110)
ACC F	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	Pérez-Pérez, 2002 (110)
ACC R	TTCGCCGAATCATCCCTAGC	346	Pérez-Pérez, 2002 (110)
EBC F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302	Pérez-Pérez, 2002 (110)
EBC R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302	Pérez-Pérez, 2002 (110)
FOX F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	Pérez-Pérez, 2002 (110)
FOX R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190	Pérez-Pérez, 2002 (110)

La identificación de BLEEs se realizó mediante PCR con primers para CTX-M universal, grupo CTX-M-1, grupo CTX-M-9, grupo CTX-M-10, SHV y TEM. Cada una de estas PCR tienen unas condiciones diferentes de tiempos y T^a.

La identificación de pAmpC se realizó mediante PCR multiplex con las seis familias de primers. Los primers tipo MOX amplifican para los genes MOX-1, MOX-2, CMY-1 y CMY-8 a CMY-11; los tipo CIT, para LAT-1 hasta LAT-4, CMY-2 a CMY-7 y BIL-1; DHA, DHA-1 y DHA-2; ACC para los genes ACC; EBC para MIR-1T y ACT-1; y FOX, para FOX-1 hasta FOX-5b.

3. Preparación de la Master Mix.

Hay que calcular la cantidad de producto necesario para la PCR por muestra y luego multiplicar por el n^o total de muestra a estudio, añadiendo siempre la cantidad de reactivos necesaria para dos muestras más, una para el control positivo y otra para el control negativo. Según la PCR que estemos realizando, los cálculos son diferentes aunque el volumen final del eppendorf con el DNA incluido debe ser de 50 µl.

El buffer siempre tiene que ser el 10% del total (5 µl). La cantidad de MgCl₂, que tiene una concentración de 25 mM, dependerá de la especificidad que necesite la reacción y la Taq polimerasa (a menor cantidad, mayor especificidad). Los dNTPs se usan a 10mM y la Taq a 5U/µl. La cantidad de DNA varía según el tipo de PCR que estemos realizando (lo normal, es añadir 2 ó 2.5 µl).

Para las PCR multiplex de AmpC los primers se preparan en una solución A de cebadores que cuenta con los primers: MOXMR, MOXMF, CITMR, CITMF, DHAMR, DHAMF, solución B que cuenta con los primers: ACCMR, ACCMF, EBCMR, EBCMF, y la solución C que contiene los primers: FOXMR, FOMF.

Según los cálculos que se utilicen, incluyendo el DNA, se añade agua bidestilada hasta completar el volumen de 50 µl. Todos los reactivos que se utilizan menos el agua destilada se conservan a -20°C, por lo que se deben sacar del congelador un rato antes de preparar la Master Mix. La Taq polimerasa debe conservarse a -20°C hasta el momento en que se añada, y una vez utilizado, rápidamente debe volver al congelador.

Por lo tanto, se irá distribuyendo en los distintos eppendorf que hayamos preparado identificados para cada muestra (tantos como muestras a analizar más un control positivo) la cantidad de Master Mix que corresponda por muestra más el DNA de la muestra.

4. Electroforesis en geles de agarosa

Es una técnica utilizada para separar, identificar y aislar fragmentos de DNA a partir de una mezcla heterogénea. Se basa en la migración unidireccional del DNA a través de una matriz porosa cuando se le aplica un campo eléctrico. A pH neutro, el DNA tiene carga negativa, lo que comporta su migración desde el cátodo (polo negativo) al ánodo (polo positivo). La movilidad electroforética de los diferentes fragmentos depende, sobre todo de su tamaño y conformación, y está poco afectada por la composición de bases o por la secuencia.

Los factores que influyen en la migración a través del gel son:

- Longitud del DNA. Las moléculas de DNA lineal migran a través de un gel a una velocidad que es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. De esta manera, utilizando marcadores de peso molecular conocido podemos determinar la longitud de un fragmento de DNA desconocido o comprobar que un fragmento tiene una longitud determinada.
- Conformación estructural del DNA. Una misma secuencia de DNA plasmídico puede presentarse en tres formas diferentes (DNA circular cerrado, DNA circular relajado, DNA lineal), pudiéndose desplazar cada una de ellas a diferente velocidad en un gel. Las movilidades relativas dependen esencialmente de la porosidad del gel, de la corriente aplicada, de la fuerza iónica del tampón utilizado para correr el gel y de la densidad de giros superhelicoidales de la molécula circular cerrada.
- Porosidad del gel. Existe una relación directa entre el logaritmo de la movilidad electroforética de un fragmento de DNA y la porosidad del gel que viene determinada por la concentración de agarosa.
- Corriente eléctrica aplicada: La velocidad de migración de los fragmentos de DNA lineal es proporcional al voltaje aplicado.

La visualización de los fragmentos de DNA se consigue mediante la incorporación al gel de un colorante fluorescente, el bromuro de etidio, que se intercala entre las dos cadenas de DNA. Este reactivo revela la presencia de una banda de DNA al ser iluminada con luz ultravioleta de longitud de onda corta (310 nm).

5. Preparación de un gel de agarosa

La concentración de agarosa que se utiliza está condicionada por el tamaño de los fragmentos de DNA a separar. Para visualizar los fragmentos de DNA amplificados por PCR la concentración de agarosa que utilizamos fue al 1% debido al tamaño de banda de los primers.

Los geles de agarosa se prepararon según se describe a continuación:

- a. Primero se prepara el TBE (Tris 0,44M, ácido bórico 0,44 M, EDTA 12,5 mM pH 8) que se va a utilizar. Para ello, se mezclan 100 ml de TBE buffer con 900 ml de agua bidestilada.
- b. Después, se mezcla la cantidad correspondiente de agarosa con el TBE preparado y se lleva a ebullición para su total disolución.
- c. Se deja enfriar hasta unos 55°C y se añade una solución acuosa de bromuro de etidio (0,5 µg/ml).
- d. Se vierte la solución en una cubeta de electroforesis previamente sellada y con el correspondiente peine y se deja solidificar.
- e. Se retira el peine sin dañar los pocillos. Y se coloca el gel en la cubeta de electroforesis llena de tampón TBE asegurando que cubra el gel.
- f. La muestra con el DNA obtenido tras la amplificación se mezcla con una solución de carga (1% SDS, 50% glicerol, 0,05% azul de bromofenol). El primer pocillo se cargan 4 µl del marcador de peso molecular, HyperLadder I (Bioline), que separa 200 pb y a continuación se van cargando los pocillos con las muestras seguidas del control positivo.

Las condiciones de electroforesis son a 95 V durante aproximadamente 1 hora con el fin de que las bandas queden bien separadas. El gel se visualiza en un transiluminador con luz ultravioleta (310nm).

También se ha utilizado el Gel Doc EZ Imager con el software Image Lab (Bio- Rad) que permite visualizar las bandas en un ordenador.

6. Secuenciación.

La secuenciación se realizó en un secuenciador XL3500 previa purificación del DNA amplificado obtenido en la PCR. Se utilizaron los primers de cada PCR a una concentración de 10 μ M.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa ChromasPro® y la página web BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) (111).

4 RESULTADOS

4.1 SELECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

De las 3965 muestras de heces que fueron procesadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa entre el 1 de Enero y el 30 de Junio de 2010 pertenecientes a 2685 pacientes (75,8 % de origen ambulatorio), se aislaron 178 enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación (cefoperazona 32 mg/L) con un fenotipo compatible con la presencia de una β -lactamasa que hidrolizaba la cefalosporina de tercera generación presente en el medio de cultivo utilizado para el screening, CCDA. Descartados 8 aislamientos compatibles con la presencia de una β -lactamasa cromosómica inducible AmpC, seleccionamos para este estudio un total de 170 aislamientos.

4.2 DETECCIÓN DE LOS FENOTIPOS DE RESISTENCIA

Las 170 enterobacterias fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas habituales (Kligler, SIM, Lisina) dando como resultado 159 *E. coli*, 9 *K. pneumoniae* y 2 *K. oxytoca*.

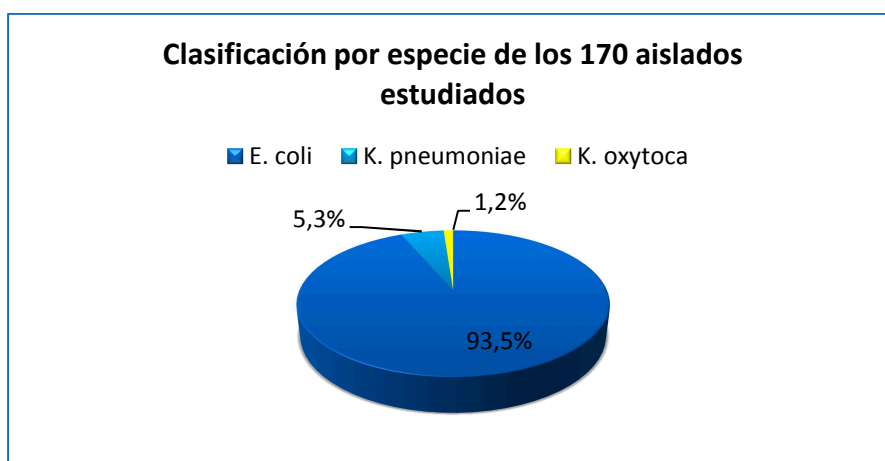


Figura 20

A los 170 aislamientos seleccionados por su resistencia a cefoperazona se les realizó los test de sinergia descritos y la sensibilidad a distintos antibióticos con/sin inhibidores de β -lactamasas mediante E-test

para clasificarlos según su fenotipo en aislamientos posibles productoras de BLEE, cefamicinasas y/o carbapenemasas.

De los 170 aislamientos, fenotípicamente 20 fueron posibles productores de AmpC plasmídica (11,8%) y 150 fueron posibles productores de BLEE (al menos uno de los test realizados para BLEE positivos) (88,2%). La mayoría de los aislamientos con una posible β -lactamasa plasmídica fueron *E. coli* (en el caso de BLEEs, 141 de 150, y en las AmpC, 18 de 20).

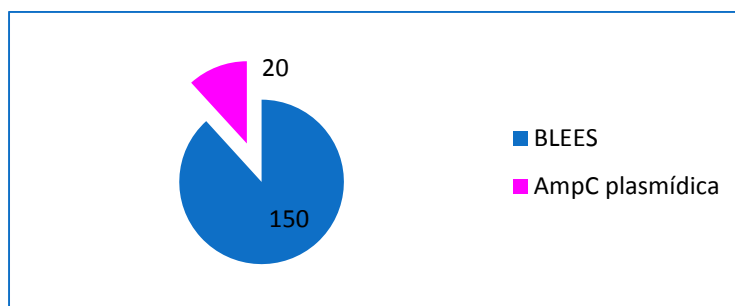


Figura 21. Aislamientos con posibles fenotipos de β -lactamasas plasmídicas

Los aislamientos con fenotipo compatible con producir una BLEE fueron clasificados por su resistencia a cefotaxima y ceftazidima en dos categorías diferentes, aquellos cefotaxima resistente y ceftazidima sensible (CTX R CAZ S) (fenotipo RS), y los que eran cefotaxima y ceftazidima resistentes (CTX R CAZ R) (fenotipo RR), clasificación que nos sirvió para establecer el algoritmo de trabajo con una búsqueda orientada de los genes de resistencia responsables del fenotipo observado.

Los aislamientos con fenotipo compatible con producir una cefamicinasa plasmídica fueron todos clasificados como fenotipo AmpC para su posterior estudio molecular.

