

## **1. INTRODUCCIÓ**

---

## 1.1. La família *Enterobacteriaceae*

La família *Enterobacteriaceae* està formada per un conjunt de bacils gramnegatius, heterogenis pel que fa al seu hàbitat i la seva capacitat patogènica, però que comparteixen caràcters estructurals i fisiològics i tenen una elevada homologia genètica.

La majoria de les espècies d'aquesta família poden ocupar indistintament hàbitats molt variats en el medi ambient; altres ocupen hàbitats més restringits, associats a determinats vegetals o al tub digestiu de certs animals. A l'home, existeixen espècies comensals estables o transitòries del tub digestiu i espècies patògenes primàries.

Els membres d'aquesta família tenen una mida entre 0,3-1,0 x 1,0-6,0 µm, poden ser mòbils (presenten flagels de localització períttrica) i no formen espores. Tots els membres són aerobis i anaerobis facultatius, amb un creixement visible després de 18-24 hores d'incubació en medis usuals. La família *Enterobacteriaceae* té requeriments nutricionals simples, fermenta la glucosa, redueix els nitrats a nitrits, és oxidasa negativa i catalasa positiva. L'absència d'activitat citocromooxidasa és una característica important perquè permet distingir els enterobacteris de molts altres bacils gramnegatius fermentadors i no fermentadors. Pel que fa a les característiques genotípiques, cal destacar que aquesta família té un contingut en el DNA de G + C entre 39-59%<sup>102</sup>.

Diversos compostos com el citrat sòdic, l'eosina, el violeta cristall, el lauril sulfat, els àcids biliars i d'altres, incorporats als medis de creixement a petites concentracions, inhibeixen la flora grampositiva i permeten el creixement dels enterobacteris i altres bacteris gramnegatius, com ara les pseudomones. A major concentració i en barreges adequades, inhibeixen els enterobacteris no patògens i permeten el creixement dels patògens com són ara les shigel·les, les salmonel·les i el gènere *Yersinia*. L'enorme activitat i variabilitat metabòlica dels membres de la família *Enterobacteriaceae* ha permès identificar les espècies que la formen basant-se en les seves diferències metabòliques.

L'habilitat de fermentar la lactosa ha estat utilitzada clàssicament com una característica diferencial que ha estat incorporada als medis de cultiu per separar la majoria de les soques d'*Escherichia*, *Klebsiella* i *Enterobacter*, que fermenten lactosa. S'anomenen coliformes. D'altres *Enterobacteriaceae* comuns no fermenten lactosa.

La paret cel·lular dels enterobacteris es caracteritza per estar formada per peptidoglicà i una membrana externa. Entre la membrana externa i la membrana citoplasmàtica hi ha l'espai periplasmàtic. La membrana externa conté els lipopolisacàrids (LPS), que actuen com a endotoxina perquè contenen àcids grassos insaturats (lípid A). La paret cel·lular constitueix una barrera osmòtica que sols és permeable a l'aigua i a les molècules orgàniques sense càrrega i de mida petites. La membrana externa conté uns canals hidrofílics formats per polímers d'unes proteïnes anomenades porines<sup>57, 102</sup> (figura 1).

Els bacteris contenen nombroses macromolècules que tenen capacitat immunogènica (antígens). De tots els antígens dels enterobacteris, els antígens O, H i K són els que tenen més interès. L'antigen O es troba a l'LPS situat a la membrana externa de la paret dels enterobacteris. Aquests LPS posseeixen estructuralment tres zones: la més interna és el lípid A, a la zona mitjana hi ha un nombre limitat de sucres (de 5 a 7) i a l'externa una llarga cadena de sucres (un polisacàrid), que constitueix l'antigen O.

Els flagels de les soques mòbils estan formats per subunitats proteiques (flagelina), altament antigèniques, que constitueixen l'antigen H.

Algunes espècies produeixen quantitats variables de polisacàrid capsular immunogènic, que constitueix, quan hi és present, l'antigen K.

En l'actualitat, la família *Enterobacteriaceae* està formada per 30 gèneres, més de 157 espècies i diversos grups no nominats<sup>84</sup>.

Les espècies comensals poden causar infeccions oportunistes. Els enterobacteris més freqüentment aïllats en un laboratori de microbiologia clínica, causants d'aquests tipus d'infeccions són *Escherichia coli* i *Klebsiella* seguides d'*Enterobacter* i les diferents espècies del grup *Proteus-Morganella-Providencia*.

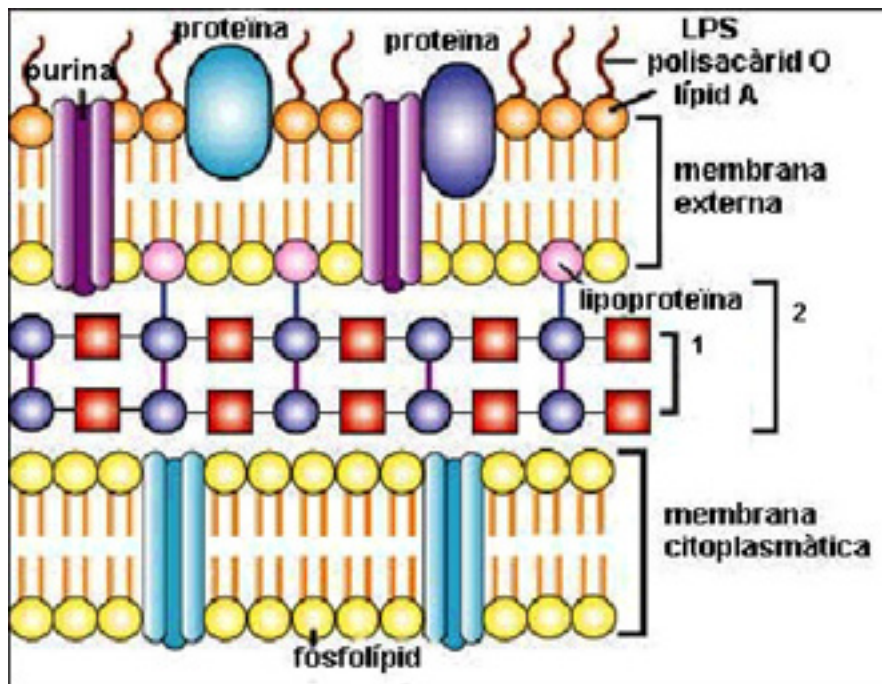
D'altra banda, es troba un grup d'enterobacteris que són patògens per a l'home, com ara les salmonel·les, les shigel·les i el gènere *Yersinia*, que causen gastroenteritis per diferents mecanismes (invasius, toxigènics) o altres quadres clínics específics com les febres tifoides (*Salmonella* serovar Typhi) o la pesta (*Yersinia pestis*)<sup>102</sup>.

El tractament d'elecció en la majoria de les infeccions produïdes pels enterobacteris són els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics. Els  $\beta$ -lactàmics són uns dels antibiòtics més utilitzats en la pràctica mèdica, ja que tenen gran eficiència terapèutica i no són tòxics per a l'home perquè bloquegen uns enzims encarregats de la síntesi de la paret bacteriana, dels quals no hi ha homòlegs als animals. Inhibeixen la multiplicació bacteriana i finalment produeixen la lisi bacteriana per un procés molt complex d'afectació de la paret cel·lular i autolisi. Excepte per als enterococs, l'acció antibiòtica és bactericida<sup>72, 138</sup>.

Els  $\beta$ -lactàmics de baix pes molecular i de naturalesa hidrofílica utilitzen les purines o canals proteics per arribar a l'espai periplasmàtic. La majoria dels antibiòtics penetren a l'interior del bacteri per difusió simple. Això no obstant, travessar la membrana externa suposa més dificultat, particularment per als antibiòtics hidrofòbics, la majoria dels quals ho fan prèvia dissolució en la membrana. Pocs antibiòtics utilitzen un mecanisme de transport actiu o autodirigit per accedir a l'interior dels bacteris. El peptidoglicà, que constitueix l'exoesquelet, no suposa un obstacle a la penetració dels antibiòtics, ja que la mida d'aquests és menor que el seu límit d'exclusió (100 kDa). Finalment hi ha la membrana citoplasmàtica o interna, que pràcticament no oposa resistència al pas dels antibiòtics de menor pes molecular, amb independència de la hidrofobicitat de la molècula<sup>72, 138</sup> (figura 1).

Encara que els enterobacteris posseeixen la sensibilitat característica dels bacteris gramnegatius, i per tant són sensibles a la majoria dels  $\beta$ -lactàmics, aminoglicòsids, tetraciclins, cloramfenicol, colistina, sulfamides, trimetoprim i quinolones; existeixen resistències naturals d'un gènere o una espècie a alguns antibiòtics i altres d'adquirides per mutació o per recombinació genètica, seguides de selecció. El fet que els enterobacteris es trobin normalment en el tub digestiu de

l'home i dels animals fa que estiguin sota la pressió selectiva de qualsevol tractament antibiòtic, dins la qual persisteixen les soques que han esdevingut resistents per mutació o recombinació. Aquesta selecció de soques resistents també és molt important en els animals, als quals se'ls administra, a les granges, antimicrobians barrejats amb els aliments per a què s'engreixin. Aquestes soques resistents poden passar després a l'home.



**Figura 1.** Paret cel·lular dels bacteris gramnegatius formada per la membrana externa i el peptidoglicà. 1, peptidoglicà. 2, espai periplasmàtic.

## 1.2. Antibiótics $\beta$ -lactàmics

Els antibiótics  $\beta$ -lactàmics constitueixen una família caracteritzada per l'anell  $\beta$ -lactàmic, per a la seva funció antibacteriana. Tots els subgrups de  $\beta$ -lactàmics es poden considerar derivats d'un nucli químic en el qual, a més de l'anell  $\beta$ -lactàmic hi pot haver un heterocicle conjugat.

L'any 1928, Fleming va descobrir el primer  $\beta$ -lactàmic, la penicil·lina G (benzilpenicil·lina), a partir d'una soca d'un fong, *Penicillium notatum*. La penicil·lina

es va començar a utilitzar en clínica el 1941, però tenia un espectre antibacterià relativament reduït i era activa enfront a bacteris grampositius, espiroquetes i alguns gramnegatius (sobretot *Neisseria*). Posteriors modificacions en l'estructura química d'aquest antibiòtic van donar lloc a les aminopenicil·lines (ampicil·lina i amoxicil·lina) la qual cosa va permetre ampliar l'espectre d'activitat enfront a gramnegatius. El desenvolupament de derivats carboxilats i ureídics de l'ampicil·lina (les carboxipenicil·lines: carbenicil·lina i ticarcil·lina i ureidopenicil·lines: piperacil·lina) va donar lloc a agents amb major activitat contra *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* i *Pseudomonas aeruginosa*<sup>72</sup>.

L'any 1945 es va aïllar, a partir del fong *Cephalosporium acremonium*, un antimicrobià, la cefalosporina C, a partir de la qual es van sintetitzar les cefalosporines de 1a generació, que posseeixen un espectre d'activitat major que les penicil·lines. Posteriorment, van aparèixer les cefalosporines de 2a generació, que presentaven un major espectre d'activitat enfront d'organismes gramnegatius productors de  $\beta$ -lactamases, però menor activitat que els de 1a generació contra els grampositius. El 1978, es van introduir les cefalosporines de 3a generació. Darrerament s'han desenvolupat les cefalosporines de 4a generació<sup>72</sup>.

El 1976 es van obtenir altres derivats  $\beta$ -lactàmics a partir de la tienamicina, que és una substància antibiòtica extreta de cultius de *Streptomyces catleya*, els carbapenems. El primer derivat que es va utilitzar va ser l'imipenem, que té un gran espectre d'activitat, que abraça pràcticament tots els bacteris grampositius i gramnegatius tant aerobis com anaerobis.

El 1977 es va obtenir un derivat  $\beta$ -lactàmic a partir de *Streptomyces clavuligerus*<sup>105</sup>, l'àcid clavulànic, el qual, a diferència de les penicil·lines i cefalosporines, mostra un baix nivell d'activitat antibacteriana, però és un potent inhibidor de moltes  $\beta$ -lactamases<sup>106</sup>. S'uneix a les  $\beta$ -lactamases i actua com a substrat inhibidor competitiu. Aquests inhibidors generalment s'administren juntament amb  $\beta$ -lactàmics i aquesta combinació fa augmentar l'eficàcia antimicrobiana enfront als organismes productors de  $\beta$ -lactamases en bloquejar la seva activitat. Posteriorment,

es van sintetitzar altres inhidors de les  $\beta$ -lactamases com el sulbactam (inhibidor semisintètic, però menys potent que l'àcid clavulànic) i el tazobactam<sup>95</sup>.

