

INTRODUCCION

Los avances de la medicina en los países desarrollados han conseguido erradicar algunos microorganismos patógenos primarios como el bacilo diftérico, el tetánico o el virus de la viruela; sin embargo han incrementado la incidencia de las infecciones causadas por microorganismos oportunistas, destacando entre estos las especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

Los microorganismos de esta familia presentan una gran plasticidad en diversos aspectos y en particular en su capacidad para adquirir genes que les confieren resistencia a los antimicrobianos. Entre estos destacan los genes que codifican las β -lactamasas que inactivan a diversos antibióticos β -lactámicos.

La introducción de las cefalosporinas de tercera generación y los monobactams resistentes a las β -lactamasas prevalentes en los años 80s (TEM, SHV) permitió tratar las infecciones por microorganismos portadores de esas enzimas, que inactivan a las aminopenicilinas, carboxipenicilinas y en parte a las cefalosporinas de primera generación; sin embargo pronto aparecieron β -lactamasas capaces de inactivar a las cefalosporinas de tercera generación y los monobactams.

El objetivo de esta tesis es el estudio de la incidencia de las β -lactamasas que inactivan las cefalosporinas de tercera generación producidas por las especies de la familia *Enterobacteriaceae*, entre los años 1997-1999.

1) Familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* denominada así por Rahn en 1937²⁶ 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 especies¹¹⁰ incluidas en más de 30 géneros y 11 grupos con las características de la familia, pero que requieren un estudio más profunda antes de catalogarlos definitivamente (grupos entéricos no nominados). Sólo unas 40 de las 157 especies descritas son patógenas para el hombre o se ha aislado de muestras clínicas como oportunistas comensales, las otras 117 especies no se han aislado de muestras humanas⁴⁷.

En general su tamaño oscila entre 2-3µm por 0,4-0,6µm, no forman esporas, pueden ser móviles (con flagelos peritricos) o inmóviles. Estos organismos crecen bien en medios artificiales simples, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Son catalasa positiva, oxidasa negativa, reducen los nitratos a nitritos, fermentan la glucosa por la vía ácido-mixta 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). Además de los flagelos, muchas especies producen fimbrias (pili), cápsulas o ambos, que en ocasiones son importantes determinantes de virulencia. Las fimbrias o pili 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. Pueden poseer una cápsula bien definida o una cubierta laxa y mal definida, de estructura polisacárida, o sin cubierta¹³¹.

La relación genealógica existente entre los diversos géneros de *Enterobacteriaceae* está basada en técnicas moleculares como la hibridación del ADN, y es razonablemente concordante con los esquemas tradicionales de clasificación metabólica⁴⁶. Esta concordancia apoya la conclusión de que la transferencia de los genes cromosómicos (es decir, la recombinación) es rara entre las poblaciones naturales de enterobacterias.

Por ello, cada una de la gran mayoría de especies de enterobacterias, sobre todo las relacionadas con procesos patológicos específicos, comprende un número bastante limitado de linajes o clones con evolución independiente. A primera vista, esta conclusión puede parecer que contradice la facilidad de transferencia genética entre estos organismos, observada en el laboratorio, por medio de conjugación, transducción, transformación y transposición de elementos genéticos móviles como se demuestra por el rápido intercambio de plásmidos de resistencia entre *Enterobacteriaceae* (y otras muchas bacterias gramnegativas). Parte de la explicación podría residir en el equilibrio de los sistemas complejos del cromosoma lo que condicionaría dificultad para establecer otras recombinaciones aparte de las altamente homólogas a diferencia de los genes facultativos de los plásmidos. En efecto, el ADN extracromosómico confiere características que son de importancia transitoria, pero pueden conferir con frecuencia beneficios a la especie. Así, especies diferentes de *Enterobacteriaceae* son con frecuencia portadoras del mismo determinante de patogenicidad o de resistencia antibiótica, codificado en un plásmido, un transposón o un fago. Estas propiedades de virulencia o resistencia representan probablemente adiciones recientes al repertorio genético de un microorganismo, lo que le proporciona acceso a un nuevo nicho ecológico¹.

La pared celular de las enterobacterias está compuesta por mureína, lipoproteínas, fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos (LPS) y tiene una disposición laminar. La capa de lipoproteína-mureína constituye alrededor del 20% de la pared de la célula y es responsable de la rigidez celular. El 80% restante de la pared celular se une con los lípidos de la lipoproteína para formar la capa laminar. El LPS contiene las cadenas polisacáridas específicas que determinan la antigenicidad de las diversas especies (el tipo O) y su componente lipídico es la estructura responsable de la actividad endotóxica. En el caso de ciertas especies de *Enterobacteriaceae* la estructura antigénica desempeña un papel importante en la clasificación epidemiológica. Los antígenos O (antígeno somático, LPS), H (antígeno flagelar proteico) y K (antígeno capsular polisacárido) son los principales componentes que se usan en la tipificación serológica¹⁶².

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. 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 sanitario⁴¹.

Las infecciones oportunistas pueden darse siempre que existan factores predisponentes locales: todos aquellos que rompen las barreras físicas constituidas por la piel y las mucosas como las heridas, quemaduras, catéteres o las fisiológicas del árbol respiratorio (intubación) de la vía urinaria (sondas) o de la vía genital (dispositivos intrauterinos); así como factores generales: disminución de las defensas globales inespecíficas, principalmente fagocitosis y de la respuesta inmune del huésped, que puede estar disminuida por una enfermedad de base¹³³. Así en las infecciones intrahospitalarias, hasta dos tercios son secundarias a la colocación de sondas vesicales, instrumentación de la vejiga o cirugía de las vías urinarias bajas¹⁴⁸. 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)¹³².

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 hospital²¹. Hay cepas enteropatógenas de *E. coli* causa más del 50% de las infecciones urinarias tanto en hombres como en mujeres. Las mujeres son más propensas a sufrir infecciones del tracto urinario a una edad más temprana debido a diferencias en la estructura anatómica, la maduración sexual, las alteraciones que se producen durante el embarazo y el parto. Después de los 50 años de edad, el varón con hipertrofia prostática es más propenso a sufrir infección de las vías urinarias. El cateterismo u otras manipulaciones mecánicas del tracto urinario, la obstrucción, la diabetes y la incapacidad para el vaciamiento completo de la vejiga durante la micción son otros factores que predisponen a las infecciones urinarias por *E. coli* y otros microorganismos⁶⁸.

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 *Enterobacteriaceae* 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 bacteremia por gramnegativos. Forman una cápsula y por esta razón producen colonias grandes y húmedas, frecuentemente muy mucosas. *K. oxytoca* se parece a *K. pneumoniae* y desde el punto de vista clínico pueden considerarse semejantes²¹.

Ewing dividió a las *Enterobacteriaceae* en tribus integradas por géneros estrechamente relacionados. Aunque en la actualidad la mayoría de los taxónomos no acepta esta división, el concepto resulta útil para la descripción de los géneros: *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* englobados en la tribu *Proteeae*. La mayor parte de las cepas de esta tribu provienen de orina, pero también a menudo producen infecciones en otras partes del cuerpo como en heridas, neumonías y septicemia, y es causa principal de infecciones nosocomiales, a menudo graves. *Proteus* se encuentra habitualmente en el suelo, las aguas residuales y el estiércol, también con alguna frecuencia en las heces humanas normales, pero frecuentemente, en mayor número, en individuos bajo tratamiento antibiótico o durante enfermedades diarreicas ocasionadas por otros microorganismos. *P. mirabilis* es responsable de la mayor parte de las infecciones humanas causadas por este grupo de microorganismos¹⁶².

Los miembros del género *Salmonella* son patógenos ubicuos del hombre y del ganado, de los mamíferos silvestres, reptiles, pájaros e incluso de los insectos. El género *Salmonella* está constituido por un grupo de microorganismos de diversidad bioquímica y serológica amplia. Además de los seres humanos, estos microorganismos infectan a muchos animales y pueden invadir el tejido extraintestinal y producir fiebres entéricas. Las infecciones por *Salmonella* pueden presentarse como cualquiera de tres entidades clínicas características: una gastroenteritis autolimitada, una septicemia con lesiones focales o una fiebre entérica como la fiebre tifoidea. La gastroenteritis por *Salmonella* representa una infección de colon y en general se produce entre las 18 a 24 horas después de la ingestión del microorganismo. La enfermedad se caracteriza por diarrea, fiebre y dolor abdominal. Habitualmente es autolimitada y dura entre dos y cinco días²¹.

2) Antibióticos β -lactámicos

Para comprender los mecanismos de resistencia de las bacterias a un antibiótico, se debe conocer la naturaleza de los antibióticos y su mecanismo de acción. Un antibiótico es un compuesto natural que mata a una bacteria o inhibe su crecimiento. Actualmente se incluyen los antibióticos y los quimioterápicos (moléculas obtenidas por síntesis química) dentro del concepto de antimicrobianos. Es posible que en la naturaleza surgiesen los antibióticos como un medio de que un microorganismo eliminase de su alrededor a otros que competían con él por los nutrientes.

