

DISCUSSION

De un total de 13,800 cepas de enterobacterias aisladas durante el trienio 1997-1999, en el Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, se han detectado 47 cepas portadoras de BLEAs o cefamicinasas correspondientes a sólo 4 especies bacterianas: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica* y *P. mirabilis*.

Hemos sido conscientes que al inicio de este estudio la presencia de cefamicinasas en microorganismos con  $\beta$ -lactamasas inducibles puede haber sido subestimada. Ambos casos pueden ser confundidos con el patrón de resistencia obtenido en cepas hiperproductoras de la AmpC cromosómica. De hecho, el patrón amoxicilina-ácido clavulánico y cefoxitina resistente, característico de estas  $\beta$ -lactamasas, fue un criterio de exclusión para estas cepas, al asumir que el mecanismo se correspondía a una hiperproducción o desrepresión de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica.

Después de una primera selección, en función del patrón de resistencia por la técnica de difusión y el posterior estudio de la  $\beta$ -lactamasa, tanto fenotípicamente como genotípicamente, se detectó la presencia de BLEAs o cefamicinasas plasmídicas en 35 cepas de *E. coli*; 9 de *K. pneumoniae*; 2 de *S. enterica* y una de *P. mirabilis*. Así, sobre el total de cepas aisladas en el laboratorio, el porcentaje de BLEAs fue 1,83% en *K.pneumoniae* y en menor medida en las otras especies: *E. coli* 0,45%, *S. enterica* 0,1% y *P. mirabilis* 0,1%. En la tabla 23, se resume las cepas con sensibilidad disminuida a las C3G, según año, especie bacteriana, número de aislamientos y tipo de  $\beta$ -lactamasa.

En un estudio efectuado en nuestro hospital en el trienio anterior 1994-96<sup>144,146</sup>, se encontraron 10 cepas de *E. coli* productoras de BLEAs. En *K. pneumoniae* se encontró solamente una cepa productora de BLEA. Comparando ambos trienios, se observa un leve incremento para *E. coli* (de 0,14% a 0,45%) y un incremento mayor para *K. pneumoniae* (de 0,17% a 1,83%); además, de su aparición en otras especies bacterianas como: *P. mirabilis* y *S. enterica*. Estos resultados ponen en evidencia una tendencia creciente en la frecuencia y variedad de cepas con este tipo de mecanismo de resistencia, en la población a la cual sirve el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Este

incremento parece estar relacionado básicamente con dos enzimas diferentes, la enzima SHV-2 y la CTX-M-9. En el primer caso parece que tuvo una mayor incidencia en 1999, mientras que la mayor incidencia de CTX-M-9 fue en 1998.

Las especies más frecuentemente productoras de BLEAs según la literatura son *E. coli* y con mayor frecuencia *K. pneumoniae*. Sin embargo, no son únicas ya que se han descrito en otras, aunque con menor incidencia, como *Serratia marcescens* y *Enterobacter cloacae* entre otras. Una notable excepción es *E. aerogenes* en Francia cuya elevada incidencia de cepas productoras de BLEAs es atribuida a un brote epidémico<sup>40</sup>.

En 1990, se realizó un estudio multicéntrico en España en el que participaron 14 hospitales incluyendo al nuestro<sup>48</sup>. A partir de 1416 cepas de enterobacterias (seleccionadas por presentar sensibilidad disminuida a cefotaxima), entre las cuales había 673 de *E. coli*, 116 de *K. pneumoniae*, 176 de *P. mirabilis* y 7 de *P. stuartii*, entre otros microorganismos, sólo 2 cepas (0,14%) fueron finalmente confirmadas como productoras de BLEAs (1 cepa de *E. coli* y 1 cepa de *P. stuartii*). Este estudio puede considerarse de dimensión nacional y representativo de la frecuencia de BLEAs para ese año. La frecuencia de BLEAs comunicadas en esta Tesis (0,44%), es tres veces mayor a la de 1990. Siendo el nuestro un estudio local, demuestra un aumento en la frecuencia de BLEAs, no sólo respecto a períodos anteriores sino también a lo informado por Fernández-Arániz y cols.<sup>48</sup>. Sería importante la realización de estudios de tipo multicéntrico con protocolo común, en forma periódica, para evaluar la evolución de la creciente frecuencia de las cepas productoras de BLEAs.

Esta tendencia al incremento de la frecuencia de cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de BLEAs, coincide con lo observado en otras partes del mundo. En Francia se han comunicado 1,5%, 0,9% y 3,2% (1990, 1991 y 1998, respectivamente) cepas de enterobacterias productoras de BLEAs<sup>40</sup>. Los menores valores observados para la frecuencia de BLEAs en este estudio (entre 0,25% y 0,58% para 1997-99), demuestran que para la población que se atiende en nuestro hospital, la incidencia es

baja, aunque con una clara tendencia al incremento: 0,14%, 0,25%, 0,49% y 0,58% para los años 1994-96, 1997, 1998 y 1999, respectivamente<sup>144,145</sup>.

Al igual que lo observado en Francia<sup>40</sup>, no se observa un incremento en la producción de BLEAs en *E. coli*. Sin embargo, en ese país se observa un incremento notable en *P. mirabilis* (0% en 1990 a 3,7% en 1998), mientras que nosotros no encontramos ninguna BLEA en esta especie. Para *K. pneumoniae*, en este estudio aumentó (de 0,17% a 1,83%) diez veces la frecuencia observada de cepas productoras de BLEAs, mientras que en Francia<sup>40</sup> afirman no encontrar mayor variación entre los años 1991 (9,6%) y 1998 (9,4%), aún cuando en los años 1994 y 1996 estos valores suben a 22,2% y 17,7%, respectivamente; estos incrementos son considerados puntuales por los autores. Otras especies en la que De Champs y cols.<sup>40</sup>, encuentran BLEAs son: *Enterobacter aerogenes* (53,5%), *Enterobacter cloacae* (6,7%), *Citrobacter koseri* (16,7%) y *Salmonella enterica* (3,1%).

Palucha y cols.<sup>120</sup> en un estudio realizado en el Hospital Praski de Varsovia también señalan un valor muy elevado (16%) respecto al comunicado en esta Tesis (1.83%), para la frecuencia de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEAs; además de encontrarlas de manera igualmente notable en *Citrobacter* (16%) y en *S. marcescens* (32%), especies en las que nosotros no encontramos ninguna BLEA.

En una región más alejada de nuestra área de estudio, como México, también se ha comunicado la presencia de cepas productoras de BLEAs en *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae*<sup>155</sup>. En total encontraron 32 cepas productoras de BLEAs, a partir de 48 cepas (66%). Estos resultados corresponden a cepas aisladas entre 1990 y 1992.

En conclusión la incidencia de BLEAs en enterobacterias puede ser muy variable en función de las regiones y el tiempo de estudio y sobre todo de la inclusión o no de brotes epidémicos que puede hacer incrementar considerablemente este porcentaje. En esta Tesis sólo se han descrito algunos trabajos que estudian la incidencia de BLEAs que se han considerado interesantes de destacar siendo innombrables el número de publicaciones aparecidas al respecto. En nuestro estudio como se ha comentado, la

posible existencia de brotes a sido evaluada, siendo prácticamente descartada en la mayoría de situaciones. Este hecho confiere, si cabe, una mayor importancia a los relativamente bajos porcentajes de BLEAs observadas por ser un reflejo de lo que posiblemente circula a nivel ambulatorio.

Las BLEAs detectadas en nuestra área, independientemente de la especie, pertenecen a dos tipos mayoritarios, y las cefamicinasas a un solo tipo. Nos estamos refiriendo a las enzimas tipo SHV-2 y CTX-M-9 y a la cefamicinasa plasmídica CMY-2. El resto corresponde de forma anecdótica a dos pacientes con BLEAs derivadas de TEM y muy posiblemente una derivada de la otra, la TEM-12 y la TEM-10.

### **1) Cepas productoras de BLEA compatibles con CTX-M-9**

---

Las BLEAs se han intentado clasificar por su capacidad relativa para hidrolizar la cefotaxima y la ceftazidima, aunque estas diferencias no siempre son evidentes. Se denominan ceftazidimasas cuando la CIM es mayor para la ceftazidima que para la cefotaxima (por ejemplo: TEM-5, TEM-6, TEM-7 y TEM-10); y cefotaximasas, cuando la CIM es igual con cefotaxima y ceftazidima (por ejemplo: TEM-3 y TEM-4)<sup>71</sup>. Otro grupo de BLEAs más recientes, presentan una mayor actividad frente a cefotaxima que a ceftazidima. Estas BLEAs pertenecen a una familia que muestra alta homología con la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *K. oxytoca* (Clase A, según Ambler), y mayor aún con la de *Kluyvera ascorbata*, la familia CTX-M y Toho<sup>171</sup>. Estas enzimas también muestran homología con  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *Proteus vulgaris*, *Serratia fonticola* y *Citrobacter diversus*<sup>54</sup>. En todo caso, aún no está claro la relación filogenética que pueda existir entre ellas.

Las cepas productoras de las  $\beta$ -lactamasas CTX-M se descubrieron en 1989 en Alemania<sup>12</sup> y desde entonces, se han aislado cepas productoras de variantes de esta familia en áreas geográficas diversas y muy distantes entre sí. Una nueva variante de las  $\beta$ -lactamasas CTX-M, denominada CTX-M-9, fue descrita por primera vez en nuestro laboratorio en seis cepas aisladas en 1996<sup>145</sup>.

En el trienio 1997-99 se encontraron 27 cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas compatibles con una CTX-M-9. El perfil de sustrato fue el esperado; todas las cepas fueron resistentes a la ampicilina, ticarcilina y piperacilina, mostraron sensibilidad disminuida al aztreonam, C3G (excepto ceftazidima) y cefepime. En efecto, las enzimas mostraron una mayor actividad frente a cefotaxima ( $CIM_{90}=64 \mu\text{g/mL}$ ) que frente a ceftazidima ( $CIM_{90}=1 \mu\text{g/mL}$ ), en 26 de las 27 cepas. Recientemente, se ha señalado que la actividad contra ceftriaxona sería mayor que contra cefotaxima<sup>171</sup>; en esta Tesis no se evaluó cuantitativamente la actividad frente a ceftriaxona. Sin embargo, los datos presentados por Bauernfeind y cols.<sup>12,13</sup>, no confirman la afirmación de Thomson (2000)<sup>171</sup> ya que para ellos la actividad de CTX-M frente a ceftriaxona es igual o menor que contra cefotaxima.

En la cepa 1213-D, si bien se observa una clara resistencia a cefotaxima ( $CIM=128 \mu\text{g/mL}$ ), este valor está por encima del conjunto de cepas ( $CIM_{50}=32 \mu\text{g/mL}$ ), para ceftazidima se presenta también un valor elevado ( $CIM=16 \mu\text{g/mL}$  respecto a  $CIM_{50}=1 \mu\text{g/mL}$ ) y para aztreonam igualmente ( $CIM=32 \mu\text{g/mL}$  respecto a  $CIM_{50}=1 \mu\text{g/mL}$ ). Esta aparente alteración del patrón inhibitorio normal de la CTX-M-9, podría explicarse por un mayor nivel de expresión del gen que la codifica. Esta hipótesis es apoyada por los resultados de la selección con cefotaxima. Así, a pesar de que la CIM para la cefoxitina es elevada no se modifica después de la selección ( $CIM=32 \mu\text{g/mL}$  y  $CIM=64 \mu\text{g/mL}$  antes y después de la selección, respectivamente), en cambio en el caso de la cefotaxima los valores se incrementan al cabo de ésta ( $CIM=128 \mu\text{g/mL}$  a  $CIM=512 \mu\text{g/mL}$ ); lo cual explica que no se trata de una hiperproducción de la cromosómica sino, más bien de la hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa plasmídica CTX-M-9. En todo caso, se requieran estudios cinéticos para evaluar esta elevada producción de la enzima.

En general, se puede decir que la selección con cefotaxima nos permitió observar la máxima expresión de esta  $\beta$ -lactamasa (CTX-M-9), y en ningún caso se trató de una hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica ya que los valores de CIM frente a cefoxitina no se alteraron, en tanto que si se incrementaron las CIM, tras la selección, frente a las C3G, especialmente frente a cefotaxima, lo que se explica por una mayor intensidad en la expresión del gen CTX-M-9.

Bonnet y cols. (2000)<sup>20</sup>, así como otros autores<sup>92</sup>, observan que las CTX-M, son levemente más susceptibles a los inhibidores que las penicilinasas tipo TEM; siendo tazobactam el mejor inhibidor descrito para estas enzimas. En otro estudio realizado en nuestro laboratorio<sup>145</sup>, se observó que la CTX-M-9 fue inhibida a bajas concentraciones de tazobactam (IC<sub>50</sub>, 1 nM), mientras que la inhibición con clavulanato y sulbactam, requirieron concentraciones más elevadas (IC<sub>50</sub>s, 10 nM y 700 nM, respectivamente). Según los resultados de la actividad *in vitro*, las CIMs con los inhibidores no son diferentes entre el ácido clavulánico y el tazobactam; para esta comparación sólo se ha considerado aquellas cepas con valor exacto de CIM. Hay seis cepas en las que el ácido clavulánico ha sido mejor inhibidor (para la amoxicilina) que el tazobactam (para la piperacilina). En otras 5 cepas el tazobactam resultó mejor inhibidor que el ácido clavulánico, con sus respectivos antibióticos ya mencionados.

Todas las cepas presentaron sinergia de amoxicilina-acido clavulánico con cefotaxima. Esto y el resultado de la CIM, para este mismo antibiotico en todas las cepas, permite deducir que esta  $\beta$ -lactamasa al igual que el resto de la  $\beta$ -lactamasas de la familia tienen una gran actividad cefotaximasa.

Al analizar los resultados del biotipado de las cepas portadoras de CTX-M-9 para detectar posibles brotes epidémicos, no se observa concordancia ni en el tiempo ni en el espacio para aquellas cepas con idéntico biotipado. Esta en curso el estudio por técnicas de epidemiología molecular de las cepas que han presentado el mismo biotipo y serogrupo.

El perfil de resistencia de estas cepas y el pI de las  $\beta$ -lactamasas obtenidas de estas cepas sugería la presencia de CTX-M-9. Dicha  $\beta$ -lactamasa ya fue observada en el trienio anterior en nuestro laboratorio<sup>145</sup>. Esta observación fue confirmada mediante PCR usando dos pares de iniciadores: CTX-M-9<sub>IATG</sub> : CTX-M-9<sub>STOP</sub> y CTX-M-9<sub>EATG</sub> : CTX-M-9<sub>ESTOP</sub>. Los primeros para un fragmento interno del gen de 0,85Kb y el segundo par para un fragmento mayor de 1,5Kb que contienen al primer fragmento. Ventiseis de las 27 cepas fueron positivas con ambos iniciadores, lo cual demuestra concordancia con la caracterización realizada<sup>145</sup>.