L'any 1978 es va obtenir el primer monobactam a partir d'una soca de *Chromobacterium violaceum*, derivant l'aztreonam. Aquest antibiòtic té activitat enfront dels bacteris gramnegatius aerobis i anaerobis facultatius, incloent-hi els enterobacteris *P. aeruginosa*, *Haemophilus* i *Neisseria*, però no es actiu enfront dels bacteris grampositius.

### 1.2.1. Estructura i classificació dels $\beta$ -lactàmics

L'estructura bàsica d'aquests compostos és l'anell  $\beta$ -lactàmic, essencial per a l'activitat bacteriana. Els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics es poden classificar en 5 grups principals segons el seu nucli bàsic (taula 1, figura 2) :

1. *Penàmics*: posseeixen una estructura bicíclica, l'àcid 6-aminopenicil·lànic (6-APA), format per l'anell  $\beta$ -lactàmic i l'anell tiazolidínic (dipèptid tancat en forma de cicle, resultant de la condensació de la L-cisteïna i la D-valina). Les penicil·lines es poden considerar derivades del 6-APA, substituint l'hidroxil (-OH) del grup carboxil per un radical acil (R).
2. *Cefalosporines*: tenen un nucli derivat del 6-APA, però un dels grups metil (-CH<sub>3</sub>) de la valina s'incorpora a l'anell tiazolidínic, amb la qual cosa passa a contenir sis elements en lloc dels cinc que contenia l'anell de les penicil·lines, a aquest se l'anomena àcid 7-aminocefalosporànic. Dintre d'aquestes es poden agrupar en tres classes: els cefèemics, que inclouen la majoria de les cefalosporines i es caracteritzen per contenir un doble enllaç entre el carboni C<sub>2</sub> i el C<sub>3</sub> de l'anell tiazolidínic; les cefamicines, que presenten una substitució -metoxi a C<sub>7</sub>. Els oxacefèemics presenten una substitució de l'àtom d'oxigen per l'àtom de sulfur en l'anell tiazolidínic.

3. *Carbapenèmics*: es diferencien de les penicil·lines perquè tenen una substitució de l'àtom de sulfur ( $\text{CH}_2$ ) per un àtom de carboni a l'anell tiazolidínic.
4. *Clavàmics*: el seu esquelet difereix de les penicil·lines en la substitució d'un àtom de sulfur per un oxigen. Aquests tenen poca activitat com a antibiòtic, però s'uneixen a les  $\beta$ -lactamases, inactivant-les irreversiblement.
5. *Monobactàmics*: són compostos monocíclics (sols tenen l'anell  $\beta$ -lactàmic) que tenen un àcid sulfònic que dona activitat a l'anell  $\beta$ -lactàmic.

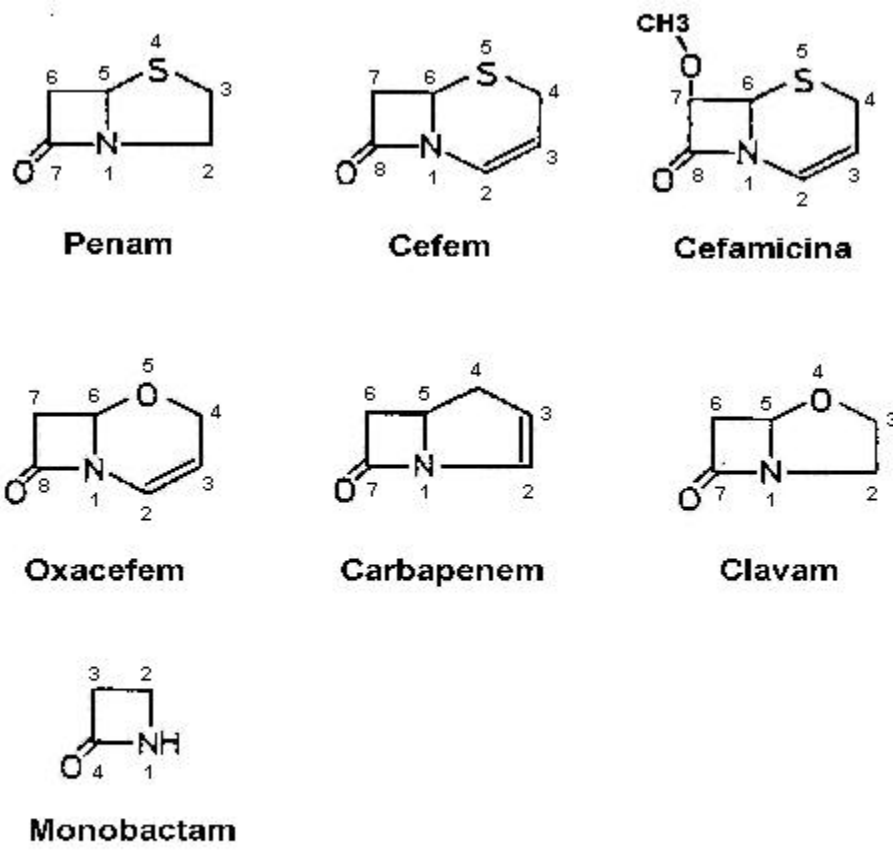
Unida a cadascuna d'aquestes estructures bàsiques es troba una cadena lateral acíclica variable (grup R). Aquestes diferents cadenes laterals donen lloc a diversos grups d'activitat, propietats farmacològiques i resistència a les  $\beta$ -lactamases.



Taula 1. Principals antibiòtics  $\beta$ -lactàmics.

GRUP	$\beta$ -LACTÀMICS
<i>Penàmics</i>	<p>Penicil·lines: ampicil·lina<sup>a</sup>, amoxicil·lina<sup>a</sup>.</p> <p>Carboxipenicil·lines: carbenicil·lina, ticarcil·lina.</p> <p>Ureidopenicil·lines: piperacil·lina.</p> <p>Isoxazolilpenicil·lines: oxacil·lina<sup>a</sup>, cloxacil·lina<sup>a</sup>.</p>
<i>Cefalosporines</i>	<p>Cefèmics:</p> <p>C1G<sup>b</sup>: cefalotina, cefazolina, cefradina, cefalexina<sup>a</sup>.</p> <p>C2G<sup>b</sup>: cefamandol, cefuroxima, cefonicid, cefaclor<sup>a</sup>.</p> <p>C3G<sup>b</sup>: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefpodoxima<sup>a</sup>, cefixima<sup>a</sup>, cefoperazona.</p> <p>C4G<sup>b</sup>: cefepima, cefpiroma.</p> <p>Cefamicines: cefoxitina i cefotetan.</p> <p>Oxacefèmics: moxobactam.</p>
<i>Carbapenèmics</i>	Imipenem, meropenem
<i>Clavàmics</i>	Àcid clavulànic <sup>a</sup>
<i>Monobactàmics</i>	Aztreonam

a, permeten l'administració oral. b, C1G, C2G, C3G i C4G: cefalosporines de 1a, 2a, 3a i 4a generació, respectivament.



**Figura 2 .** Nuclis bàsics dels principals antibiòtics  $\beta$ -lactàmics.

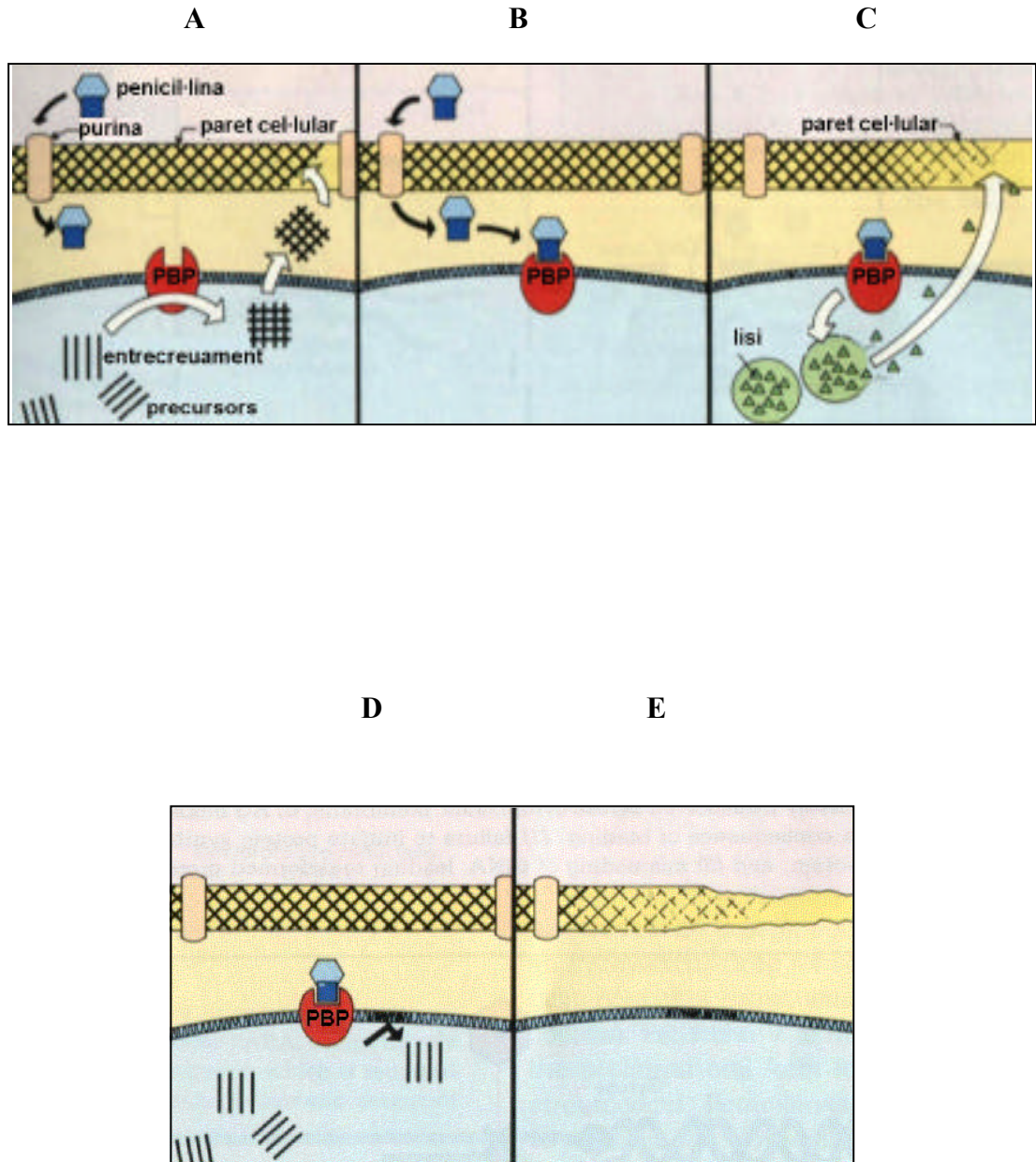
### 1.2.2. Mecanisme d'acció dels antibiòtics $\beta$ -lactàmics

Els  $\beta$ -lactàmics són agents bactericides sobre els bacteris en creixement. L'eficàcia es basa en la concentració de l'antibiòtic en el medi i en el temps d'actuació.

Els  $\beta$ -lactàmics tenen com a molècules dianes les proteïnes fixadores de penicil·lina (*Penicillin binding proteins*, PBP). De fet, les PBP són enzims que tenen activitat transglucosidasa, transpeptidasa i, alguns endopeptidasa, les quals estan implicades en les últimes fases de síntesi del peptidoglicà. S'ha proposat que el grup -CO-N- de l'anell  $\beta$ -lactàmic funciona com un anàleg estructural del substrat de les PBP implicades en la reacció d'entrecreuament (transpeptidació) entre el pèptid del peptidoglicà naixent i el del peptidoglicà acceptor. El  $\beta$ -lactàmic es combina en el centre actiu de la transpeptidasa, i dona lloc a un complex enzim- $\beta$ -lactàmic inactiu i força estable<sup>138</sup>.

La inhibició o disminució de la síntesi de la capa de peptidoglicà juntament amb reaccions que desencadenen l'alliberament d'autolisines (amidases i glucosidases) encarregades de degradar la capa del peptidoglicà fa que el bacteri acabi lisant-se per l'acció de tots aquests factors. No obstant això, el mecanisme precís pel qual aquests agents lisen els bacteris sensibles segueix sent poc clar<sup>138</sup>.

Per tant, l'acció bactericida i lítica dels  $\beta$ -lactàmics és afavorida pel fet que el bacteri es trobi en creixement i en un medi hipotònic<sup>40,130</sup> (figura 3).