Los β -lactámicos son uno de los grupos de antibióticos más usados en la práctica médica, poseen una gran eficacia terapéutica y no son tóxicos para el hombre ya que actúan bloqueando las enzimas biosintéticas de una estructura como el peptidoglicano que sólo se encuentra en las células bacterianas (procariotas) y no tiene homólogo en las células animales (eucariotas); ambas características hacen de estos antibióticos uno de los mejores grupos terapéuticos bacterianos¹³⁴.

2.1 Clasificación

La estructura básica de estos compuestos es el anillo β -lactámico, esencial para su actividad antibacteriana. Entre ellos se cuentan: 1) las penicilinas (penicilina, amoxicilina, ticarcilina y piperacilina), 2) las cefalosporinas (1^{ra} generación: cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefradina; 2^{da} generación: cefaclor, cefamandol, cefuroxima; 3^{ra} generación: cefpodoxima, cefoperazona, ceftibuteno, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima; y 4^{ta} generación: cefepima), 3) las cefamicinas como cefoxitina, 4) los monobactams (aztreonam), 5) los carbapenems (imipenem y meropenem), y 6) un grupo con escasa actividad antibacteriana pero capaz de inhibir las β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam)⁹⁸

2.2 Estructura

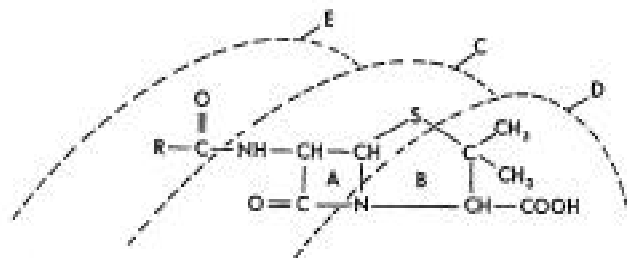
La estructura química básica de cada una de las seis clases principales de β -lactámicos se ilustra en la figura 1. Así: a) las penicilinas poseen una estructura bicíclica, el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), un dipéptido cerrado en forma de ciclo que se forma por la condensación de L-cisteína y D-valina, resultando en un anillo β -lactámico y un anillo tiazolidínico; b) las cefalosporinas, tienen un núcleo que es un derivado de los mismos aminoácidos que el 6-APA, pero uno de los grupos metilo de la valina se incorpora al anillo tiazolidínico, por lo que éste contiene seis elementos en lugar de los cinco que contenía el anillo de las penicilinas, a éste se le denomina ácido 7-aminocefalosporánico; c) las cefamicinas, muy relacionadas a las cefalosporinas, poseen en la posición 7 un grupo β -metoxi ($-\text{OCH}_3$); d) el ácido clavulánico, su esqueleto difiere de las penicilinas en la sustitución de un oxígeno por un átomo de sulfuro; e) los carbapenems, se diferencian de las penicilinas porque existe una sustitución de un átomo de carbono (CH_2) por un átomo de sulfuro del anillo tiazolidínico; y f) los monobactams, que son compuestos monocíclicos donde un grupo de ácido sulfónico, en lugar de un anillo fusionado, permite que el anillo β -lactámico sea activo^{38,58}.

Unida a cada una de estas estructuras básicas se encuentra una cadena lateral acílica variable (grupo R). Estas diferentes cadenas laterales influyen en el grado de actividad, espectro, propiedades farmacológicas y resistencia a las β -lactamasas.

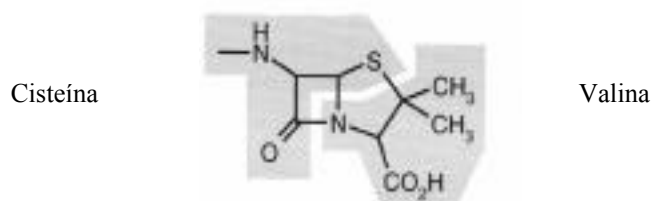
Fig. 1: Estructura de los β -lactámicos

a) Estructura de la penicilina

- A, β -lactámico
- B, anillo tiazolidínico
- C, fragmento procedente de la L-cisteína
- D, fragmento procedente de la D-valina
- E, grupo acilo

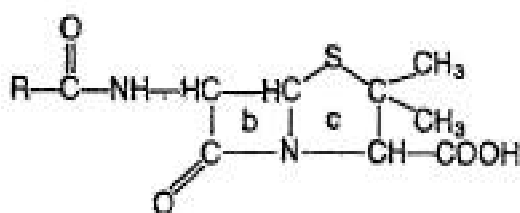


b) Acido 6- β -aminopenicilánico

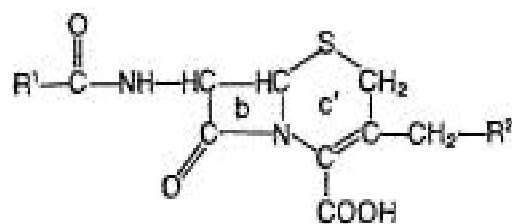


c) Estructura básica de los antibióticos β -lactámicos

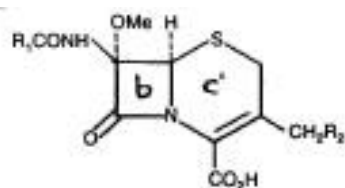
Penicilinas



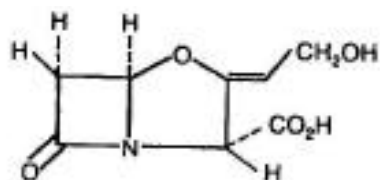
Cefalosporinas



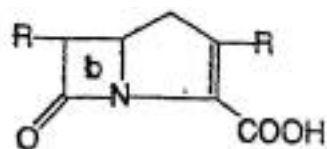
Cefamicinas



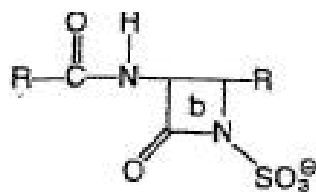
Acido clavulánico



Carbapenems



Monobactams



R o R¹ o R², las diferentes cadenas laterales

b, anillo β -lactámico

c, anillo tiazolidínico

c', anillo tiazolidínico

c'', anillo dihidrotiacínico

2.3 Mecanismo de acción de los β -lactámicos

Los β -lactámicos son agentes bactericidas de efecto lento. La eficacia está más relacionada con el tiempo de actuación que con la concentración de antibiótico en el medio. Su mecanismo de acción consiste en el bloqueo de la actividad transpeptidasa, carboxipeptidasa, endopeptidasa o transglucosilasa de las proteínas fijadoras de penicilina (*Penicillin binding proteins*, PBP) con la consiguiente inhibición o disminución de la síntesis de la capa de peptidoglicano^{98,154}.

Los antibióticos que contienen un anillo β -lactámico se comportan químicamente como agentes acilantes, que reaccionan para producir derivados peniciloicos. Se ha propuesto que la penicilina actuaría como análogo del sustrato de las PBP, acilando el sitio activo de la enzima con formación de un complejo inactivo bastante estable. La similitud estereoquímica de estos antibióticos (el grupo amida en el anillo β -lactámico) con la secuencia terminal del pentapéptido de la mureína (el dipéptido D-alanil-D-alanina) les permite interactuar con las PBP situadas en la superficie de la membrana plasmática bacteriana, moléculas encargadas de modelar la configuración definitiva de la capa de peptidoglicano (en esta etapa, entre las cadenas lineales adyacentes de peptidoglicano se producen ligaduras cruzadas, existiendo sólo una única unión cruzada entre una cadena peptídica lateral y otra, mediante un puente peptídico), además de guiar su reorganización durante la división de las bacterias. El último estadio de la síntesis de la pared celular ha sido identificado como la fase durante la cual los compuestos β -lactámicos interfieren en forma competitiva, en la actividad de las PBP.

La inhibición de las reacciones de biosíntesis por antibióticos β -lactámicos está acompañada por cambios morfológicos característicos. Las diferencias morfológicas observadas, se deben a la PBP que resulta afectada. Cuando las bacterias se desarrollan en presencia de penicilina se acumulan intermediarios de la síntesis de la pared celular, nucleótidos de uridina sin uniones cruzadas, y las nuevas paredes no se pueden formar y la bacteria muere por efecto osmótico o digerida por enzimas autolíticas, que se activan como consecuencia del bloqueo de la función de una o varias PBP⁸⁸. Sin embargo el mecanismo preciso por el cual estos agentes lisan las bacterias sensibles continúa siendo poco claro⁵⁸.

2.4 Evolución histórica

2.4.1 Las penicilinas

El primer miembro de los β -lactámicos, la penicilina, se obtuvo en 1928 de una cepa del género *Penicillium notatum*. La utilidad de esta penicilina natural, bencilpenicilina (penicilina G), esta en función de su espectro antibacteriano relativamente reducido:

cocos grampositivos, espiroquetas y unos cuantos organismos gramnegativos (sobre todo, *Neisseria*). Con el tiempo, se llevaron a cabo modificaciones semisintéticas. Un grupo de estos productos, en el que se encuentran la oxacilina, es resistente a la β -lactamasa estafilocócica. Hay otro grupo de penicilinas semisintéticas que presenta un espectro ampliado frente a gramnegativos, las aminopenicilinas: ampicilina y amoxicilina. En la ampicilina el grupo amino de la cadena lateral mejora la penetración a través de la membrana externa, cargada negativamente; pero este antibiótico presenta sólo la mitad de actividad que la bencilpenicilina frente a los organismos grampositivos, siendo también sensible a las β -lactamasas. La amoxicilina se absorbe mejor que la ampicilina. El desarrollo de derivados carboxi y ureidos de la ampicilina ha conducido a la introducción de agentes con mayor actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*. Las carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina) además son más activas contra cepas de *Enterobacter*, *Serratia* y ciertas cepas de *Proteus*. Las ureidopenicilinas, la piperacilina, son más inhibitoras para *P. aeruginosa*. Desgraciadamente, todas las penicilinas siguen siendo sensibles a las β -lactamasas. Existen otros compuestos con el anillo β -lactámico de las penicilinas, pero en las que el anillo tiazolidínico se ha suprimido o se ha sustituido por otro. El grupo más importante de estos compuestos son las cefalosporinas⁵⁹.