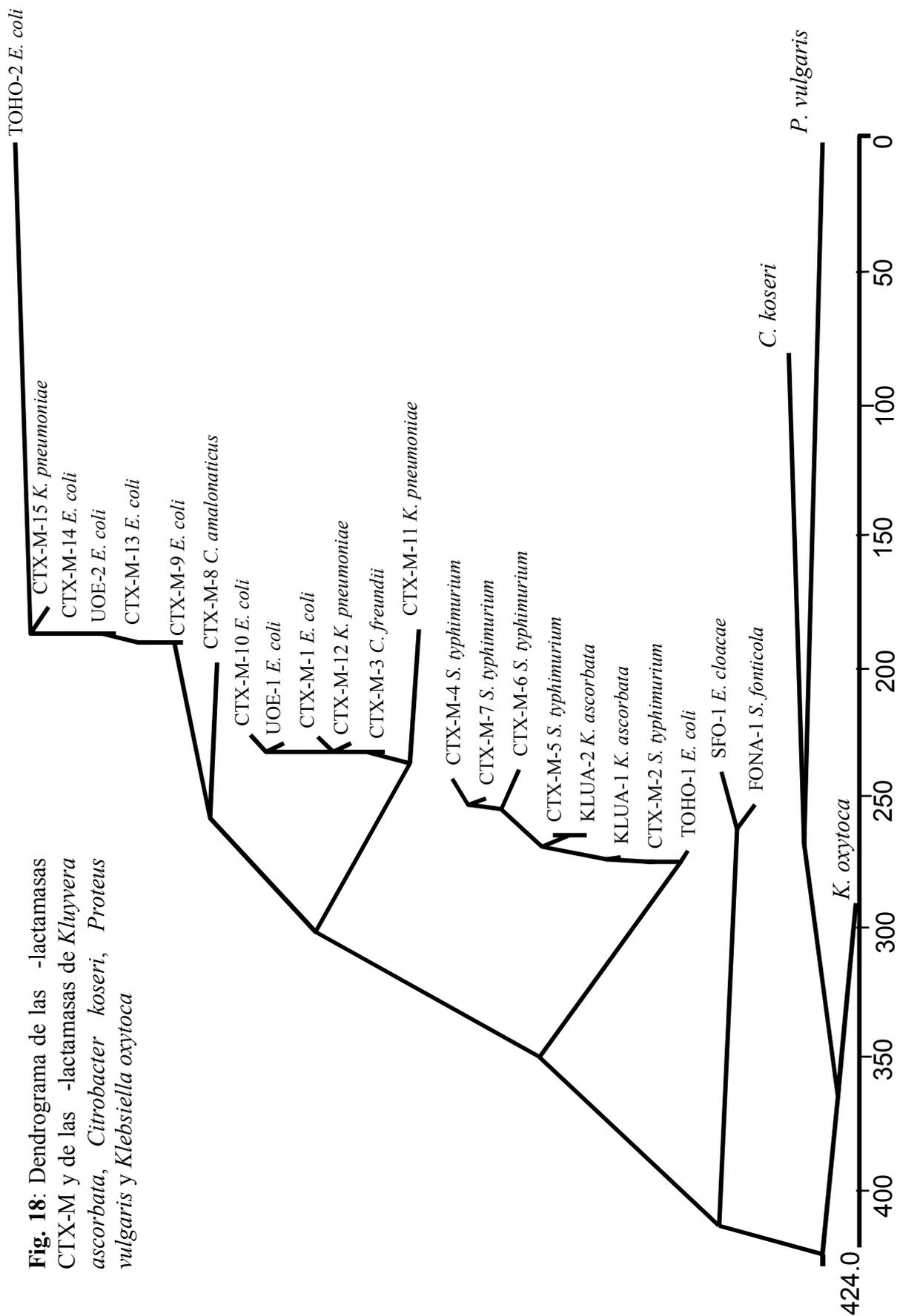
La cepa 1387-D, fue positiva para la PCR del fragmento menor y negativa para la PCR del fragmento mayor. Tanto el patrón de resistencia, el pI, como la amplificación del segmento menor, permiten afirmar que estamos frente a una  $\beta$ -lactamasa estrechamente relacionada con CTX-M-9; sin embargo, el entorno del gen puede haber sufrido cambios que hayan afectado el resultado de la PCR del fragmento mayor. El ORF correspondiente a esta enzima tiene 873 pb<sup>145</sup> y el fragmento mayor es más grande (1,5Kb), por lo cual abarcaría regiones de naturaleza desconocida y probablemente susceptibles de variación.

Finalmente, de las 27 cepas productoras de CTX-M-9, tres producían exclusivamente esta enzima mientras que las otras 24 cepas producían, además, una  $\beta$ -lactamasa compatible con TEM-1. Se sabe que esta enzima carece de actividad frente a las cefamicinas, oximinocetoximas y monobactams<sup>171</sup>, pero sí son activas frente a las penicilinas y cefalosporinas de primera generación.

De las 913 cepas de *S. enterica* aisladas, una (144-Ma), perteneciente al serotipo Virchow presentó sensibilidad disminuida a cefotaxima (6  $\mu$ g/mL), fue sensible a la ceftazidima, cefepime y aztreonam; además, se observó sinergia característica de BLEA. Todo ello configuró un fenotipo de resistencia semejante al observado en las cepas de *E. coli* productoras de la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-9. Luego, se verificó la identidad CTX-M-9 de esta cepa mediante PCR específica para dicho gen. En *Salmonella* serovar Typhimurium se ha detectado varias  $\beta$ -lactamasas del tipo CTX-M en diversas localidades. En Argentina se detectó CTX-M-2<sup>13</sup>; en Rusia se detectó CTX-M-4<sup>55</sup>; en Riga (Latvia)<sup>95</sup> y Grecia<sup>56</sup>, se encontraron cepas productoras de CTX-M-5; también en Grecia se detectó una cepa productora de CTX-M-6 en 1997<sup>54</sup>. En España se han detectado, otros tipos de BLEA en las cepas de *Salmonella*, siendo la primera la comunicada por Morosini y col. en 1996<sup>103</sup>; esta  $\beta$ -lactamasa fue la TEM-27 producida por *S. enterica* serovar Othmarschen causante de un brote nosocomial. Por tal motivo, este es el primer aislamiento (Barcelona, 1997) de una BLEA CTX-M-9 en una cepa de *S. enterica* serovar Virchow. Hasta la fecha se han publicado tres aislamientos más, en Murcia en 1998, en heces de pacientes con gastroenteritis, dos de los cuales no requirieron hospitalización<sup>156</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M se han aislado en 7 especies diferentes de la familia *Enterobacteriaceae* y en lugares muy distantes geográficamente<sup>156</sup>. Así la CTX-M-1 producida por *E. coli* fue aislada en Alemania en 1989<sup>12</sup>; MEN-1 producida por *E. coli* fue aislada de un paciente italiano en Francia en 1989<sup>156</sup>; CTX-M-3 producida por *C. freundii* en Polonia en 1996<sup>63</sup>; CTX-M-8 producida por *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *C. amalonaticus*, en Brazil en 1997<sup>20</sup> y CTX-M-10 producida por *E. coli* en España en 1997<sup>119</sup>. Adicionalmente hay descritas en el GenBank siete  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M pendientes de publicación estas son: CTX-M-11 producida por *K. pneumoniae* en China registrada en el 2000 (GenBank: AY005110); CTX-M-12 producida por *K. pneumoniae* en Kenya y registrada en el 2000 (GenBank: AF305837); CTX-M-13 producida por *E. coli* en China registrada en el 2000 (GenBank: AF252621); CTX-M-14 producida por *E. coli* en China registrada en el 2000 (GenBank: AF252622); y CTX-M-15 producida por *K. pneumoniae* en China registrada en el 2000 (GenBank: AF252623). Esta familia de  $\beta$ -lactamasas sigue siendo detectada en lugares y sitios tan diversos que se hace difícil inferir sobre su origen o patrón de dispersión (Figura 18).

Hasta hoy día se creía que las enzimas CTX-M eran derivadas de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *K. oxytoca*, aunque la relación directa no es probable dado que la identidad de las secuencias es menor al 80%. La identidad de la secuencia de aminoácidos entre la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-10, por ejemplo, y la enzima cromosómica de *Kluyvera ascorbata* (datos no publicados de C. Humeniuk [GenBank: CAB59824]), *K. oxytoca*<sup>3</sup> y *C. diversus*<sup>125</sup> fueron 81, 71 y 69%, respectivamente. Por lo tanto, si esta  $\beta$ -lactamasa es derivada de una de las enzimas cromosómicas, la producida por *K. ascorbata* es la mejor candidata<sup>119</sup>; sin embargo aún está por determinarse si la  $\beta$ -lactamasa de *K. ascorbata* (GenBank: CAB59824), es efectivamente de localización cromosómica.



## 2) Cepas productoras de BLEA compatible con SHV-2

---

Las cepas productoras de BLEAs tipo SHV se encuentran con mayor frecuencia en *K. pneumoniae* y *E. coli*. Las BLEAs tipo TEM, y particularmente las tipo SHV, son infrecuentes en *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y otras especies de enterobacterias en particular en las portadoras de cefalosporinas AmpC cromosómica. Por ejemplo, en Grecia se aisló una cepa de *Serratia marcescens* productora de “SHV-5-like” (identificada por pl) y en China se aisló una cepa de *Enterobacter gergoviae* productora de SHV-2<sup>78</sup>. También se han encontrado cepas de *S. marcescens* y *E. cloacae*, productoras de SHV-4. De otro lado, algunos autores han detectado BLEAs tipo SHV en varios serotipos de *Salmonella enterica*, siendo en todos los casos la SHV-2; sin embargo Nüesch-Inderbinen y cols.<sup>117</sup> han encontrado la variante SHV-2a en *Salmonella enterica* serotipo Wien.

En nuestro laboratorio, en el trienio 1997-99, se han identificado 14 cepas productoras -lactamasa compatible con SHV-2; seis cepas de *E. coli* y 8 cepas de *K. pneumoniae*. Estas representaron el 0,08% de las 7705 cepas de *E. coli* y 1,63% de las 491 cepas de *K. pneumoniae* aisladas en ese período. En el trienio anterior, 1994-96<sup>146</sup>, se identificaron 3 cepas productoras de -lactamasa compatible con SHV-2: dos cepas de *E. coli* (que representaron el 0,03% de los 7054 cepas de esta especie) y una de *K. pneumoniae* (que representó el 0,17% de los 581 cepas de esta especie). En ambas especies, es notable el incremento de la frecuencia de cepas productoras de -lactamasa compatible con SHV-2. En *E. coli*, la presencia de cepas productoras de este tipo de BLEAs se ha triplicado. En *K. pneumoniae*, el incremento es más significativo aumentando prácticamente 10 veces la presencia de este tipo de cepas.

Entre abril de 1988 y mayo de 1990, se produce en dos hospitales de Madrid una alta incidencia de cepas con resistencia a C3G mediadas por BLEAs, a las que se les atribuye el carácter de brote epidémico<sup>49</sup>. La -lactamasa fue identificada como SHV-2 y fue encontrada en 59 cepas pertenecientes a 4 especies bacterianas: *K. pneumoniae* (61%), *K. oxytoca* (5%), *S. marcescens* (31%) y *E. coli* (3%). Este estudio deja constancia de la aparición de cepas que producen este tipo de BLEA en España, al

menos, desde finales de los 80s. Sin embargo el número de cepas que producen SHV-2 es notablemente mayor al observado en los dos períodos tri-anales estudiados en Barcelona.

En un estudio realizado en Suiza<sup>117</sup>, se aislaron 60 cepas de *Enterobacteriaceae* con sensibilidad disminuida a C3G, en un período de dos años (1993-95), de las cuales 12 fueron caracterizadas como SHV-2. Las cepas productoras de esta enzima, pertenecieron a *K. pneumoniae* (6 cepas), *E. coli* (5 cepas) y *E. cloacae* (1 cepa). También se aislaron 13 cepas productoras de SHV-2a. Aunque estos datos no son comparables con los encontrados en nuestro hospital, ya que en este estudio se recolectaron cepas de varios hospitales de Suiza y en dos años, sirven como referencia de la presencia y dispersión de esta familia de  $\beta$ -lactamasa en Europa.

Un método para probar la sensibilidad de las cepas, es el de disco difusión; pero en general, no es suficientemente sensible para detectar las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, lo cual puede incrementar el número o la proporción de falsos negativos, subestimando la real incidencia de las BLEAs<sup>117</sup>.

Nicolas y cols.<sup>112</sup> propusieron que la detección de ciertos tipos de SHV mediante la prueba de sinergia depende del nivel de producción de la enzima. Sin embargo, Nüesch-Inderbinen y cols.<sup>116</sup> comprobaron que las cepas que expresaban la SHV-2, eran todas detectadas por este método, indicando que no sólo el nivel de producción de la enzima, sino que posiblemente, la naturaleza del enzima (parámetros de actividad) tenía una influencia en el resultado positivo de dicha prueba así, vieron que las cepas portadoras de SHV-3 tuvieron el test de sinergia negativo, pero el test de PCR/*NheI* positivo. Excepcionalmente, también tuvieron un test de sinergia positivo con valores altos de CIM frente a C3G, pero negativos para el test PCR/*NheI*, lo cual indicaría la presencia del gen *bla<sub>SHV-1</sub>* combinado con un gen adicional *bla* que codifica para una BLEA. Además, una digestión parcial o incompleta daría lugar a la observación de tres fragmentos y podría hacer pensar que se esta antes dos genes diferentes (una BLEA y una no BLEA), cuando sólo se trataría de un artefacto; es importante asegurarse

entonces que la digestión sea correcta. En nuestro caso todas nuestras cepas presentaron sinergia y el test PCR/*NheI* fue positivo.

El pI 7,6 es común a SHV-1 y BLEAs derivadas de SHV, por lo cual no es un criterio válido que sirva para diferenciar la presencia de BLEAs. Una metodología complementaria es utilizar PCR con iniciadores *bla*<sub>SHV</sub> y digestión con *NheI*<sup>116</sup>. En 1996, se propuso como técnica para diferenciar las SHV de espectro ampliado de las de espectro extendido, usar la enzima de restricción *NheI*, que corta en la diana GCT:AGC. Esta técnica se basa en el hecho de que la mutación de SHV-1 a SHV BLEA, es puntual y se produce en la posición 238 donde el codon cambia de (GGC) a (AGC); es decir, de glicina a serina. Las cepas con alto valor de CIM frente a C3G, pI 7,6 y PCR<sub>SHV</sub> positiva, fueron sometidas a digestión con *NheI*; si la enzima no corta podríamos estar frente a una no BLEA SHV-1 o SHV-11, o frente a las BLEAs SHV-6, SHV-8 o SHV-13 o alguna nueva variante. Cuando *NheI* corta, podemos estar en presencia de SHV-2, SHV-2a o SHV-7<sup>116</sup>. En ambos casos no es posible diferenciar entre una  $\beta$ -lactamasa y otra a no ser que se realice la secuenciación del gen.