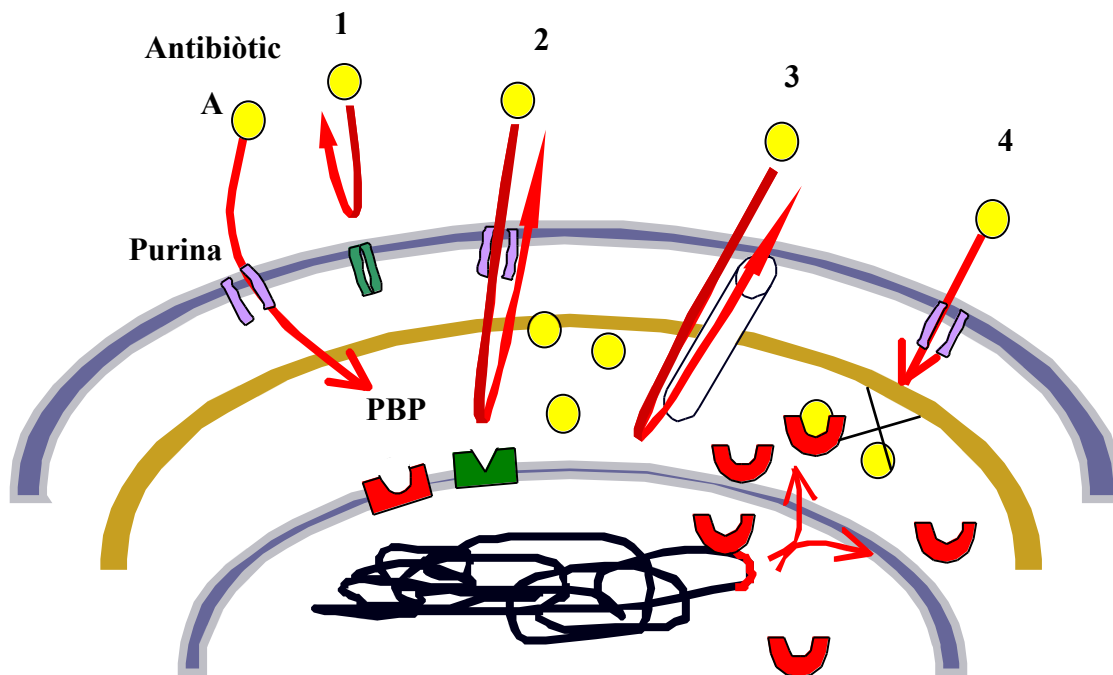


**Figura 3.** Inhibició de la síntesi de la paret cel·lular com a conseqüència de l'actuació d'un lactàmic. A, formació dels precursors del peptidoglicà mitjançant les PBP. B, entrada de la penicil·lina a través de les purines i unió amb les PBP. C, alliberament d'autolisines que s'encarregaran de degradar la paret. D, la unió de la penicil·lina a les PBP li impedirà continuar la síntesi del peptidoglicà. E, la paret cel·lular perd integritat i no podrà resistir la pressió osmòtica.

### 1.3. Resistència antimicrobiana

#### 1.3.1. Mecanismes de resistència antimicrobiana

En els bacteris gramnegatius la resistència als antibiòtics  $\beta$ -lactàmics pot ser deguda a quatre mecanismes: 1) alteració de la permeabilitat cel·lular, 2) disminució de l'afinitat de la molècula diana (PBP) per a l'antibiòtic, 3) mecanismes de reflux i 4) hidròlisi enzimàtica de l'antibiòtic per l'acció de  $\beta$ -lactamases (figura 4). Encara que alguns d'aquests mecanismes poden actuar simultàniament, el mecanisme majoritari de resistència antimicrobiana als  $\beta$ -lactàmics en bacils gramnegatius que causen infeccions és l'expressió de  $\beta$ -lactamases.



**Figura 4.** Mecanismes de resistència als antibiòtics  $\beta$ -lactàmics. El mecanisme d'acció dels  $\beta$ -lactàmics segueix el procés indicat a A: travessa la membrana externa a través d'una purina i passa a l'espai periplasmàtic fins que troba la diana (PBP) a la membrana interna. Els nombres 1 a 4, indiquen els mecanismes de resistència als  $\beta$ -lactàmics: 1, disminució de la permeabilitat; 2, modificació de la PBP; 3, mecanismes de reflux i 4, producció de  $\beta$ -lactamases.

### 1.3.2. Resistència natural i resistència adquirida

La resistència als antimicrobians pot ser intrínseca o adquirida. Es troba codificada en gens que es poden localitzar en el cromosoma o en plasmidis (o en bacteriòfags lisogènics). La resistència intrínseca és aquella resistència que de forma natural posseeixen algunes espècies bacterianes per un antimicrobià com és, per exemple: disposar d'una membrana externa que fa de barrera natural impermeable a l'antibiòtic (exemple: la resistència natural als glicopèptids en enterobacteris); la falta de sistemes de transport per un determinat antimicrobià (exemple: resistència a aminoglicòsids en anaerobis); sistemes de bombeig actiu (exemple: *E. coli* mitjançant *AcrAB*<sup>87</sup> i en *P. aeruginosa* per *MexA*, *B*<sup>150</sup>); manca de la molècula diana que permeti la combinació amb l'antibiòtic a fi que aquest pugui exercir la seva activitat; presència d'enzims inactivadors (exemple:  $\beta$ -lactamasa cromosòmica SHV-1 de *K. pneumoniae* o  $\beta$ -lactamasa cromosòmica AmpC induïble en *Enterobacter*). Aquests mecanismes de resistència intrínseca depenen de funcions o estructures codificades al cromosoma bacterià.

D'altra banda, la resistència adquirida és aquella que el bacteri no posseeix de manera natural, però que pot haver adquirit i, sota pressió selectiva, pot arribar a quedar fixada. Es pot adquirir de manera vertical i, posteriorment, és transferida a la descendència; o bé horitzontalment mitjançant l'adquisició de DNA forani que conté gens de resistència. Aquesta transferència de DNA forani es pot fer mitjançant plasmidis o transposons conjugatius (conjugació), bacteriòfags (transducció) o seqüències de DNA lliure (transformació). La seva integració en l'hoste i, per tant, la posterior difusibilitat tindrà lloc per processos com la recombinació homòloga, la recombinació de lloc específic (per exemple: els integrons) o per mecanismes de transposició.

La conjugació és un procés pel qual el DNA plasmídic es transfereix d'un bacteri donador a un bacteri receptor mitjançant ponts d'unió que s'estableixen entre ambdues cèl·lules. Molts dels gens codificadors de  $\beta$ -lactamases es troben localitzats en plasmidis conjugatius.

La transducció és la transferència de DNA a un bacteri mediada per un bacteriòfag. Un cop produïda la infecció, el DNA del bacteriòfag s'insereix en el DNA cromosòmic i passa a un cicle de lisogènia. Quan el bacteriòfag inicia el cicle lític, el genoma víric s'escindeix del cromosoma bacterià amb la qual cosa és possible que s'endugui part d'aquest cromosoma, així es formen noves partícules víriques que podran contenir fragments del DNA cromosòmic. Posteriorment, quan torni a infectar una nova cèl·lula hoste, aquest inserirà el seu genoma i també incorporará seqüències del genoma de la soca que anteriorment havia infectat.

La transformació és transferència d'informació genètica, en forma de DNA nu, entre una cèl·lula receptora i una de donadora, sense necessitat que entrin en contacte. Hi ha microorganismes en què la transformació té lloc amb certa freqüència com és el cas de *Bacillus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* i *Neisseria* (<http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/BactGenetics/transform.html>).

### 1.4. Les $\beta$ -lactamases

Actualment se sap que la resistència als antibiòtics, incloent-hi els  $\beta$ -lactàmics, es produeix per l'acció simultània de diversos mecanismes. En els enterobacteris, el mecanisme majoritari causant de resistència bacteriana és la producció de  $\beta$ -lactamases, malgrat que freqüentment s'hi poden trobar associats altres mecanismes com ara la permeabilitat o el reflux.

L'increment de les soques productores de  $\beta$ -lactamases ha disminuït enormement la utilitat de l'ampicil·lina enfront dels enterobacteris. La difusió de gens codificadors de nous enzims amb un espectre d'acció ampliat, derivats d'antics enzims d'activitat més restringida, pot fer trontollar el valor de les cefalosporines d'espectre ampliat enfront dels enterobacteris<sup>70</sup>.

### 1.4.1. Origen de les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases possiblement deriven de diferents PBP, amb les quals guarden homologia seqüencial i estructural. Podria ser que la funció original d'algun precursor fos la de participar en la biosíntesi de la paret o la d'evitar l'autolesió en els microorganismes que produeixen de forma natural antibiòtics  $\beta$ -lactàmics, la qual cosa vol dir que no ha de ser estrany que els gens codificadors de les  $\beta$ -lactamases es trobin localitzats al cromosoma d'alguns bacteris, com és el cas de *Streptomyces clavuligerus* i *Nocardia lactamdurans* on es localitzen formant part del grup gènic implicat en la biosíntesi de  $\beta$ -lactàmics. Pérez-Llanera i col.<sup>96</sup> proposen que el principal paper de les  $\beta$ -lactamases codificades en els grups gènics implicats en la biosíntesi de  $\beta$ -lactàmics és la síntesi i la remodelació de la paret cel·lular.

Cundliffe i col.<sup>28</sup> proposen la hipòtesi que els gens codificadors de resistència als antibiòtics deriven dels organismes productors d'antibiòtics en els quals juguen un paper protector, que evita el suïcidi.

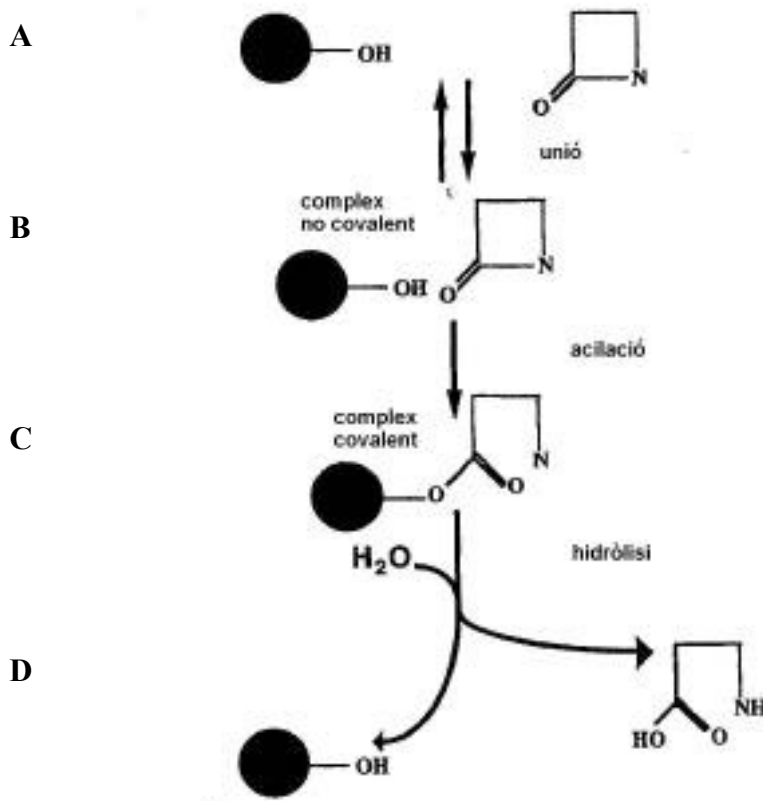
Aquests gens podrien haver estat mobilitzats per transposons a plasmidis, la qual cosa permetria una difusió més àmplia, mantinguda per la pressió selectiva dels antibiòtics utilitzats<sup>96</sup>.

### 1.4.2. Mecanisme d'acció de les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases s'uneixen als antibiòtics  $\beta$ -lactàmics mitjançant un enllaç no covalent reversible; posteriorment té lloc una reacció d'acilació entre el grup ester de l'anell  $\beta$ -lactàmic i el grup hidroxil lliure del residu de serina del lloc actiu de l'enzim. Finalment, l'enzim que resta actiu és hidrolitzat i alliberat i l'antibiòtic, inactivat<sup>142</sup> (figura 4).

La majoria dels enzims tenen un residu de serina com a molècula efectora situada al centre actiu de l'enzim. Alguns, però, requereixen de zinc com a molècula activa per a la seva activitat: són els metal·loenzims.