2.4.2 Las cefalosporinas

En 1945 se aisló el primer antimicrobiano cefalosporánico de cultivos del hongo *Cephalosporium acremonium* al que se denominó cefalosporina C. La primera cefalosporina útil fue la cefalotina, que posee un espectro antimicrobiano algo más amplio que el de la penicilina. Este compuesto y su pariente próximo, la cefazolina (denominadas genericamente cefalosporinas de 1^{ra} generación), se utilizan ampliamente en clínica. Los derivados que se obtuvieron a continuación, las cefalosporinas de 2^{da} generación (por ejemplo cefuroxima), presentaron un amplio espectro frente a los organismos gramnegativos productores de β -lactamasas, pero menor actividad que los agentes de primera generación contra los grampositivos, siendo muy utilizados en los tratamientos empíricos y en el caso de las cefamicinas (cefexitina) en infecciones mixtas dado su actividad frente a anaerobios. El avance de la industria farmacéutica

hace que se desarrolle nuevos β -lactámicos, así se introducen las cefalosporinas de tercera generación (C3G) en 1978 en Europa, y en 1981 en los Estados Unidos de Norteamérica. Las denominadas C3G aparecieron a lo largo de los años 80, y la primera cefalosporina comercializada fue la cefotaxima y un poco más tarde la ceftriaxona, derivados con eficacia mejorada frente a organismos gramnegativos. En los últimos años se han desarrollado las denominadas cefalosporinas de cuarta generación, como el cefepime⁸⁸.

2.4.3 Los carbapenems

Los carbapenems se obtienen de la tienamicina, una sustancia antibiótica extraída de los cultivos de *Streptomyces catleya*, en 1976. A partir de este núcleo se obtuvo por síntesis la formidoil-tienamicina con actividad antibacteriana mucho mayor que los demás antibióticos β -lactámicos. El primer derivado que se utilizó, el imipenem, tiene un espectro antibacteriano excepcionalmente amplio; se une con extraordinaria afinidad a la PBP2, 1a y 1b, por ello su acción antimicrobiana conduce a la producción de células bacterianas esféricas que se alisan con rapidez y facilidad. La acción sobre los grampositivos abarca prácticamente a todos los patógenos, tanto los cocos como bacilos. Casi todos los bacilos gramnegativos son sensibles incluyendo la mayoría de las cepas resistentes a los demás β -lactámicos. También son activos frente a las bacterias anaerobias^{38,59}.

2.4.4 Los monobactams

Los monobactams son producidos por bacterias telúricas. El primer monobactámico se obtuvo de una cepa de *Chromobacterium violaceum*, en 1978. De allí se derivó sintéticamente, el aztreonam. Este antimicrobiano es muy estable a la hidrólisis de las β -lactamasas bacterianas y además presenta una cierta especificidad por las PBP-3, proteína que interviene en la división bacteriana y cuando es bloqueada por acción de los antibióticos se generan bacterias filamentosas sin septos. Su espectro se limita a bacterias gramnegativas aerobias y anaerobias facultativas, incluyendo enterobacterias, *P. aeruginosa*, *Haemophilus* y *Neisseria*¹⁵³.

2.4.5 Inhibidores de las β -lactamasas

Al margen de los esfuerzos dirigidos a reducir la sensibilidad de los β -lactámicos frente a las diversas β -lactamasas, también se ha abordado el problema de otra forma, consistente en inactivar irreversiblemente la enzima mediante sustratos que, aunque carecen de actividad bactericida, presentan una alta afinidad por la misma, como el ácido clavulánico (un oxa- β -lactámico) o el sulbactam (una sulfona del ácido penicilánico). Cuando se administran asociados a otro β -lactámico con actividad bactericida (habitualmente la amoxicilina), estos compuestos aumentan la eficacia antimicrobiana frente a organismos productores de β -lactamasas. El uso extensivo de los inhibidores de β -lactamasas como el clavulanato, el sulbactam y el tazobactam y de cefalosporinas estables a β -lactamasas, particularmente en las unidades de cuidados intensivos, puede actuar como un factor de presión selectiva que facilite la emergencia de enterobacterias oportunistas y producir serias infecciones.

3) Resistencia antimicrobiana

Las bacterias se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza. Así, todas las superficies cutáneo mucosas del hombre (piel, vías respiratorias, digestiva y genital) se hallan revestidas por numerosos y diversos microorganismos, fundamentalmente bacterias. La concentración y diversidad de estos dependen del territorio evaluado. En los pacientes sometidos a tratamiento antibiótico, se pueden producir cambios en el tipo de bacterias de la flora normal y las proporciones entre éstas, así como un incremento de las especies autóctonas resistentes a los antibióticos. Muchas de las cepas resistentes tienen notable capacidad de dispersión y pueden causar infecciones oportunistas.

Desde el descubrimiento del primer antibiótico, la penicilina, por Alexander Fleming en 1928 hasta la fecha se ha sucedido enormes y profundos cambios en este campo. En primer lugar el uso de antibióticos supuso una revolución médica, sin precedentes, en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, pero a su vez rápidamente aparecieron bacterias que adquirieron resistencia con los consiguientes fracasos terapéuticos. A los 6 años de la introducción de la bencilpenicilina, por ejemplo, la frecuencia de resistencia

de los estafilococos en los hospitales británicos aumentó desde menos de un 10% hasta más de un 60%, y hoy es de un 90% a nivel mundial¹⁰¹.

Sin embargo, en otros casos, como en el de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo grupo A), nunca han desarrollado resistencia a la penicilina y aún quedan varios tipos de antibióticos para la infección estreptocócica.

3.1 Mecanismos de resistencia

En general la resistencia bacteriana puede darse por cuatro mecanismos, estos son: a) alteración de la diana del antimicrobiano, ya sea por reducción o eliminación de la afinidad del antibiótico por la molécula sobre la cual ejerce su efecto; b) disminuyendo la cantidad de antibiótico que accede a su diana por alteración de la permeabilidad lo que modifica la entrada del antibiótico o por aumento de la eliminación del antibiótico mediante un sistema de bombeo; c) mecanismo enzimático, destruyendo o inactivando el antibiótico; y d) desarrollando vías metabólicas alternativas, resistentes al antibiótico. De estos mecanismos tres de ellos son los causantes de la resistencia a los β -lactámicos: alteración o reemplazamiento de las dianas, que en este caso son las PBP; mecanismo de eflujo o expulsión del antibiótico; disminución de la permeabilidad por reducción de las porinas; y producción de β -lactamasas⁸⁹. Uno de los más extendidos entre las especies de *Enterobacteriaceae* es la inactivación enzimática.

3.2 Introducción a la genética de la resistencia

3.2.1 Resistencia natural y resistencia adquirida

Todas las propiedades de la célula microbiana incluyendo la resistencia a los antimicrobianos, están determinados por el genoma microbiano, el cual se encuentra en la célula en tres tipos de elementos genéticos: el cromosoma, los plásmidos, y los bacteriófagos lisógenos.

La resistencia bacteriana puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es la resistencia natural que poseen algunas especies bacterianas. Esta resistencia natural puede deberse a disponer de una membrana externa que haga de barrera natural impermeable ante el antibiótico; a la falta de sistemas de transporte para ese antimicrobiano; a un mecanismo de eflujo detoxificante; a la falta de la molécula diana que permita combinarse con el antibiótico para que éste ejerza su actividad; o a la presencia de enzimas inactivantes.

De otro lado, la resistencia adquirida se produce por alguno de los mismos mecanismos por los que tiene lugar la resistencia natural y se adquieren por: 1) mutación y selección (evolución vertical); 2) transferencia de fragmentos de ADN que codifican la resistencia entre cepas y especies (evolución horizontal).

3.2.2 Evolución vertical y horizontal

La variabilidad genética es esencial para que la evolución microbiana pueda ocurrir. Los agentes antimicrobianos ejercen una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas, favoreciendo a aquellos microorganismos capaces de sobrevivir a ellos. Entonces a partir de un genoma se pueden seleccionar las variaciones génicas más adecuadas para adaptarse a un ambiente. Muchas variaciones pueden ser letales o perjudiciales en condiciones normales, pero si cambia el ambiente alguna variación puede resultar ventajosa. Frente a los antibióticos las bacterias han respondido, según su estrategia, seleccionando individuos que poseen mecanismos de resistencias. Las bacterias que habitan en ambientes naturales donde existen organismos productores de antibióticos han podido adquirir resistencias de esta forma desde hace mucho tiempo¹⁷².