Siempre que, el valor del pI sea diferente a 7,6, permite discriminar entre no BLEAs y BLEAs de la familia SHV. Con pI 8,2, por ejemplo, estamos frente a BLEAs, que podrían ser SHV-5, SHV-9, SHV-10 ó SHV-12, pero se necesita la secuenciación del gen para diferenciarlas. Por eso, a partir de los criterios señalados sólo es posible identificar inequívocamente SHV-3 (valores altos de CIM frente a C3G, pI 7,0 y digestión por *NheI*) y SHV4 (valores altos de CIM frente a C3G, pI 7,8 y digestión por *NheI*)<sup>116</sup>. Esto es válido con la información reportada a la fecha (WEB: Lahey Clinic Jacoby&Bush 2000)<sup>72</sup>, cuando ya se han registrado 26 variantes de la familia SHV, pero de las cuales en su mayoría aún no se ha informado el perfil inhibitorio ni el valor de pI.

De lo discutido líneas arriba, se deduce que una vez determinada la presencia de BLEA es bastante más complejo precisar de que enzima se trata. Aunque el perfil de hidrólisis de substratos, de inhibición y la determinación del punto isoeléctrico de la enzima, son esenciales, la caracterización definitiva depende de la secuenciación del gen que codifica la enzima.

Thomson, K. y Sanders, C.<sup>170</sup> demostraron que la cefpodoxima era un buen marcador de BLEAs. En este estudio, las seis cepas de *E. coli* portadoras de SHV-2 fueron resistentes a cefpodoxima, lo cual está de acuerdo con su naturaleza de BLEA. Además, después de la selección con cefotaxima, el valor de CIM frente a la cefpodoxima se incrementó de 3 a 6 diluciones dobles progresivas. Por otro lado, los valores observados para cefoxitina, antes y después de la selección, están dentro del rango de las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas del grupo 2be (clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros): CIM 2-8  $\mu\text{g/mL}$ <sup>43</sup>, lo que indica que con la selección lo que se consiguió es que la  $\beta$ -lactamasa SHV-2 expresara su alto grado de resistencia a las C3G, y se puede afirmar que no se trata de una hiperproducción de la cromosómica ya que en el gel de isoelectroenfoque, de las cepas seleccionadas, no se observó más que el mismo pI de las cepas originales y los mismos CIM para la cefoxitina, descartando también esto, en parte, la aparición de nuevos mutantes. Es decir, probablemente antes de la selección, las cepas de *E. coli* productoras de la SHV-2, sólo expresaban la  $\beta$ -lactamasa en un grado basal y después de la selección con una C3G, como la cefotaxima, pudieron expresarla en mayor grado.

En las 8 cepas de *K. pneumoniae*, los valores de CIM frente a cefpodoxima indica su naturaleza de BLEA. En el caso de la cefoxitina 5 cepas están dentro del rango de BLEA del grupo 2be (4  $\mu\text{g/mL}$ ); las otras tres cepas (154-Fb, 156-Fb y 163-Fb), muestran valores de CIM superiores (16  $\mu\text{g/mL}$ ), pero aún no alcanzan el valor fijado para  $\beta$ -lactamasa del grupo 1 (>16  $\mu\text{g/mL}$ ). Además, estas cepas no mostraron ninguna banda característica de las  $\beta$ -lactamasas del grupo 1, en el gel de isoelectroenfoque.

Para Thomson, K. y Sanders, C.<sup>170</sup>, cefoperazona no muestra utilidad para discriminar BLEAs de no BLEAs, ya que ambos tipos de cepas presentan similar sensibilidad (79% y 85%, respectivamente). Por su lado, Livermore, D.<sup>89</sup> afirma que las cepas productoras de BLEAs derivadas de TEM y SHV, muestran resistencia a la cefoperazona. En nuestro estudio, de las seis cepas de *E. coli*, cinco fueron sensibles mientras que la cepa 1310-D fue resistente; después de la selección con cefotaxima todas fueron resistentes. Las cepas de *K. pneumoniae* presentan valores de CIM entre sensibles e intermedios.

Todo lo cual indicaría, *a priori*, que la utilidad de la cefoperazona para discriminar BLEAs de no BLEAs no está del todo demostrada.

Nüesch-Inderbinen y cols.<sup>115</sup> al comparar SHV-2 y SHV-2a, asocia la mayor eficiencia de actividad ceftazidimasa de la SHV-2a, a la mutación que cambia leucina por glutamina en la posición 31 de la enzima. En esta Tesis cinco de las seis cepas aisladas de *E.coli* muestran valores de CIM similares frente a cefotaxima y frente a ceftazidima; además, después de la selección con cefotaxima la eficiencia frente a ceftazidima es menor, lo cual está de acuerdo con lo descrito por Nüesch-Inderbinen para la SHV-2. De otro lado, las seis cepas mostraron sinergia con cefotaxima y solo cinco con ceftazidima. De otro lado, de las 8 cepas de *K. pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasa compatible con SHV-2, la CIMs fueron similares para ceftazidima y cefotaxima; la cepa 154-Fb muestra mayor diferencia para la CIMs de estos antibióticos siendo resistente frente a ceftazidima y sensible frente a cefotaxima. Sin embargo la diferencia no es significativa.

Cuando se compararon SHV-2 y SHV-2a mediante un ensayo de construcciones genéticas<sup>115</sup>, en las que se asociaron estos genes con diferentes tipos de promotores (fuerte y débil), concluyeron que la mayor actividad ceftazidimasa de SHV-2a, se debe a la mutación en la posición 31 de la enzima y que esta actividad se acentúa en presencia de un promotor fuerte. Además, la presencia de promotores fuertes también podría explicar la resistencia incrementada mediante la hiperproducción de la enzima<sup>127,130</sup>.

Respecto a la relación epidemiológica de las seis cepas de *E. coli* productoras de SHV-2 es importante destacar que todas presentaban el mismo biotipo 1775, aunque no el mismo serogrupo, pero no se pudo demostrar la relación entre los que compartían biotipo y serogrupo ya que sus hallazgos correspondían a salas y a tiempos diferentes.

---

### 3) Cepas productoras de TEM-12 y TEM-10

---

La TEM-1 es una  $\beta$ -lactamasa ampliamente distribuida en la familia *Enterobacteriaceae*, particularmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*, y otras especies. Su sustrato son las penicilinas y las cefalosporinas de primera generación y son de codificación plasmídica. La habilidad del gen TEM-1, para mutar y codificar variantes enzimáticas capaces de hidrolizar las C3G ha sido demostrada ampliamente por muchos centros<sup>42,128</sup>. Así, TEM-1 ha dado origen a una numerosa familia de BLEAs por mutaciones, que en la mayoría de casos son simples (19 de 86 variantes) o dobles (21 de 86) respecto de la secuencia original de TEM-1.

La BLEA TEM-12 fue aislada por primera vez en 1987, en una cepa de *E. coli* procedente de USA y publicada en 1990<sup>97,178</sup> y en *K. pneumoniae* en el área de Cincinnati - Boston en 1988<sup>139</sup>. Inicialmente fue conocida como YOU-2, de codificación plasmídica<sup>139</sup>, luego se le asignó un nombre correspondiente a la familia a la que pertenece, TEM-12; Webber y cols.<sup>178</sup> encontraron que la enzima TEM-12 presentaba una actividad ceftazidimasa elevada y que a diferencia de las otras enzimas de la misma familia (derivadas de TEM-1), era de codificación cromosómica. Rice y cols.<sup>140</sup> comprueban mediante secuenciación que YOU-2 y TEM-12 son codificadas por el mismo gen; actualmente se le conoce como TEM-12. Por lo tanto, TEM-12 puede ser codificada a nivel cromosómico o plasmídico, no habiéndose encontrado diferencias fenotípicas entre los dos tipos.

En este estudio se analizaron cinco muestras de orina de un mismo paciente (paciente A), en todas las cuales se aisló *E. coli*, tal como se describió en el apartado de resultados. De estas muestras, las cuatro primeras cepas se aislaron aproximadamente con un mes de diferencia a cada una, presentando el mismo patrón de resistencia y dos  $\beta$ -lactamasas de igual pI. Basándonos en estas características comunes asumimos que se trataba de la misma cepa y sólo se analizó la primera de la serie (1365-D). La quinta muestra (1401-D) se aisló tres meses después de la última de la primera serie, presentó un perfil de resistencia más elevado frente a todos los  $\beta$ -lactámicos y fue considerada

como otra cepa diferente, aunque probablemente derivada de “la primera”. Esta cepa fue luego caracterizada como productora de la TEM-10.

La cepa inicial (1365-D) se identificó como productora de dos  $\beta$ -lactamasas compatibles con TEM-1 y una con TEM-12, siendo esta última la de interés por tratarse de una BLEA. Esta cepa representó el 0,01% de las 7705 cepas de *E. coli* durante el trienio 1997-99. En el período anterior 1994-96, Sabaté y cols.<sup>144</sup> reporta también una cepa productora de TEM-12 que significó el 0,03% de las 7054 cepas de *E. coli* aisladas en dicho período. Por lo tanto, no se observan diferencias entre los dos períodos analizados en la frecuencia de aparición de cepas productoras de TEM-12 y TEM-10, en el ámbito de la población que atiende el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Se estima que el 50% de las cepas de *E. coli* aisladas en el mundo, tienen la  $\beta$ -lactamasa TEM-1 y que aproximadamente el 80% de las  $\beta$ -lactamasas de codificación plasmídica en los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son TEM-1; por esta razón la coexistencia de TEM-1 y una BLEA es un hecho frecuente<sup>160</sup>, tal como ha sido observado en la cepa 1365-D y en 24 cepas caracterizadas como productoras de la BLEA CTX-M-9 en este mismo estudio.

En la quinta muestra del paciente A, fue aislada una cepa de *E. coli* productora, como se ha comentado, de la BLEA TEM-10. Esta enzima es también derivada de TEM-1 y fue inicialmente conocida con el nombre de MGH-1, en cepas de *K. pneumoniae* siendo detectada por primera vez en 1989 en Chicago<sup>135</sup>. Su identificación y denominación definitiva como TEM-10 se realizó mediante secuenciación del gen<sup>140</sup>.

El perfil de resistencia de TEM-10 descrito por Quinn y cols.<sup>135</sup>, se resume de la siguiente manera: hidroliza la ceftazidima y el aztreonam además de las penicilinas como la piperacilina y carbenicilina; los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico y sulbactan, restauran la sensibilidad a los  $\beta$ -lactámicos. La cepa 1401-D, portadora de la TEM-10, también presenta un perfil de resistencia similar pero con valores de CIM levemente incrementados (una o dos diluciones dobles progresivas) frente a ceftazidima y aztreonam; estos incrementos fueron significativamente superiores

para nuestra cepa frente a cefuroxima (6 diluciones dobles progresivas), cefoxitina (más de 4 diluciones dobles progresivas) y cefotaxima (4 diluciones dobles progresivas), en todos los casos respecto a los valores reportados<sup>135</sup>. Además, en esta Tesis la identidad de TEM-10 ha sido verificada mediante secuenciación del gen. Entonces, cabe preguntarse, ¿porqué si estamos ante la misma TEM-10, se observan claras diferencias en el perfil de resistencia?

Una posible explicación, viendo el notable incremento de la CIM para cefoxitina (>64 µg/mL), es la hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC en la cepa 1401-D, pero esta posibilidad se descartó ya que en sucesivas realizaciones del gel de isoelectroenfoque no se pudo observar la banda típica de esta enzima. Una hipótesis alternativa es que este incremento se deba a que se trate de una cepa que además de TEM-10 presente defectos a nivel de las porinas. Al respecto, un experimento realizado por Negri y cols.<sup>109</sup> demostró que ante períodos de exposición largos a bajas concentraciones de cefotaxima, en las cepas productoras de TEM-12 aparecía una nueva subpoblación de mutantes carentes de porinas en la membrana externa. Es decir, la presión de selección leve o moderada permite un nuevo crecimiento de la población bacteriana gracias a la selección de un mutante, con un mecanismo de resistencia diferente al enzimático (en este caso la TEM-12) como consecuencia de la presión de selección que se está ejerciendo (en el caso de este experimento la cefotaxima). En otro estudio realizado por Medeiros y cols.<sup>97</sup> observan que la cefoxitina ha fallado en el tratamiento de los pacientes porque las cepas (de *K. pneumoniae*) productoras de BLEAs pierden porinas de la membrana externa durante la terapia, presumiblemente disminuyendo la tasa de penetración del antibiótico hacia la célula bacteriana<sup>121</sup>.

Por otro lado, tratándose de la quinta muestra (cepa 1401-D) de un paciente en el que en las cuatro primeras muestras ya se había aislado cepas de *E. coli* productoras de TEM-1 y TEM-12, simultáneamente, y que ha sido tratado con ceftazidima (intravenoso), estaríamos frente a un caso de selección secuencial de mutantes, según el proceso experimentalmente demostrado por Negri y cols.<sup>109</sup>. Esta asociación también ha sido observada por otros investigadores<sup>23,109</sup> frente al uso extendido de ceftazidima en varios hospitales en Estados Unidos y uno en Inglaterra, donde la evolución de la TEM-12 ha

dado lugar a la aparición de TEM-10 y TEM-26, tanto en brotes hospitalarios como dentro de un mismo microorganismo.

#### 4) Cepas portadoras de CMY-2

---

Las cefamicinasas plasmídicas a diferencia de las BLEAs determinan resistencia a las cefamicinas y a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, así como a las C3G. En esta Tesis se encontraron tres cepas productoras de cefamicinasa CMY-2 durante el trienio 1997-99, las cuales pertenecen a tres especies bacterianas. Una cepa de *S. enterica* serovar Mikawasima de un total de 913 cepas de *S. enterica* aisladas (0,1%), una cepa de *K. pneumoniae* (0,47%) de un total de 491 y una cepa de *P. mirabilis* (0,11%) de 948 cepas de esta especie.