Tabla 6. Bacterias seleccionadas por su compatibilidad de fenotipo como productoras de BLEE

Bacterias según su especie	Fenotipo RR	Fenotipo RS	Total
<i>E. coli</i>	66	75	141
<i>K. pneumoniae</i>	6	1	7
<i>K. oxytoca</i>	-	2	2
Total	73	78	150

A continuación se describen mediante dos algoritmos el número de aislamientos seleccionados por posibles productores de BLEE y posibles productores de AmpC plasmídica y el modo de proceder a continuación dependiendo del fenotipo encontrado y de la sensibilidad a cefotaxima, ceftazidima, cefepime y ceftoxitina.

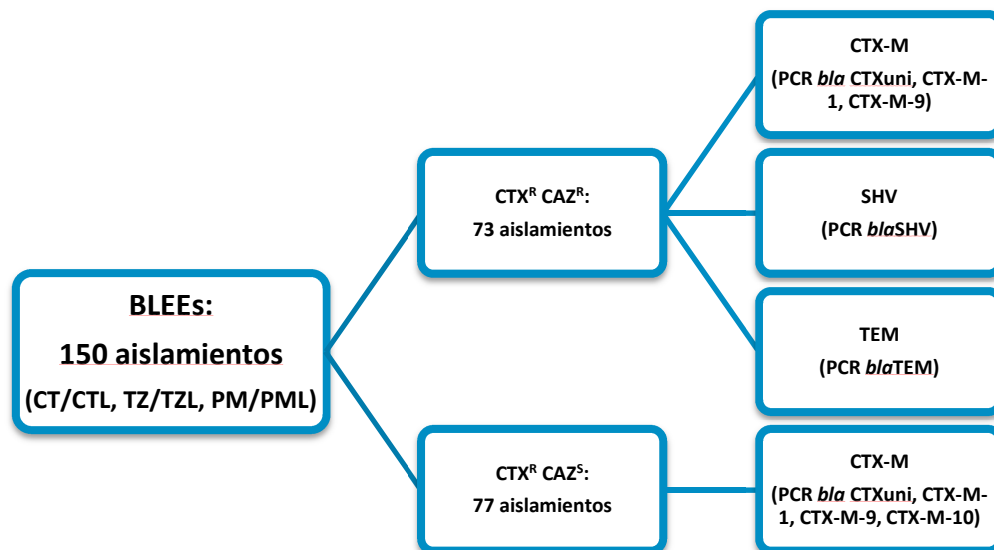


Figura 22. Número de aislamientos a los que se les realizó el algoritmo de trabajo de posible BLEE según el fenotipo de resistencia obtenido

En aquellos aislamientos que independientemente de su fenotipo de resistencia (RR o RS) presentaban sensibilidad disminuida o resistencia a cefoxitina y sensibilidad disminuida o resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico se les investigó la presencia de AmpC plasmídicas (20 aislamientos) y sólo aquellas que dieron un resultado negativo fueron seleccionadas para investigar la presencia de BLEE (4 aislamientos).

A continuación se muestra el algoritmo que se siguió en aquellos aislamientos que independientemente de su resistencia a cefotaxima y ceftazidima fueron resistentes a cefoxitina.

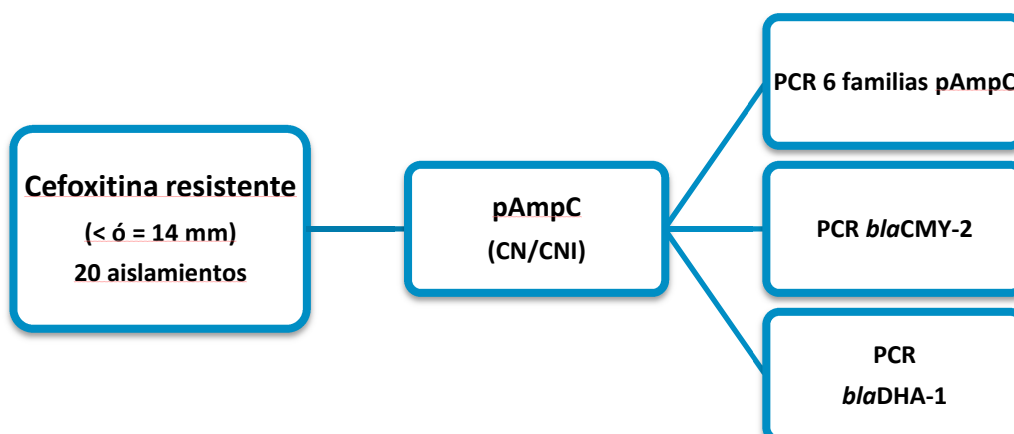


Figura 23. Número de aislamientos a los que se les realizó el algoritmo de trabajo con un fenotipo de posible AmpC

En cuanto a la presencia de carbapenemasas, se les realizó un test de screening a todos los aislamientos con ertapenem. siendo éste para todos los aislamientos sensible por lo que no se encontró ningún portador fecal de enterobacteria con carbapenemasa.

4.3 PRESENCIA DE BLEEs

Se investigó la presencia de BLEEs a 150 aislamientos a los que hay que añadir aquellos que tenían la cefoxitina resistente y fueron incluidos en el grupo de estudio de presencia de AmpC plasmídica pero resultaron ser negativas (4 aislamientos).

4.3.1 CONFIRMACIÓN DE BLEEs MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES

Tras la realización de las distintas PCR de las β -lactamasas tipo CTX-M (universal, 1, 9 y 10), SHV y TEM se obtuvo un resultado positivo de portadores fecales (positiva al menos una BLEE) en 151 de los casos (3,8% del total de coprocultivos analizados que significa el 5,6% de los pacientes estudiados) siendo el grupo mayoritario de BLEEs el grupo CTX-M-9 (52,3 %), seguido del grupo CTX-M-1 (35,1 %).

Tabla 7. Resultados obtenidos diferenciando según fenotipos para las distintas PCR de grupos de BLEEs realizadas

Grupo BLEEs	Fenotipo RR	Fenotipo RS	Total
CTX-M-9	13	66	79
CTX-M-1	44	9	53
CTX-M-10	-	1	1
CTX-M-UNI	12	2	14
TEM	31	NR	31
SHV	13	NR	13

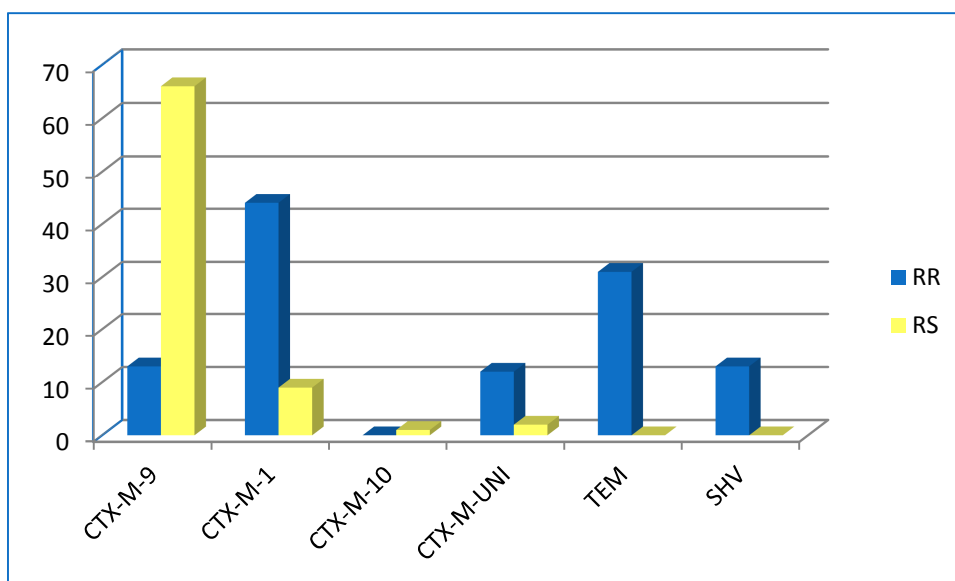


Figura 24. Gráfica comparativa diferenciando según fenotipos RR o RS para las distintas PCR de grupos de BLEEs realizadas

37 aislamientos (24,5%) resultaron ser positivos a la presencia de dos enzimas; 27 al grupo CTX-M (14 del grupo CTX-M-1; 3 del grupo CTX-M-9; y 5 de CTX-M-universal) más TEM (17,9%); y los 10 restantes a CTX-M (4 del grupo CTX-M-9; y 2 del grupo CTX-M-1) más SHV (6,6%). Además, 4 aislamientos presentaron una CTX-M (3 del grupo CTX-M-1, y 1 de CTX-M-universal), una SHV y una TEM (2,65% del total de BLEEs).