3.2.2.1 Evolución vertical

La evolución vertical se produce bajo una selección característica de la evolución darwiniana, es decir, se da por un principio de selección natural: una mutación espontánea en el cromosoma bacteriano puede conferir resistencia a uno o varios antimicrobianos en al menos un miembro de la población bacteriana. Estas mutaciones

generalmente envuelven sustituciones, deleciones, o adiciones de una o unas pocas pares de bases. Tales errores se dan al azar y espontaneamente y son independientes de la presencia o ausencia de un antibiótico en particular⁶⁷.

Gracias a que la división celular ocurre con gran eficacia, las bacterias pueden originar un gran número de individuos ligeramente diferentes debido a la variabilidad intrínseca de la replicación del material genético. En el cromosoma bacteriano las mutaciones son el resultado de errores en el proceso de replicación del ADN y pueden ocurrir con una frecuencia de aproximadamente en 10^{-8} por división celular. La mayoría de mutaciones son reparadas sin que ha la célula le conlleve ningún cambio, pero cuando se producen, como el crecimiento bacteriano, tomando como ejemplo *E. coli*, se da hasta alcanzar una densidad poblacional de 10^9 células, cada mutante puede ser desarrollado en una sola generación en 15 a 20 minutos de crecimiento bacteriano. Sin presión selectiva es muy difícil que se fije una mutación en la población, pero la sólo influencia de un antibiótico tiende a seleccionar el mutante resistente, en tal situación la cepa salvaje sensible (no mutante) será eliminada por el antibiótico, mientras que los mutantes resistentes sobreviven y proliferan hasta llegar a ser el tipo predominante.

Así, a modo de ejemplo, puede citarse a la familia de β -lactamasas tipo TEM. A partir de un ancestro común la β -lactamasa TEM-1 o la TEM-2, codificados por los genes *bla*_{TEM-1} y *bla*_{TEM-2} (ambos difieren únicamente en un nucleótido), han evolucionado incorporando mutaciones puntuales en regiones cercanas a los centros activos. Estas mutaciones alteraran la actividad enzimática de TEM-1 y TEM-2 ampliando su espectro de actividad y confiriendo a la bacteria portadora una mayor resistencia a β -lactámicos que la bacteria portadora de la enzima ancestral.

3.2.2.2 Evolución horizontal

La evolución horizontal es la adquisición de genes de resistencia a partir de otro microorganismo no parental. El mecanismo por el cual se establece este tipo de resistencia es variado, pero con frecuencia las bacterias con genes de resistencia donan estos genes a otras bacterias a través de varios procesos de intercambio genético propios

de las bacterias. Estos genes se pueden transmitir fuera del propio linaje, de esta forma, una bacteria resistente a un antibiótico puede hacer llegar este gen de resistencia a otra que no necesariamente tiene que ser de la misma especie ni género.

Esta adquisición de la variabilidad genómica, es debida a la adquisición de ADN foráneo llevado por plásmidos, bacteriofagos, secuencias de ADN libre o por elementos genéticos transponibles como los transposones¹³⁸. Los mecanismos responsables de esta adquisición de ADN foráneo son la conjugación, la transducción y la transformación.

Conjugación, es el proceso por el cual el ADN plasmídico se transfiere de una bacteria donante a una bacteria receptora, implica un contacto real entre célula y célula. En las enterobacterias la conjugación es un proceso que se da con cierta facilidad y al que se le ha atribuido un gran papel en la diseminación de genes de resistencia, un ejemplo puede ser la diseminación de las β -lactamasas, muchas de las cuales están codificadas en plásmidos conjugativos.

Transducción, consiste en la transferencia del material genético de una bacteria a otra usando como vector un bacteriófago. Tras la infección del microorganismo por el bacteriofago, el ADN viral se inserta en el ADN cromosómico de la bacteria. Al iniciar el ciclo lítico del bacteriofago, el genoma vírico se escinde del cromosoma bacteriano pudiendo llevar consigo parte de este cromosoma. Se forman nuevas partículas virales en cuyo genoma se encuentran segmentos del cromosoma bacteriano. Cuando infecta al siguiente hospedador inserta su genoma en el de la nueva bacteria incorporando también secuencias del anterior.

Transformación, permite la adquisición y la incorporación de ADN exógeno desnudo. Implica la liberación de ADN en el medio por lisis de algunas células, seguido de la captación directa de este ADN por parte de las células receptoras. Hay microorganismos en los que la transformación tiene lugar con cierta frecuencia, por ejemplo en el caso de los estreptococos, incluyendo *S. pneumoniae*. En estos géneros se ha sugerido que la adquisición de la resistencia a β -lactámicos y quinolonas, se debe a modificaciones de la diana, que son fruto de la recombinación del ADN cromosómico con el ADN foráneo

introducido en la célula como ADN libre. El fruto de esta recombinación es la creación de unos genes en forma de mosaicos (en el caso de las resistencias a β -lactámicos en el gen de las PBP y en el caso de la resistencia a las quinolonas en el gen de las girasas y/o de la topoisomerasa IV).

Así pues la recombinación genética puede seguir a la transferencia del ADN, y de esta forma crearse un nuevo genotipo (recombinante). Cuando existen regiones homólogas del ADN, la recombinación clásica ocurre, tanto entre diferentes plásmidos y entre diferentes plásmidos y el cromosoma. Sin embargo otro tipo de recombinación puede ser la transposición mediada por transposones.

Los transposones, son secuencias de ADN capaces de moverse por si solas (transposición) de un fragmento de ADN a otro. Se caracterizan por presentar extremos con secuencias nucleotídicas invertidas y complementarias (secuencias de inserción), que son reconocidas por la enzima fundamental para saltar o moverse a lo largo del material genético, la transposasa.

Los integrones no se movilizan por si mismos pero tienen gran importancia en relación a la resistencia ya que son pequeños sistemas genéticos modulares, desempeñan una función importante en la adquisición y la diseminación de los genes de resistencia. Están formados por piezas denominadas casete que llevan un gen, o más raramente dos, y son capaces de insertarse o separarse, una tras otra del integron. Tanto si están contenidos en un transposon como si son vehiculados por un plásmido, la estructura básica de los integrones se compone invariablemente de tres elementos clave: en primer lugar, el sitio blanco de las recombinaciones (attI) donde se fijan los casetes; luego un gen que codifica una integrasa (intI) permite recombinar los casetes en el sitio attI; finalmente un promotor (Pant) que controla la expresión de los genes de estos casetes. No solo se transfieren los genes sino que las proteínas que codifican se sintetizan en grandes cantidades, lo que favorece mucho la resistencia. Los casetes pueden ser encontrados insertos en diferentes ordenes y combinaciones^{10,65}.

Dada la variedad de mecanismos de transferencia génica, los genes que confieren resistencia han podido pasar de una a otra bacteria, y este proceso se ha favorecido por el uso masivo de antibióticos desde la segunda mitad del presente siglo¹⁰².

3.3 Control de la resistencia

En general, con los años se han conseguido antibióticos más efectivos, sin embargo los microorganismos encuentran continuamente mecanismos para evadirlos desarrollando resistencias a los mismos. Por un principio de selección, las bacterias desarrollan distintas vías para sobrevivir en la presencia de antibióticos, no sólo gracias a que se reproducen con gran rapidez, sino dada su gran variabilidad genética.

En los últimos años la aparición y difusión de cepas de microorganismos multiresistentes, causantes de infecciones graves, ha reactualizado el concepto de “infección intratable”, recuperado de los tiempos pasados cuando no existían antibióticos eficaces. La mortalidad de pacientes infectados con bacterias resistentes puede incluso doblar a la causada por microorganismos sensibles. El número de muertos directamente relacionados con una respuesta ineficaz a los antibióticos debida a la resistencia microbiana, puede llegar a ser en España de casi 2000 al año⁶. En la pérdida de sensibilidad a un antibiótico intervienen varios factores: el uso indiscriminado de los antibióticos, la prolongación de la hospitalización, el incremento de pacientes inmunodeprimidos y el progreso de las técnicas en medicina resultando en un incremento en el uso de terapias invasivas y artificiales¹⁷².

El uso y abuso de los antibióticos se ha disparado desde la aparición de los primeros, y estos medicamentos encuentran en la actualidad muchas aplicaciones no médicas, encontrándonos frente a un serio problema de salud pública, de escala mundial. Existe un elevado empleo de antibióticos en hospitales y granjas, lo que incrementa los niveles de bacterias resistentes en personas que no reciben el tratamiento, así como en los microorganismos telúricos¹⁸³.

En España se calcula que alrededor de 24 personas por cada 1000 habitantes se encuentran diariamente bajo tratamiento antibiótico⁶¹. En el mundo industrializado sólo se puede acceder a la mayoría de los antibióticos mediante prescripción médica, pero esta restricción no garantiza un empleo correcto. Con frecuencia los pacientes no terminan el tratamiento y almacenan las dosis sobrantes para automedicarse, o medicar a familiares y amigos, en cantidades menores a las terapéuticas. En ambas circunstancias, la incorrecta dosificación no será capaz de eliminar por completo al agente infeccioso y estimulará el crecimiento de las cepas resistentes, que luego podrán producir trastornos de difícil tratamiento. En los países en vías de desarrollo existe un control aún menor sobre el empleo de los antibióticos. Se pueden comprar sin prescripción médica muchos de los fármacos, y aunque se compra poco por la falta de dinero, la calidad de los mismos muchas veces es mala. Esto aumenta las resistencias y una vez aparecidas las bacterias resistentes se multiplican y, a falta de tratamientos apropiados, se vuelven endémicas. Entonces cuando aparecen los problemas clínicos de resistencia en estos países, que normalmente no tienen acceso a medicamentos caros, pueden faltar las alternativas terapéuticas¹⁸².