El patrón de sensibilidad tanto de las cepas salvajes como de los transconjugantes obtenidos, es similar al descrito previamente en enterobacterias productoras de la  $\beta$ -lactamasas CMY-2 o CMY2b, tales como *S. enterica* serovar Typhimurium variante Copenhagen<sup>50</sup>, *S. enterica* serovar Senftenberg<sup>82</sup>, *K. pneumoniae*<sup>14</sup> y *E. coli*<sup>18</sup>. Las  $\beta$ -lactamasas CMY-2 y CMY-2b son muy similares y las únicas diferencias detectadas en dos posiciones de la secuencia aminoacídica a nivel del péptido señal<sup>82</sup>.

*S. enterica*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae*, son generalmente sensibles a las cefalosporinas y tan solo ésta última es naturalmente resistente a las penicilinas. Actualmente, alrededor del 30 al 40% de las cepas de *S. enterica* y *P. mirabilis* son resistentes a las penicilinas, por producción de  $\beta$ -lactamasas tipo TEM-1, TEM-2 o SHV-1, mayoritariamente. De éstas, se han originado las BLEAs que se caracterizan por conferir resistencia a cefalosporinas de tercera generación, aunque no a cefamicinasas y solo en algunos casos a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Por su lado, las cefamicinasas como la CMY-2, confieren resistencia no sólo a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera generación, sino también a cefamicinas y también a la combinación  $\beta$ -lactámico-inhibidor como la amoxicilina-ácido clavulánico, cefotaxima-ácido clavulánico y ceftazidima-ácido clavulánico.

Todas las cefamicinasas plasmídicas detectadas hasta el momento en el área mediterránea pertenecen a un grupo muy homogéneo, CMY-2 a CMY-5, LAT-1 a LAT-4 y BIL-1; todas relacionadas con la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *C. freundii*<sup>15,16,18,28,50,51,53,57,82,166,173,174,176,185</sup>. De éstas, la más frecuente es la CMY-2.

La detección de  $\beta$ -lactamasas AmpC mediada por plásmidos, es difícil debido a que no es fácil su detección en el laboratorio, sobre todo porque puede confundirse con una hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC, en las cepas portadoras de esta enzima en el cromosoma, o con pérdida de permeabilidad de las porinas. En nuestro laboratorio el test “screening” para la detección de estas cepas fue la disminución del halo de la cefoxitina en la placa de disco difusión, y posteriormente el pI.

En el período 1994-96, 48 cepas de *E. coli*, que mostraron un patrón de resistencia compatible con una  $\beta$ -lactamasa AmpC, pero que además presentaban  $\beta$ -lactamasa de pI elevado >8, compatible con la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *E. coli*, se procedió a hacer la PCR con iniciadores degenerados que amplifican el *ampC* cromosómico de *E. cloacae*, *C. freundii* y algunas cefamicinasas plasmídicas como CMY-2, resultando negativa en todo los casos<sup>146</sup>. Estos resultados sugerían que el mecanismo de resistencia en estas cepas era la hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica y no una cefamicinasa plasmídica.

En esta Tesis se excluyeron en función de estos resultados previos, todas las cepas de *E. coli* cefoxitina resistente con lo cual somos conscientes de la posible subestimación de la presencia de cefamicinasas plasmídicas no detectables bajo ese screening; aún así se encontraron tres cepas portadoras de CMY-2. Después de nuestros hallazgos, en el año 2000, encontramos tres cepas más de *E. coli* portadoras de la cefamicinasa CMY-2, todo lo cual nos estaría indicando que las cefamicinasas plasmídicas y en particular la CMY-2 recién aparece en nuestro entorno. Sin embargo, en la medida de las posibilidades es recomendable poder disponer de otro métodos de detección como el test tridimensional<sup>169</sup> o poder utilizar el test basado en un inhibidor específico de las  $\beta$ -lactamasas AmpC como el BRL 42715, aunque lamentablemente aún esta en fase de desarrollo y no esta disponible<sup>34</sup>.

En las cefamicinasas plasmídicas no se ha demostrado la presencia de genes reguladores, como en sus homólogos cromosómicos. La única excepción es una cepa de *S. enterica* serovar Enteritidis productora de  $\beta$ -lactamasa plasmídica DHA-1, estrechamente relacionada con la  $\beta$ -lactamasa de la Clase C de *M. morgani*, con quien alcanza 98,7% de identidad en la secuencia nucleotídica. En esta especie se ha demostrado la presencia del gen regulador *ampR* responsable del fenotipo inducible, contiguo al gen que codifica para DHA-1<sup>7</sup>. La pérdida de la inducibilidad en la mayoría de las AmpCs mediada por plásmidos puede ser debida a que los genes reguladores de la inducción están ausentes o son no funcionales<sup>171</sup>. Como lo sugieren Bauernfeind y cols.<sup>15</sup>, la CMY-2 ha derivado de la  $\beta$ -lactamasa AmpC de *C. freundii* por su elevada homología (95,8%); por ello, aunque no se observó ningún tipo de inducción, nos planteamos la posibilidad que nuestras cepas hayan incorporado también el gen *ampR*. La PCR específica para *ampR* no dio producto amplificado lo cual nos permite en principio, descartar la presencia de este gen tal como es conocido en *C. freundii*.

El entorno genético del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> es desconocido en estas cepas. Se planteó la hipótesis de que pudiera encontrarse formando parte de un integrón de la Clase 1, para lo cual, se realizó una PCR con iniciadores específicos 5CS y 3CS. El resultado fue positivo en las tres cepas y sus transconjugantes con una región variable interna de aproximadamente unas 3Kb de longitud, pero al realizar la PCR en forma cruzada los iniciadores específicos de integrones Clase 1 con los iniciadores *ampC1* y *ampC2*, no se obtuvieron amplificadas, lo cual nos permite descartar que este gen este formando parte de este tipo de integrones.

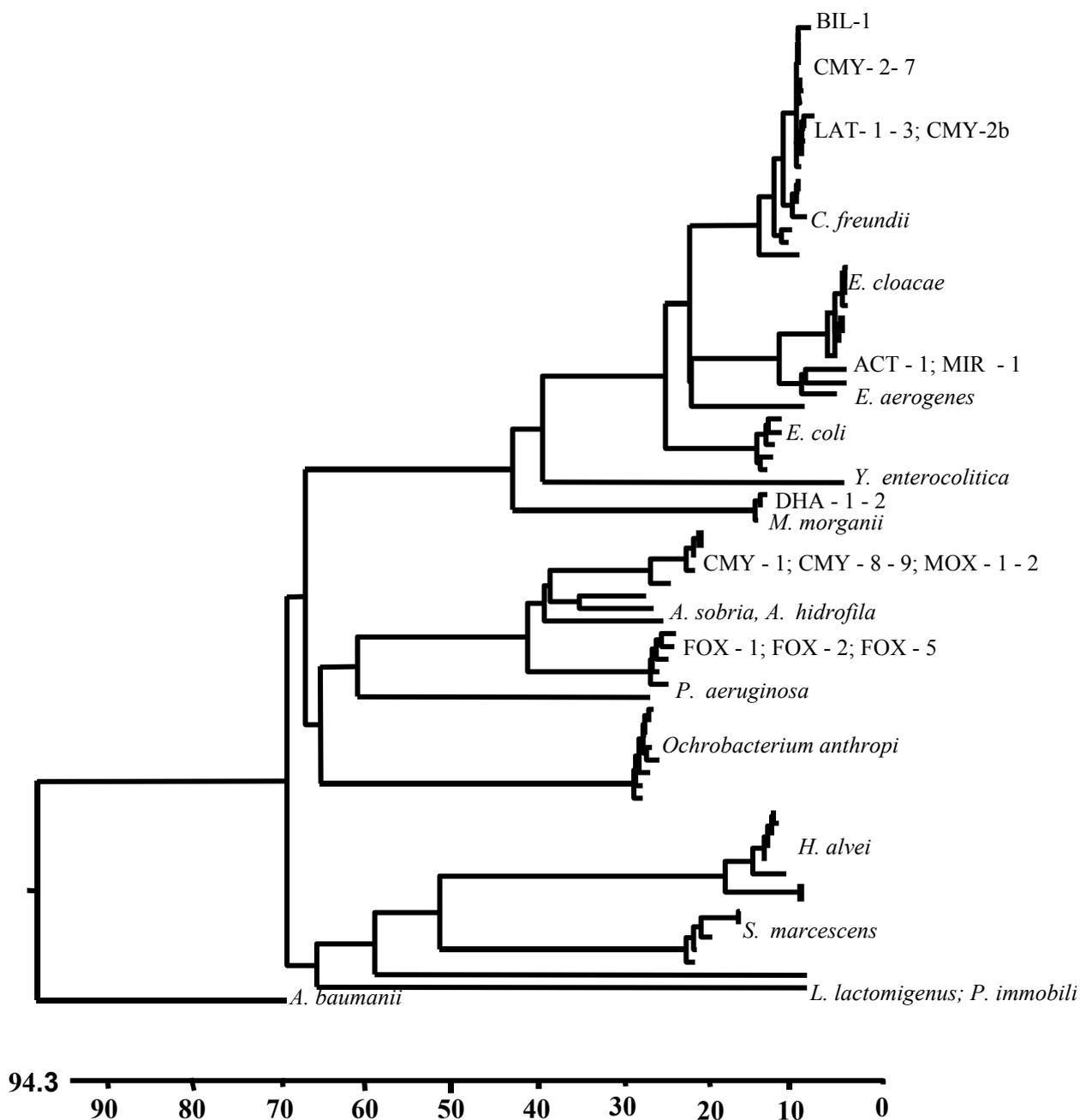
Igualmente se exploró la posibilidad de que estas  $\beta$ -lactamasas se encontrasen formando parte de un integrón compuesto como In6 o In7, de forma similar a lo observado en la cefamicinasa DHA-1, aunque en este caso no se ha encontrado como un elemento móvil del tipo “gene cassette”. Este tipo de localización también se presume para CMY-1 y MOX-1<sup>177</sup>. La PCR se realizó utilizando un iniciador en el *orf341* y los iniciadores *ampC1* o *ampC2*. El resultado negativo en ambos casos permite descartar la localización de CMY-2 de nuestras cepas en un entorno similar al descrito para DHA-1.

Sin embargo, un resultado negativo en la PCR no permite afirmar la ausencia de estos entornos, los cuales pueden estar presentes pero con algunas alteraciones (mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, etc).

La  $\beta$ -lactamasa CMY-2 se ha difundido geográficamente por toda la cuenca mediterránea en los últimos 10 años. Aparentemente esta dispersión se ha alcanzado por la transmisión interespecífica del vector de esta cefamicinasa. Así, se ha detectado en cepas de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* y varios serotipos de *S. enterica* (Senftenberg, Typhimurium, Mikawasima y Montevideo)<sup>108</sup>. En todos los casos descritos, dicha  $\beta$ -lactamasa se ha transferido por conjugación con la  $\beta$ -lactamasa TEM-1, así como con el patrón de resistencia asociado: claranfencol, tetraciclina, sulfametoxazol, gentamicina y tobramicina (de entre los antibióticos que los diferentes estudios han evaluado)<sup>14,18,50,82</sup>, este patrón también se ha observado en *P. mirabilis* portador de la CMY-4<sup>176</sup>. Las cepas analizadas en esta Tesis mostraron un comportamiento similar a éste. Sin embargo, resulta interesante, aunque difícil de explicar, los mayores valores de CIM de los transconjugantes de *S. enterica* y *P. mirabilis* frente a cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, respecto a los valores de CIM de las respectivas cepas silvestres.

En esta Tesis se informa de uno de los primeros hallazgos de cefamicinasas en España; otro trabajo reciente<sup>22</sup> documenta el aislamiento de una cepa de *E. coli* productora de la cefamicinasa FOX-4, en Las Palmas de Gran Canaria. Además nuestro estudio documenta los primeros aislamientos de *P. mirabilis* y *S. enterica* serovar Mikawasima productoras de CMY-2.

Es de preveer, que en el futuro, su incidencia se incremente y con ello disminuyan las opciones para tratar las infecciones por microorganismos portadores de estas  $\beta$ -lactamasas (Figura 19). Practicamente, estas cepas son resistentes a todos los antibióticos excepto carbapenems, cefalosporinas de cuarta generación y fluoroquinolonas<sup>171</sup>; pero por ejemplo frente a los carbapenems, concretamente frente a imipenem, ya se ha documentado algunas resistencias mediadas por estas cefamicinasas asociadas a alteraciones de las proteínas de la membrana externa<sup>24,166</sup>.



**Fig 19:** Dendrograma de las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC (Clase C) descritas hasta el momento.

---

## 5) Detección de BLEAs y cefamicinasas

---

Las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas del tipo SHV, junto con las TEM, representan las familias de  $\beta$ -lactamasas de mayor importancia clínica. Las formas parentales de estas familias (SHV-1, TEM-1 y TEM-2), carecen de actividad frente a cefamicinas, las oxyiminocefalosporinas, monobactams y carbapenems, que resultan ser estables a estas  $\beta$ -lactamasas. Estas enzimas producen resistencia frente a todas las penicilinas con actividad frente a bacterias gram negativas, excepto la temocilina, y también algunas cefalosporinas como la cefalotina y el cefaclor<sup>117,171</sup>. A inicios de la década de los 80, se detectaron en Europa, cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli*, resistentes a cefotaxima, ceftazidima y también a aztreonam. Esta resistencia se debía a la producción de  $\beta$ -lactamasas derivadas por sustitución aminoácidica en los sitios activos de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, las cuales extendieron su perfil de sustrato a aztreonam, C3G (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefpodoxima, cefoperazona) y cefepime, siendo denominadas BLEAs ( $\beta$ -lactamasas de espectro extendido).

La detección de BLEAs es un problema importante a tener en cuenta. La detección de la presencia de una BLEA en la rutina del laboratorio se hace difícil debido a que las CIMs frente a C3G, aunque elevadas, son menores que los puntos de corte usados para definir la resistencia por el National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)<sup>136</sup>. Por ello, de acuerdo a las nuevas recomendaciones de la NCCLS<sup>107</sup>, las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* que son inhibidas en un menor grado que la población normalmente susceptible, deben ser estudiadas porque pueden ser portadoras potenciales de una BLEA.

En un estudio realizado por Thomson y col.<sup>170</sup> se probó la eficacia de la cefpodoxima para la detección de BLEAs, encontrándose que el 100% de las cepas no BLEAS fueron sensibles frente a este antibiótico; mientras que, el 96% de las BLEAs fueron resistentes; cabe destacar que en este estudio no se incluyeron cepas productoras de cefamicinasas plasmídicas AmpC (grupo 1). En todo caso, se interpreta de estos resultados, que todas las cepas resistentes son productoras de BLEAs, pero no todas las

cepas sensibles (o intermedias) son no productoras de BLEAs, ya que hay un 4% de cepas con resultado falso negativo.