**Figura 4.** Mecanisme d'acció de les  $\beta$ -lactamases. A, l'enzim s'associa de forma reversible a l'antibiòtic i forma un complex no covalent. B, l'anell  $\beta$ -lactàmic és reconegut per un grup hidroxil lliure de la cadena del residu de serina del lloc actiu de l'enzim, amb la qual cosa es produeix un enllaç acil ester. C, hidròlisi de l'enllaç ester, en què s'allibera l'enzim actiu i l'antibiòtic inactiu, D. Aquest mecanisme té lloc en les  $\beta$ -lactamases de la classe A, C i D però no les de la classe B, les quals requereixen ions zinc per reconèixer l'anell  $\beta$ -lactàmic.

### 1.4.3. Classificació de les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases han estat classificades en funció del seu espectre hidrolític, la sensibilitat enfront dels inhibidors i segons la localització cromosòmica o plasmídica dels seus gens. Una de les primeres classificacions va ser la proposada per Jack i Richmond el 1970<sup>58</sup>, que va dividir els enzims en cinc grups segons el seu perfil de substrats. Aquesta classificació va ser ampliada per Richmond i Sykes l'any 1973<sup>114</sup>. En els posteriors quinze anys es van fer evidents les limitacions d'aquestes classificacions i fou necessari fer-ne una reorganització. L'any 1989<sup>15</sup>, Bush en va fer

una proposta, la qual fou actualitzada posteriorment el 1995<sup>18</sup>. Aquesta darrera revisió classifica les  $\beta$ -lactamases segons la preferència pels diferents substrats: penicil·lina, oxacil·lina, carbenicil·lina, cefaloridina, cefalosporines d'espectre ampliat i imipenem, així com també per la seva sensibilitat a ser inhibides per l'àcid clavulànic<sup>70</sup>. Aquesta classificació agrupa les  $\beta$ -lactamases en quatre classes (1 a 4), de les quals el grup 2 és el més nombrós i heterogeni i s'ha dividit en vuit subgrups.

La classificació proposada per Bush, Jacoby i Medeiros<sup>18</sup> agrupa les  $\beta$ -lactamases plasmídiques en els grups 1, 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d i 3a. Aquestes, no són pròpies d'espècie i, per tant, la seva distribució en el món bacterià dependrà de la capacitat de difusió i de la pressió selectiva a la qual s'hagin trobat sotmesos els diferents microorganismes. La majoria de les  $\beta$ -lactamases pertanyents als grups 2b, 2c i algunes del grup 2d són  $\beta$ -lactamases que hidrolitzen penicil·lines i cefalosporines de 1a generació. Les  $\beta$ -lactamases del grup 2be deriven per mutacions puntuals de les del grup 2b i han adquirit un major espectre de substrats, també s'anomenen  $\beta$ -lactamases d'espectre ampliat (BLEA) perquè tenen un patró de sensibilitat semblant a 2b, 2c i 2d, però hidrolitzen a més a més les cefalosporines de 3a i 4a generació i l'aztreonam. Les  $\beta$ -lactamases del grup 2br deriven de les del grup 2b i per mutacions puntuals han esdevingut resistents a l'acció dels inhibidors. Les  $\beta$ -lactamases del grup 2d són les oxacil·linases que inclouen  $\beta$ -lactamases d'ampli espectre i les  $\beta$ -lactamases derivades d'aquestes que per mutacions puntuals han adquirit un major reconeixement de substrats (BLEA). El darrer grup de  $\beta$ -lactamases plasmídiques és el 3a, que inclou les carbapenemases.

La classificació de les  $\beta$ -lactamases també s'ha fet en funció de l'estructura molecular, proposada per primera vegada per Ambler l'any 1980<sup>2</sup>. Aquesta classificació permet reflectir la relació de parentiu o evolutiva que hi ha entre elles. Reconeix quatre classes anomenades A, B, C i D i agrupa les classes A, C i D en grups d'enzims evolutivament diferents que tenen en el seu centre actiu una serina, mentre que la classe B són metal·loenzims, és a dir, enzims dependents de zinc<sup>16, 23</sup>.

## Introducció

**Taula 2.** Classificació de les  $\beta$ -lactamases.

Grup funcional <sup>a</sup>	Classe molecular (Ambler) <sup>b</sup>	Centre actiu	Perfil de substrats preferents	Inhibició		Enzims representatius
				AC <sup>c</sup>	EDTA	
1	C	Serina	La majoria dels $\beta$ -lactàmics (excepte els carbapenems)	-	-	Cefalosporinases cromosòmiques de gramnegatius. Com a plasmídiques: MIR-1, MOX-1, MOX-2, FOX-1 a FOX-5, CMY-1 a CMY-9, LAT-1 a LAT-4, BIL-1, ACT-1, DHA-1 i DHA-2.
2a	A	Serina	Penicil·lines	+	-	Penicil·linases de bacteris grampositius, que podent ser cromosòmiques o plasmídiques.
2b	A	Serina	Penicil·lines i cefalosporines	+	-	Penicil·linases-cefalosporinases. Plasmídiques: TEM-1, TEM-2, SHV-1, OHIO-1 i ROB-1. Cromosòmica: SHV-1 de <i>K. pneumoniae</i> .
2be	A	Serina	Penicil·lines, cefalosporines (espectre ampliat) i monobactams	+	-	Penicil·linases-cefalosporinases d'espectre ampliat: hidrolitzen penicil·lines i cefalosporines de 1a, 2a i 3a generació. Plasmídiques: TEM-3 a TEM-29, TEM-42, TEM-43, TEM-46 a TEM-50, TEM-52 a TEM-58, TEM-60 a TEM-64, TEM-66 a TEM-72, TEM-75, TEM-80, TEM-85 a TEM-94; SHV-2 a SHV-34 (excepte SHV-10); CTX-M-1 a CTX-M-15; TOHO-1, TOHO-2, UOE-1 i OUE-2, SFO-1, FEC-1, VEB-1, PER-1, GES-1, GES-2. Cromosòmica: K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i> , KLUA-1 i KLUA-2 de <i>Kluyvera ascorba</i> i KLUC-1 de <i>Kluyvera cryocrescens</i> .
2br	A	Serina	Penicil·lines	-	-	Penicil·linases resistent als inhibidors derivades de TEM (IRT). Plasmídiques TEM-30 a TEM-41, TEM-44 a TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73 a TEM-74, TEM-76 a TEM-79, TEM-81 <sup>a</sup> TEM-84 i SHV-10.
2c	A	Serina	Penicil·lines i carbenicil·lines	+	-	Penicil·linases-carbenicil·linases plasmídiques: PSE-1 (CARB-2), PSE-3, PSE-4 (CARB-1), PSE-5 (CARB-7), CARB-3 a CARB-6.
2d	D	Serina	Penicil·lines i cloxacil·lina	+/-	-	Penicil·linases-oxacil·linases plasmídiques: OXA-1 a OXA-35.
2e	A	Serina	Cefalosporines	+	-	Cefalosporinasa cromosòmica induïble de <i>Proteus vulgaris</i> (K1); <i>Citrobacter koseri</i> i <i>Citrobacter sedlakii</i> (Sed-1).
2f	A	Serina	Penicil·lines, cefalosporines i carbapenems	+	-	Penicil·linases, cefalosporinases i carbapenemases cromosòmiques: NMC-A i IMI-1 d' <i>Enterobacter cloacae</i> , SME-1 de <i>Serratia marcescens</i> , L-2 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> i KPC-1 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
3a	B1	Zinc	Carbapenems i la majoria dels $\beta$ -lactàmics (excepte els monobactams)	-	+	Carbapenemases plasmídiques: IMP-1 a IMP-8, VIM-1 a VIM-3 i MET-1, en <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus fragilis</i> i <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
3a	B3	Zinc		Carbapenemasa cromosòmica induïble: L1 i THIN-B de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> i <i>Janthinobacterium lividum</i> .		
3b	B2	Zinc		-	+	Carbapenemases cromosòmiques: CphA i Sfh-1 d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .
3c	B3	Zinc		-	+	Carbapenemasa cromosòmica FEZ-1 de <i>Legionella gormanii</i> .
4	? <sup>d</sup>	Serina	Penicil·lines	-	-	Penicil·linasa cromosòmica o plasmídica de <i>Burkholderia cepacia</i> .

a, classificació basada en el grup funcional<sup>18</sup> i b, classificació basada en les característiques moleculars<sup>2</sup>, ambdues amb petites modificacions i actualitzacions<sup>17</sup>. c, àcid clavulànic. d, desconegut.

#### 1.4.4. Distribució de les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases són enzims codificats per gens (*bla*) de localització molt variable i es podent trobar en el DNA cromosòmic o plasmídic. Molts plasmidis poden transferir-se d'un bacteri a un altre, però a més, molt sovint, els gens codificadors de  $\beta$ -lactamases es troben formant part d'estructures que presenten mobilitat pròpia, com és el cas dels transposons i els integrons. El fet que els gens que codifiquen les  $\beta$ -lactamases es trobin formant part d'elements mòbils, junt amb l'existència d'una pressió selectiva dels antibiòtics condueix a la selecció de gens mutants de  $\beta$ -lactamases que han ampliat el seu perfil d'hidròlisi i a una major difusió d'aquests gens en diferents espècies i en diferents àrees geogràfiques.

##### 1.4.4.1. $\beta$ -Lactamases cromosòmiques

La majoria dels enterobacteris, com altres bacteris d'altres grups, posseeixen en el seu cromosoma un gen codificador d'una  $\beta$ -lactamasa i hi ha una correlació entre l'espècie bacteriana i el tipus de  $\beta$ -lactamasa<sup>70</sup>.

Algunes espècies com ara *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri* i *Yersinia enterocolitica* posseeixen  $\beta$ -lactamases de codificació cromosòmica pertanyents a la classe A (sensibles a l'àcid clavulànic) i s'expressen a nivells basals baixos els quals resulten escassament operatius ja que la quantitat produïda és insuficient per inactivar els  $\beta$ -lactàmics o sols afecta els més làbils com l'ampicil·lina. Un exemple és la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 en *K. pneumoniae* i la K1 en *K. oxytoca*.

*K. pneumoniae* produeix constitutivament una  $\beta$ -lactamasa cromosòmica, SHV-1, codificada per *bla*<sub>SHV-1</sub> (grup 2b), que confereix un patró de resistència típic, caracteritzat per produir resistència a l'ampicil·lina, la ticarcil·lina i la piperacil·lina. En casos d'hiperproducció apareix resistència a cefazolina, pot disminuir

discretament la sensibilitat a l'àcid clavulànic i a la ceftazidima i s'observa una lleugera sinèrgia entre aquests dos últims<sup>97, 112</sup>.

*K. oxytoca* expressa una  $\beta$ -lactamasa cromosòmica constitutiva K1 (o també anomenada KOXY) (grup 2be), que confereix resistència a l'ampicil·lina, la ticarcil·lina, la piperacil·lina i, segons el grau d'hiperproducció, es pot observar franca resistència a l'àcid clavulànic, a la cefazolina, a l'aztreonam i una disminució en la sensibilitat a les C3G<sup>42</sup>.

*E. coli* i *Shigella* posseeixen  $\beta$ -lactamases de codificació cromosòmica de la classe C d'expressió constitutiva però a nivells molt baixos (perquè posseeixen un promotor molt dèbil i un atenuador en l'extrem 5' del gen) que són insuficients per afectar els  $\beta$ -lactàmics. Hi ha una sèrie d'alteracions que incrementen l'expressió d'aquest gen. Se n'han descrit tres tipus: mutacions en el promotor, mutacions en l'atenuador o un increment en el nombre de còpies del gen. Aquest augment de l'expressió del gen fa que alguns  $\beta$ -lactàmics com ara les cefamicines (cefexitina), els inhibidors de les  $\beta$ -lactamases (àcid clavulànic), les penicil·lines, les cefalosporines de 1a generació i segons el grau d'expressió fins i tot les cefalosporines de 3a generació i l'aztreonam, esdevinguin inactius<sup>19, 85</sup>.

Hi ha un altre grup d'enterobacteris que també posseeixen  $\beta$ -lactamases de codificació cromosòmica de la classe C: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* i d'altres. Aquestes  $\beta$ -lactamases tenen les característiques pròpies del grup C, activitat penicil·linasa i cefalosporinasa, resistència a l'acció de l'àcid clavulànic i l'EDTA. Són produïdes a uns nivells basals relativament elevats i són induïbles en particular per la cefexitina i l'imipenem. Mutacions en els gens reguladors poden donar lloc a una desrepressió de la producció de l'enzim, la qual cosa inactiva tots els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics, excepte els carbapenems, que són hidrolitzats a una proporció molt baixa. En el cas que també hi hagi alteracions en la permeabilitat de la membrana externa, els carbapenems també poden resultar inactius<sup>2, 39, 67, 68, 73</sup>.