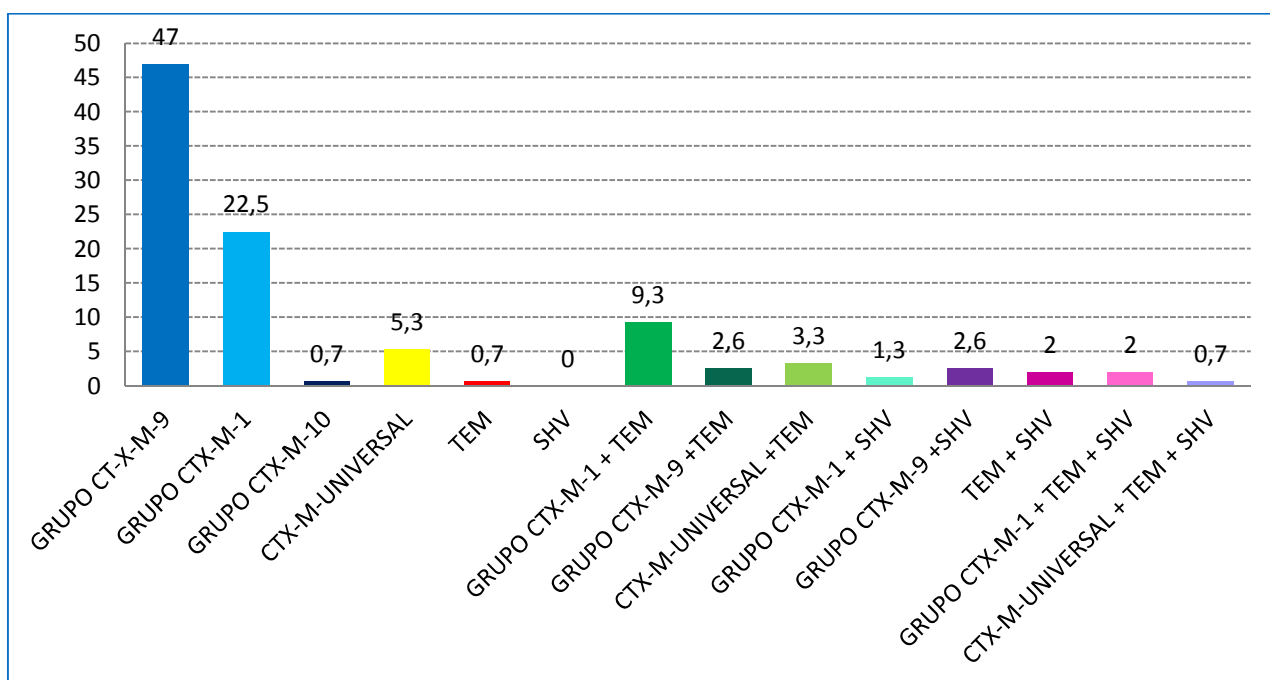


Figura 25. Porcentaje de aislamientos positivos según el tipo de BLEE encontrada

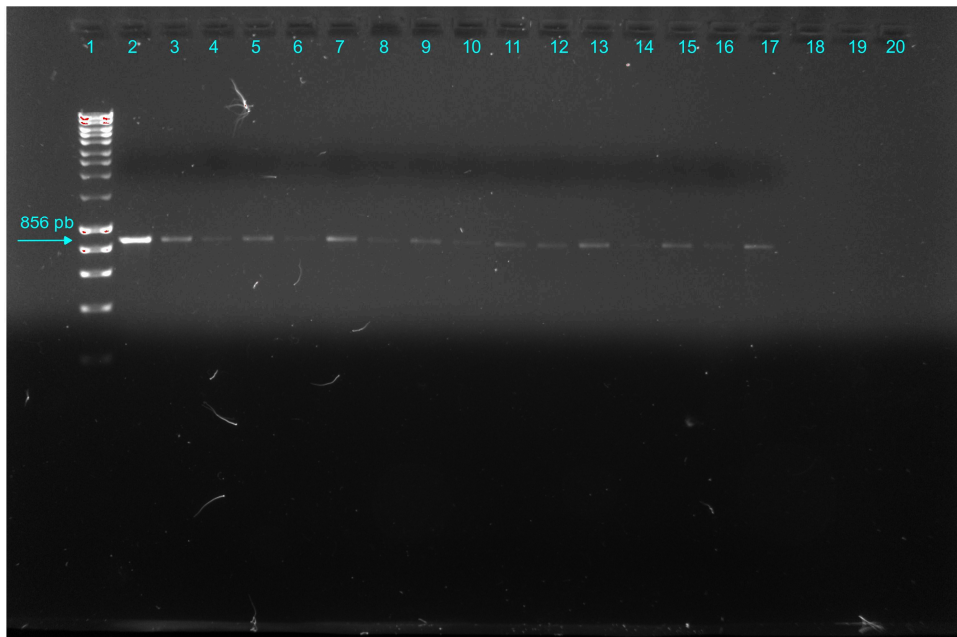


Figura 26. PCR CTX-M-9. La banda se encuentra en el gel a 856 pb.

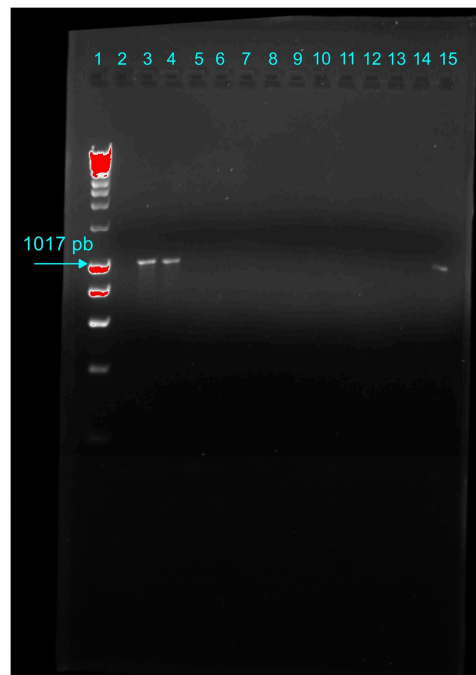


Figura 27. PCR CTX-M-1. La banda se encuentra en el gel a 1017 pb.

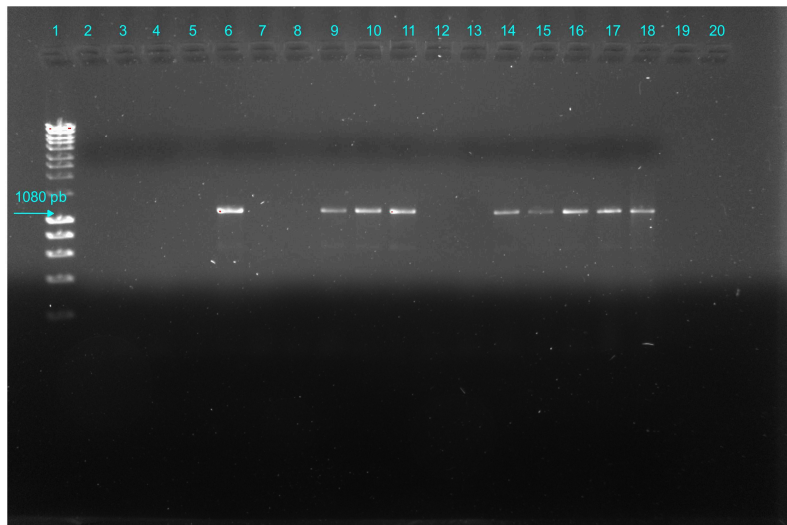


Figura 28. PCR TEM. La banda se sitúa en el gel a 1080 pb.

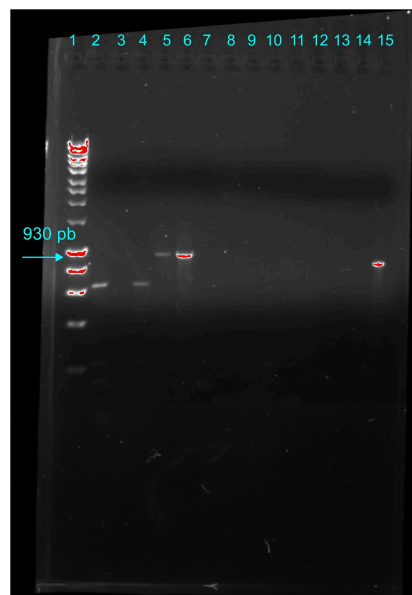


Figura 29. PCR SHV. La banda se sitúa en el gel a 930 pb.

En ausencia de ninguna BLEE del grupo CTX-M, se obtuvieron 3 aislamientos positivos a TEM y SHV (2%) de las que dos correspondieron a *K. pneumoniae* y uno a *E. coli*; y 1 aislamiento que se corresponde con un *E. coli*, que fue sólo positivo para la PCR de la β -lactamasa TEM (0.7%).

4.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS BLEES

Tras realizar la caracterización de las BLEEs mediante secuenciación del amplicón obtenido mediante PCR se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 8. Resultados obtenidos por grupos CTX-M ya caracterizados

GRUPO CTX-M-1				GRUPO CTX-M-9			
CTX-M-1	CTX-M-3	CTX-M-15	CTX-M-32	CTX-M-9	CTX-M-14	CTX-M-24	CTX-M-27
13	1	31	8	5	72	1	1

La prevalencia de CTX-M respecto del total de portadores fecales estudiados en el Servicio de Microbiología fue del 5,5%.

La CTX-M-14 perteneciente al grupo CTX-M-9 resultó ser la BLEE mayoritaria del total de β -lactamasas plasmídicas encontradas representando el 47,7% del total de aislamientos de BLEES. La segunda BLEE más frecuente fue CTX-M-15, perteneciente al grupo CTX-M-1 representando el 20% de todas las BLEES.

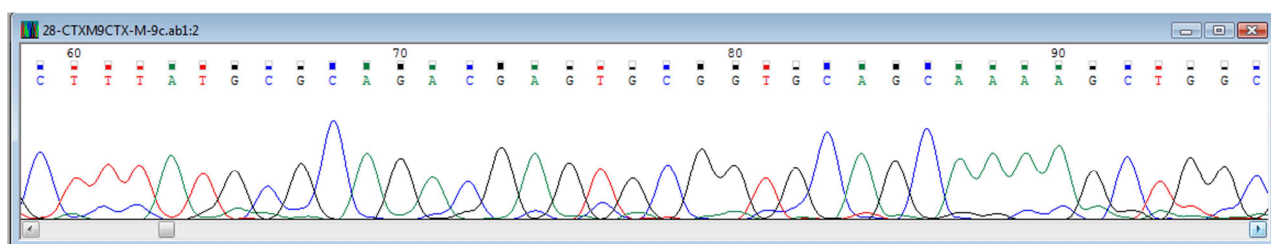


Figura 30. Cromatograma del aislamiento n° 28 que tras el análisis de la secuencia resultó ser una enzima CTX-M-

14

En el grupo CTX-M-9, la β -lactamasa mayoritaria fue la CTX-M-14 (91% de las BLEEs de este grupo), resultando ser un 47,7% del total de BLEEs, seguida por la CTX-M-9 (6,3% de las BLEEs de este grupo) siendo un 3,3% del total de las BLEEs encontradas. También encontramos una BLEE CTX-M-24 y una BLEE CTX-M-27.

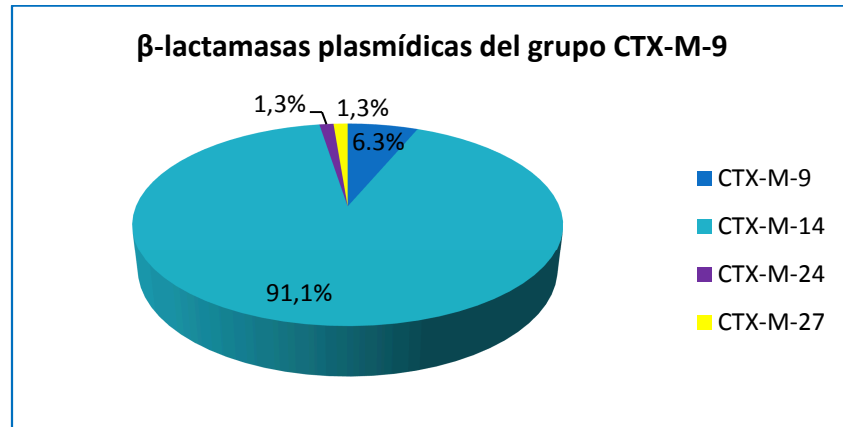


Figura 31

Respecto a las enzimas grupo CTX-M-1, la predominante fue CTX-M-15 (58% de las BLEEs de este grupo) siendo el 20,5% del total de BLEEs), seguida de CTX-M-1 (24,15% de las BLEEs de este grupo) siendo el 8,6% del total de las BLEEs encontradas, de CTX-M-25 (15,1% de las BLEEs de este grupo). Una BLEE fue caracterizada como CTX-M-3.