El test de sinergia o prueba de doble disco difusión aprovecha el hecho que las BLEAs producen hidrólisis de las C3G y la sensibilidad que muestran a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como la amoxicilina-ácido clavulánico. Un método alternativo para la detección de BLEAs es el dado por M'Zali, y cols.<sup>106</sup>, el cual requiere de un par de discos adicionales de cefotaxima-ácido clavulánico y ceftazidima-ácido clavulánico. El criterio para determinar si se está en presencia, o no, de una BLEA, viene dado por la proporción [(cefalosporina/ácido clavulánico)/cefalosporina] medida a partir de los diámetros de inhibición; cuando este índice es  $\geq 1,5$ , estamos en presencia de una BLEA.

Otro estudio probó que cefpodoxima es el antibiótico que mejor discrimina entre las  $\beta$ -lactamasas del grupo 1 y 2be (clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros), respecto a las demás  $\beta$ -lactamasas del grupo 2 (b, c y d). Las CIMs varían de  $4\mu\text{g/mL}$  a  $>16\mu\text{g/mL}$  en el primer grupo de  $\beta$ -lactamasas, mientras que las CIMs para el segundo grupo oscilan entre  $0,5\mu\text{g/mL}$  y  $2\mu\text{g/mL}$ . Por otro lado, la cefoxitina ha mostrado ser muy eficiente para diferenciar las  $\beta$ -lactamasa del grupo 1 (CIM  $>16\mu\text{g/mL}$ ) de las del grupo 2be (CIM  $2-8\mu\text{g/mL}$ )<sup>43</sup>. Es decir este puede ser un buen criterio para diferenciar cefamicinasas plasmídicas de BLEAs del grupo 2be.

A pesar de todas las técnicas señaladas las BLEAs y las cefamicinasas plasmídicas constituyen una seria amenaza para la terapia con  $\beta$ -lactámicos, sino pueden ser detectadas. Las BLEAs característicamente habían reducido la sensibilidad a las C3G y/o aztreonam, pero la resistencia *in vitro*, como hemos visto, indicada ya sea tanto por disco difusión o por la CIM, puede ser baja a moderada. Igualmente las cefamicinasas plasmídicas tienen como característica sensibilidad disminuida a C3G y/o aztreonam, resistencia a cefoxitina y no son inhibidas por el ácido clavulánico, pero una hiperproducción de la enzima cromosómica, en el caso de *E. coli*, también puede dar un patrón similar.

Todos estos procesos tienen sus limitaciones, así por ejemplo, a pesar que el test de sinergia técnicamente es fácil, depende de la lectura subjetiva de las interacciones entre las zonas de inhibición, además puede perder su sensibilidad por un problema de espaciamiento de los discos. En este sentido, el E-test es menos subjetivo que el test de sinergia ya que su interpretación está basada en la lectura cuantitativa de la CIM para la ceftazidima o cefotaxima en ausencia o presencia del ácido clavulánico.

Desafortunadamente con la mayoría de los tests de sensibilidad el patrón esperado para cepas portadoras o no de BLEA, o cefamicinasa, puede ser modificado por la acción de diferentes mecanismos como la producción de grandes cantidades de  $\beta$ -lactamasas ya sea por mutaciones en su promotor o adquisición de secuencias de inserción que reemplazan la función del promotor, o por incremento de número de copias del plásmido, o incremento en el número de copias del gen. Otros mecanismos capaces de modificar el patrón de resistencia es restringir la tasa de entrada del  $\beta$ -lactámico ya sea por las modificaciones de la permeabilidad de la membrana por pérdida de porinas, por alteración de las PBPs o por el mecanismo de eflujo.

A pesar de ello, otras metodologías aplicables a los aislados clínicos, han sido propuestas para la identificación de BLEAs sin tener que recurrir al procedimiento más costoso y técnicamente más exigente que es la secuenciación. Estas dos nuevas técnicas de biología molecular son básicamente para la caracterización de BLEAs tipo SHV y fueron propuestas cuando el número de BLEAs descrito hasta el momento era reducido (6 a 12 tipos diferentes). Una es la propuesta por M'Zali y cols.<sup>105</sup> que usa la PCR-SSCP ("single strand conformational polymorphisms") para examinar numerosas cepas de SHV. Esta técnica es capaz de detectar tanto mutaciones conocidas como nuevas, que ocurren dentro del producto amplificado. Otra alternativa adicional<sup>78</sup> es la caracterización mediante LCR ("ligase chain reaction"), que permite discriminar entre las variantes de SHV, aunque la diferencia sea en una mutación puntual (SHV-1, 2, 2a, 3, 4, 5 y 12). Esta caracterización muestra concordancia con el fenotipo descrito mediante perfil de resistencia y punto isoeléctrico. Estas técnicas podrían ser consideradas en las BLEAs tipo SHV, ya que es una familia, hasta entonces, con pocos representantes por lo que la diferenciación entre cada una de ellas sería más rápida y

con la posibilidad de realizar en mayor número de cepas que por secuenciación. Posiblemente, hoy por hoy, estas técnicas pueden ser útiles en determinadas situaciones requiriendo en muchos casos de una secuenciación para la caracterización definitiva de la  $\beta$ -lactamasa.

Finalmente podemos decir que es esencial la rápida y correcta detección de las BLEAs, que puedan aparecer en nuestro medio, así como de las cefamicinasas, porque el poder proveer no solo a tiempo sino de una información correcta y exacta acerca de la ocurrencia de tales enzimas puede evitar la dispersión de las mismas. Además esto ayudará a los clínicos a dar la terapéutica adecuada y de esta forma detener el sobre uso de antibióticos de última generación, una forma de incrementar la incidencia de estas  $\beta$ -lactamasas.

La vigilancia es un componente esencial de los programas de control de las infecciones, sobre todo cuando sabemos que la mayoría de nuestras cepas estudiadas viene de hospitalización. Por eso el conocimiento de los patrones de resistencia antibiótica es crucial no sólo para poder escoger un tratamiento empírico, sino para la implementación y evaluación de programas que minimicen la difusión de estas resistencias. El tener un microorganismo productor de BLEA en una infección clínica puede resultar en un mal tratamiento, sobre todo si alguna C3G y/o aztreonam es usado para el mismo. Las mutaciones en las secuencias de los genes de las primeras  $\beta$ -lactamasas plasmídicas aparecidas han generado distintas BLEAs después del uso de los nuevos  $\beta$ -lactámicos particularmente ceftazidima y aztreonam, acelerando su evolución, esto generalmente se ha visto en las UCIs. Así también las bacterias patógenas han encontrado rápidamente como desarrollar varios mecanismos de resistencias que interactúan cuando son necesarios.

Poder detectar a tiempo los patógenos que llevan resistencias y aplicar medidas de control es importante, igualmente el enseñar el uso juicioso de los antibióticos es importante en el control de la resistencia.

---

## 6) Características clínicas de los pacientes

---

Las infecciones representan en la actualidad un importante problema de salud pública por su morbimortalidad y por las implicaciones económicas que suponen para el sistema sanitario. En España, más del 25% de las primeras consultas en los centros de atención primaria se deben a un proceso infeccioso y en la hospitalización la infección nosocomial alcanza una prevalencia del 10%, siendo las más prevalentes la infección de tracto urinario (ITU), de herida quirúrgica y la neumonía<sup>124</sup>. Las infecciones oportunistas se caracterizan por 1) tener con frecuencia un origen endógeno ya que su agente causal proviene del propio reservorio del paciente y forma parte de la flora habitual del mismo; 2) diversas enfermedades requieren técnicas invasoras, cateterismos, sondas permanentes, entre otros que facilitan estas infecciones; 3) los estados de inmunodepresión en pacientes con cánceres o receptores de un trasplante favorecen el desarrollo de estos procesos infecciosos; 4) en la población ingresada en los hospitales predominan los ancianos frecuentemente debilitados y con diversas enfermedades simultáneas; y 5) utilización inadecuada de los antimicrobianos. Si a esto agregamos que los hospitales pueden ser una fuente de microorganismos resistentes, ya que ellos, generalmente, tienen una flora residente que infecta a los pacientes regularmente, podemos tener en resumen el panorama general del tipo y características clínicas de los pacientes que en esta Tesis se encontraron portadores de cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *S. enterica* productor de alguna de las  $\beta$ -lactamasas discutidas en páginas previas.

En promedio en cada año del trienio, del total de muestras analizadas entre un 50-85% de las muestras correspondieron a orinas y las muestras de sangre entre el 8-25%. En otros trabajos, descritos en la literatura acerca de BLEAs, las cepas procedían con mayor frecuencia de orina (cerca del 50% de las cepas), también de sangre (alrededor de 15%), seguido de pus y heridas<sup>128</sup>. Además las ITUs, son las infecciones bacterianas más frecuentes, ya que las infecciones respiratorias que la superan en número son en su mayoría de naturaleza no bacteriana. *E. coli* es el uropatógeno más frecuentemente encontrado<sup>77</sup> en las ITUs en todo el mundo, pero también el patógeno nosocomial más común (<33%)<sup>37</sup>.

En general las infecciones son una causa frecuente del aumento de la morbilidad en pacientes con una amplia variedad de neoplasias, y los patógenos asociados a esta alta morbilidad son miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp.) y *P. aeruginosa*. Con la quimioterapia intensiva ha aumentado la probabilidad de que los pacientes portadores de tumores sólidos mueran de infecciones y no de la enfermedad de base<sup>154</sup>. En nuestro estudio el mayor número de aislamientos correspondían a pacientes con neoplasias sólidas (11pacientes de 45) seguido de los pacientes con problemas cardiacos (7 pacientes de 45).

En un estudio realizado por Sotto y cols.<sup>163</sup> no observa que exista mayor riesgo de resistencia en un *E. coli* de ITU nosocomiales que ITU de pacientes ambulatorios, lo mismo observa Olesen y cols.<sup>118</sup> en las bacteremias debido a *E. coli* de adquisición nosocomial o comunitaria. Sin embargo Perrin y cols.<sup>126</sup>, quienes estudian pacientes hospitalizados en un hospital geriátrico, observan que la tasa de resistencia para amoxicilina-ácido clavulánico, ofloxacino y cotrimoxazol en cepas de *E. coli* responsables de ITUs nosocomiales fue mucho más alto que en cepas responsables de ITUs adquiridas en la comunidad. Además observaron utilizando un modelo de regresión logística que haber tenido una ITU previa durante el año anterior era el factor más común de riesgo para tener resistencia a los diferentes antibióticos estudiados. En esta Tesis este último parámetro no fue evaluado, y tampoco se puede predecir sobre la importancia de adquisición nosocomial o ambulatoria excepto por el número de aislamientos ya sea intrahospitalario (31 pacientes) o extrahospitalario (16 pacientes). La mayoría de las salas de hospitalización fueron la de neurología (6 casos) y la de cirugía general (6 casos). Pero si consideramos que la sala de cirugía general es una sala transitoria donde el paciente permanece durante algunas horas y analizando cada caso nos encontramos que 5 de los 6 pacientes a los que se les solicitó el estudio microbiológico (4 urocultivos y un drenaje subfrénico) tenían como enfermedad de base una neoplasia es decir procedían de la sala de oncología, y el otro era una insuficiencia cardíaca; entonces la sala de oncología en una reevaluación es la sala donde se aísla mayor número de cepas con BLEAs.

Es un hecho que se está produciendo un envejecimiento progresivo de la población y de allí el mayor número de patologías observables en este grupo. Según estadística de las Naciones Unidas entre los años 1950-2025 la población mundial se duplicará, mientras que el número de personas mayores de 60 años se multiplicarán por 5. En España se calcula que los menores de 14 años pasaran del 20,2% existente en 1950 al 19,4% en el 2001, mientras que los mayores de 65 años pasaran del 7,2% al 15,1% en el mismo período de tiempo<sup>157</sup>.

Con la edad hay modificaciones involutivas de los órganos, alteraciones del sistema inmune con disminución de las funciones de los linfocitos T y de la inmunidad celular, así como problemas nutricionales. Las infecciones son más frecuentes en este grupo de edad, son más insidiosas y se complican con la presencia de otras enfermedades<sup>113</sup>. De la misma forma en esta Tesis las cepas portadoras de BLEAs o cefamicinasas fueron aisladas en su gran mayoría de pacientes mayores a 60 años. Se han observado frecuentemente en los últimos años brotes de cepas multiresistentes provenientes de orina en las residencias donde viven ancianos, así entre diciembre de 1997 y marzo de 1999, en un Hospital de Israel, se observaron 97 cepas de *E. coli* con sensibilidad disminuida a C3G<sup>161</sup>.

De otro lado la frecuencia de las ITUs está influida de forma importante por la edad, sexo y determinadas situaciones propias de cada paciente. Así entre las mujeres mayores de 60 años la posibilidad de tener ITU es de 20%, mientras que los hombres de esa edad solo la presentan en un 10%, y esto aumenta en pacientes hospitalizados, sobre todo portadores de sondas. Entre marzo y agosto de 1994 se observó un brote, de *E. coli* portadores de BLEA en el departamento geriátrico de un hospital francés, que causó ITU en seis pacientes de dicha unidad, así mismo se comprobó por estudio del hisopado rectal que los mismos eran portadores de dichas cepas hasta mucho después del brote, así como otros pacientes que no mostraron signos de infección, esto se comprobó por ribotipado<sup>36</sup>.

Por otro lado no es de extrañar que en nuestro estudio se hallan más mujeres que hombres (30 mujeres mayoritariamente >60 años versus 16 hombres mayoritariamente

entre 45 y 60 años), ya que en general después de los 75 años las mujeres son en promedio dos veces más numerosas que los hombres. Además en el inicio de la vejez, hacia los 65 años, en los hombres son más numerosos los cánceres y las enfermedades cardiovasculares (la cardiopatía isquémica) que en las mujeres<sup>62</sup>. La interacción de enfermedades crónicas y de cambios fisiológicos asociados a la edad facilita la transmisión en los hospitales por la alta tasa de infecciones endémicas. La alta frecuencia de infección resulta en el uso intensivo antimicrobiano. Todo esto contribuye a un aumento de cepas con resistencia antimicrobiana entre los pacientes de los hospitales<sup>113</sup>.

Entre las enfermedades generales que facilitan con mayor frecuencia las infecciones oportunistas están la diabetes, la cirrosis y las neoplasias malignas, generalmente estas últimas por la granulopenia acompañante. La infección oportunista más frecuente en los pacientes con factores predisponente son la ITU, la infección de heridas (quirúrgicas, traumáticas y quemaduras), infecciones respiratorias (intubados) y la peritonitis (perforación intestinal). Muchas personas con factores predisponentes generales están sondadas o intubadas por lo que presentan además asociados, factores predisponentes locales.