En alguns serotips de *Yersinia enterocolitica* s'ha descrit l'existència simultània de més d'una  $\beta$ -lactamasa cromòmica de la classe A i C<sup>12, 98</sup>. D'altra banda, també hi ha enterobacteris que presenten carència de  $\beta$ -lactamases de codificació cromosòmica com és el cas de les salmonel·les i possiblement de *P. mirabilis*, per la qual cosa són naturalment sensibles a tots els  $\beta$ -lactàmics incloent-hi l'ampicil·lina (i l'amoxicil·lina). En aquests bacteris la presència d'una  $\beta$ -lactamasa que comporti resistència a aquests antibiòtics es deurà a l'adquisició d'un plasmidi o un altre vector genètic que contingui el gen que la codifiqui.

### 1.4.4.2. $\beta$ -Lactamases plasmídiques

Les primeres  $\beta$ -lactamases plasmídiques que es van descriure van ser en soques de *S. aureus* poc temps després de la introducció de la penicil·lina en la terapèutica. Actualment a Espanya, de la mateixa manera que en la majoria dels països, més del 90% de les soques de *S. aureus* produeixen penicil·linases.

En els bacteris gramnegatius, les  $\beta$ -lactamases plasmídiques estan àmpliament distribuïdes, encara que la seva incidència depèn de l'espècie, sent la TEM-1 la més freqüent, present en més d'un 50% de les soques d'*E. coli* i *Neisseria gonorrhoeae* i en més d'un 30% de les d'*Haemophilus influenzae*<sup>32, 136</sup> (<http://biosafety.ihe.be/AR/betalactamases.html>).

En general, les  $\beta$ -lactamases plasmídiques són diferents de les  $\beta$ -lactamases cromosòmiques, encara que hi ha casos en què existeix la mateixa  $\beta$ -lactamasa de codificació cromosòmica i plasmídica, com és el cas de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 i la cromosòmica de *K. pneumoniae*; les  $\beta$ -lactamases plasmídiques BIL-1, CMY-1 a CMY-9, FOX-1 a FOX-5, LAT-1 a LAT-4, MIR-1, ACT-1, MOX-1, MOX-2 i DHA-1 que són enzims del tipus AmpC codificats per gens que possiblement provenen del cromosoma de les espècies d'*Enterobacter*, *Citrobacter* i *M. organii*; així com una de les darreres famílies de  $\beta$ -lactamases plasmídiques descrites, la família CTX-M, on concretament la CTX-M-5 presenta un 100% d'homologia amb la

-lactamasa cromosòmica KLUA-2 de *Kluyvera ascorbata*. És probable, doncs, que les -lactamases plasmídiques tinguin el seu origen en les -lactamases cromosòmiques, encara que en molts casos l'organisme del qual procedeix encara és desconegut. L'àmplia distribució de les -lactamases plasmídiques es deu al fet que molts dels gens codificadors d'aquestes formen part d'elements que presenten mobilitat pròpia com són ara els transposons o integrons els quals a la vegada estan continguts en plasmidis, cosa que els confereix una gran difusibilitat. Amb freqüència aquests vectors porten associats gens de resistència a altres antibiòtics com per exemple: aminoglicòsids, tetraciclins, cloramfenicol, sulfamides i trimetoprim, la qual cosa incrementa les possibilitats de selecció.

Les -lactamases plasmídiques generalment tenen expressió constitutiva, encara que la seva expressió és variable i depèn de molts factors com poden ser: el tipus de promotor que tinguin, el nombre de còpies del plasmidi en què està continguda (multicòpia), el nombre de còpies del gen (de la taxa de transposició del gen en el cas que sigui mediat per elements mòbils), etc. Darrerament s'ha descrit una -lactamasa plasmídica d'expressió induïble en una soca de *S. enterica* serovar Enteritidis, la DHA-1, el gen codificador d'aquesta -lactamasa (*ampC*) conté el seu gen regulador *ampR*, sent tots dos procedents del cromosoma de *M. morgani*<sup>140</sup>.

Les -lactamases plasmídiques dels enterobacteris es podrien agrupar d'acord amb el fenotip de resistència, en els grups següents (vegeu la taula 2):

- I. -Lactamases d'ampli espectre (TEM, SHV, OXA, PSE) (grups 2b, 2c i 2d)
- II. -Lactamases d'espectre ampliat (TEM, SHV, OXA, CTX-M) (grups 2be i 2d)
- III. -Lactamases resistents als inhibidors (IRT) (grup 2br)
- IV. -Lactamases plasmídiques AmpC (grup 1)
- V. Carbapenemases plasmídiques (grup 3a)

## I. -Lactamases d'ampli espectre (TEM, SHV, PSE, OXA)

Es caracteritzen per presentar un fenotip de resistència a l'ampicil·lina i la ticarcil·lina, en menor grau a la piperacil·lina i segons el grau d'expressió poden arribar a hidrolitzar les cefalosporines de 1a generació. L'àcid clavulànic les inhibeix, encara que les oxacil·linases (OXA) i les carbenicil·linases (CARB o PSE) presenten menys sensibilitat a l'acció de l'àcid clavulànic.

La primera -lactamasa plasmídica descrita va ser la TEM-1, aïllada d'una soca d'*E. coli* el 1965<sup>76</sup>. A partir d'aleshores s'ha expandit àmpliament i s'ha detectat en enterobacteris entre un 20% i un 60%. La seva freqüència variarà en funció de l'espècie i el lloc<sup>71, 119</sup>. Actualment, més d'un 50% de soques d'*E. coli* presenten el fenotip de resistència a l'ampicil·lina per producció de TEM-1 (<http://biosafety.ihe.be/AR/betalactamases.html>). En un estudi realitzat a Escòcia en soques d'*E. coli* resistents a l'ampicil·lina es va observar que un 88,2% d'aquestes era degut a la presència de TEM-1<sup>136</sup>. Aquest enzim també s'ha trobat en soques de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* i *Acinetobacter*. A partir dels enterobacteris, aquest enzim s'ha expandit a *Haemophilus influenzae* i a *Neisseria gonorrhoeae*.

La hiperproducció d'aquest enzim dona lloc a una discreta disminució de la sensibilitat a la cefazolina i a l'àcid clavulànic<sup>146</sup>.

Una mutació puntual en el gen codificador de la TEM-1 dona lloc a la TEM-2, que és una -lactamasa que presenta un fenotip de resistència indistingible de la TEM-1 però que se'n diferencia en el seu punt isoelèctric (5,4 per 5,6).

Una altra -lactamasa d'ampli espectre és la SHV-1, descrita per primera vegada l'any 1974<sup>116</sup>. *K. pneumoniae* és portadora d'aquest gen a nivell cromosòmic (*bla<sub>SHV-1</sub>*). El fenotip de resistència observat en soques que expressen aquest enzim és indistingible de les portadores de l'enzim TEM-1 o TEM-2. L'única diferència es detecta en aquells casos on la soca hiperprodueix l'enzim. Les soques hiperproductores de TEM, com s'ha dit anteriorment, són resistents a cefazolina i presenten una disminució de la sensibilitat a l'àcid clavulànic però en els casos en què



hiperproduueixen SHV-1 s'observa, a més a més, una disminució de la sensibilitat a la ceftazidima<sup>146</sup>.

Una altra família de  $\beta$ -lactamases d'ampli espectre són les carbenicil·linases, CARB o PSE (per raó que majoritàriament s'han aïllat en espècies de *Pseudomonas*). Aquests enzims com el seu nom indica, hidrolitzen preferentment les carboxipenicil·lines (carbenicil·lina i ticarcil·lina) i són menys sensibles a l'àcid clavulànic. Comprèn des de la CARB-1 (PSE-4), CARB-2 (PSE-1), PSE-3, CARB-3 a CARB-6 i CARB-7 (PSE-5).

Les  $\beta$ -lactamases: TEM-1, TEM-2, SHV-1 i les de la família CARB, pertanyen a la classe A d'Ambler.

La darrera família que pertany al grup de les  $\beta$ -lactamases d'ampli espectre són les oxacil·linases, enzims que hidrolitzen preferentment oxacil·lina i altres isoxazolilpenicil·lines, però també hidrolitzen aminopenicil·lines i carboxipenicil·lines. La seva activitat no s'inhibeix per l'àcid clavulànic o ho fa a nivells baixos<sup>18</sup>. Són enzims de codificació plasmídica observats freqüentment en soques de *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella enterica*<sup>69, 141</sup>. Pertanyen a la classe D d'Ambler que es correspon amb la classe 2d de Bush-Jacoby i Medeiros. La més comuna és l'OXA-1, que es troba molt distribuïda en la família *Enterobacteriaceae*<sup>76</sup>. En *E. coli* entre un 3% i un 23% de les soques resistents a l'ampicil·lina posseeixen aquest enzim<sup>145</sup>. Enzims derivats d'aquesta família també s'han detectat en soques de *Serratia*, *Klebsiella* i *P. aeruginosa*. En un estudi realitzat al nostre laboratori en soques de *Salmonella enterica* que presentaven sensibilitat disminuïda a l'àcid clavulànic, es va observar que majoritàriament eren portadores d'aquesta  $\beta$ -lactamasa<sup>141</sup>.

## II. $\beta$ -Lactamases d'espectre ampliat (BLEA) (TEM, SHV, OXA, CTX-M)

Algunes de les  $\beta$ -lactamases d'espectre ampliat (BLEA) deriven per mutacions puntuals de les  $\beta$ -lactamases d'ampli espectre. Es caracteritzen per ser

més sensibles a l'acció de l'àcid clavulànic respecte de les que deriven, però han ampliat el seu espectre d'acció i han passat a hidrolitzar en diferents graus, les cefalosporines de 2a i 3a generació i l'aztreonam, sense afectar la cefoxitina (cefamicina) ni l'imipenem (carbapenem).

La presència de  $\beta$ -lactamases d'espectre ampliat se sospita per l'antibiograma de la soca i el test amb doble disc (cefalosporina 3a generació-àcid clavulànic) que mostra la sinèrgia entre ambdós. Es produeix un fenotip de sinèrgia característic de les BLEA.

Com a  $\beta$ -lactamases d'espectre ampliat derivades de TEM fins a l'actualitat hi ha descrites des de: TEM-3 a la TEM-29, TEM-42, TEM-43, TEM-46 a la TEM-50, TEM-52 a la TEM-58, TEM-60 a la TEM-64, TEM-66 a la TEM-72, TEM-75, TEM-80, TEM-85 a la TEM-94; dintre de les quals hi ha enzims que hidrolitzen la cefotaxima i la ceftazidima (per exemple: TEM-4), altres que presenten preferència per la hidròlisi de ceftazidima, anomenades ceftazidimases (per exemple: TEM-5, TEM-7, TEM-12, TEM-16), altres que preferencialment hidrolitzen la cefotaxima, cefotaximases (per exemple: TEM-3, TEM-20, TEM-25) i altres, com la TEM-22, que hidrolitzen preferentment l'aztreonam més que no pas les cefalosporines de 3a generació<sup>4, 15, 70</sup>.

De les  $\beta$ -lactamases d'espectre ampliat derivades de SHV hi ha des de SHV-2 fins a SHV-34 (excepte la SHV-10). De la mateixa manera que en el cas anterior hi ha enzims que tenen activitat hidrolítica preferent per cefotaxima i ceftazidima (per exemple: SHV-2, SHV-12), altres que hidrolitzen més ràpidament la cefotaxima que la ceftazidima o l'aztreonam, per exemple, SHV-13 i d'altres que mostren preferència d'hidròlisi enfront de la ceftazidima, per exemple, SHV-4, SHV-6<sup>15, 70</sup>.

Un altre grup de BLEA són les oxacil·linases plasmídiques agrupades segons el criteri de classificació de Bush-Jacoby i Medeiros<sup>18</sup> (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>). Aquestes  $\beta$ -lactamases plasmídiques d'espectre ampliat rarament s'han trobat en enterobacteris. Es caracteritzen per posseir espectre preferencial d'hidròlisi per la cefotaxima, presenten una menor activitat enfront a l'aztreonam i són poc inactivades per l'àcid clavulànic. Es poden agrupar en quatre grups segons el grau d'homologia de les seqüències nucleotídiques:

les derivades d'OXA-1 (OXA-30), derivades d'OXA-2 (OXA-3, OXA-15), derivades d'OXA-7 (OXA-10, OXA-11, OXA-14, OXA-16 i OXA-17) i derivades d'OXA-9 (OXA-12, OXA-18, OXA-22). El grup de les oxacil·linases, a diferència dels anteriors grups de  $\beta$ -lactamases, presenten una major diversitat aminoacídica: del 20 al 30%<sup>121, 123, 129</sup>.