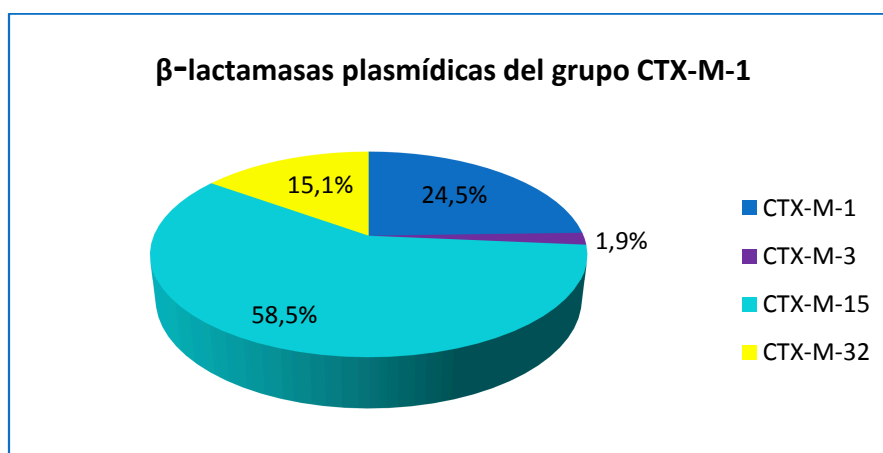


Figura 32

Query	24	MVKKSLRQFTLMATATVTLILGSPFLYAQTADVQKLAELERQSGGRLGVALINTADNSQ	83
Sbjct	1	MVKKSLRQFTLMATATVTLILGSPFLYAQTADVQKLAELERQSGGRLGVALINTADNSQ	60
Query	84	IILYRADERFAMCSTSKVMAA AVLKKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNNYPPIAEKHVNGTM	143
Sbjct	61	IILYRADERFAMCSTSKVMAA AVLKKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNNYPPIAEKHVNGTM	120
Query	144	SLAELSAALQYSDNVAMNKLIH VGGPASPVTAFARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDP	203
Sbjct	121	SLAELSAALQYSDNVAMNKLIH VGGPASPVTAFARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDP	180
Query	204	RDTTSPRAMAQTLRNLTLGKALGDSQRAQLVTWMMKGNITGAASI QAGLPASWVVGDKTGS	263
Sbjct	181	RDTTSPRAMAQTLRNLTLGKALGDSQRAQLVTWMMKGNITGAASI QAGLPASWVVGDKTGS	240
Query	264	G YGTINDIAVIWPKDRAPLILVTYFTQPQPKAESRRDVLASAAKIVIDGL	314
Sbjct	241	G YGTINDIAVIWPKDRAPLILVTYFTQPQPKAESRRDVLASAAKIVINGL	291

Figura 33. Comparación de la secuencia que codifica a la enzima CTX-M-1 (inferior) con el aislamiento nº 54 (superior). Resultó ser una enzima CTX-M-15 por las mutaciones que se observan remarcadas (los aminoácidos 80, 117, 143, 242 y 289)

Se han obtenido 14 aislamientos con un fenotipo compatible a BLEE que sólo han resultado ser positivos a la CTX-M-universal (9,3%), por lo que no han podido ser caracterizadas, y están a la espera de que se les realice la PCR de otros grupos CTX-M minoritarios, como son el grupo CTX-M-2 y el grupo CTX-M-8. De estos 14 aislamientos, se detectó en 6 de ellas la presencia concomitante de otras β -lactamasas (en 5 de ellas, TEM; y en 1, TEM y SHV).

4.3.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS PORTADORES FECALES DE BLEES

Respecto al sexo de los pacientes portadores fecales, 51,6% fueron hombres y 48,4% mujeres, con lo que no se observaron diferencias apreciables.

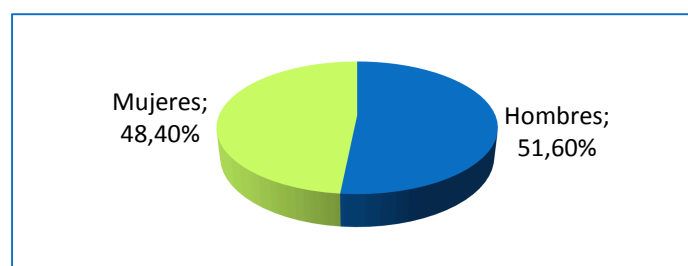


Figura 34. Gráfico que representa los portadores fecales en función del sexo

En cuanto a la distribución de las BLEEs obtenidas respecto a las edades de los pacientes, el grupo mayoritario fue en el grupo de edad entre 0-14 años (37,8%), seguido de los pacientes del grupo de edad de mayores de 65 años, con un 23,8%, del grupo de edad de 26-50 años, con un 22,5%, y de los portadores del grupo de edad entre 51 y 65 años, con un 10,6%; y por último, el grupo de edad donde se aisló un menor número de portadores fecales fue en el rango de edad de 15 a 25 años, con un 5,3%.

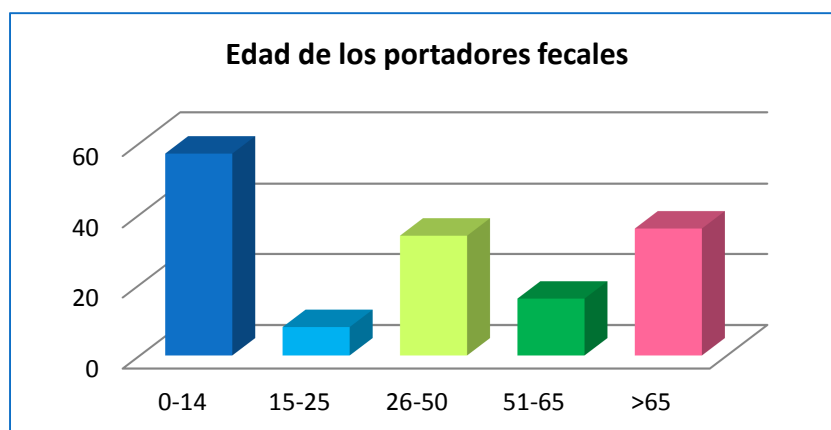


Figura 35. Gráfico que distribuye a los portadores fecales de BLEEs según la edad

Según su procedencia, en 50 de los casos los pacientes eran de origen hospitalario (33,1%), y en 101 de origen ambulatorio (66,9%).

En los pacientes de origen hospitalario no se presentó una gran diferencia entre los aislamientos con una β -lactamasa de los grupos CTX-M-1 y CTX-M-9 mientras que en los pacientes ambulatorios la diferencia fue más acusada, con un predominio del grupo CTX-M-9.

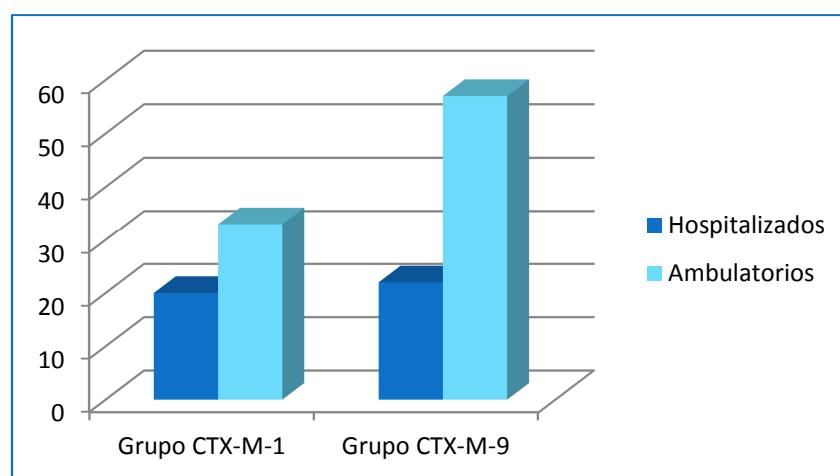


Figura 36. Gráfica que relaciona el origen del paciente y los grupos CTX-M-1 y CTX-M-9

Respecto al total de pacientes que resultaron ser portadores de BLEE (151 pacientes), en pacientes ambulatorios se aisló como enzima mayoritaria la CTX-M-14 con una prevalencia del 35% (en 53 pacientes) al igual que en los pacientes de origen hospitalario donde con una prevalencia del 12,6% fue también la enzima más frecuente.

Respecto al resto de grupos de BLEEs, la diferencia de prevalencia observada entre pacientes de origen hospitalario y ambulatorio fue más notable en las β -lactamasas CTX-M-1 con un 2% y un 6,6%, respectivamente.

Entre los tres tipos de CTX-M más predominantes (CTX-M-1, CTX-M-14 y CTX-M-15), el que presentó menores diferencias según el origen del paciente fue la enzima CTX-M-15 (un 9,3% de origen hospitalario y un 11,2% de origen ambulatorio).

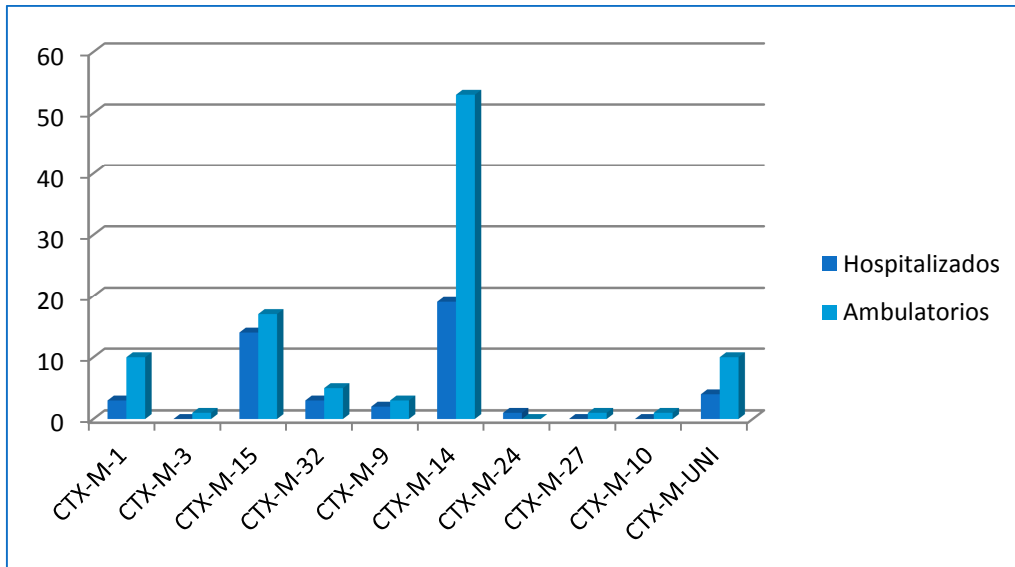


Figura 37. Gráfica que relaciona el origen del paciente y los tipos de CTX-M aislados

Dentro los aislamientos de origen hospitalario, fue en el Servicio de Digestivo donde se aislaron más BLEEs, con un 26%, seguido de Urgencias y Medicina Interna, ambos con un 16%.

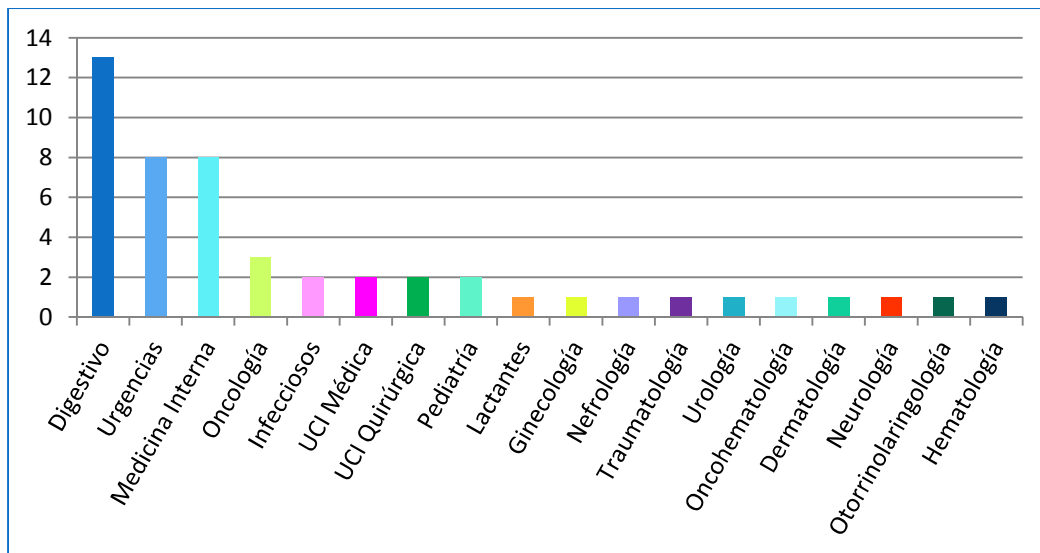


Figura 38. Resultados de los pacientes de origen hospitalario por servicio

4.4 PRESENCIA DE AmpC

Del total de los coprocultivos estudiados se seleccionaron 20 aislamientos con fenotipo AmpC para investigar los genes de resistencia responsables del fenotipo AmpC. Los 20 aislamientos resultaron tener un fenotipo de cefotaxima resistente y ceftazidima resistente, además de la cefoxitina resistente. En cuanto al cefepime, el 85% de los aislamientos resultaron ser sensibles.