Visto el panorama general es importante recalcar algunos casos como los tres pacientes portadores de BLEAs y tres pacientes portadores de cefamicinasas, los cuales se discutirán en los siguientes párrafos.

Del paciente A, de las que 5 cepas se describieron en el punto 2.1 de resultados, se estudiaron solamente dos cepas (1365-D y 1401-D). Aunque los criterios para tomar sólo una de la cuatro primeras cepas aisladas, se refieren únicamente a su perfil de inhibición y al punto isoeléctrico, criterios que son clínicamente válidos y los que interesan en este estudio, es posible que en términos de secuencia de aminoácidos o nucleótidos, la identidad de las  $\beta$ -lactamasas de las cuatro cepas no sea exactamente igual.

Dicho paciente, es una niña de 7 años con diagnóstico, un año antes, de leucemia aguda mieloblástica; con períodos de hospitalización en el último año entre 5 días y 1 mes, períodos en los cuales ha recibido profilaxis antimicrobiana, ha tenido urocultivos negativos, hemocultivos positivos con *E. coli*, *Streptococcus* del grupo “viridans” y *Micrococcus* y también tres meses antes hematuria persistente. El 26/03/99 se procede a extracción de medula osea, por eso antes de este ingreso tiene profilaxis antibiótica de 10 días con cefixime oral (17/03/99 al 27/03/99). El 06/05/99 se procede al trasplante autólogo de medula osea y se da profilaxis 21 días con cotrimoxazol y norfloxacino oral, además de fluconazol y aciclovir oral (07/05/99 al 28/05/99). Por febrícula, a pesar de tener urocultivo negativo se empieza tratamiento de 9 días con amicacina oral y ceftazidima más vancomicina endovenosa (10/05/99 a 19/05/99) y 2 días con miconazol oral (17/05/99 al 18/05/99). El 28/05/99 se tiene el primer urinocultivo positivo para *E. coli* portador de TEM-12, por esta razón, además de la febrícula persistente (hemocultivos seriados negativos) se reinstaura amicacina y ceftazidima más vancomicina endovenosa del 28/05/99 al 07/06/99. El 07/06/99 se retiran los antibióticos, la fiebre cede y a partir del 10/06/99 se observa una recuperación medular progresiva. El 15/06/99 se le vuelve aislar en otro urocultivo *E. coli* portador de TEM-12, se da 12 días cotrimoxazol más amoxicilina-ácido clavulánico oral (14/06/99 al 26/06/99). La paciente esta afebril pero el 26/06/99 se aísla en otro urocultivo *E. coli* con TEM-12, entonces se cambia la terapia por 11 días de cefotaxima endovenosa (26/06/99 al 07/07/99). Se hace urocultivo de control el día 01/07/99 y es negativo, a pesar de ello se continua con la cefotaxima porque es difícil saber si el urocultivo es negativo por el tratamiento antibiótico a que está sometida o porque ya se a negativizado el cultivo. El 08/07/99 se vuelve hacer otro urocultivo y es negativo, pero en el urocultivo del día 09/07/99 se vuelve aislar otro *E. coli* con TEM-12, entonces se vuelve a cambiar la terapia por ceftriaxona endovenosa 6 días (09/07/99 a 15/07/99) y además del 15/07/99 al 22/07/99 se da nitrofurantoina, al final del tratamiento se hace un nuevo urocultivo y es negativo, se da de alta.

Durante dos meses la paciente estuvo en casa sólo con controles ambulatorios. El 30/09/99 se hace urocultivo de control y es negativo. Por fiebre persistente, se ingresa la paciente, se vuelve a dar profilaxis antibiótica 10 días ciprofloxacino (03/10/99 a

13/10/99), el urocultivo es negativo, se toma hemocultivo se instaura 3 días con ceftazidima endovenosa más cotrimoxazol oral (03/10/99 al 06/10/99). El hemocultivo es positivo se aísla un *E. coli* sensible a todo excepto al cotrimoxazol, se cambia la terapia por 4 días de ceftriaxona endovenosa más gentamicina (06/10/99 al 10/10/99). Del 18/10/99 al 27/10/99 se instaura terapia con meropenem endovenoso, el día 26/10/99 se aísla de otro urocultivo un *E. coli* portador de TEM-10, se sigue 10 días de cefixima oral (27/10/99 a 07/11/99). El 10/11/99 se hace urocultivo de control es negativo.

En un estudio retrospectivo realizado en niños hospitalizados y ambulatorios en un hospital pediátrico en Canada entre 1992-94<sup>163</sup>, establece como algunos factores de riesgo de aislar cepas de *E. coli* resistentes en ITU, tener entre 2 y 6 años, haber recibido tratamiento antimicrobiano a 6 meses, haber tenido hospitalización previa, tener una enfermedad crónica de base, tener algún daño en el tracto genitourinario y tener hospitalización previa de < de 1 año. Todos estos factores de riesgo más o menos se dan en la paciente estudiada por nosotros.

Dado su estado de deficiencia inmunitaria por la enfermedad de base de la paciente A, se establecen pautas profilácticas, destinadas a evitar la colonización y reducir la flora endógena, ya que esta es la causa de más del 80% de las bacteriemias en infecciones en estos pacientes, por ello el uso de la vancomicina, aunque se ha observado que pueden producir un gran impacto sobre la flora colónica, favoreciendo la colonización por bacilos gramnegativos procedentes del medio hospitalario<sup>129</sup>. Otro tipo de profilaxis utilizada en esta paciente es la del cotrimoxazol junto con el norfloxacin y también el ciprofloxacino junto con un antifúngico como el fluconazol y también el uso de un antivírico como el aciclovir. Estos antimicrobianos actúan selectivamente sobre la flora aerobia y respetan la flora entérica anaerobia.

A pesar de que es considerado que las bacterias con BLEAs tipo TEM o SHV no se pueden tratar con C3G e incluso desde hace varios años las normativas dadas por la NCCLS señalan que todos los  $\beta$ -lactámicos deben ser dados como resistentes, aunque en el test *in vitro* alguno sea susceptible, se tiene documentado que organismos

portadores de BLEAs que parecen resistentes a unas C3G pero susceptibles a cefotaxima *in vivo* puede resultar efectivo el tratamiento con este antimicrobiano, aunque es importante tener en cuenta el efecto de la dosis y la concentración en el sitio de infección<sup>45</sup>.

En el caso de nuestra paciente A, el tratamiento con cefotaxima resulto infructuoso, en cambio si fue más efectivo, en una primera etapa con el *E. coli* portador de TEM-12 el tratamiento con ceftriaxona, para la cual la cepa era sensible (CIM 1 µg/mL)<sup>139,140</sup>, además de la nitrofurantoína, un antiséptico urinario cuyo mecanismo de acción no es muy bien conocido pero que es efectivo gracias a su biodisponibilidad elevada 90%, ya que más del 90% de *E. coli* permanecen susceptibles a este antimicrobiano<sup>37</sup>.

La cefixima, una C3G oral cuya principal bondad es la de poseer una vida media mayor que las otras C3G<sup>60</sup>, fue administrada después del meropenem endovenoso y seguramente esto ayudó a eliminar al *E. coli* productor de TEM-10.

Las dos muestras del paciente B, fueron de diferente origen (orina y exudado esternal); sin embargo, se consideró sólo una cepa, ya que el patrón de resistencia y el pI de ambas fueron iguales, de tal forma que presumiblemente el paciente estuvo colonizado por una única cepa. Esto explicaría aislados tan similares en dos fluidos diferentes. En el paciente C, se aislaron tres cepas, una de orina, otra de sangre y otra un hisopado rectal, considerándose para este estudio sólo una cepa, por similares razones a las explicadas para el paciente B.

El uso de profilaxis antibiótica en estos pacientes aumenta la probabilidad de seleccionar microorganismos resistentes en un hospital, y si el tubo digestivo de estos pacientes es colonizado, se convierte en el reservorio a partir del cual ascienden para causar infecciones urinarias. Así en el caso del paciente B, una paciente de 64 años, sometida a una cirugía cardíaca (by pass), profilaxis antibiótica con cefazolina y gentamicina, con 17 días de internamiento antes de la aparición de la ITU y de la infección de herida esternal, se aisló un *E. coli* productor de CTX-M-9. En el caso del paciente C, donde también se aisló un *E. coli* productor de CTX-M-9, sólo se sabe que

es un paciente de 87 años, con cardiopatía isquémica, quien ingreso por fractura de fémur 22 días antes en el Hospital de Jaén, pero no consta el tratamiento antibiótico recibido allí, y dos días después de su ingreso a nuestro hospital se les aisló el *E. coli* en la orina y sangre, y luego en un hisopado rectal, al tercer día; cabe recalcar que en este paciente el entorno donde se halla el gen que codifica para una  $\beta$ -lactamasa compatible con CTX-M-9, en ambas muestras, es diferente que en el resto de cepas de *E. coli* productoras de esa  $\beta$ -lactamasa. En resumen, en ambos pacientes probablemente, el origen del agente infeccioso es su reservorio intestinal.

Durante el trienio 1997-99 se encontraron 3 cepas productoras de cefamicinasa CMY-2. La cepa *S. enterica* serovar Mikawasima (170-Ma) se aisló en las heces de una niña de 5 años, que acudió a urgencias de pediatría por presentar un cuadro de gastroenteritis aguda, que no requirió hospitalización y tampoco consta tratamiento antimicrobiano, por lo que se supone su remisión sin necesidad de instaurar un tratamiento.

La cepa de *P. mirabilis* productora de CMY-2 (89-Hb), se encontró en una paciente de 87 años internada el 09/09/99 por pseudoartrosis séptica por fractura supracondilea de fémur derecho (el 20/02/99), con una cardioangioesclerosis como enfermedad de base. Además en 1998 sufrió una fractura pertrocanterea de fémur derecho y no tiene deambulacion hace año y medio aproximadamente. Se le pauta profilácticamente desde el 09/09/99 al 16/09/99 ceftazidima y ampicilina endovenosa. Se realizan cultivos de la prótesis infectada y se aísla *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus*, se instaura del 16/09/99 al 29/10/99 imipenem endovenoso. El 29/10/99 se aísla en el exudado de la herida postquirúrgica una cepa de *P. mirabilis* productora de CMY-2, por lo que se decide aislamiento de la paciente y seguir con la antibioticoterapia específica de imipenem. El 10/12/99 se negativiza el cultivo por lo que se suspende el antibiótico y se retira el aislamiento de la paciente.

La otra cepa productora de CMY-2 fue encontrada en un hemocultivo positivo para *K. pneumoniae* (175-Fb). El paciente tenía 70 años y fue internado por haber sufrido un accidente vascular cerebral con fractura de cadera. Como enfermedad de base presentaba un quiste renal derecho. Ingresa el 20/10/99, y desde esa fecha se da

amoxicilina-ácido clavulánico oral hasta el 28/10/99. Debido al aislamiento de *S. aureus* en un hemocultivo se cambia de pauta desde el 04/11/99 al 22/12/99 por cloxacilina oral y desde el 05/11/99 al 09/11/99 se agrega gentamicina endovenosa y a partir del 12/11/99 al 30/01/00 rifampicina oral. El 20/12/99 se aísla *K. pneumoniae* portador de CMY-2 de un hemocultivo, por probable sepsis por cateter. A partir del 23/12/99 se instaura ciprofloxacino endovenoso hasta el 30/01/00, fecha en que se suspende el antibiótico por tener cultivos de control desde el 03/01/00 negativos.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este estudio son las siguientes:

1) Se ha constatado que de las 13,800 enterobacterias aisladas, en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau entre 1997 y 1999, el número de cepas portadoras de BLEAs y cefamicinasas son 35 cepas de *Escherichia coli* que representa el 0,45% del total de cepas de *E. coli* estudiadas, 9 cepas de *Klebsiella pneumoniae* que representa el 1,83% del total de *K. pneumoniae*, 2 cepas de *Salmonella enterica* que representa el 0,11% del total de *S. enterica* y 1 cepa de *Proteus mirabilis* que representa el 0,11% del total de cepas de *P. mirabilis* estudiadas, por lo que su incidencia aún puede considerarse muy baja.

2) Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido detectadas en *Escherichia coli* han sido CTX-M-9 en 27 cepas, SHV-2 en 6 cepas, TEM-10 en 1 cepa y TEM-12 en 1 cepa; en *Klebsiella pneumoniae* se ha detectado SHV-2 en 8 cepas y en *Salmonella enterica* CTX-M-9 en 1 cepa.

3) De los datos expuestos se constata un predominio en nuestro medio de la CTX-M-9 que por otro lado ha aumentado con respecto a períodos anteriores pasando en *Escherichia coli* del 0,08% en el período 1994-1996 al 0,45% en los años evaluados en este estudio, lo que representa un incremento del quintuplo entre ambos períodos.

4) La selección con cefotaxima, en 21 cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa compatible con CTX-M-9 o SHV-2, permitió observar en 11 de ellas un incremento de 4 a 9 veces en la expresión de esas enzimas, lo que justifica la no utilización de estos antimicrobianos en clínica a pesar de que sus valores de CIM sean bajos.

5) Hemos detectado por primera vez en nuestro ámbito la presencia de cefamicinasas plasmídicas, concretamente de la CMY-2, en tres cepas de las siguientes especies: *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* y *Proteus mirabilis*

6) En los pacientes infectados por estas enterobacterias, la infección del tracto urinario fue la localización más frecuente significando el 73% de los casos, el 61% de los pacientes tenía más de 60 años, el 80% eran mujeres y la enfermedad de base predominante en estos pacientes fue la neoplasia sólida.

7) La incidencia global de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y cefamicinasas plasmídicas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, ha sido del 0,48%. Ello supone un aumento respecto al trienio anterior 1994-96 y donde la incidencia fue del 0,14%, lo cual es importante tenerlo en cuenta para la vigilancia y estudio de las mismas.

8) En este período, no se evidenció ningún brote epidémico intrahospitalario (H. de Sant Pau) causado por estos microorganismos, ya que no hubo relación ni en el tiempo ni en el espacio, entre las cepas portadoras de las  $\beta$ -lactamasas implicadas, presentando además serogrupos y biotipos diferentes.

BIBLIOGRAFIA



8. Barthélemy, M., Guionie, M., Labia, R. Beta-lactamases: determination of their isoelectric points. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13:695-698.
9. Barthélemy, M., Peduzzi, J., Bernard, H., Tancrede, C., Labia, R. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum -lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1122: 15-22.
10. Bass, L., Liebert, C., Lee, M., Summers, A., White, D., Thayer, S., Maurer, J. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in Avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2925-2929.
11. Bauernfeind, A., Chong, Y., Schweighart, S. Extended broad spectrum -lactamase in *Klebsiella pneumoniae*, including resistance to cephamycins. *Infection* 1989;17: 316-321.
12. Bauernfeind, A., Grimm, H., Schweighart, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 1990; 18: 294-298.
13. Bauernfeind, A., Casellas, M., Goldberg, M., Holley, M., Jungwirth, R., Mangold, P., Röhnisch, T., Schweighart, S., Wilhelm, R. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* 1992; 20: 158-163.
14. Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S., Casellas, M. Sequences of -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 509-513.