Los mismos medicamentos que se prescriben para terapia humana encuentran amplia aplicación en la ganadería y en la agricultura. En la ganadería algunos antimicrobianos se dan para estimular el crecimiento, aunque el mecanismo no está claro, pero la exposición prolongada a dosis bajas es la fórmula perfecta de seleccionar una cantidad creciente de bacterias resistentes en los animales tratados, que luego pasarán a los cuidadores y, más ampliamente, a los que preparen o consuman la carne sin cocinar. En agricultura los antibióticos se aplican en forma de aerosoles en hectáreas de árboles frutales. De nuevo, las bacterias llegarán al hombre a través de la cadena trófica y pueden colonizar el tracto digestivo una vez digerido el alimento. Se ha detectado cepas multirresistentes en enterobacterias, *Pseudomonas* y otras bacterias aisladas en aguas residuales.

El control de la resistencia a antibióticos a escala internacional exige la cooperación entre países y la concertación de esfuerzos por educar a la población sobre las resistencias a los antibióticos y el impacto de un uso inapropiado de los fármacos. El

fenómeno es mundial e incluye todos los gérmenes patógenos para el ser humano y todas las clases de antibióticos. Aunque el problema de la resistencia bacteriana es mundial, existen una serie de puntos clave, de patógenos problema que marcan la situación actual, en cuanto que, son aquéllos en que la respuesta a antimicrobianos se ha modificado y deteriorado de forma más grave y significativa, condicionan con mayor frecuencia fracasos terapéuticos o son los patógenos en que se hallan más reducidas las posibilidades de tratamiento y otros como en el caso de las *Enterobacteriaceae* donde el problema no es grave pero requiere ser vigilado para que no se convierta en un problema mayor, como ya lo es la resistencia a la vancomicina en *Staphylococcus aureus*.

4) β -lactamasas

Hoy se sabe que en muchas bacterias la resistencia a los antibióticos, se produce por la acción simultánea de varios mecanismos; pero para los antibióticos β -lactámicos, en las enterobacterias el más importante por su frecuencia y eficacia es la producción de β -lactamasas (penicilinasas y cefalosporinasas), que son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico, inactivándolo.

4.1 β -lactamasas en grampositivos y gramnegativos

Las β -lactamasas de los microorganismos gramnegativos difieren en muchos aspectos de las enzimas de las especies grampositivas, pero fundamentalmente en su localización. La gran cantidad de β -lactamasa (dependiente de la densidad poblacional) que las especies grampositivas liberan al medio extracelular, da como resultado un efecto poblacional. En contraste, la localización y permanencia de la enzima en el espacio periplasmático de las especies gramnegativas, restringe la acción de la β -lactamasa hasta después de que el β -lactámico ha penetrado al espacio periplásmico, por lo tanto el nivel de resistencia es una propiedad individual de cada célula y depende de la competencia que se establece entre las velocidades de penetración del antibiótico y de inactivación¹¹⁴.

En la actualidad existen más de trescientas β -lactamasas diferentes, tanto en microorganismos grampositivos como en gramnegativos^{30,97}.

4.2 Origen de las β -lactamasas

Las β -lactamasas, probablemente derivan de diferentes PBP, con las que guardan homología secuencial y estructural. Es posible que su función natural originaria fuera la de participar en la biosíntesis de la pared o la de evitar la autolesión en los microorganismos que producen naturalmente antibióticos β -lactámicos; por lo que no es de extrañar que se hallen codificadas en el cromosoma de diversas bacterias dado su significado funcional. A través de elementos móviles como plásmidos, transposones y otros pueden difundir largamente entre las bacterias, manteniéndose por la presión selectiva de los antibióticos utilizados por el hombre.

4.3 Modo de acción de las β -lactamasas

Las β -lactamasas se unen al antibiótico formando un complejo reversible no covalente; el grupo éster del anillo β -lactámico es acilado por el grupo hidroxilo libre del residuo de serina, que es el sitio activo de la enzima; finalmente hay un proceso de hidrólisis por el cual se reactiva la enzima y se libera el antibiótico inactivo^{87,89}.

4.4 Detección y caracterización de las β -lactamasas

Aunque el patrón de resistencia de una enterobacteria puede orientar respecto al tipo de β -lactamasa presente, reconocerlas basándose en el patrón de resistencia requiere una gran experiencia y aún así es difícil, por la posibilidad de la hiperproducción de una enzima, que modifica el espectro de resistencia en relación con su expresión basal o la presencia simultánea de más de una β -lactamasa plasmídica o de otros mecanismos de resistencia no enzimáticos asociados (permeabilidad, eflujo).

Por eso para identificar la β -lactamasa, junto al patrón fenotípico de resistencia, es necesario estudiar su punto isoelectrico (pI), sus parámetros cinéticos: velocidad de

hidrólisis sobre el antibiótico (K cat) y la afinidad por él (Km). Posteriormente pueden caracterizarse mediante sondas genéticas o por PCR con iniciadores específicos, para poder determinar con elevado nivel de probabilidad la (las) enzima presente, que en algún caso puede confirmarse aplicando técnicas de restricción sobre los amplicones, aunque en otros su determinación precisa requiere la secuenciación.

4.5 Codificación de las β -lactamasas

Las β -lactamasas pueden ser codificadas por genes cromosómicos y plasmídicos y a su vez encontrarse en otras estructuras móviles como transposones o integrones. Los plásmidos se transfieren entre los diferentes géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae*, propagándose también a los bacilos gramnegativos pertenecientes a otras familias (*Pseudomonadas*, *Vibrionaceae*, etc.). Los genes que las codifican son los genes *bla*^{3,30}.

La expresión de algunas β -lactamasas es constitutiva, mientras que otras son inducidas por la exposición al antibiótico. Las β -lactamasas cromosómicas endógenas, que confieren bajo nivel de resistencia, están muy difundidas entre las bacterias.

4.6 Clasificación de las β -lactamasas

Las β -lactamasas han sido descritas desde los años cincuenta hasta la actualidad²⁹. La primera β -lactamasa descrita, era una enzima capaz de hidrolizar la penicilina y fue publicada en Nature en 1940¹⁰¹. Conforme se han ido detectando nuevas β -lactamasas se han intentado clasificar. Las primeras clasificaciones se basaron en el perfil del sustrato, en el punto isoeléctrico, en el peso molecular, en la capacidad de la enzima de ser inducible o no y en la localización del gen productor de la enzima ya sea en el cromosoma o en el plásmido. Así, Sawai y col. en 1968¹⁵², describen penicilinasas y cefalosporinasas; Richmond y Sykes en 1973¹⁴², clasifican las enzimas en cinco grupos según su perfil de sustrato; Sykes y Matthew en 1976¹⁶⁷, enfatizan en las β -lactamasas plasmídicas que podían ser diferenciadas por su punto isoeléctrico; Mitsuhashi y Inoue en 1981¹⁰⁰ añaden la categoría de β -lactamasas que hidrolizan la cefuroxima. Más

recientemente, el poder saber la secuencia aminoacídica de algunas β -lactamasas, junto con sus propiedades enzimáticas han liderado la clasificación de estas enzimas: Ambler, 1980² y Jaurin y cols. en 1981⁷³ clasifican las enzimas en cuatro clases según su estructura molecular A, B, C y D; Bush en 1989²⁹, incluye enzimas producidas por toda clase de bacterias y es el primer esquema que trata de correlacionar las propiedades del sustrato y del inhibidor con la estructura molecular; Bush, Jacoby y Medeiros en 1995, revisan la anterior clasificación³⁰. Esta última clasificación se basa en la relativa actividad de las β -lactamasas, frente a la cefaloridina, cefalosporinas de espectro ampliado, benzylpenicilina, carbenicilina, oxacilina e imipenem, y la sensibilidad a los inhibidores como la cloxacilina, aztreonam y clavulánico; reconoce cuatro clases mayores de β -lactamasas, una de las cuales, el grupo 2, el más numeroso y heterogéneo, se ha subdividido en 8 subgrupos⁸⁷ (Tabla 1).