4.4.1 CONFIRMACIÓN DE LAS AmpC PLASMÍDICAS MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES

Tras realizar PCR a todos los aislamientos con 6 parejas de primers y posterior secuenciación obtuvimos que 13 de los aislamientos producían una enzima CMY-2 y 3 aislamientos una enzima DHA-1.

Cuatro cepas resultaron ser negativas a las seis familias de AmpC plasmídicas estudiadas por lo que se estudió la posible presencia de BLEE. De ellas, tres resultaron ser positivas para una enzima CTX-M.

Cabe destacar que los 16 aislamientos productores de AmpC plasmídica fueron identificados como *E. coli*.

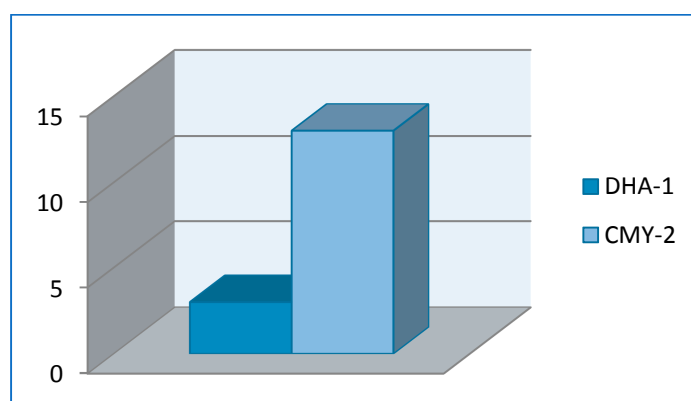


Figura 39. Resultados de la caracterización de las AmpC plasmídicas producidas por los 16 *E. coli*

4.4.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PORTADORES FECALES DE AmpC

Respecto al sexo de los pacientes, el 31,25% fueron hombres y el 68,75% mujeres.

Según la edad, un 50% de los casos procedían de pacientes de grupo de edad de mayores de 65 años, seguidos de los pacientes de grupo de edad entre 0 y 14 años, y del grupo de edad entre 26 y 50 años, con un 18,75%. En los tramos de edad entre 15 y 25, y 51 y 65, solamente se aisló una β -lactamasas plasmídica tipo AmpC en cada una de ellos (6,25% en cada rango).

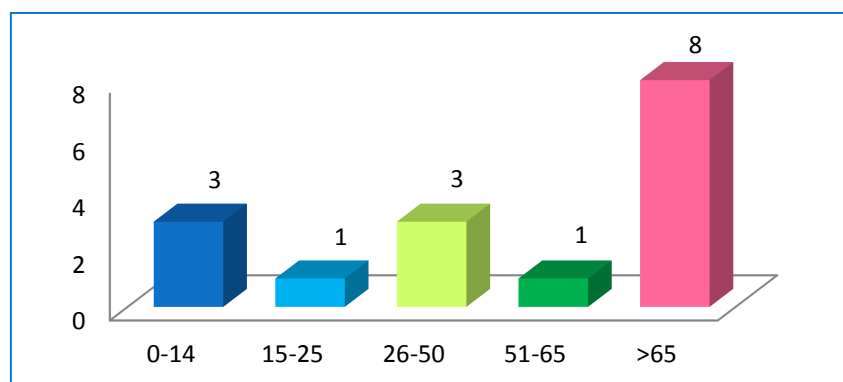


Figura 40. Gráfico de las AmpC obtenidas distribuidas por rangos de edad

Según su procedencia, el 56,3 % de los pacientes que portaban enterobacterias productoras de AmpC plasmídicas eran pacientes ingresados en nuestro hospital mientras que el 43,7% de los pacientes procedían de la comunidad, sector III de Zaragoza.

De los pacientes hospitalizados, el 30 % procedían del Servicio de Digestivo, seguido de Pediatría Lactantes y Medicina Interna con un 20 %. El resto de los pacientes estaban ingresados en diferentes servicios del hospital.

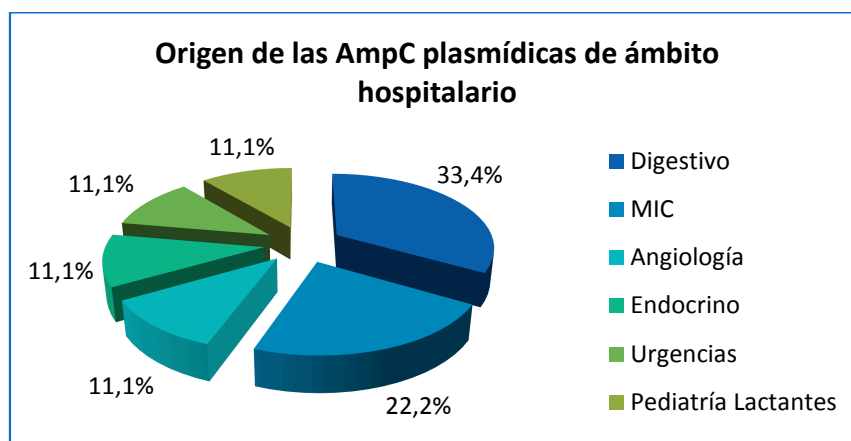


Figura 41

4.5 PREVALENCIA DE LAS β -LACTAMASAS PLASMÍDICAS

La prevalencia de BLEEs en los portadores fecales estudiados fue de un 5,6% en nuestro entorno.

Los tipos de BLEEs CTX-M con mayor predominio en los portadores fecales de nuestro sector fueron CTX-M-14 (2,7%), seguido de CTX-M-15 (1,2%), porcentajes referidos respecto al total de pacientes analizados.

Del resto de tipos de BLEE, ninguno alcanzó una prevalencia superior al 1%. De estas enzimas más minoritarias, destacan la CTX-M-1 con 0,5% y la CTX-M-32 con un 0,3%.

Tabla 9. Distribución de los portadores fecales de AmpC respecto al total de pacientes (2685)

Tipos de CTX-M	GRUPO CTX-M-1				GRUPO CTX-M-9			
	CTX-M-1	CTX-M-3	CTX-M-15	CTX-M-32	CTX-M-9	CTX-M-14	CTX-M-24	CTX-M-27
Total enzimas aisladas	13	1	31	8	5	72	1	1
% de portadores fecales	0,5	0,04	1,2	0,3	0,2	2,7	0,04	0,04

Las β -lactamasas plasmídicas AmpC tuvieron una prevalencia en portadores fecales de 0,6%.

La prevalencia de la CMY-2, AmpC mayoritaria, fue de 0,5% respecto al total de pacientes analizados.

Tabla 10. Distribución de los portadores fecales de AmpC respecto al total de pacientes (2685)

Tipos de AmpC	CMY-2	DHA-1
	13	3
% de portadores fecales	0,5	0,1

5 DISCUSIÓN

5.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

5.1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS BLEEs EN NUESTRA REGIÓN

Los datos de nuestro trabajo indican durante el periodo estudiado (entre 1 de Enero a 30 de Junio de 2010) una prevalencia de 5,6% de portadores fecales de bacterias productoras de BLEE pertenecientes al Sector III de Zaragoza

En nuestro hospital se realizó un estudio de características similares durante dos períodos de tiempo separados entre sí 17 meses (112).

Entre Abril de 2002 y Febrero de 2003 se obtuvo un 2,3% de portadores fecales de aislamientos productores de BLEEs, y entre Agosto de 2004 y Julio de 2005 se encontró un 7,4% lo que denota un aumento significativo, siendo un 2,5% de portadores fecales de origen hospitalario y un 2,1% de origen ambulatorio en 2002, y en el caso de 2004, fueron un 8,1% y 7,2%, respectivamente (112). Comparando estos estudios con el trabajo llevado a cabo actualmente, se puede observar que desde 2005 las cifras se mantienen en un porcentaje considerable, si bien parece que incluso ha disminuido la prevalencia de portadores en nuestro sector.

En nuestro trabajo, los pacientes portadores fecales de origen hospitalario representaron el 1,9% mientras que los de origen ambulatorio fueron un 2,8%. Como se puede observar, el porcentaje de los pacientes portadores fecales de origen ambulatorio fue mayor que los de origen hospitalario siendo una diferencia con los estudios llevados a cabo anteriormente donde en los dos casos el porcentaje mayoritario fue de pacientes portadores fecales de origen hospitalario.

En dicho estudio (112), el 75,5 % de los pacientes analizados procedía de origen ambulatorio mientras que en nuestro estudio fue de un 75,8%, por lo que la relación entre pacientes de origen ambulatorio y hospitalario fue similar.

5.1.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS BLEEs EN ESPAÑA

En España, se realizó un estudio nacional en el año 2000 en el que participaron cerca de 40 hospitales para establecer un mapa de la epidemiología de las BLEEs en España por comunidades (99).

Desde entonces, el panorama nacional ha cambiado bastante como veremos a continuación. Las BLEEs SHV y TEM ya no son las más abundantes y han dejado paso a la familia CTX-M.

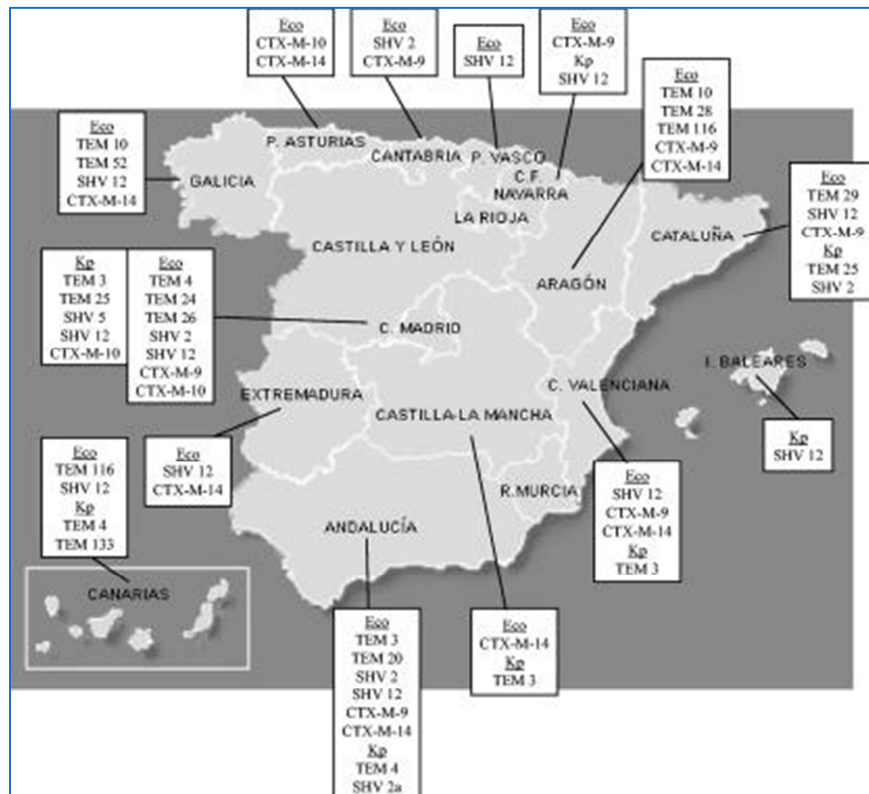


Figura 42. Mapa de España de distribución de las BLEEs en 2005 en muestras clínicas (97)

En un estudio realizado de portadores fecales en Madrid, durante dos períodos de tiempo, aislaron BLEEs en el 0,3% y 0,7% en 1991, y en el 11,8% y 5,5% en 2003 (en pacientes de origen hospitalario y ambulatorio, respectivamente) (96). En el mismo hospital realizaron un nuevo estudio en 2010 en el que los pacientes hospitalizados representaban el 8,9% y los de origen ambulatorio el 7,9%. (113).