22. Bou, G., Oliver, A., Ojeda, M., Monzón, C., Martínez-Beltrán, J. Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid mediated  $\beta$ -lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2549-2553.
23. Bradford, P., Cherubin, C., Idemyor, V., Rasmussen, B., Bush, K. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime hydrolyzing  $\beta$ -lactamases in a single isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 761-766.
24. Bradford, P., Urban, C., Mariano, N., Projan, S., Rahal, J., Bush, K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid mediated AmpC  $\beta$ -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 563-569.
25. Bradford, P., Yang, Y., Sahm, D., Grope, L., Gardovska, D., Storch, G. CTX-M-5, a novel cefotaxima-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1980-1984.
26. Brenner D.J. *Enterobacteriaceae*. En: Krieg N. R., Holt J. G., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1984; 408-516.
27. Bret, L., Chanal-Claris, C., Sirot, D., Labia, R., Sirot, J. Characterization on an inhibitor resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2  $\beta$ -lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 183-191.
28. Bret, L., Chanal-Claris, C., Sirot, D., Chaibi, E., Labia, R., Sirot, J. Chromosomally encoded ampC-type  $\beta$ -lactamase in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1110-1114.

29. Bush, K. Classification of  $\beta$ -lactamases: group 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 264-70.
30. Bush, K., Jacoby, G., Medeiros, A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
31. Canica, M., Aroff, N., Barthélemy, M., Labia, R., Krishnamoorthy, R., Paul, G., Dupret, J. Phenotypic study of resistance of  $\beta$ -lactamase inhibitor resistant TEM enzymes which differ by naturally occurring variations and by site directed substitution at Asp. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1323-28
32. Caroff, N., Espaze, E., Gautreau, D., Richet, H., Reynaud, A. Analysis of the effects of  $-43$  and  $-32$  ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 783-788.
33. Collatz, E., Labia, R., Gutmann, L. Molecular evolution of ubiquitous  $\beta$ -lactamases towards extended-spectrum enzymes active against newer  $\beta$ -lactam antibiotics. *Mol Microbiol* 1990; 4: 1615-1620.
34. Coudron, P., Smith-Moland, E., Thomson, K. Occurrence and detection of AmpC  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1791-1796.
35. Courvalin, P., Goldstein, F., Philippon, A., Sirot, J. L'antibiogramme. 1<sup>a</sup> Ed., mpc/VIGOT, Bruselas 1985; 343.
36. Cukier, L., Lutzler, P., Bizien, A., Avril, J. Investigation of an epidemic of a extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* in a geriatrics department. *Pathol Biol* 1999; 47: 440-444.

37. Chomarat, M. Resistance of bacteria in urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16: 483-487.
38. Davis, B. Quimioterapia. En: Davis, B.; Dulbecco, R.; Eisen, H., Ginsberg, H. eds. *Tratado de Microbiología*. 4ª Ed. Masson S.A., Barcelona, 1996; 193-219.
39. De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Poupart, C., Dumas, P., Sirot, J. Concomitant dissemination of three extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among different *Enterobacteriaceae* isolated in a french hospital. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27: 441-457.
40. De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Bonnet, R., Sirot, J. and The French Study Group. A 1998 survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3177-3179.
41. Domínguez-Gil, A. Aspectos económicos de la infección. *Rev Esp Quimioterapia*, 1998; 11(Supl.3): 81-90.
42. Du Bois, S., Marriott, M., Amyes, S. TEM- and SHV-derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 7-22.
43. Ehrhardt, A., Sanders, C., Smith-Moland, E. Use of an isogenic *Escherichia coli* panel to design tests for discrimination of  $\beta$ -lactamase functional groups of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 630-633.
44. Elwell, L., Roberts, M., Mayer, L., Falkow, S. Plasmid mediated  $\beta$ -lactamase production in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 11: 528-533.

45. Essack, S. Treatment options for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producers. FEMS Microbiol Lett 2000; 190: 181-184.
46. Farmer III, J.J., Davis, B., Hickman-Brenner, F., McWhorter, A., Huntley-Carter, G., Asbury, M., Riddle, C., Whathen-Grady, H., Elias, C., Fanning, G., Steigerwalt, A., O'hara, C., Morris, G., Smith, P., Brenner, D. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1985; 21: 46-76.
47. Farmer III, J.J. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification, En: Murray, P., Tenover, F., Tenover, F., Tenover, F., Tenover, F., Tenover, F., eds. Manual of Clinical Microbiology, 7<sup>a</sup> Ed. ASM, Washington DC, 1999; 442-458.
48. Fernández-Aranguiz, A., Alonso, R., Colom, K., Gallego, L., Morla, A., Garaizar, J., Cisterna, R. Estudio multicéntrico de la resistencia a la cefotaxima durante el año 1991: Detección y caracterización de nuevas  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado. Rev Esp Quimioterapia 1991; 4: 137-144.
49. Fernández-Rodríguez, A., Reguera, J., Pérez-Díaz, J., Picazo, J., Baquero, F. Primera epidemia española de resistencia plasmídica a cefalosporinas de tercera generación: implicación de SHV-2. Enferm Infecc Microbiol Clin 1992;10: 456-461.
50. Fey, P., Safranek, T., Rupp, M., Dunne, E., Ribot, E., Iwen, P., Bradford, P., Angulo, F., Hinrichs, S. Ceftriaxone resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. N Engl J Med 2000; 342: 1242-1249.
51. Fosberry, A., Payne, D., Lawlor, E., Hodgson, J. Cloning and sequence analysis of *bla*<sub>BIL-1</sub>, a plasmid mediated class C  $\beta$ -lactamase gene in *Escherichia coli* BS. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 1182-1185.

52. Galleni, M., Lindberg, F., Normank, S., Cole, S., Honore, N., Joris, B., Frere, J. Sequence and comparative analysis of three *Enterobacter cloacae* ampC -lactamase genes and their products. *Biochem J* 1988; 250: 753-760.
53. Gazouli, M., Tzouvelekis, L., Prinarakis, E., Miriagou, V., Tzelepi, E. Transferable cefoxitin resistance in *Enterobacteriaceae* from Greek hospitals and characterization of a plasmid mediated group 1 -lactamase (LAT-2). *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1736-1740.
54. Gazouli, M., Sidorenko, S., Tzelepi, E., Kozlova, S., Gladin, D., Tzouvelekis, L. A plasmid mediated -lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St. Petersburg. Russia. *J. Antimicrob. Chemother* 1998; 41: 119-121.
55. Gazouli, M., Tzelepi, E., Sidorenko, S., Tzouvelekis, L. Sequence of the gene encoding a plasmid mediated cefotaxime hydrolyzing class A -lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1259-1262.
56. Gazouli, M., Tzelepi, E., Markogiannakis, A., Legakis, N., Tzouvelekis, L. Two novel plasmid mediated cefotaxime hydrolyzing -lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 165: 289-293.
57. Gazouli, M., Tzouvelekis, L., Vatopoulos, A., Tzelepi, E. Transferable class C -lactamases in *Escherichia coli* strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 and LAT-4) closely related to *Citrobacter freundii* AmpC -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 419-425.

58. García de Lomas, J., Navarro, D., Gimeno, C. Mecanismo de acción de los antimicrobianos. En: García Sánchez, J., López, R. y Prieto, J. eds., Antimicrobianos en medicina. Prous Science, Barcelona, 1999; 19-28.
59. García, J., Fresnadillo, M., Arce, J., García E. Antibióticos betalactámicos. En: García Sánchez, J.; López, R., Prieto, J. eds., Antimicrobianos en medicina. Prous Science, Barcelona, 1999; 213-226.
60. García-Rodríguez, J., Muñoz, J. Cefalosporinas En: García Sánchez, J.; López, R., Prieto, J. eds., Antimicrobianos en Medicina. Prous Science, Barcelona, 1999; 273-298.
61. Gil, F., Payá, M., Asensio, M., Torres, M., Pastor, R., Merino J. Incumplimiento del tratamiento con antibióticos en infecciones agudas no graves. Med Clin 1999; 112: 731-733.
62. Gjonca, A., Bobak, M. Albanian paradox, another example of protective effect of Mediterranean lifestyle?. Lancet 1997; 350: 1815-1817.
63. Gniadkowski, M., Schneider, I., Palucha, A., Jungwirth, R., Mikiewicz, B., Bauernfeind, A. Cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime hydrolyzing  $\beta$ -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 827-832.
64. Gutmann, L., Ferre, B., Goldstein, F., Rizk, N., Pinto-Schuster, E., Acar, J., Collatz, E. SHV-5, a novel SHV-type  $\beta$ -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 951-956.

65. Hall, R., Collis, C. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 1995;15: 593-600.
66. Henquell, C., Sirot, D., Chanal, C., De Champs, C., Chatron, P., Lafeuille, B., Texier, P., Sirot, J., Cluzel, R. Frequency of inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in France. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 707-714.
67. Heymann, D. The urgency of a massive effort against infectious diseases. World Health Organization, 29 June 2000.
68. Hooton, T. Pathogenesis of urinary tract infections: an update. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(Suppl. 1): 1-7.
69. Ishii, Y., Ohno, A., Taguchi, H., Imajo, S., Ishiguro, M., Matsuzawa, M. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase isolated from *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2269-2275.
70. Jacoby, G., Medeiros, A. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1697-1704.
71. Jacoby, G. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13 (Suppl 1): S2-S11.
72. Jacoby, G., Bush, K. (2000) Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant  $\beta$ -lactamases. Internet: <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>
73. Jaurin, B., Grundström, T., Edlund, T., Normark, S. The *E. coli*  $\beta$ -lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* 1981; 290: 221-225.

74. Jaurin, B., Grundström, T. *AmpC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of  $\beta$ -lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 4897-4901.
75. Jarlier, V., Nicolas, M., Fournier, G., Philippon A. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 867-878.
76. Jouvenot, M., Deschaseaux, M., Royez, M., Mougín, C., Cooksey, R., Michel-Briand Y., Adessi, G. Molecular hybridization versus isoelectric focusing to determine TEM-type  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 300-305.
77. Kahlmeter, G. The ECO-SENS project: a prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens interim report. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46 (Suppl 1): 15-22.
78. Kim, J., Lee, H. Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV  $\beta$ -lactamases by ligase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1860-1864.
79. Kitzis, M., Billot-Klein, D., Goldstein, F., Williamson, R., Tran Van Nhieu, G., Carlet, J., Acar, J., Gutmann, L. Dissemination of the novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase CTX-1, which confers resistance to broad-spectrum cephalosporins, and its inhibition by  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 9-14.
80. Kliebe, C., Nies, B., Meyer, J., Tolxdorff-Neutzling, R., Wiederman, B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 302-307.

81. Knothe, H., Shah, P., Kreméry, V., Antal, M., Mitsuhashi, S. Trasferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11: 315-317.
82. Koeck, J., Arlet, G., Philippon. A., Basmaciogullari, S., Thien, H., Buisson, Y. Cavallo, J. A plasmid mediated CMY-2  $\beta$ -lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 152: 255-260.
83. Levesque, C., Piche, L., Larose, C., Roy, P. PCR mapping of integrons reveals novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:185-191.
84. Lindberg, F., Lindquist, S., Normark, S. Inactivation of the *ampC* gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii*  $\beta$ -lactamases. *J Bacteriol* 1987; 169: 1923-1928.
85. Lindberg, F., Lindquist, S., Normark, S. Genetic basics of induction and overproduction of chromosomal class 1  $\beta$ -lactamase in nonfastidious gramnegative bacilli. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 782-785.
86. Liu, P., Gur, D., Hall, L., Livermore, D. Survey of the prevalence of  $\beta$ -lactamases amongst 1000 gramnegative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 429-447.
87. Livermore, D.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-584.
88. Livermore, D., Williams, J.  $\beta$ -lactams: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance. En: Lorian, V. ed. *Antibiotics in laboratory medicine*. 4<sup>a</sup> Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1996; 502-578.

89. Livermore, D.  $\beta$ -lactamases mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41(Suppl. D): 25-41.
90. Lodge, J., Minchin, S., Piddock, L., Busby, J. Cloning sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *P. aeruginosa* chromosomal ampC  $\beta$ -lactamase. *Biochem J* 1990; 272: 627-631.
91. Lodge, G., Piddock, L. The control of Class I  $\beta$ -lactamase expression in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28: 167-172.
92. Ma, L., Ishii, Y., Ishiguro, M., Matsuzawa, H., Yamaguchi, K. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A  $\beta$ -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1181-1186.
93. Marchese, A., Arlet, G., Schito, G., Lagrange, P., Philipon A. Characterization of FOX-3, an AmpC-Type plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase from an italian isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 446-467.
94. Mathew, A., Harris, A., Marshall, M., Ross G. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of  $\beta$ -lactamases. *J Gen Microbiol* 1975; 88: 169-178.
95. Mathew, M. Plasmid mediated  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J Antimicrob Chemother* 1979; 5: 349-358.
96. Matsumoto, Y., Ikeda, F., Kamimura, T., Yokota, Y., Mine, Y. Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyminocephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1243-1246.

97. Medeiros, A. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactams antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24(Suppl S1): S19-S45.
98. Mensa, J., Gatell, J., Jiménez de Anta, M., Prats, G. Guía terapéutica antimicrobiana. 10<sup>a</sup> Ed. Masson S.A., Barcelona, 2000.
99. Miró, E., del Cuerpo, M., Navarro, F., Sabaté, M., Mirelis, B., Prats, G. Emergence of clinical *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 535-538.
100. Mitsuhashi, S.; Inoue, M., Masuyoshi, S. Antibacterial activity of cefotaxime. *J Antimicrob Chemother* 1980; 6(Suppl A): 37-46.
101. Moellering, R., Jr Meeting the challenges of  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31(Suppl A): 1-8.
102. Moken, M., McMurry, L., Levy, S. Selection of multiple antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 41: 2770-2772.
103. Morosini, M., Blázquez, J., Negri, M., Canton, R., Loza, E., Baquero, F. Characterization of a nosocomial outbreak involving an epidemic plasmid encoding for TEM-27 in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Othmarschen. *J Infect Dis* 1996; 174: 1015-1020.
104. Morosini, M., Negri, M., Schichet, B., Baquero, M., Baquero, F., Blázquez, J. An extended-spectrum AmpC-type  $\beta$ -lactamase obtained by in vitro antibiotic selection. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 165: 85-90.