Las tres clases de enzima (según Ambler) tanto la A, como la C y la D son enzimas cuyo centro activo es la serina, mientras la clase B son las enzimas que comprenden metaloenzimas en las cuales los átomos de Zn^{2+} interactúan con un residuo de cisteína y tres residuos de histidina, probablemente en el sitio activo o parte de este³³. Las β -lactamasas de la clase A, las cuales preferentemente hidrolizan las penicilinas, contienen entre 260 y 270 residuos de aminoácidos. Esta clase incluye las β -lactamasas de *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces albus* G, *Bacillus licheniformis*, y, de las bacterias gramnegativas con β -lactamasas mediadas por plásmidos tales como TEM-1 y SHV-1². Sólo unas pocas enzimas han sido asignadas a la clase B, tales como las β -lactamasas del tipo II de *Bacillus cereus* y la β -lactamasas LI de las *Pseudomonas maltophilia*⁸⁹. Las β -lactamasas de la clase C, las cuales contienen entre 360 y 370 aminoácidos, son representados por la β -lactamasa cromosómica de *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens* y *P. aeruginosa*. Las β -lactamasas de la clase D, comprenden las β -lactamasas plasmídicas mediadas por las enzimas OXA-1 a OXA-19, son similares en tamaño a las enzimas de la clase A y preferentemente hidrolizan la oxacilina. A diferencia de lo que existe entre aquellas enzimas OXA, donde hay cierta homología entre ellas, dentro de la clase A y C, la homología es muy poca⁸⁷.

Tabla 1 - Clasificación esquemática de las β -lactamasas

Grupo ^a	Inh. clavulán ^b	Sustrato preferente	Genes ^d	Enzimas representativas
1 (C)	N	Cefalosporinas	Croms Plasm	Enzimas cromosómicas de bacterias gram negativas MIR-1, MOX-1, FOX-1, CMY-2
2a (A)	S	Penicilinas	Croms /Plasm	Penicilinasas de bacterias gram positivas
2b (A)	S	Cefalosporinas de 1 ^o generación, penicilinas	Plasm Croms /Plasm	TEM-1, TEM-2, SHV-1, OHIO-1, ROB-1 SHV-1 (cromosómica en <i>K. pneumoniae</i>)
2be(A)	S	Cefalosporinas 1 ^o - 3 ^o generación, penicilinas y monobactámicos	Plasm Croms	TEM-3 a TEM-29, TEM-42, TEM-43, TEM-46 a TEM-50, TEM-52 a TEM-58, TEM-60 a TEM-63, TEM-66 a TEM-72, TEM-75, TEM-80 a TEM-90, SHV-2, SHV-2a, SHV-3 a SHV-30, TOHO-1, TOHO-2, CTX-M-1 a CTX-M-9, PER-1, PER-2 K1 (cromosómica de <i>K. oxytoca</i>)
2br(A)	N	Penicilinas, inhibidores de - lactamasas	Plasm	TEM-30 a TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, TEM-76 a TEM-79
2c (A)	S	Cefalosporinas 1 ^o - 3 ^o generación, penicilinas, carbenicilina	Plasm	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d (D)	S ^c	Penicilinas, cloxacilina	Plasm Croms	OXA-1 a OXA-19 <i>Aeromonas</i>
2e (A)	S	Cefalosporinas	Croms	<i>Proteus vulgaris</i>
2f (A)	S	Cefalosporinas 1 ^o - 3 ^o generación, penicilina, carbapenemes	Croms	<i>Enterobacter cloacae</i> NMC-A, IMI-1 <i>Serratia marcescens</i> Sme-1
3 (B)	N	Cefalosporinas 1 ^o - 3 ^o generación, penicilina, carbapenemes	Croms Plasm	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> L1, <i>Bacteroides fragilis</i> Ccr-A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IMP-1
4	N	Penicilinas	Croms /Plasm	<i>Burkholderia cepacia</i>

^aLa letra en paréntesis corresponde a la clasificación de Ambler

^bS, -lactamasas que son inhibidas por 10 μ M de ácido clavulánico; N, -lactamasas que no son inhibidas por 10 μ M de ácido clavulánico. ^cLa inhibición por el ácido clavulánico puede ocurrir en altas concentraciones para algunos miembros de este grupo

^dCroms: cromosómicos; Plasm: plasmídicos

Los dos grupos de β -lactamasas plasmídicas más comunes, actualmente con más de un centenar de miembros, y de mayor importancia clínica en *Enterobacteriaceae*, son los de la clase A (en particular las β -lactamasas de los grupos 2b, 2be y 2br, de acuerdo a la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros) y los de la clase C³⁰. Ambos grupos con actividad enzimática que opera ligado al sitio activo de la serina.

4.6.1 β -lactamasas cromosómicas

La mayoría de las enterobacterias, como muchas bacterias de otros grupos, poseen en su cromosoma un gen que codifica una β -lactamasa; existe especificidad entre la especie bacteriana y el tipo de β -lactamasa.

En algunas especies como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *C. diversus* y *Yersinia enterocolitica* (y en la mayoría de las cepas del género anaerobio *Bacteroides*), la β -lactamasa cromosómica es de clase A (sensible al ácido clavulánico); se expresa a niveles bajos, que resultan escasamente operativos, ya que la exigua cantidad producida no es suficiente para inactivar a los β -lactámicos o sólo afecta a los más lábiles como la ampicilina. Este es el caso de SHV-1 de *K. pneumoniae* y K1 en *K. oxytoca*. Sin embargo, estas enzimas son inducibles, excepto en *Klebsiella*, por lo que se puede incrementar su producción basal durante el tratamiento.

Otro grupo de enterobacterias poseen β -lactamasas cromosómicas de la clase C: *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *C. freundii* y *M. morgani*, (y *P. aeruginosa*). Estas β -lactamasas, que no son sensibles al ácido clavulánico y, son inducibles (fenómeno reversible) particularmente por cefoxitin e imipenem, se expresan a nivel moderado. Las mutaciones en los genes reguladores pueden implicar una elevada y continua producción (constitutiva) de la enzima (desrepresión, fenómeno irreversible), la cual inactiva a todos los β -lactámicos, excepto los carbapenems. Sin embargo, en presencia de alteraciones en las porinas, que disminuyan la permeabilidad de la membrana externa, los carbapenems también pueden resultar inactivos^{2,29,52,84,85,90}.

Tanto la inducción como la desrepresión, requieren de al menos cinco genes: *ampC*, *ampR*, *ampD*, *ampG* y *ampE*. El mecanismo de regulación de la β -lactamasa cromosómica inducible de clase C, está relacionado con el reciclaje de los muropéptidos. El producto de expresión de *ampR* (AmpR) es una proteína que se une al ADN, en un lugar entre *ampR* y *ampC* (genes contiguos), y en condiciones normales, actúa como represor de *ampC*. En presencia de acumulación de derivados de peptidoglicano (muropéptidos: D-tripéptidos y D-tetrapéptidos), la proteína AmpR cambia a la conformación activadora y permite la expresión de *ampC* produciéndose la β -lactamasa (en presencia de β -lactámicos inductores: inducción; o en mutantes *ampD*: desrepresión). La expresión de *ampC*, se debe a que en el reciclaje de los muropéptidos, quienes se desprenden del péptidoglicano en el espacio periplasmático, ingresan al citoplasma a través de AmpG (producto de expresión de *ampG*, que es una proteína integral tipo permeasa de la membrana interna) y estimulan la conversión a la forma activadora de AmpR. Pero, por la presencia de AmpD (amidasa específica de muropéptidos), los muropéptidos son degradados (parte glicosídica: N-acetilglucosamina y N-acetilanhidromureína), de manera que ya no pueden unirse a AmpR. Luego, los oligopéptidos (tri y tetra) son nuevamente glicosilados, activados con UDP y transportados nuevamente al espacio periplasmático donde sirven para reconstituir el péptidoglicano^{91,180}.

E. coli y *Shigella*, poseen una β -lactamasa cromosómica de la clase C, pero producida en cantidades insuficientes para afectar a los β -lactámicos. Tienen un sistema de regulación diferente del mencionado anteriormente (*E. cloacae* y otras); carecen de *ampR* en su genoma cromosómico¹⁷⁹, por lo que expresan constitutivamente *ampC* (no inducible). La eficiencia de transcripción de *ampC* depende entonces de su promotor, de la región del atenuador o del número de copias del gen. Dado que en *E. coli*, *ampC* tiene un promotor débil, mutaciones en éste o en la región del atenuador, tienen como consecuencia un aumento en la tasa de transcripción. También se ha observado que el nivel de expresión de *ampC*, puede estar asociado a un mayor número de copias del gen. Otros factores que provocan un aumento en los niveles de expresión de *ampC*, pueden ser la incorporación de un elemento de inserción conteniendo secuencias promotoras (IS2) o la adquisición de un promotor fuerte, como el de *Shigella*^{32,111}.

Fuera de la familia *Enterobacteriaceae*, en el cromosoma, además de β -lactamasas de las clases A y C se han detectado otras pertenecientes a la clase B (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides fragilis*, *Flavobacterium odoratum*, *Aeromonas hydrophila*) que son carbapenemasas. También se han detectado como cromosómicas aunque no son naturales de la especie, tres más de este tipo que pertenecen a la clase A (grupo 2f). Sme-1 en *S. marcescens* y IMI-1 y NmcA en *E. cloacae*. Se inactivan por el ácido clavulánico, hidrolizan las amino y carboxipenicilinas y aztreonam pero no a las C3G; su actividad frente a los carbapenems es inferior a la de las metaloenzimas (clase B). Se localizan en el cromosoma (NmcA es inducible) y no se han encontrado en su entorno estructuras compatibles con transposones o integrones. También se ha detectado enzimas cromosómicas de la clase D en *Aeromonas sobria*.

En algunas especies del género *Yersinia* se ha descrito la existencia simultánea de más de una β -lactamasa cromosómica.