En nuestro trabajo, los datos obtenidos de pacientes portadores fecales según su origen son de 7,7% en pacientes hospitalizados (50 de 649 pacientes) y de 5% de origen ambulatorio (101 de 2036 pacientes). Observamos que la prevalencia de pacientes portadores de BLEE de origen hospitalario es mayor que los de procedencia ambulatoria, aunque se observa que en los dos casos hay una tendencia al alza.

En otro estudio que se llevó a cabo en Barcelona durante tres períodos entre 2001 y 2002, se investigó la prevalencia de portadores fecales de BLEEs en pacientes ambulatorios, y obtuvieron unos datos de 2,1%, 3,8% y 7,5% de aislamientos de *E. coli* y *E. cloacae* con BLEE en cada período de tiempo, respectivamente. También podemos ver que hay un aumento de la aparición de BLEEs en un breve espacio de tiempo (114). Esto se correlaciona con los datos obtenidos en los demás estudios.

Respecto a las BLEES encontradas, en nuestro estudio, un 52,3% pertenecían al grupo CTX-M-9 y un 35,1% al grupo CTX-M-1. La β -lactamasa plasmídica mayoritaria fue la CTX-M-14 con un 43,1%.

Dentro del grupo CTX-M-9, la BLEE mayoritaria fue la CTX-M-14 (47,7% del total), seguida de la CTX-M-9 (6,3%). En cuanto al grupo CTX-M-1, un 20,5% del total de BLEEs resultó ser CTX-M-15 y de CTX-M-1 se aislaron un 8,6%.

En el estudio realizado por Valverde y col. en 2004 (96), obtuvieron un 32,1% de CTX-M-14, un 21,4% de CTX-M-9 y un 3,6% de CTX-M-10.

Rodríguez-Baño y col. obtuvieron en 2008, un porcentaje superior a 64% de portadores fecales de BLEE, aunque el grupo en el que realizó el estudio tenían una infección de tracto urinario (ITU) adquirida en la comunidad con un cultivo positivo para *E. coli* portador de BLEE. Además, se analizaron en grupo de pacientes no relacionados con los pacientes con ITU y se obtuvo una prevalencia de 7,4 % (102).

Otro estudio realizado en el 2008 en el que se incluían muestras clínicas y portadores fecales, mostró que el grupo CTX-M-9 es el más representado en España, y en particular, el grupo CTX-M-14 en *E. coli* (115).

En el trabajo realizado por Paniagua y col. en 2010 estudiando la presencia de portadores fecales, un 40% de las BLEES encontradas pertenecían al grupo CTX-M-9, siendo la mayoritaria la CTX-M-14, seguida del grupo CTX-M-1 donde la predominante fue la enzima CTX-M-15. En este último trabajo, un 38% de las BLEEs en pacientes ambulatorios fueron CTX-M-14, mientras que en los pacientes hospitalizados, un 75% fueron CTX-M-15. Además, asilaron un 29% de SHV y un 4,4% de TEM (113).

Comparando nuestros resultados con los trabajos anteriormente expuestos, se puede observar que el grupo mayoritario de BLEE es CTX-M-9 seguido del grupo CTX-M-1. La CTX-M-14 es la enzima predominante en estos trabajos. Cabe destacar que la CTX-M-15 es la segunda enzima más abundante. Por el contrario, en nuestro estudio sólo se encontró una enzima CTX-M-10, que comparado con otros estudios, su presencia es inferior. En cuanto a los demás grupos de BLEES, se obtuvo un 20,5% de TEM y un 8,6% de SHV, resultados invertidos a los obtenidos en el trabajo de Paniagua, donde se aprecia que la presencia del grupo SHV fue superior al grupo TEM.

5.1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS BLEEs EN EUROPA

La prevalencia de BLEEs en Europa es más alta que en Estados Unidos pero más baja que en Asia y Sudamérica aunque se han observado importantes diferencias entre países europeos (115). (Cantón, 2008)

En dicho estudio establecieron la distribución de las β -lactamasas plasmídicas CTX-M en Europa, como vemos en el siguiente mapa:

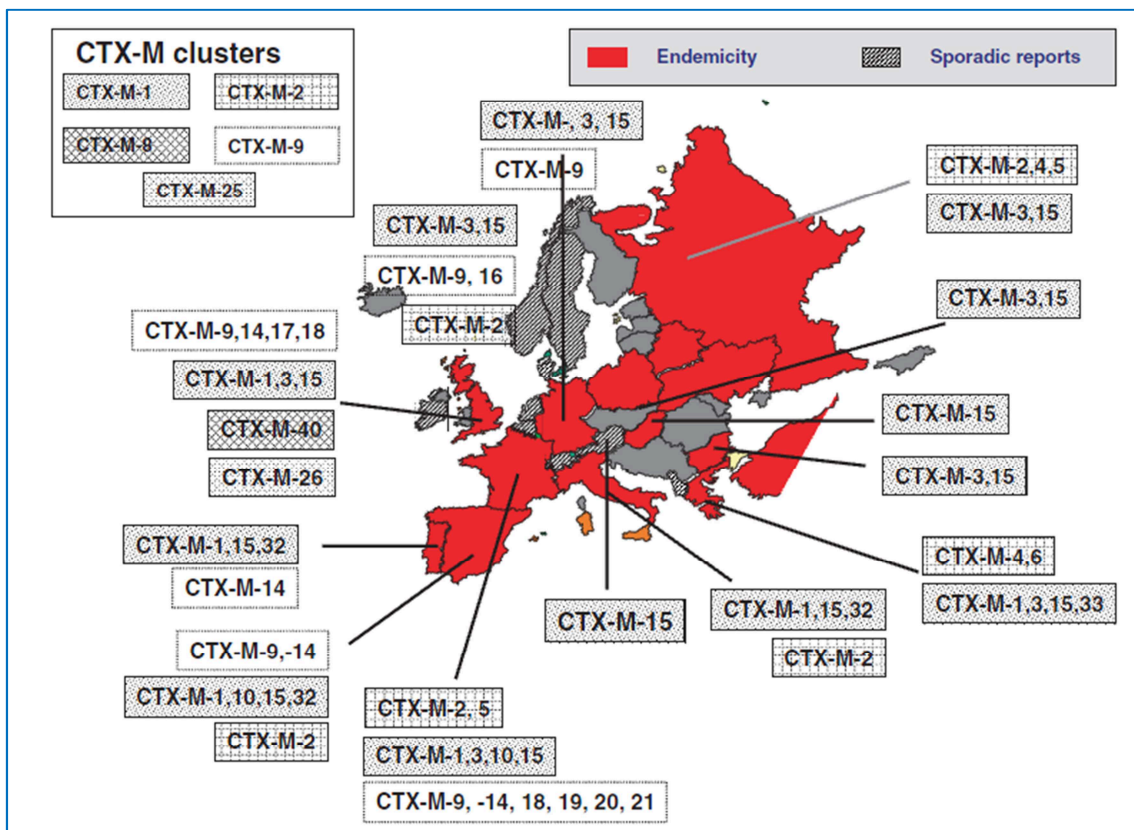


Figura 43. Distribución de las CTX-M en Europa en 2008 (115)

En un estudio multicéntrico en el que participaron hospitales de varios países europeos se encontró un 3,2% de BLEEs, en el que el 0,5% correspondió a *E. coli* y el 2,7% a *K. pneumoniae*. Esto es una gran diferencia con nuestros datos ya que *E. coli* representó el 5,8% frente al 0,3% de *K. pneumoniae* (99, 115).

En un estudio de vigilancia epidemiológica europeo en 2005 se observó una prevalencia alta de BLEEs en diversos países del este de Europa como Bulgaria con un 28% o Rumanía, con un 16% (incluían la presencia de BLEEs en portadores fecales) (116, 117).

Es notable que la β -lactamasa CTX-M-15 es la enzima dominante del oeste de Europa; en Reino Unido, Italia, Francia y Portugal esta enzima se está expandiendo rápidamente (80).

En un estudio realizado en Francia, la prevalencia de portadores fecales de BLEEs fue de un 15,8%. Separadas por grupos, las prevalencias fueron de 9,2% para TEM, 5,9% para CTX-M 0,7% para SHV. Dentro del grupo de las β -lactamasas CTX-M, el 89% fueron CTX-M-15; y dentro de las BLEEs, las enzimas del grupo TEM fueron las más abundantes con un 58,3%. (118)

En Suecia, se observó en 2008 una prevalencia de portadores fecales de BLEEs del 1,9% y en 2010 del 5%. El grupo CTX-M-1 fue el grupo dominante dentro de las β -lactamasas plasmídicas. Otros estudios recientes demuestran que en Suecia las bacterias productoras de BLEEs están en aumento. (119)

Todos estos datos que se corresponden con países europeos muestran como grupo mayoritario el CTX-M-1, y dentro de él, la CTX-M-15, mientras que en España, y en concreto en nuestro estudio, el grupo predominante es el grupo CTX-M-9, y en concreto, la CTX-M-14.

5.1.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS BLEEs EN ASIA

Un estudio realizado en la India en el año 2010 sobre portadores de BLEEs en la UCI mostró una alta tasas de colonización, en la que predominaban las BLEEs del grupo CTX-M (83,3%), seguidas de las TEM (54.3%) y de las SHV (32.6%) (120).

En Indonesia, en un trabajo realizado en 2012 se obtuvo un 9,5% de portadores fecales de BLEEs. La CTX-M-15 resultó ser la enzima más prevalente (43%). La enterobacteria en la que se aislaron más BLEEs fue el *E. coli* con un 92,6%, distribuyéndose las enzimas que codificaron en CTX-M-15, con el 47,1%, en CTX-M-14 con un 10,3%, y en CTX-M-9, con un 7,4%. En el resto de enterobacterias, se aislaron un 35,9% de CTX-M-15, y un 5,1% de CTX-M-9. En total de las enterobacterias, la CTX-M-14 y la CTX-M-9 supusieron un 6,5% cada una(121).

Se obtuvo una prevalencia de 20,3% de portadores de BLEEs en un estudio llevado a cabo en Corea en el año 2012, siendo el *E. coli* la enterobacteria mayoritaria con un 96,6% (122).

En un estudio similar en Japón, el resultado de portadores fecales de BLEEs fue, sin embargo, de un 69,3%. El grupo CTX-M supuso un 65,7% del total de β -lactamasas plasmídicas encontradas, siendo el 60,6% del grupo CXT-M-9, y el 38,7% del grupo CTX-M-1. La bacteria predominante fue el *E. coli* con un 85,4% (123).