105. M'Zali, F., Gascoyne-Binzi, D., Heritage, J., Hawkey, P. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV  $\beta$ -lactamase using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 797-802.
106. M'Zali, F., Chanawong, A., Kerr, K., Birkenhead, D., Hawkey, P. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the E-test ESBL. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 881-885.
107. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6 y M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 1999.
108. Navarro, F., Pérez-Trallero, E., Marimón, J., Aliaga, R., Gomariz, M., Mirelis, B. CMY-2 producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain. 2001 (remitido a publicación).
109. Negri, M., Lipsitch, M., Blázquez, J., Levin, B., Baquero, F. Concentration dependent selection of small phenotypic differences in TEM  $\beta$ -lactamase mediated antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2485-2491.
110. Neidhart, F.C. *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology. 2ª Ed. ASM, Washington DC, 1996.
111. Nelson, E., Gay Elisha, B. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 957-959.

112. Nicolas, M., Jarlier, V., Honore, N., Philippon, A., Cole, S. Molecular characterization of the gene encoding SHV-3  $\beta$ -lactamase responsible for transferable cefotaxime resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 2096-2100.
113. Nicolle, L., Strausbaugh, L., Garibaldi, R. Infections and antibiotic resistance in nursing homes. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 1-17.
114. Nikaido, H., Normark, S. Sensitivity of *Escherichia coli* to various beta-lactams is determined by interplay of outer membrane permeability and degradation by periplasmic beta-lactamases: a quantitative predictive treatment. *Mol Microbiol* 1987; 1: 29-36.
115. Nüesch-Inderbilen, M., Hächler, H., Kayser, F. New system based on site-directed mutagenesis for highly accurate comparison of resistance levels conferred by SHV  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1726-1730.
116. Nüesch-Inderbilen, M., Hächler, H., Kayser, F. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV  $\beta$ -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 398-402.
117. Nüesch-Inderbilen, M., Kayser, F., Hächler, H. Survey and molecular genetics of SHV  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 943-949.
118. Olesen, B., Kolmos, H., Orskov, F., Orskov, I. A comparative study of nosocomial and community-acquired strains of *Escherichia coli* causing bacteraemia in a Danish University Hospital. *J Hosp Infect* 1995; 24: 295-304.

119. Oliver, A., Pérez-Díaz, C., Coque, T., Baquero, F., Cantón, R. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 616-620.
120. Palucha, A., Mikiewicz, Hryniewica, W., Gniadkowski, M. Concurrent outbreaks of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing organisms of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw hospital. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 489-499.
121. Pangon, B., Bizet, C., Buré, A. In vivo selection of a cephamycin resistant, porin deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3  $\beta$ -lactamase. *J Infect Dis* 1989;159: 1005-1006.
122. Papanicolau, G., Medeiros, A., Jacoby, G. Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino and methoxy  $\beta$ -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2200-2209.
123. Payne, D., Amyes, S. (1991) Transferable resistance to extended-spectrum  $\beta$ -lactams: a major threat or a minor inconvenience? *J Antimicrob Chemother* 1991; 27: 255-261.
124. Peña, C., Pujol, M., Pallarés, R. Estimación del coste atribuible a la infección nosocomial: Prolongación de la estancia hospitalaria y cálculo de costes alternativos. *Med Clin* 1996; 106: 441-444.
125. Perilli, M., Franceschini, N., Segatore, B., Amicosante, G., Oratore, A., Duez, C., Joris, B., Frere J. Cloning and nucleotide sequencing of the gene encoding the  $\beta$ -lactamase from *Citrobacter diversus*. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 67: 79-84.

126. Perrin, M., Donnio, Y., Heurtin-Lecorre, C., Travert, F., Avril, L. Comparative antimicrobial resistance and genomic diversity of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in the community and in hospitals. *J Hosp Infect* 1999; 41: 273-279.
127. Petit, A., Ben Yaghlane-Bousslama, H., Sofer, L., Labia, R. Does high level production of SHV-type penicillinase confer resistance to ceftazidime in Enterobacteriaceae? *FEMS Microbiol Lett* 1992; 71:89-94.
128. Philippon, A., Labia, R., Jacoby, G. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1131-1136.
129. Pizzo, P. Empirical therapy and prevention of infection in the immunocompromised. En: Mandel, G., Douglas, R., Bennett, J. eds. *Principles and practice of infectious diseases*. Churchill, Livingstone, New York, 1999; 2686-2696.
130. Podkielski, A., Schonling, J., Melzer, B., Haase, G Different promoters of SHV-2 and SHV-2a  $\beta$ -lactamase lead to diverse level of cefotaxime resistance in their bacterial producers. *J Gen Microbiol* 1991; 137: 1667-1675.
131. Prats, G., Mirelis, B. Enterobacteriaceae. En: Perea, E. J. eds. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Doyma, Barcelona, 1992; 624-646.
132. Prats, G., Mirelis, B. Enterobacterias. Características generales. Enterobacterias oportunistas. *Escherichia coli*. En: García-Rodríguez, J. y Picazo, J. eds. *Microbiología Médica*. Mosby/Doyma, S.A., Madrid, 1996; 223-238.

133. Prats, G. Flora normal y microorganismos patógenos en ginecología y obstetricia. En: Cabero, L. ed. Patología infecciosa en ginecología y obstetricia. Hoechst Marion Roussel, Barcelona, 1999;1-20.
134. Pritout, J., Sanders, C., Sanders, E. Antimicrobial resistance with focus on  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacilli. Am J Med 1997; 103: 51-59.
135. Quinn, J., Miyashiro, D., Sahm, D., Flamm, R., Bush, K. Novel plasmid mediated  $\beta$ -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1451-1456.
136. Rasheed, J., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., Steward, C., Hill, B., Medeiros, A., Tenover, F. Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 647-653.
137. Rasmussen, B., Bush, K. Carbapenem hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 223-232.
138. Recchia, G., Hall, R. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. Trends Microbiol 1997; 5: 389-393.
139. Rice, L., Willey, S., Papanicolaou, G., Medeiros, A., Eliopoulos, G., Moellering, R., Jacoby, G. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamases at a Massachusetts chronic care facility. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 2193-2199.
140. Rice, L., Marshall, S., Carias, L., Sutton, L., Jacoby, G. Sequences of MGH-1, YOU-1 and YOU-2 extended spectrum  $\beta$ -lactamase genes. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 2760-2761.

141. Richard, J. Une méthode simple de marquage épidémiologique: la biotypie, application a *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli*. Bull Assoc. Anc. Elèves Inst. Pasteur 1981; 87: 14-21.
142. Richmond, M., Sykes, R. The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. Adv Microb Physiol 1973; 9: 31-88.
143. Roupas, A., Pitton, J. (1974) R factor-mediated and chromosomal resistance to ampicillin in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1974; 5: 186-191.
144. Sabaté, M., Vergés, C., Miró, E., Mirelis, B., Navarro, F., Del Río, E., Prats, G. Incidencia de betalactamasas de espectro ampliado en *Escherichia coli* en un hospital universitario durante 1994-1996. Enferm Infecc Microbiol Clin 1999; 17: 401-404.
145. Sabaté, M., Tarragó, R., Miró, E., Vergés, C., Navarro, F., Barbe, J., Prats, G. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1970-1973.
146. Sabaté, M., Miró, E., Navarro, F., Vergés, C., Aliaga, R., Mirelis, B., Prats, G.  $\beta$ -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates in Spain between 1994-1996. 2001 (remitido para publicación).
147. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

148. Sancho, J. Epidemiología y etiología quirúrgica de las complicaciones infecciosas postoperatorias. En: Alvarez, F. ed. Complicaciones infecciosas en el postoperatorio de cirugía abdominal. Ergon, S.A., Madrid, 2000, 3-20
149. Sanders, C., Iaconis, J., Bodey, G., Samonis, G. Resistance to ticarcillin-potassium clavulanate among clinical isolates of the family *Enterobacteriaceae*: role of PSE-1  $\beta$ -lactamase and high levels of TEM-1 and SHV-1 and problems with false susceptibility in disk diffusion tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1365-1369.
150. Sanders, C., Sanders, W.  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 824-839.
151. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 5463-5467.
152. 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; 12: 423-434.
153. Senda, K., Arakawa, Y., Nakashima, K., Ito, H., Ichiyama, S., Shimokata, K. Multifocal outbreaks of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad spectrum  $\beta$ -lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 349-353.
154. Shlaes, D., Binczewski, B., Rice, L. Emerging antimicrobial resistance and the immunocompromised host. *Clin Infect Dis* 1993; 17(Suppl 2): S527-S536.
155. Silva, J., Aguilar, C., Becerra, Z., Lopez-Antunano, F., Garcia, R. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of enterobacteria in Mexico. *Microb Drug Resist* 1999; 5: 189-193.

156. Simarro, E., Navarro, F., Ruiz, J., Miró, E., Gómez, J., Mirelis, B. *Salmonella enterica* serovar Virchow with CTX-M-like  $\beta$ -lactamase in Spain. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4676-4678.
157. Simón, M., Honorato, J. Tratamiento antibiótico en la tercera edad. En: Drobnic, L. ed. Tratamiento antimicrobiano. Madrid, 1997; 75-83.
158. Sirot, D., Chanal, C., Labia, R., Meyran, M., Sirot, J., Cluzel, R. Comparative study of five plasmid-mediated ceftazidimases isolated in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24: 509-521.
159. Sirot, D., Goldstein, F., Soussy, C., Courtieu, A., Husson, M., Lemozy, J., Meyran, M., Morel, C., Perez, R., Quentin-Noury, C., Reverdy, M., Scheftel, J., Rosembaim, M., Rezvany, Y. Resistance to cefotaxime and seven other  $\beta$ -lactams in members of the family *Enterobacteriaceae*: A 3 year survey in France. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1677-1681.
160. Siu, L., Lu, P., Hsueh, P., Lin, F., Chang, S., Luh, K., Ho, M., Lee, C. Bacteremia due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 4020-4027.
161. Slucky-Shraga, I., Wolk, M., Volis, S., Vulikh, I., Sompolinsky, D. Multiresistant *Escherichia coli* from elderly patients. *Harefuah* 2000;139: 25-29.
162. Sonnenwirth, A. The enteric bacilli and bacteroides. En: Davis, B.; Dulbecco, R.; Eisen, H., Ginsberg, H. eds. *Microbiology, including immunology and molecular genetics*. 5<sup>a</sup> Ed. Harper and Row, Pennsylvania, 1988; 645-672.

- 
163. Sotto, A., Merle de Boever, C., Fabbro-Peray, P., Gouby, A., Sirot, D., Jourdan, J. Risk factors for antibiotic resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 438-444.
  164. Spratt G. Penicillin-binding proteins and the future of  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Gen Microbiol* 1983;129: 1247-1250.
  165. Stapleton, P., Wu, P., King, A., Shannon, K., French, G., Philips, I. Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2478-2483.
  166. Stapleton, P., Shannon, K., French, G. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid determined CMY-4  $\beta$ -lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1206-1210.
  167. Sykes, R., Mathew, M. The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976; 2: 115-127.
  168. Then, R., Angehrn, P. Trapping of nonhydrolyzable cephalosporinases in *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* as a possible resistance mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21: 711-721.
  169. Thomson, K., Sanders, C. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double disk and three dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1877-1882.
  170. Thomson, K., Sanders, C. A simple and reliable method to screen isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* for the production of TEM and SHV derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 549-554.

171. Thomson, K., Smith-Moland, E. Version 2000: the new  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect* 2000; 2: 1225-1235.
172. Towner, K. J. Mechanisms of acquired resistance. En: Greenwood, D. ed. *Antimicrobial Chemotherapy*, 3<sup>a</sup> Ed. Oxford University Press, Oxford, 1995; 147-158.
173. Tzouvelekis, L., Tzelepi, E., Mentis, A., Tsakris, A. Identification of a novel plasmid mediated  $\beta$ -lactamase with chromosomal cephalosporinase characteristics from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 645-654.
174. Tzouvelekis, L., Tzelepi, E., Mentis, A. Nucleotide sequence of a plasmid mediated cephalosporinase gene (*bla<sub>LAT-1</sub>*) found in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2207-2209.
175. Tzouvelekis, L., Gazouli, M., Markogiannaki, A., Paraskaki, E., Legakis, N., Tzelepi, E. Emergence of resistance to third generation cephalosporins amongst *Salmonella typhimurium* isolates in Greece: report of the first three cases. *J. Antimicrob. Chemother* 1998; 42: 273-275.
176. Verdet, Ch., Arlet, G., Redjeb, S., Hassen. A., Lagrange, P., Philippon, A. Characterisation of CMY-4, an AmpC-type plasmid mediated  $\beta$ -lactamase in a Tunisian clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 169: 235-240.
177. Verdet, Ch., Arlet, G., Barnaud, G., Lagrange, P., Philippon, A. A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla<sub>DHA-1</sub>* gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 222-225.

178. Weber, D., Sanders, C., Bakken, J., Quinn, J. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*. J Infect Dis 1990; 162: 460-465.
179. Wiedemann, B., Kliebe, C., Kresken, M. The epidemiology of  $\beta$ -lactamases. J Antimicrob Chemother 1989; 24(Suppl B): 1-22.
180. Wiedemann, B., Dietz, H., Pfeifle, D. Induction of  $\beta$ -lactamase in *Enterobacter cloacae*. Clin Infect Dis 1998; 27(Suppl 1): S42-S47.
181. World Health Organization. The World Health Report 1996. Fighting disease, fostering development. WHO, Geneva, 1996.
182. World Health Organization. Containing Antimicrobial Resistance: Review of the literature of a WHO workshop on the development of a global strategy for the containment of antimicrobial resistance. Geneva, 1999.
183. World Health Organization. Overcoming Antimicrobial Resistance, Geneva, 2000.
184. Wu, S., Dornbusch, K., Norgren, M., Kronwall, G. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase from *Klebsiella oxytoca* not belonging to the TEM or SHV family. J Antimicrob Chemother 1994; 30: 3-16.
185. Wu, S., Dornbusch, K., Kronwall, G., Norgren, M. Characterization and nucleotide sequence of a *Klebsiella oxytoca* cryptic plasmid encoding a CMY-type  $\beta$ -lactamase: confirmation that the plasmid mediated cephamycinase originated from the *Citrobacter freundii* AmpC  $\beta$ -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1350-1357.

186. Zhou, X., Bordon, F., Sirot, D., Kitzis, M., Gutmann, L. Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1  $\beta$ -lactamase conferring resistance of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1085-89.