Fa dotze anys es va descriure una nova família d'enzims d'espectre ampliat, la família CTX-M. Aquests enzims es caracteritzen per ser més actius enfront de la cefotaxima i són susceptibles a la inhibició pels inhibidors de les  $\beta$ -lactamases. Fins a l'actualitat han estat descrits més de 20 tipus d'enzims diferents, anomenats CTX-M, Toho o UOE. Aquests enzims no s'han relacionat amb cap de les  $\beta$ -lactamases plasmídiques conegudes, però es postula que es podrien haver originat a partir de  $\beta$ -lactamases cromosòmiques, sent la més probable la descrita en *K. ascorbata*. Concretament s'ha descrit que la  $\beta$ -lactamasa cromosòmica de *K. ascorbata* KLUA-2 (nombre d'accés CAB63259) mostra un 100% d'homologia amb la  $\beta$ -lactamasa plasmídica CTX-M-5<sup>13</sup>. La presència d'aquests enzims s'ha descrit en diverses espècies de la família *Enterobacteriaceae* en zones geogràficament molt distants (Alemanya, Itàlia, Argentina, Japó, Índia i Espanya), la majoria dels quals, de codificació plasmídica. La divergència de la seqüència aminoacídica així com la dispersió temporal i espacial de les soques que expressen dites  $\beta$ -lactamases fa difícil poder predir el seu origen.

### III. $\beta$ -Lactamases resistents als inhibidors (IRT)

Hom va començar a descriure aquests enzims a principis del anys noranta, són derivats dels enzims d'ampli espectre pertanyents a la família TEM (TEM-1 i TEM-2), que per determinades mutacions han esdevingut resistents als inhibidors de les  $\beta$ -lactamases com per exemple l'àcid clavulànic, tazobactam i el sulbactam. Han estat anomenats IRT (*inhibitor resistant TEM-type*). Aquests enzims resistents als inhibidors, comparats amb els enzims dels quals deriven, són menys eficients en la

hidròlisi de benzilpenicil·lina, aminopenicil·lines i cefalosporines. Això no obstant, la hiperproducció d'aquests enzims els confereix nivells substancials de resistència<sup>11</sup>.

Fins a l'actualitat es coneixen de la TEM-30 a TEM-41, de TEM-44 a TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, de la TEM-76 a TEM-79 i de la TEM-81 a TEM-84 ([www.lahey.org/studies/temtable.htm](http://www.lahey.org/studies/temtable.htm)).

L'any 1997 es va descriure un enzim derivat de SHV (concretament de la BLEA SHV-9), la SHV-10, que conferia resistència a les aminopenicil·lines, als inhibidors, i era també actiu enfront de les cefalosporines<sup>103</sup>. S'ha descrit un enzim derivat de la família TEM, la TEM-50, que es caracteritza per presentar una mutació que li confereix el fenotip de les  $\beta$ -lactamases d'espectre ampliat i una altra mutació que li dóna resistència als inhibidors; s'expressa com un patró mixt<sup>128</sup>.

#### IV. $\beta$ -Lactamases plasmídiques AmpC

Aquests enzims posseeixen un espectre de reconeixement de substrats molt ampli, incloent-hi tots els  $\beta$ -lactàmics excepte els carbapenems. La majoria, a diferència de les  $\beta$ -lactamases d'espectre ampliat, hidrolitzen les cefamicines (cefexitina) (excepte ACC-1 i ACC-1-like)<sup>43, 81</sup>, no s'inhibeixen per l'àcid clavulànic (excepte MOX-1) i mostren una menor activitat enfront de les cefalosporines de 4a generació (cefepima) a diferència de les  $\beta$ -lactamases d'espectre ampliat<sup>7</sup>. Aquestes característiques del perfil d'hidròlisi de substrats el fa semblant al que presenten les  $\beta$ -lactamases cromòmiques de la classe C, de les quals possiblement deriven. Convé destacar que aquestes  $\beta$ -lactamases plasmídiques, a diferència de les cromosòmiques, tenen expressió constitutiva. Recentment, però, s'ha detectat en una soca de *S. enterica* serovar Enteritidis, la  $\beta$ -lactamasa plasmídica DHA-1 pertanyent a la classe C, que és induïble<sup>6</sup>. Fa poc que s'ha identificat una nova  $\beta$ -lactamasa plasmídica induïble derivada de DHA-1, la DHA-2, en una soca de *K. pneumoniae*<sup>34</sup>.

Els gens codificadors d'aquests enzims pertanyents a la classe C presenten un alt grau d'homologia amb els gens cromosòmics característics d'espècies com *E.*

*cloacae* (MIR-1), *C. freundii* (CMY-2 a la CMY-5, LAT-1, LAT-2, BIL-1) i *P. aeruginosa* (MOX-1, CMY-1, FOX-1). En el cas de FOX-2 i FOX-3, no s'han pogut establir les seves relacions filogenètiques. La DHA-1 és una  $\beta$ -lactamasa molt pròxima filogenèticament a la  $\beta$ -lactamasa cromosòmica de *M. Morganii* i les  $\beta$ -lactamases plasmídiques ACC-1 i ACC-1-like deriven de la  $\beta$ -lactamasa cromosòmica d'*Hafnia alvei*<sup>43, 80</sup>.

### V. Carbapenemases plasmídiques

Són enzims que pertanyen a la classe B d'Ambler. Es caracteritzen perquè poden hidrolitzar tots els  $\beta$ -lactàmics excepte l'aztreonam, principalment els carbapenems (imipenem i meropenem), d'aquí prové el seu nom. No s'inactiven per l'àcid clavulànic, però sí per l'EDTA. Són metal·loenzims, ja que requereixen zinc com a cofactor per a ser actius.

Aquests gens localitzats en plasmidis deriven de gens cromosòmics d'espècies de *Bacillus*, *Bacteroides*, *Aeromonas*, de *Stenotrophomonas maltophilia* i de *Legionella gormanii*. Es van començar a detectar al Japó (possiblement perquè l'ús dels carbapenems en teràpia és notable)<sup>16</sup>. La primera carbapenemasa, la IMP-1, es va descriure el 1991 en una soca de *Serratia marcescens*, encara que darrerament i de forma ocasional s'han detectat en enterobacteris i *P. aeruginosa*. Fins a l'actualitat hi ha caracteritzades des d'IMP-1 fins a IMP-8. L'any 1999 es va descriure una nova  $\beta$ -lactamasa pertanyent a la classe B, VIM-1<sup>65</sup>. Aquest enzim mostra entre un 16,4%-38,7% d'identitat amb altres  $\beta$ -lactamases de la classe B. Actualment es coneixen des de VIM-1 fins a VIM-3. Els gens codificadors d'aquests enzims, tant derivats d'IMP com de VIM, es troben formant part d'integrans i algun d'aquests integrans en plasmidis conjugatius, com per exemple IMP-1<sup>63, 81</sup>, la qual cosa els confereix una taxa de difusibilitat alta.

Molts gens de resistència en *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas* es troben en plasmidis, els quals poden contenir transposons. Alguns transposons com ara el Tn3

expressen gens de resistència antimicrobiana com les  $\beta$ -lactamases del tipus TEM (i els seus derivats d'espectre ampliat); el Tn5 confereix resistència a la kanamicina i el Tn10 confereix resistència a la tetraciclina. Molt sovint, els plasmidis i transposons que codifiquen resistències antimicrobianes múltiples porten integrons, elements capaços de capturar i integrar gens de resistència.

El fet que els gens que codifiquen les  $\beta$ -lactamases es trobin formant part d'elements mòbils, junt amb l'existència d'una pressió selectiva per l'ús successiu de  $\beta$ -lactàmics amb activitat més àmplia, està conduint a la selecció de gens que codifiquen  $\beta$ -lactamases que han ampliat el seu perfil d'hidròlisi, amb la qual cosa s'afavoreix la seva difusió entre diferents espècies i en diferents àrees geogràfiques.

### **1.5. Elements mòbils**

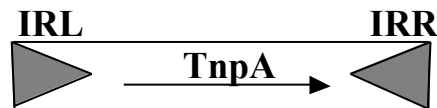
#### **1.5.1. Elements transposables: seqüències d'inserció, transposons compostos i transposons de la família tn3**

Els elements transposables es caracteritzen per ser seqüències de DNA amb capacitat pròpia per moure's en el genoma, sense necessitar homologia amb la seqüència receptora. Requereixen d'una proteïna específica per a la transposició: la transposasa (TnpA). Com a elements transposables hi ha les seqüències d'inserció (IS), que són els que presenten l'estructura més senzilla i els transposons (els transposons compostos i els transposons derivats de la família Tn3). El procés de transposició es caracteritza pel reconeixement dut a terme per la transposasa de les repeticions invertides (IR) dels elements transposables i de la duplicació de la seqüència diana reconeguda<sup>20</sup>.

La transposició està estretament regulada per un o diversos mecanismes que operen en sèrie, els quals normalment mantenen les freqüències de transposició a nivells molt baixos.

### 1.5.1.1. Seqüències d'inserció (IS)

Les seqüències d'inserció són els elements transposables més petits, tenen entre 700 i 2.500 parells de bases. S'han trobat a tots els genomes, tant d'eubacteris (grampositius i gramnegatius) com d'arqueobacteris. També són freqüents als genomes de bacteriòfags i encara més als plasmidis<sup>20</sup>. Entre les IS hi ha moltes variacions d'estructura, però normalment es caracteritzen per tenir en els extrems repeticions invertides (IR) entre 10 i 40 pb<sup>74</sup>, tot i que s'han trobat IS com la IS200, que no en tenen. Moltes IS tenen un marc obert de lectura (*orf*) o diversos de superposats que codifiquen la transposasa i la seva regulació<sup>20</sup> (figura 5).



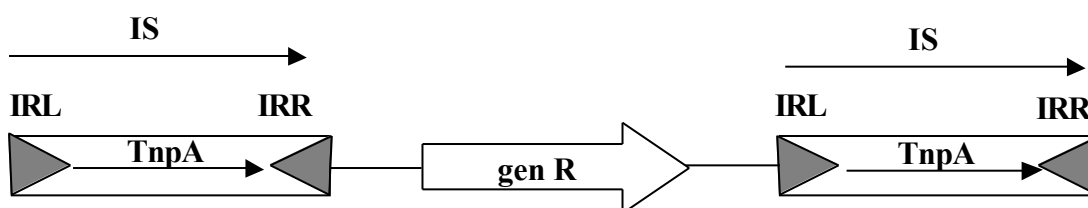
**Figura 5.** Representació esquemàtica d'una seqüència d'inserció (IS). IRL, repetició invertida de l'esquerra; IRR, repetició invertida de la dreta; TnpA, gen codificador de la transposasa.

### 1.5.1.2. Transposons (Tn)

Els transposons són elements mòbils que, a diferència de les IS, porten gens addicionals, a més dels necessaris per a la seva mobilització. N'hi ha de dues classes: els transposons compostos i els transposons de la família de Tn3. Els transposons compostos estan formats per dues IS que tenen diferents gens entremig. En la majoria dels casos una de les dues IS és inactiva. Generalment, totes dues IS es disposen en forma invertida una respecte de l'altra, però també hi ha transposons on les dues IS es troben disposades en la mateixa direcció. Per exemple, el Tn5 està format per dues seqüències IS50 invertides i una regió central que conté gens de resistència a la kanamicina, l'estreptomicina i la bleomicina; en canvi, el Tn9 té una regió central que conté gens de resistència a cloramfenicol i està flanquejada per repeticions directes

d'IS<sup>20</sup>. Els transposons compostos més coneguts són els que contenen gens de resistència a agents antimicrobians (figura 6).

Els transposons de la família de Tn3 no estan formats per IS però tenen repeticions terminals. A més de la transposasa, codifiquen una resolvasa, que és l'enzim encarregat de solventar les estructures formades durant el procés de transposició (o cointegrats) actuant sobre seqüències adjacents, anomenades *res*. La majoria dels transposons de la família Tn3 porten gens addicionals de resistència a antibiòtics<sup>8, 20</sup>. El Tn21 i el Tn1696 pertanyen a la família Tn3; són transposons grans que confereixen resistència al mercuri i a diversos antibiòtics. Concretament, el Tn21 té una regió central que conté un gen que confereix resistència a sulfonamides (*sulI*) i un gen que confereix resistència a l'estreptomicina i l'espectomicina (*aadA1*). El Tn1696 conté gens de resistència a l'estreptomicina i l'espectinomicina (*aadA1*) i al cloramfenicol (*cmlA1*).



**Figura 6.** Esquema d'un transposó compost format per dues IS disposades en la mateixa direcció. Entre ambdues IS es troba un gen de resistència (gen R).