Por lo que se acaba de exponer, se puede deducir la resistencia natural de las enterobacterias a los antibióticos β -lactámicos, aunque el perfil de resistencia depende, además de la clase, de la cantidad de enzima producida.

Diversas bacterias carecen en su cromosoma de genes codificantes de β -lactamasas como sucede en los estafilococos, estreptococos, enterococos, neisserias (meningococo y gonococo) salmonelas, *P. mirabilis* y *H. influenzae*, por lo que son sensibles a la penicilina y a la ampicilina. En estas bacterias la presencia de una β -lactamasa, que comporta resistencia a esos antibióticos, se debe a la adquisición de un plásmido u otro vector genético externo portador del gen.

4.6.2 β -lactamasas plasmídicas

A los microorganismos se incorporan piezas genéticas (plásmidos o transposones conjugativos) portadoras de genes de β -lactamasas que modifican el perfil de sensibilidad natural de las cepas salvajes de enterobacterias a los antibióticos β -lactámicos. Con gran frecuencia estos vectores portan simultáneamente genes de

resistencia para otros antibióticos como aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfamidas y trimetoprim.

Las β -lactamasas plasmídicas son, generalmente, constitutivas (no inducibles) y su nivel de expresión es variable pudiendo incrementar su producción basal debido a variaciones en la localización del gen y la existencia de multicopias del plásmido o de los genes. Por lo tanto, todas estas enzimas pueden estar producidas a bajo nivel o hiperproducidas.

4.6.2.1 β -lactamasas de amplio espectro clásicas

La mayoría de las β -lactamasas plasmídicas que se encuentran en las enterobacterias, como la TEM-1, TEM-2, SHV-1 y OXA-1 que son las más frecuentes, pertenecen a la clase A. Hidrolizan, y por tanto inactivan, con eficacia decreciente a la ampicilina, ticarcilina, piperacilina y cefalosporinas de primera generación, siendo sensibles al ácido clavulánico. La síntesis de antibióticos como la cefoxitina, la cefotaxima y el aztreonam, que no se inactivan por estas β -lactamasas permitió superar la resistencia de las enterobacterias productoras de esas enzimas.

4.6.2.1.1 β -lactamasa TEM-1

En respuesta al uso clínico y extendido de las penicilinas de más amplio espectro como la ampicilina y la carbenicilina, y de las primeras cefalosporinas aparecidas en los años 60 y principios de los 70, aparecen las β -lactamasas mediadas por plásmidos que comienzan a emerger básicamente entre *Enterobacteriaceae* y otras bacterias gramnegativas. La primera enzima mediada por un plásmido y encontrada en una enterobacteria, fue la TEM-1 aislada en *E. coli* en 1965⁹⁵. El nombre de TEM es una contracción de Temoniera, el nombre de un paciente del que fue aislado. Desde esa época se ha expandido entre un 20 y un 60% entre las enterobacterias; su frecuencia varía con la especie y el lugar^{89,150}. En *E. coli* es la responsable de la resistencia a la ampicilina en cerca del 25% de las cepas¹⁷⁹.

Esta enzima se ha aislado también en cepas de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Desde las enterobacterias esta enzima se expandió a *Haemophilus influenzae* y a *Neisseria gonorrhoeae*. Más tarde se ha observado que en muchas cepas aisladas en clínica se pueden encontrar dos o hasta tres tipos de β -lactamasas mediadas por plásmidos, y en muchos casos se ha visto que la TEM-1 es una de estas β -lactamasas^{44,76}.

También se han observado hiperproducciones de TEM-1 responsables de la disminución de la sensibilidad a la amoxicilina-ácido clavulánico.

4.6.2.1.2 β -lactamasa SHV-1

La SHV es una contracción de sulhidrilo variable, una descripción de las propiedades bioquímicas de esta β -lactamasa. La SHV-1 fue también llamado PIT-2, porque fue por primera vez descrito por Pitton en 1972¹⁴³. La SHV-1 plasmídica ha sido detectada principalmente en *Klebsiella* (además de ser portadora natural de SHV-1 en su cromosoma) entre un 33% y un 94% de las cepas que producen resistencia a la ampicilina¹⁴⁹.

Se han observado hiperproducciones de SHV-1 tanto en *E. coli* como en *K.pneumoniae*. La hiperproducción de la SHV-1 produce una disminución de la sensibilidad a la ceftazidima y a la amoxicilina-ácido clavulánico^{99,185}.

4.6.2.2 β -lactamasas de espectro extendido BLEAS

4.6.2.2.1 β -lactamasas de espectro extendido tipo TEM y SHV

Las C3G son resistentes a las penicilinasas plasmídicas clásicas (TEM-1, TEM-2 y SHV-1)¹⁶⁸. Pero en 1983 y debido al uso intensivo de estos compuestos en el tratamiento de las infecciones en los hospitales, emergió un nuevo tipo de resistencia a aquellos antibióticos¹²⁸. Fue en la República Federal de Alemania donde se detectó por primera vez en cepas de *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *S. marcescens*, una β -lactamasa plasmídica capaz de hidrolizar a las C3G, que se denominó SHV-2 por su similitud

con SHV-1³. Después de ese primer aislamiento han aparecido en los cinco continentes, sobre todo en el género *Klebsiella* inicialmente, poco después en *E. coli* y luego progresivamente en las demás enterobacterias.

Las BLEAs derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, se inactivan por el ácido clavulánico al que suelen ser aún más sensibles que las propias β -lactamasas de las que se derivan, pero expanden su espectro de acción hidrolizando las cefalosporinas de segunda y tercera generación y al aztreonam, sin afectar a la cefoxitina (cefamicina) ni al imipenem (carbapenem). En general, la eficiencia catalítica global de estas variantes suele ser inferior a las de sus parentales lo que en ocasiones se halla compensado por la disposición de promotores más eficientes^{39,70,80,81,158}.

Al estudiar estas β -lactamasas se observó que similares a las β -lactamasas plasmídicas clásicas de la que se derivaban, en las que mínimas modificaciones en su estructura, muchas veces la variación de un sólo aminoácido, (por mutaciones puntuales en los correspondientes genes estructurales) dan lugar a alteraciones muy considerables en su espectro de sustrato, se les denominó β -lactamasas de espectro extendido (BLEA)^{64,79,158}.

El grado de actividad sobre los diferentes β -lactámicos varía según la β -lactamasa implicada, así la TEM-4 por ejemplo actúa sobre cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima en tanto que la TEM-12 y la TEM-26 son fundamentalmente ceftazidimasas, hidrolizando poco la cefotaxima.

Hay otras enzimas de espectro extendido derivadas de la SHV-1. En todas ellas, la acumulación de nuevas mutaciones, sobre mutantes previas, puede incrementar y modificar el espectro de actividad de una β -lactamasa. Por ejemplo en la SHV-2, que se origina de la SHV-1 por la mutación Gly-238-Ser, cuando aparece la mutación Glu-240-Lys se origina la SHV-5; en el caso de SHV-3, que proviene de SHV-2 por la mutación Leu-205-Arg, cuando aparece la mutación Glu-240-Lys se origina la SHV-4, en ambos casos la acción global incrementa la resistencia a la ceftazidima y al aztreonam⁴.

En general estas enzimas han sido encontradas en muchas *Enterobacteriaceae*, sin embargo son predominantes en *K. pneumoniae*. En el caso de los derivados de SHV, esta situación podría estar en relación con el hecho de que la enzima original SHV-1 probablemente se deriva del gen de codificación cromosómica de *Klebsiella*, ya que es idéntica³. Hay sin embargo, menos claridad para los derivados de TEM, ya que el origen de las TEM-1 y 2 no se conoce.

En Inglaterra, Francia y Portugal del 14 al 16% de las BLEAs se detectan en *K. pneumoniae*. Otras *Enterobacteriaceae* también producen BLEAs pero en mucha menor frecuencia. En Francia, por ejemplo del 2 al 3% del total de enterobacterias portadoras de BLEAs son *Enterobacter* spp y *K. oxytoca*, y el 0,1% a *E. coli*. No sorprende que los brotes hallan sido asociados a largas hospitalizaciones, cirugía, o la presencia de catéteres urinarios o arteriales, especialmente en pacientes de las unidades de cuidados intensivos. De hecho también se ha observado la aparición de nuevos mutantes de β -lactamasas de espectro extendido en la misma institución o incluso en el mismo paciente⁸⁶. El tracto gastrointestinal de los pacientes hospitalizados puede actuar como reservorio de estos microorganismos portadores de BLEAs¹⁵⁹.

En la actualidad se conocen 89 BLEAS tipo TEM, 31 tipo SHV y 9 tipo OXA (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>)⁷² pero es difícil cerrar un número porque continuamente se describen nuevas mutantes. Probablemente la diferencia de las políticas en el uso de antibióticos de cada país hace que se distribuya una u otra enzima.