En Asia se observa una alta tasa de portadores fecales en comparación con Europa, y en concreto, con el estudio del presente documento.

En el siguiente mapa se observa la distribución de las CTX-M en el año 2006 (124):

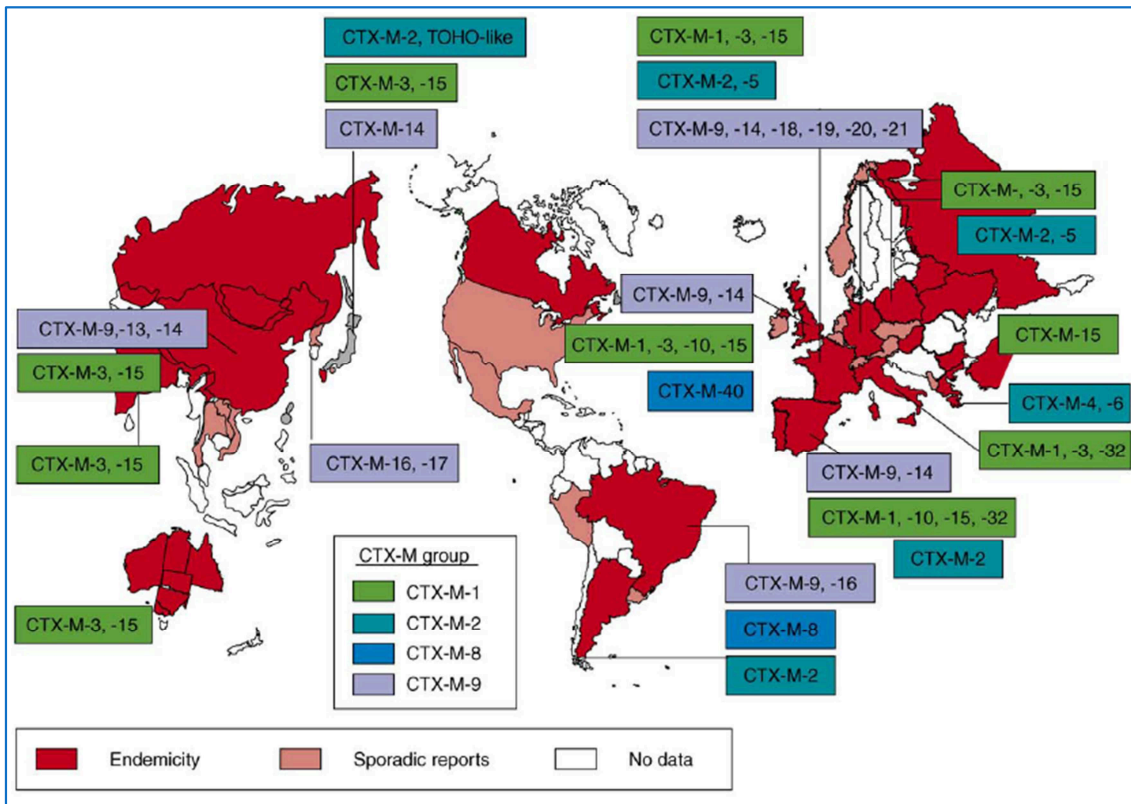


Figura 44 Distribución de las áreas geográficas de las CTX-M en el año 2006 (124)

5.1.5 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS BLEEs EN ÁFRICA

En un estudio llevado a cabo en Túnez en 2011, tuvieron una prevalencia de portadores fecales de un 7,3%, siendo el grupo predominante el CTX-M-1 con un 81,8% (125).

En otro trabajo de 2011, en Madagascar, un 10,1% del total de pacientes analizados resultaron ser portadores fecales de BLEEs. Dentro del grupo CTX-M-1, resultó ser la CTX-M-15 la enzima mayoritaria (126).

En los datos presentados en un estudio en Camerún en el año 2012, dividieron los pacientes entre ambulatorios, con un 23,1% de portadores fecales de BLEEs, y voluntarios sanos, con 6,7%. El grupo mayoritario fue el CTX-M-1 con un 97% (de ellas, 98%, CTX-M-15, y un 2%, CTX-M-1) (127).

En África, los datos son un poco dispares en cuanto a la prevalencia de portadores fecales de BLEEs, pero sí coincide en todos los casos que la enzima predominante fue del grupo CTX-M-1. Esto es una diferencia respecto a nuestro estudio ya que el grupo mayoritario obtenido fue el CTX-M-9.

5.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS AmpC

En cuanto a las AmpC, no hay muchos estudios de estas β -lactamasas plasmídicas en portadores fecales por lo que no se ha podido comparar los resultados obtenidos. Lo que sí que es cierto es que las AmpC están teniendo cada vez más importancia en el panorama de las resistencias a antibióticos.

El porcentaje de AmpC respecto al total de las β -lactamasas plasmídicas fue de 9,6% y representó un 0,6% del total de pacientes estudiados.

5.3 INTERÉS DEL ESTUDIO

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos, y en particular la producción de β -lactamasas plasmídicas (BLEEs, cefamicinasas, carbapenemasas), es un grave problema descrito principalmente en cepas de origen clínico. Sin embargo, no existen muchos datos sobre la prevalencia y la capacidad de difusión de estas resistencias en otros ambientes como puede ser la colonización fecal.

Los datos de diferentes estudios demuestran el interés de realizar cada cierto tiempo estudios en la población sana y en la hospitalizada del estado de portador de β -lactamasas plasmídicas por ser considerado un factor de riesgo en pacientes que posteriormente padezcan infecciones por flora endógena, como infecciones intraabdominales, peritoneales o urinarias.

También se considera como factor de riesgo ser portador fecal en aquellos casos de padecer una infección polimicrobiana por microorganismos multirresistentes productores de BLEEs, cefamicinasas y/o carbapenemasas.

6 CONCLUSIONES

- Coincidiendo con la prevalencia encontrada en infecciones clínicas, destacamos en nuestro medio una elevada presencia de portadores fecales de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* productores de β -lactamasas de espectro extendido, fundamentalmente en la primera especie. Estos datos están de acuerdo con la tendencia ascendente de las cifras descritas para *Escherichia coli* en las diversas publicaciones nacionales e internacionales.
- Con los datos obtenidos, podemos observar que en nuestro sector la progresión de la presencia de β -lactamasas plasmídicas en portadores fecales se ha estabilizado en los últimos años manteniéndose una prevalencia en torno al 5%.
- En nuestro trabajo se encontraron β -lactamasas de espectro extendido de los grupos CTX-M-9 (tipos CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-24, CTX-M-27), CTX-M-1 (CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-32), CTX-M-10, TEM y SHV con un predominio importante de la enzima CTX-M-14. Esta distribución es coincidente con los estudios realizados en otros centros hospitalarios del país en los que se ha descrito aumento de la presencia de enzimas del grupo CTX-M, en particular CTX-M-14 y diferente a lo encontrado en otros países de Europa donde CTX-M-15 y TEM son las enzimas predominantes
- Dos tercios de las especies productoras de β -lactamasas de espectro extendido se aislaron en pacientes de origen ambulatorio. Esto puede estar en relación con el importante consumo de antibióticos de amplio espectro en el medio extrahospitalario.
- En cuanto las β -lactamasas plasmídicas AmpC, constatamos la emergencia de *E. coli* productores de CMY-2 en *E. coli* de la flora intestinal por primera vez en nuestro sector sanitario. CMY-2 y DHA-1 fueron las dos enzimas encontradas.
- Todavía no ha emergido la presencia de carbapenemasas plasmídicas en portadores fecales aunque habrá que continuar la vigilancia epidemiológica.

7 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una limitación de nuestro estudio fue el medio que utilizamos como screening para discriminar las enterobacterias con un posible mecanismo de resistencia tipo BLEE o AmpC. La concentración de cefoperazona en el medio CCDA es de 32 µg/L, que era la concentración que estaba considerada como el punto de corte establecido por el CLSI (104) para el cribaje de BLEEs hasta el año 2011, Este punto de corte ha cambiado y actualmente es de 2µg/L por lo que siguiendo las recomendaciones de hoy en día, podríamos haber perdido alguna enterobacteria que podría tener una β-lactamasa plasmídica que no habría crecido a esa concentración pero sí podría haberlo hecho a una de 2µg/L.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Brenner DJ. *Enterobacteriaceae*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. Manual of Systematic Bacteriology: Bergey's; 1984. p. 408-516.
2. Neidhart FC. *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology. 2ª ed. Washington DC: ASM; 1996.
3. National Center for Biotechnology Information. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy.
4. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Biology of Microorganisms.: Pearson; 2003.
5. Prats G, Mirelis B. *Enterobacteriaceae*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Barcelona: Doyma; 1992. p. 624-46.
6. Huijbregts RPH, de Kroon AIPM, de Kruijff B. Topology and transport of membrana lipids in bacteria. Elsevier, editor: Biochimica et Biophysica Acta; 2000. 43-61 p.
7. Sonnenwirth A. The enteric bacilli and bacteroides. In: Davis B, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg, H., editors. Microbiology, including immunology and molecular genetics. 5a ed. Pennsylvania: Harper and Row; 1988. p. 645-72.
8. Domínguez-Gil A. Aspectos económicos de la infección. Rev Esp Quimioterapia. 1998;11(Supl.3):81-90.
9. Prats G, Mirelis B. Enterobacterias oportunistas. *Escherichia coli*. In: García-Rodríguez J, Picazo J, editors. Enterobacterias Características generales. Madrid: Microbiología Médica. Mosby/Doyma, S.A.; 1996. p. 223-38.
10. Bopp C, Brenner F, Wells, J., Strockbine N. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Murray P, Jo Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover F, editors. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed. Washington DC: ASM; 1999. p. 459-74.
11. Tipper D, Strominger J. Mechanism of action of peniciline: A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1965;54:1133-41.
12. Tomasz A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. Annu Rev Microbiol. 1979;33:113-37.
13. Batchelor FR, Doyle FP, Nayler JH, Rolison GN. Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations. Nature. 1959 Jan;183(4656):257-8.
14. Marshall WF, Blair JE. The cephalosporins. Mayo Clin Proc. 1999 Feb;74(2):187-95.
15. Fried JS, Hinthorn DR. The cephalosporins. Dis Mon. 1985 Jul;31(7):1-60.
16. Klein NC, Cunha BA. Third-generation cephalosporins. Med Clin North Am. 1995 Jul;79(4):705-19.

17. Mella SM, M. ZC, Bello HT, Domínguez MY, González GR, Zemelman RZ. Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Rev Clin Infect.* 2001;18:7-19.
18. Brown AG, Butterworth D, Cole M, Hanscomb G, Hood JD, Reading C, et al. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo).* 1976 Jun;29(6):668-9.
19. Payne DJ, Cramp R, Winstanley DJ, Knowles DJ. Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Apr;38(4):767-72.
20. Gales AC, Sader HS, Sinto S, Santos OP, Mendes CM. In vitro activity of ampicillin-sulbactam against clinical multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Chemother.* 1996 Dec;8(6):416-9.
21. Gobernado M, Bouza E, Perea E, Alvarez-Bravo J, García Rodríguez JA. A national multicenter study of the in-vitro activity of piperacillin-tazobactam. The Spanish Piperacillin-Tazobactam Group. *Rev Esp Quimioter.* 1998 Jun;11(2):139-46.
22. Snyder L, Champness W. *Molecular Genetics of Bacteria.* Washington, D. C.: ASM Press; 1997.
23. Marín M, Gudiol F. Beta-Lactam antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003 Jan;21(1):42-55.
24. Guardabassi L, Courvalin C. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* Washington, D. C.: Aarestrup, F. ASM Press; 2006. p. 1-18.
25. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis.* 1988 Jul-Aug;10(4):677-8.
26. Walsh C. Enzymatic destruction or modification of the antibiotic by resistant bacteria. *Antibiotics Actions, origins, resistance.* Washington, D. C.: ASM Press; 2003b. p. 107-24.
27. Livermore DM. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother.* 1998 Jun;41 Suppl D:25-41.
28. Sawai T, Mitsuhashi S, Yamagishi S. Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of beta-lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to alpha-aminobenzylpenicillin. *Jpn J Microbiol.* 1968 Dec;12(4):423-34.
29. Richmond MH, Sykes RB. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol.* 1973;9:31-88.
30. Sykes RB, Matthew M. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1976 Jun;2(2):115-57.
31. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 May;289(1036):321-31.
32. Frère JM, Galleni M, Bush K, Dideberg O. Is it necessary to change the classification of beta-lactamases? *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jun;55(6):1051-3.
33. Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 Mar;33(3):264-70.

34. Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 Mar;33(3):271-6.
35. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jun;39(6):1211-33.
36. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):969-76.
37. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 1983 Nov-Dec;11(6):315-7.
38. Lahey Clinic Foundation, Inc. Burlington, MA. Available from: www.lahey.org/Studies.
39. Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol.* 2007 Oct;7(5):459-69.
40. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Oct;8(4):557-84.
41. Sanders CC. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:573-93.
42. Bennett PM, Chopra I. Molecular basis of beta-lactamase induction in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Feb;37(2):153-8.
43. Livermore DM. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol.* 1987 Aug;6(4):439-45.
44. Navarro Risueño F, Miró Cardona E, Mirelis Otero B. Interpretive reading of the antibiogram of enterobacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002 May;20(5):225-34.
45. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol.* 2011 Dec;301(8):654-8.
46. Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SG. TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother.* 1995 Jan;35(1):7-22.
47. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature.* 1965 Oct;208(5007):239-41.
48. Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs.* 2003;63(4):353-65.
49. Barthélémy M, Peduzzi J, Labia R. Distinction between the primary structures of TEM-1 and TEM-2 beta-lactamases. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 1985 May-Jun;136A(3):311-21.
50. 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; 1988.

51. Tzouveleakis LS, Bonomo RA. SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999 Nov;5(11):847-64.
52. Huletsky A, Knox JR, Levesque RC. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *J Biol Chem.* 1993 Feb;268(5):3690-7.
53. Barlow M, Hall BG. Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J Mol Evol.* 2002 Sep;55(3):314-21.
54. Jacoby GA. Beta-lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Apr;50(4):1123-9.
55. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Nov;34(11):2200-9.
56. GenBank: The National Center for Biotechnology Info. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/.
57. Lahey Clinic Foundation, Inc. Burlington, MA. Available from: www.lahey.org/Studies.
58. Nakano R, Okamoto R, Nakano Y, Kaneko K, Okitsu N, Hosaka Y, et al. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Apr;48(4):1151-8.
59. Seral C, Gude MJ, Castillo FJ. Emergence of plasmid mediated AmpC β -lactamasas: Origin, importance, detection and therapeutical options. *Rev Esp Quimioter.* 2012 Jun;25(2):89-99.
60. Reisbig MD, Hanson ND. The ACT-1 plasmid-encoded AmpC beta-lactamase is inducible: detection in a complex beta-lactamase background. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Mar;49(3):557-60.
61. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):161-82, Table of Contents.
62. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jan;46(1):1-11.
63. Barnaud G, Arlet G, Verdet C, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Sep;42(9):2352-8.
64. Fortineau N, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Feb;47(2):207-10.
65. Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006 2006 Jun-Jul;24(6):370-2.
66. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 2002 Jun;8(6):321-31.

67. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):15-22.
68. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med*. 2005 Jan;352(4):380-91.
69. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis*. 2005 Feb;11(2):260-4. PubMed PMID: 15752444.
70. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):329-32.
71. Jacoby GA, Bush K. Beta-lactamase nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2005 Dec;43(12):6220.
72. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 1990 Sep-Oct;18(5):294-8.
73. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Oct;18(4):657-86.
74. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Dec;50(6):1031-4.
75. Cartelle M, del Mar Tomas M, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jun;48(6):2308-13.
76. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):1-14.
77. Rodríguez MM, Power P, Radice M, Vay C, Famiglietti A, Galleni M, et al. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Dec;48(12):4895-7.
78. Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, et al. 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 May;49(5):2112-5.
79. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;14(4):933-51, table of contents.
80. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Feb;59(2):165-74.
81. Poirel L, Naas T, Le Thomas I, Karim A, Bingen E, Nordmann P. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Dec;45(12):3355-61.
82. Gazouli M, Legakis NJ, Tzouveleki LS. Effect of substitution of Asn for Arg-276 in the cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase CTX-M-4. *FEMS Microbiol Lett*. 1998 Dec;169(2):289-93.

83. Tzouveleki LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents*. 2000 Mar;14(2):137-42.
84. Gazouli M, Tzelepi E, Sidorenko SV, Tzouveleki LS. Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 May;42(5):1259-62.
85. Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA, Orman BE, Pineiro SA, Centron D. blaCTX-M-2 is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jul;46(7):2303-6.
86. Sabaté M, Navarro F, Miró E, Campoy S, Mirelis B, Barbé J, et al. Novel complex sul1-type integron in *Escherichia coli* carrying bla(CTX-M-9). *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Aug;46(8):2656-61.
87. Yuan M, Aucken H, Hall LM, Pitt TL, Livermore DM. Epidemiological typing of *klebsiellae* with extended-spectrum beta-lactamases from European intensive care units. *J Antimicrob Chemother*. 1998 May;41(5):527-39.
88. Sabaté M, Miró E, Navarro F, Vergés C, Aliaga R, Mirelis B, et al. Beta-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 Jun;49(6):989-97.
89. García A, Navarro F, Miró E, Villa L, Mirelis B, Coll P, et al. Acquisition and diffusion of bla CTX-M-9 gene by R478-IncHI2 derivative plasmids. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Jun;271(1):71-7.
90. Navarro F, Mesa RJ, Miró E, Gómez L, Mirelis B, Coll P. Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Aug;273(1):120-3.
91. Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela MeC, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol*. 2002 Apr;40(4):1237-43.
92. Legrand P, Fournier G, Buré A, Jarlier V, Nicolas MH, Decré D, et al. Detection of extended broad-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in four French hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989 Jun;8(6):527-9.
93. Paterson DL, Yu VL. Extended-spectrum beta-lactamases: a call for improved detection and control. *Clin Infect Dis*. 1999 Dec;29(6):1419-22.
94. Levin BR. Minimizing potential resistance: a population dynamics view. *Clin Infect Dis*. 2001 Sep;33 Suppl 3:S161-9.
95. Cantón R, Coque TM, Baquero F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Aug;16(4):315-25.
96. Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol*. 2004 Oct;42(10):4769-75.

97. Smith DL, Dushoff J, Perencevich EN, Harris AD, Levin SA. Persistent colonization and the spread of antibiotic resistance in nosocomial pathogens: resistance is a regional problem. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar;101(10):3709-14.
98. Oteo J, Navarro C, Cercenado E, Delgado-Iribarren A, Wilhelmi I, Orden B, et al. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol*. 2006 Jul;44(7):2359-66.
99. Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A, (GEIH) SGfNI. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 May;49(5):2122-5.
100. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill*. 2008 Nov;13(47).
101. Valverde A, Grill F, Coque TM, Pintado V, Baquero F, Cantón R, et al. High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. *J Clin Microbiol*. 2008 Aug;46(8):2796-9.
102. Rodríguez-Baño J, López-Cerero L, Navarro MD, Díaz de Alba P, Pascual A. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Nov;62(5):1142-9.
103. Seral García C, Pardos de la Gándara M, Castillo García FJ. Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 Jan;28 Suppl 1:12-8.
104. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing- Approved standard M100-S22 and Twenty-Second Informational Supplement. PA, USA.: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne; 2011.
105. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 2.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2012.
106. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, et al. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol*. 2003 Sep;41(9):4264-9.
107. Weill FX, Lailler R, Praud K, Kérouanton A, Fabre L, Brisabois A, et al. Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5767-73.
108. Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Feb;46(2):500-10.
109. Díaz MA, Hernández-Bello JR, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Calvo J, Blanco J, et al. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol*. 2010 Aug;48(8):2840-5.
110. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):2153-62.

111. Basic Local Alignment Search Tool: National Center for Biotechnology Information. Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.
112. Castillo García FJ, Seral García C, Pardos De la Gandara M, Millán Lou MI, Pitart Ferré C. Prevalence of fecal carriage of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in hospitalized and ambulatory patients during two non-outbreak periods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Jan;26(1):77-8.
113. Paniagua R, Valverde A, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* fecal carriers using a chromogenic medium. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Aug;67(4):376-9.
114. Mirelis B, Navarro F, Miró E, Mesa RJ, Coll P, Prats G. Community transmission of extended-spectrum beta-lactamase. *Emerg Infect Dis*. 2003 Aug;9(8):1024-5.
115. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14 Suppl 1:144-53.
116. EARSS Annual report 2005. National Institute of Public Health and the Environment. Bilthoven: European Antimicrobial Resistance Surveillance System., 2006.
117. European Centre for Disease Prevention and Control Available from: <http://www.rivm.nl/earss/result/>.
118. Vidal-Navarro L, Pfeiffer C, Bouziges N, Sotto A, Lavigne JP. Faecal carriage of multidrug-resistant Gram-negative bacilli during a non-outbreak situation in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Nov;65(11):2455-8.
119. Strömdahl H, Tham J, Melander E, Walder M, Edquist PJ, Odenholt I. Prevalence of faecal ESBL carriage in the community and in a hospital setting in a county of Southern Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Oct;30(10):1159-62.
120. Azim A, Dwivedi M, Rao PB, Baronia AK, Singh RK, Prasad KN, et al. Epidemiology of bacterial colonization at intensive care unit admission with emphasis on extended-spectrum beta-lactamase- and metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria-an Indian experience. *J Med Microbiol*. 2010 Aug;59(Pt 8):955-60.
121. Severin JA, Lestari ES, Kloezen W, Lemmens-den Toom N, Mertaniasih NM, Kuntaman K, et al. Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among humans in Java, Indonesia, in 2001-2002. *Trop Med Int Health*. 2012 Jan.
122. Ko YJ, Moon HW, Hur M, Park CM, Cho SE, Yun YM. Fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Korean community and hospital settings. *Infection*. 2012 Jun.
123. Luvsansharav UO, Hirai I, Nakata A, Imura K, Yamauchi K, Niki M, et al. Prevalence of and risk factors associated with faecal carriage of CTX-M β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in rural Thai communities. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jul;67(7):1769-74.
124. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Oct;9(5):466-75.

125. Ben Sallem R, Ben Slama K, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N, et al. Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Jul;31(7):1511-6.
126. Herindrainy P, Randrianirina F, Ratovoson R, Ratsima Hariniana E, Buisson Y, Genel N, et al. Rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in community settings in Madagascar. *PLoS One*. 2011;6(7):e22738.
127. Lonchel CM, Meex C, Gangoué-Piéboji J, Boreux R, Assoumou MC, Melin P, et al. Proportion of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community setting in Ngaoundere, Cameroon. *BMC Infect Dis*. 2012;12:53.