Hi ha un tipus de transposons que, a diferència dels descrits anteriorment, posseeixen no sols la capacitat de mobilitzar-se, sinó que també poden autotransferir-se: són els transposons conjugatius. Són elements genètics no replicatius que, a més a més, tenen la capacitat de transferir-se no tant sols en l'àmbit intracel·lular sinó també intercel·lular. En el procés de transferència requereixen, igual que en la conjugació, el contacte entre dues cèl·lules, però a diferència dels plasmidis, aquests no es poden replicar independentment i s'han de mantenir en l'hoste integrats en el DNA genòmic o plasmídic. Així doncs, els transposons conjugatius posseeixen totes les característiques pròpies dels transposons citades anteriorment i, a més a més, requereixen de sistemes genètics complexos per dur a terme tot el procés bioquímic de



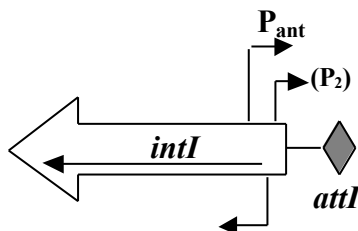
la transferència entre cèl·lules. Es troben més freqüentment en bacteris grampositius com són ara els estreptococs i els enterococs. La majoria dels transposons conjugatius descrits porten gens de resistència a la tetraciclina, la kanamicina, el cloramfenicol o l'eritromicina<sup>118, 143</sup>.

## 1.5.2. ELS INTEGRONS

Els integrons són estructures genètiques que van ser descrites a principis dels anys 80, quan la seqüenciació de diferents gens de resistència va revelar una seqüència comuna en la regió 5' que contenia un promotor i un gen codificador d'una integrasa similar a les descrites en els bacteriòfags. Es caracteritzen per ser estructures genètiques capaces d'integrar o mobilitzar gens casset que poden codificar determinants de resistència als antibiòtics i determinants amb altres funcions. Els integrons s'han disseminat àmpliament entre les espècies d'*Enterobacteriaceae* i alguns s'han descrit com a part de transposons<sup>91</sup>.

### 1.5.2.1. Definició dels integrons

Els integrons estan formats per tres elements necessaris per a la captura de gens exògens (continguts en els gens casset): un gen que codifica una integrasa (*intI*), un altre de lloc de recombinació específic (*attI*) i finalment un promotor ( $P_{ant}$ ) per a l'expressió dels gens casset adjacents. A vegades contenen un segon promotor més fort,  $P_2$ , localitzat adjacentment al primer (figura 7).



**Figura 7.** Part conservada en totes les diferents classes d'integrons. *intI* (gen codificador de la integrasa),  $P_{ant}$  (promotor de l'integró responsable de l'expressió dels cassets),  $P_2$  (promotor fort; no sempre present), *attI* (lloc de recombinació específic).

Els gens (exògens) que són incorporats als integrons tenen una estructura particular i se'ls ha denominat gens casset (*gene cassette*). La integració es produeix per un mecanisme de recombinació de lloc específic.

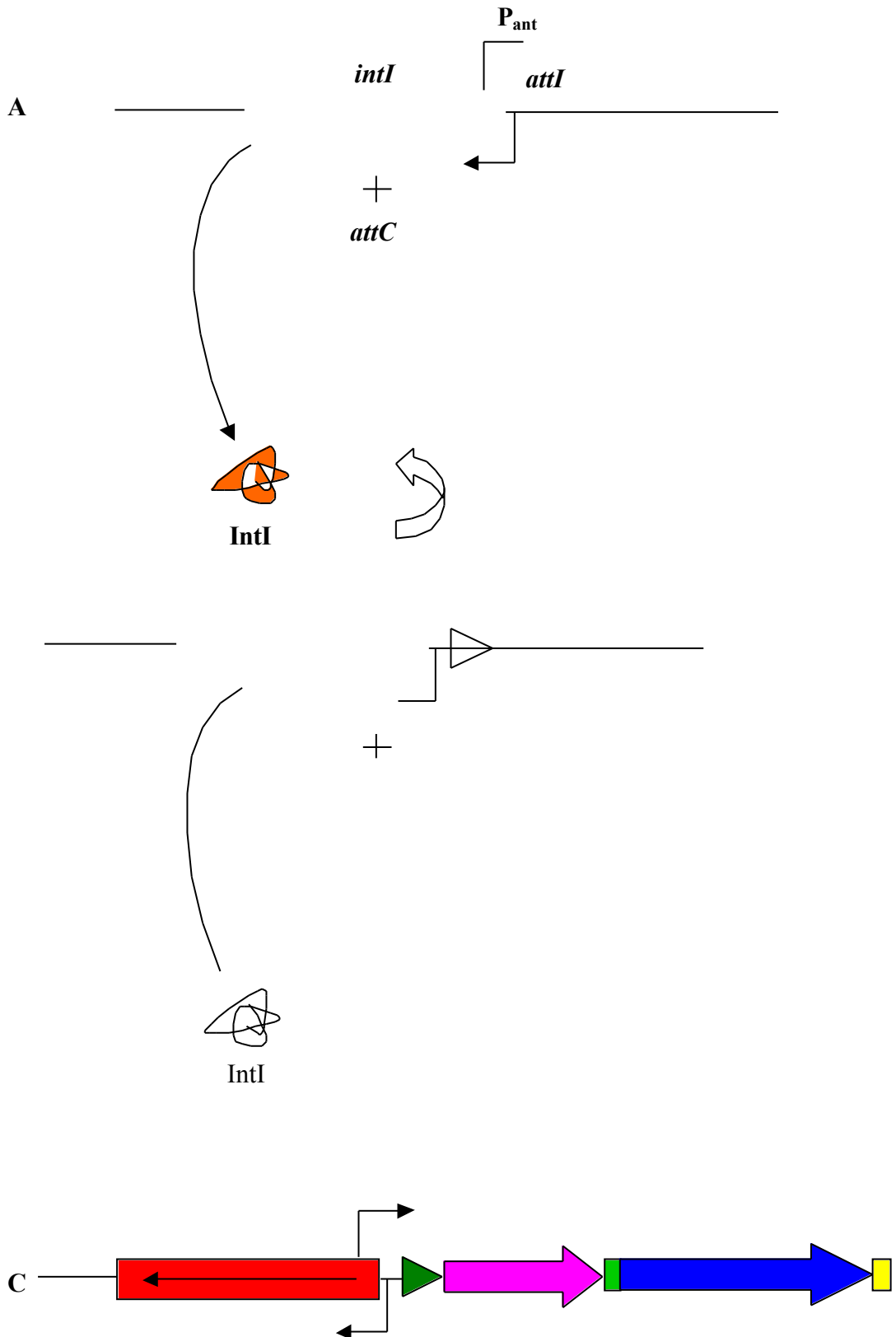
Els integrons contenen un lloc de recombinació anomenat *attI* (format per 65 pb que inclou el lloc de recombinació i dues regions corresponents als lloc d'unió fort i dèbil de la integrasa) en el qual els gens capturats són integrats gràcies a l'acció de la integrasa IntI. Aquesta integrasa sembla que pertany a la família de les recombinases ja que presenta les dues regions *consensus* trobades a la integrasa (IntI) del fag i a altres recombinases<sup>89, 131</sup>.

Els gens casset o gens exògens capturats pels integrons són molècules de DNA no replicatives que es troben en el DNA circular lliure però que es poden trobar constituint part d'una molècula de DNA (plasmidi o cromosoma) com a seqüències lineals. En aquest darrer cas, majoritàriament estan inclosos en integrons, tot i que rarament s'han trobat gens casset fora dels integrons (*aadB* i *dfrA14*) en zones no específiques, possiblement a causa que la recombinació duta a terme per la IntI ha estat en un lloc secundari<sup>107</sup>. Aquests gens casset, generalment, inclouen un únic gen i en posició posterior presenten una seqüència de recombinació de lloc específic, coneguda com a *attC* o element de 59 bases (59-be), la qual permet el reconeixement i la mobilització dels cassets<sup>48, 51, 52, 108</sup>. La mida dels cassets varia considerablement entre 262 i 1.549 pb<sup>108</sup>.

Els gens casset normalment no contenen promotors i s'expressen utilitzant el promotor de l'integró. La transcripció dels gens casset inserits en l'integró s'inicia a partir d'un mateix promotor i tots ells són transcrits en un transcrit comú d'mRNA, la qual cosa dóna lloc, per tant, a una relativa disminució de la transcripció en els gens més distals<sup>24</sup>.

Els gens casset no es poden moure independentment, però els mobilitza la integrasa codificada en l'integró, que reconeix l'*attC* del gen casset i el lloc receptor *attI* de l'integró. Això permet tant la integració com l'excisió d'aquests cassets en l'integró (figura 8). La integrasa de la classe 1 (IntI1), a més a més de catalitzar la

reacció d'integració o excisió entre *attI1* i *attC*<sup>26, 50, 75, 110</sup>, pot catalitzar ocasionalment processos de recombinació, tant d'integració com d'excisió, entre dos *attC*<sup>26, 48, 75, 132</sup>. També ha estat documentada la recombinació integrativa entre dos *attI1*<sup>53</sup> i fins i tot entre llocs secundaris i l'*attC*<sup>35, 36, 53, 110, 132</sup> o l'*attI1*<sup>53</sup>, encara que aquests dos darrers casos tenen lloc a una freqüència baixa. La inserció i/o l'excisió dels cassets dintre de l'integró juga un paper important en la disseminació i la formació de noves combinacions de gens de resistència als antibiòtics. El fet que molts integrons posseïxin més d'un gen casset de resistència, juntament amb el fet que molts estan localitzats en elements genètics com per exemple transposons o plasmidis, que porten determinants de resistència, fa que la selecció a través d'un d'aquests determinants de resistència antimicrobiana seleccioni els altres (selecció en *autoestop*)<sup>33</sup>.



**figura 8.** Model d'intercanvi de gens cassette. A, estructura comuna de tots els integrons, conté el gen codificador de la integrasa (*intI*), el promotor responsable de l'expressió de cassets inserits ( $P_{ant}$ ) i el lloc de recombinació específic (*attI*); gen cassette A on s'indica l'*attC*. B, la integrasa catalitza la recombinació de lloc específic entre l'*attC* del cassette i l'*attI* de l'integró. C, posteriorment té lloc la integració d'un segon cassette B que desplaça l'anterior cassette cap a 3'. La reacció de la integrasa és reversible, és a dir, tant pot integrar com excindir cassets de l'integró.

### 1.5.2.2. Estructura de l'*attI* i l'*attC*

L'estructura de l'*attC* difereix de la que presenta l'*attI* (figura 9).

La família de l'*attC* constitueix un gran grup que té diverses seqüències i longituds (entre 57 i 141 pb)<sup>108</sup>, però que comparteix unes característiques comunes<sup>25, 48, 132</sup>: tots presenten una seqüència *consensus* de 25 pb a cada extrem (LH i RH), que és una repetició invertida imperfecta l'una de l'altra; separades per una regió variable quant a seqüència i longitud. L'organització de cada regió *consensus* comprèn un parell de dominis d'unió a la integrasa orientats de forma invertida i separats per un espai de 7-8 pb<sup>132</sup> (figura 9b). El punt de recombinació té lloc al final de la regió *consensus* RH que conté la regió *consensus* GTTRRRY (sent R = purina, A o G i Y = pirimidina, C o T) i està localitzat en una única posició entre els residus G i T adjacents<sup>132</sup>. S'ha demostrat experimentalment que canvis introduïts en aquests residus són crítics per a l'activitat i que fins i tot canvis en la seqüència conservada i invertida RYYAAC localitzada en l'altre extrem (LH), en els residus AAC, també comporten una reducció en l'activitat però en aquest cas menor<sup>132</sup>. Tots els cassets inserits en integrons i identificats fins al moment es troben en la mateixa orientació, la qual cosa permet l'expressió dels gens associats a partir del promotor P<sub>ant</sub> de l'integró. És probable que les característiques de l'*attC*, per exemple, les diferències entre les regions LH i RH juguin un paper important en assegurar que el casset s'insereixi en l'orientació correcta<sup>132</sup>.