4.6.2.2.2 β -lactamasas de espectro extendido de la familia CTX-M

Un nuevo grupo de reciente aparición y que se ha incorporado a la clase A (subgrupo 2be) son las enzimas del grupo CTX-M. Poseen una afinidad de sustrato muy preferente por la cefotaxima y son susceptibles a la inhibición por inhibidores de β -lactamasas. Sin embargo, su secuencia de proteínas es muy distinta a la de las TEM, SHV u OXA siendo en cambio similar (85% de homología) a la β -lactamasa cromosómica de *K. oxytoca*¹⁴ y recientemente se ha descrito una alta homología con la β -lactamasa de *Kluyvera ascorbata* KluA1 y KluA2. Estas son CTX-M-1 (MEN-1), CTX-M-2, CTX-

M-3, CTX-M-4 CTX-M-5 CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-8, CTX-M-9, TOHO-1 y TOHO-2^{9,13,25,54,69,92,145,175}. Estas enzimas se han aislado en áreas geográficamente distantes como Alemania, Italia, Argentina y España, lo que sugiere una amplia difusión de estas β -lactamasas.

4.6.2.2.3 Oxacilinasas

Otro grupo de β -lactamasas plasmídicas está formado por las OXA (OXA-1 a OXA19) que se han incluido en el grupo D de Ambler. Estas enzimas tienen un perfil de sustrato semejante a TEM-1, TEM-2 y SHV-1; son inactivadas por el ácido clavulánico, pero con mucha menor eficacia que lo son para las β -lactamasas TEM-1, TEM-2 o SHV-1.

En el grupo de enzimas OXA, la más común es OXA-1 la cual está muy distribuida en la familia *Enterobacteriaceae*⁹⁵. En *E. coli* entre un 3 y un 23% de las cepas resistentes a la ampicilina poseen esta enzima. OXA-2 ha sido aislado de *E. coli*, *P. mirabilis*, *Serratia* y *Salmonella*. En las cepas de *Serratia* la enzima es detectada con una frecuencia entre 9 y 25%. OXA-3 ha sido detectada principalmente en *Klebsiella* y menos frecuentemente en *E. coli*. Las enzimas OXA-4 y OXA-7 han sido aisladas en cepas de *E. coli* resistentes a la ampicilina, y OXA-5 y OXA-6 en cepas de *P. aeruginosa* resistente a la carbenicilina.

También se conocen BLEAs derivadas de OXA como OXA-10, OXA-11, OXA-14 a OXA19, pero raramente se han encontrado en enterobacterias; estas enzimas poseen un espectro dominante de ceftazidimasa tienen menor actividad frente al aztreonam y son poco inactivadas por el clavulánico.

La OXA-10 (PSE-2) enzima capaz de hidrolizar la oxacilina en grandes cantidades, ha sido detectada en *P. aeruginosa* y ocasionalmente en *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *P. stuarti*. Estas cepas de *P. aeruginosa* se han aislado en ciertas regiones de Turquía.

4.6.2.3 β -lactamasas resistentes a los inhibidores

Otro grupo de β -lactamasas, conocido desde los primeros años 90, son unas enzimas que no modifican de forma sustancial el espectro de sustratos que hidroliza, pero sí modifican su reconocimiento por inhibidores de β -lactamasas. Se han originado partir de TEM-1 y TEM-2 y son resistentes a los inhibidores de las β -lactamasas como el ácido clavulánico o el sulbactam; se les ha denominado β -lactamasas resistentes a los inhibidores (IRBL), pero también son conocidas como IRT (Inhibitor Resistant TEM). Se conocen varias enzimas con esa actividad (TEM-30 a TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, TEM-76 a TEM-79). Estas enzimas resistentes a los inhibidores, muestran menor actividad hidrolítica frente a todas las cefalosporinas, por lo que no parecen constituir una gran amenaza^{19,27,66,165,186}.

En estas enzimas aparecen cambios de aminoácidos en hasta tres puntos distintos y han sido detectadas principalmente en *E. coli*, *K. pneumoniae* y, más recientemente en *P. mirabilis*³¹. Las posiciones en las que estas modificaciones son más frecuentes son Met 69, Trp 165, Met 182, Arg 244, Arg 275 y Asn 276. Se trata de cambios que no afectan a su espectro, pero reducen de forma notable su sensibilidad a la inhibición por ácido clavulánico y otros inhibidores de β -lactamasas.

También se ha descrito una IRBL, derivada de SHV, la SHV-10, resistente a la acción del ácido clavulánico; de otro lado se ha encontrado un enzima, TEM-50, con una mutación del tipo BLEA y otra IRT, aunque su actividad en ambos sentidos es pequeña.

4.6.2.4 Cefamicinasas

Puesto que las enzimas cromosómicas de clase C se consideraban no transferibles, se pensaba que no tendrían la capacidad de difundir entre especies y géneros distintos, como las β -lactamasas plasmidicas. Sin embargo de un modo progresivo, se ha ido detectado la difusión de plásmidos portadores de diversas β -lactamasas de clase C semejante a las cromosómicas de diversas enterobacterias y pseudomonas, a partir de las cuales probablemente se han originado^{2,74}.

Estas enzimas poseen un amplio espectro, que incluye a todos los β -lactámicos excepto los carbapenems (imipenem y meropenem). Característicamente hidrolizan la cefoxitina y otras cefamicinas (7-alfa-methoxy-cefalosporinas) por lo que se las ha denominado cefamicinasas. No son inhibidas por el ácido clavulánico (excepto MOX-1) y muestran menor actividad hidrolítica frente a las cefalosporinas de cuarta generación, cefepime¹⁵; por tanto, el espectro de hidrólisis y los perfiles de inhibición de estas β -lactamasas son muy semejantes a los de las cromosómicas de clase C con las que guardan grados variables de homología (98-40%). Es interesante señalar que estas β -lactamasas a diferencia de las cromosómicas, generalmente, no son inducibles, expresándose constitutivamente a niveles relativamente elevados y operativos¹⁰⁴. Recientemente, se ha comunicado la detección de una *Salmonella enterica* serovar Enteritidis con una β -lactamasa DHA-1 que es la primera β -lactamasa AmpC codificada por un plásmido que se encontró que era inducible⁷.

En 1989 se detectó en una cepa de *K. pneumoniae* una cefamicinasa codificada por un gen plasmídico a la que se denominó MIR-1¹¹. La comparación de sus características con otras β -lactamasas conocidas resultó en la postulación de que se trataba de la primera cefamicinasa. Esta enzima mostraba un 90% de homología con el gen *ampC* de *E. cloacae*¹²².

En ese mismo año, 1989, se aisló en Seul (Korea del Sur) de una infección de herida, una cepa de *K. pneumoniae* productora de una cefamicinasa a la que se le denominó CMY-1, cuya secuencia nucleotídica fue presentada años más tarde en 1996. Una comparación de la secuencia de aminoácidos demostró un 57.5% homología con el gen *ampC* *P. aeruginosa*, siendo ésta homología la más cercana, con alguna β -lactamasa de clase C cromosómica conocida¹⁶.

El dato de otra cefamicinasa plasmídica, CMY-2, fue publicado en 1990. La secuencia nucleotídica del gen *bla*_{CMY-2} fue presentada en 1992¹³. En los últimos años se han encontrado los genes *ampC* (CMY-2) principalmente en plásmidos conjugativos aislados de *K. pneumoniae* y ocasionalmente en *E. coli*.

Aunque no se ha efectuado una clasificación formal de estas β -lactamasas plasmídicas de clase C, alguna tienen secuencias nucleotídicas y aminoácidas muy parecidas a *C. freundii* (CMY-2, CMY-2b, CMY-3, CMY-4, CMY-5, LAT-1, LAT-2, BIL-1), a *E. cloacae* (MIR-1, ACT-1), y en otros casos, quizás mucho menos evidente, a *P. aeruginosa* (MOX-1, CMY-1, FOX-1), mientras que la filogenia de otras como FOX-2 y FOX-3 no está tan clara^{11,16,17,85,93,96,123,167,177}. Recientemente se ha descrito otra β -lactamasa muy próxima filogenéticamente a la de *M. morgani*, la DHA-1. Lógicamente estos grupos pueden incrementar con el descubrimiento de nuevas β -lactamasas.

El paso de β -lactamasas del cromosoma a plásmidos es probablemente el origen de muchas β -lactamasas plasmídicas (sino de todas), así, aparte de las de la clase C que se acaban de señalar, cabe destacar la homología, previamente comentada, entre la β -lactamasa cromosómica de *K. pneumoniae* con la plasmídica SHV-1 o la cromosómica de *Kluyvera ascorbata* con la plasmídica MEN-1 (CTX-M1) entre otras.

4.6.2.5 Carbapenemasas

Las carbapenemasas son enzimas capaces de hidrolizar los carbapenems: imipenem y meropenem; también se han denominado metaloenzimas (clase B) ya que necesitan Zn^{2+} como cofactor para ser activas y no se inactivan por el ácido clavulánico pero sí por el EDTA. Es el caso de la enzima IMP-1 descrita por primera vez en 1991 en cepas de *S. marcescens* y encontrada ocasionalmente, desde entonces, en enterobacterias y *P. aeruginosa* en Japón. Se trata de una enzima emparentada con las β -lactamasas cromosómicas de *Aeromonas*, *Bacillus* y *Flavobacterium* de las que probablemente haya derivado¹⁵³.

Estas carbapenemasas presentan un perfil de sustrato relativamente semejante hidrolizando todos los β -lactámicos excepto la piperacilina y el aztreonam. Hasta la actualidad estos genes no han difundido a pesar de que se han detectado en transposones e integrones¹³⁷.