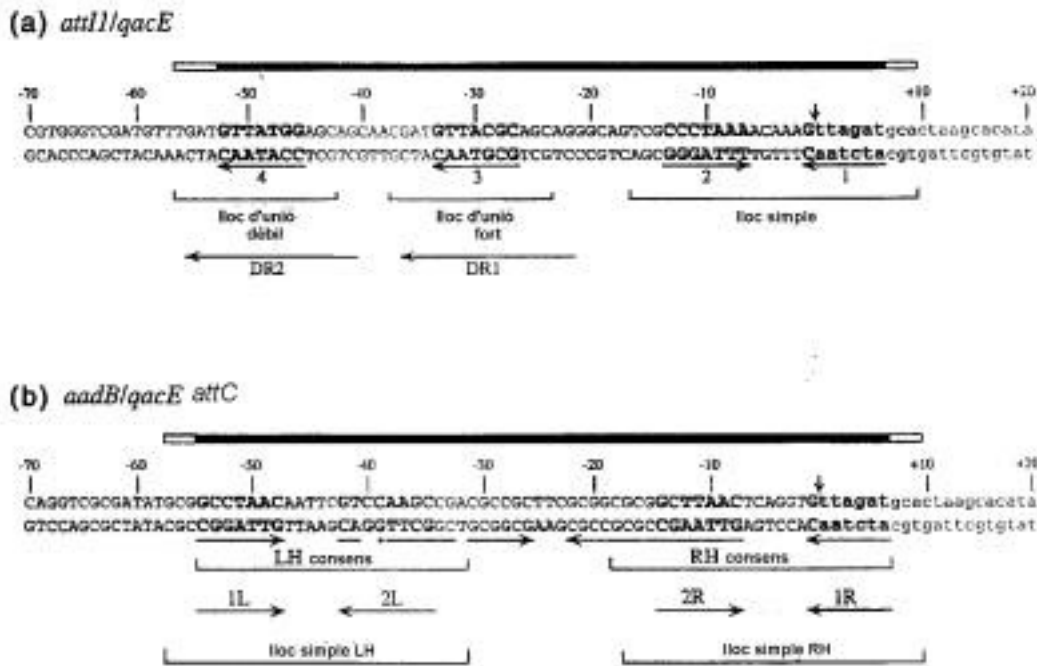
L'*attII* (corresponent a la regió *attI* dels integrons de la classe 1 -vegeu més endavant la classificació dels integrons-) ha estat el més estudiat. Està format per 65 pb que inclouen un lloc simple i dues regions localitzades a l'esquerra d'aquest lloc simple anomenades DR1 i DR2, corresponents als llocs d'unió fort i dèbil de la integrasa (IntII; integrasa dels integrons de la classe 1), respectivament<sup>25, 50</sup> (figura 9a). Tota la seqüència de 65 pb d'*attII* és necessària per a la recombinació *attII* x *attC* que és 100 vegades més eficient que la recombinació *attII* x *attII*. Encara que aquesta darrera és menys eficient, requereix tan sols la petita regió que conté el lloc simple<sup>92</sup>. És probable que els dos llocs d'unió a la integrasa (DR1 i DR2) actuïn com a

activadors de la recombinació per mitjà de la retenció de la integrasa IntI1 en la proximitat del lloc simple. L'estructura de l'*attI* és molt diferent de la que presenta l'*attC*; no obstant això comparteix una característica amb l'*attC*, la seqüència *consensus* GTTRRRY, encara que en *attI* manca la seqüència *consensus* invertida RYYAAC<sup>132</sup>. La posició del lloc de creuament ha estat localitzada, igual que en l'*attC*, entre la guanina (G) i la timina (T)<sup>53</sup>.

El fet que l'estructura de l'*attI* difereixi respecte de la d'*attC* sembla que té un paper important en assegurar preferentment la integració dels cassets adjacents al lloc *attI* de la classe 1 d'integrans<sup>92</sup>.

L'estructura dels llocs *attI* no mostra les mateixes característiques en les diferents classes d'integrans, així com tampoc no mostren una certa identitat en la seqüència<sup>25, 50, 110</sup>. La regió *attI* dels integrans de la classe 1, classe 2 i la classe 3 (*attI1*, *attI2* i *attI3*, respectivament) s'ha pogut detectar per similitud de seqüències, una regió potencial a contenir el lloc simple (consisteix en un parell de dominis invertits on s'uneix la integrasa en forma de dímer)<sup>47</sup>; aquest, però, no s'ha detectat en l'*attI4* (present en els integrans de la classe 4).

Les reaccions catalitzades per la integrasa IntI1 codificada pels integrans de la classe 1 han estat molt estudiades<sup>75</sup>. IntI1 pot catalitzar tant processos d'integració com d'excisió, recombinació entre *attC* x *attI1*; entre *attC* x *attC* i entre *attI1* x *attI1*. IntI1 també reconeix l'*attI2* i l'*attI3* pertanyents als integrans de la classe 2 i 3, respectivament, encara que l'eficiència de recombinació entre *attI2* o *attI3* i un *attC* és més baixa que la reacció equivalent entre *attI1* x *attC*<sup>26, 50</sup>. La recombinació entre *attI1* o *attC* amb altres llocs secundaris també ha estat descrita<sup>53, 110</sup>.

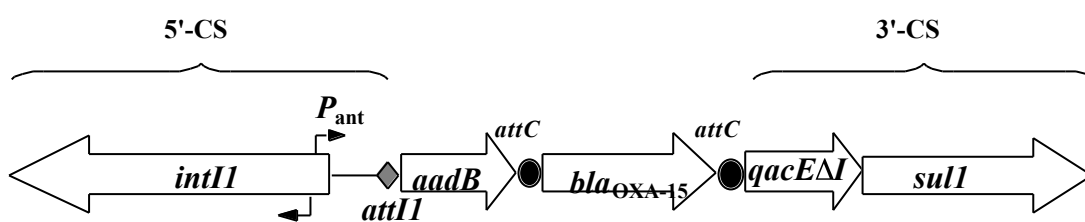


**Figura 9.** Estructura i seqüència de l'*attII* i l'*attC*. Amb un barra negra s'indica l'extensió d'*attII* i *attC* i en barres blanques es mostren altres bases implicades en el reconeixement per *IntI*. En negreta s'indica el *core site* de 7 pb (1-4 en *attII*; 1L, 2L, 1R i 2R en *attC*) i amb fletxes s'indiquen les seves orientacions relatives. També es mostra l'extensió dels llocs simples. Amb fletxes verticals s'indiquen els punts d'entrecruament. (a), seqüència d'*attII/qacE*. Es mostra el lloc fort i dèbil d'unió a *IntI*<sup>25</sup> i un parell de repeticions directes, DR1 i DR2. (b), seqüència d'*aadB/qacE attC*. S'hi indiquen les repeticions invertides amb fletxes i amb un asterisc es mostra la posició extra d'una C en 2L en comparació amb 2R. S'hi assenyalen l'extensió de les seqüències *consensus* d'*attC* de LH i RH definides per Stokes i col.<sup>132</sup>.

### 1.5.2.3. Classificació dels integrans

La classificació dels integrans es basa en la seqüència codificadora de la integrasa. Actualment se'n coneixen nou, de classes (figura 10). Els membres de les classes 1, 2, 3 contenen gens casset de resistència als antibiòtics<sup>3, 108</sup>; els de les classes 4, 5, 6 i 7 contenen gens casset que no codifiquen resistència a antibiòtics<sup>21, 86</sup> (nombre d'accés AF179595), l'integró de la classe 8 no presenta cap gen casset<sup>86</sup> i el de la classe 9 conté un gen casset de resistència a antibiòtics<sup>56</sup> i altres gens casset de funció desconeguda.

Els integrons de la classe 1 són els que es troben amb major freqüència en soques aïllades de casos clínics. Es caracteritzen per tenir una seqüència 5' conservada (5'-CS) que conté el gen codificador de la integrasa. La majoria conté també una seqüència 3' conservada (3'-CS) que inclou el gen que dóna resistència a components d'amoni quaternari (*qacEΔI*) i el gen de resistència a sulfonamida (*sulI*); aquests dos gens de resistència no són cassetts, sinó que es troben fixos en l'integró (figura 11). La longitud d'aquesta regió anomenada 3'-CS és variable en el seu extrem 3', com s'ha descrit en In1, In2, In3, In4, In5 i In10<sup>49</sup>. També s'han caracteritzat integrons de la classe 1 que presenten delecions en aquesta regió 3'-CS, com per exemple l'integró localitzat en Tn5086 i el localitzat en Tn5090<sup>104, 135</sup>. Així doncs, el contingut i l'extensió del segment 3'-CS difereix en cada integró<sup>49, 94</sup>, tot i això Stokes i col.<sup>131</sup> descriuen que aquest fragment conté tres pautes obertes de lectura: l'*orf4* (*qacEΔI*), dóna resistència a components d'amoni quaternari i presenta una pauta oberta de lectura a l'extrem 3' que se solapa amb els primers dos codons de *sulI*, encara que amb una pauta de lectura diferent; *sulI*, un determinant de la resistència a les sulfonamides, i l'*orf5* el producte del qual presenta similitud amb la puromicina-acetiltransferasa<sup>9</sup>.



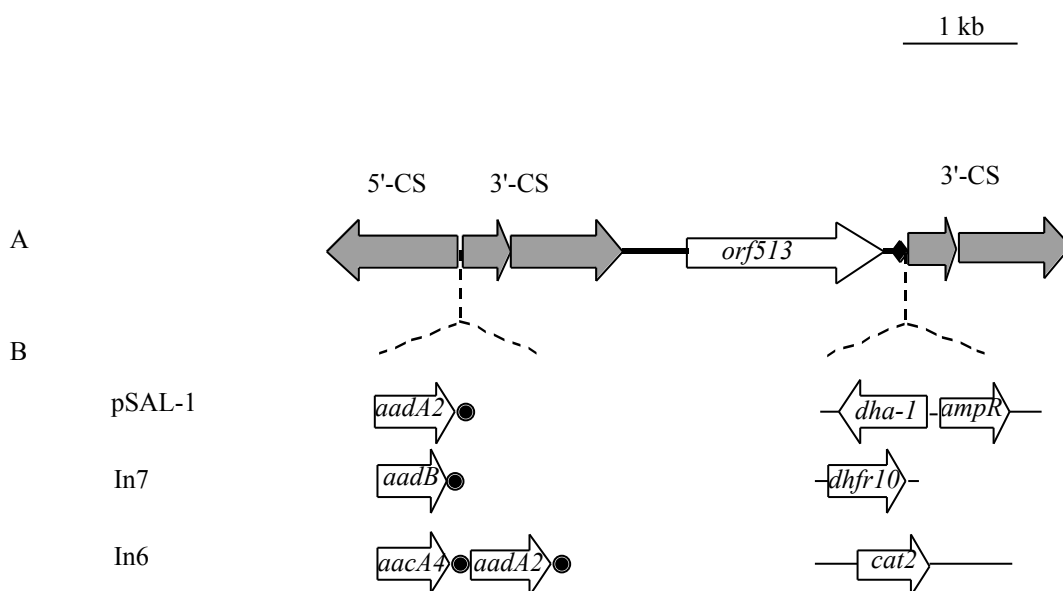
**Figura 11.** Exemple d'un integró de la classe 1<sup>29</sup>. S'hi mostren els segments conservats 5'-CS i 3'-CS. El segment 5'-CS és el comú a tots els integrons i conté el gen codificador de la integrasa (*intI1*), el promotor responsable de l'expressió dels gens casset ( $P_{ant}$ ) i el lloc de recombinació específic (*attI1*). El segment 3'-CS conté el gen que codifica resistència a compostos d'amoni quaternari (*qacEΔI*) i el gen que dóna resistència a sulfonamides (*sulI*). Entre aquestes dues regions conservades es troben dos gens casset (*aadB*) i (*bla<sub>OXA-2</sub>*), gens que donen resistència a aminoglicòsids i a lactàmics, respectivament. Cada gen casset porta associat l'*attC* (●).



Molts dels integrons pertanyents a aquesta classe han estat identificats en elements transposables com el Tn21 (l'integró In2)<sup>131</sup>, el Tn1696 (l'integró In4)<sup>91</sup> (ambdós classificats com a membres de la família del Tn3) o en transposons defectius com és el cas d'In0, In2 i In5<sup>14, 108</sup>.

L'any 1992 Bissonnette i col.<sup>9</sup> proposen un model d'evolució de la regió 3'-CS dels integrons segons el qual aquests van descendre d'un ancessor comú que contenia un segment 3' conservat més curt i al qual hi mancava el *sull* i l'*orf5*. Els resultats exposats per Paulsen i col.<sup>94</sup> mostren que l'integró contingut en el plasmidi R751 conté *qacE1* i difereix amb *qacEΔ1* en el seu extrem 3' i no conté *sull* ni *orf5*. A més, s'ha pogut observar que les soques que contenen *qacE1* són més resistents, a nivells elevats, a un ventall de compostos tòxics, que les soques que contenen *qacEΔ1*. Això suggereix que *qacEΔ1* prové de *qacE* per inserció d'un segment de DNA que contenia *sull* i *orf5* en l'extrem 3' de *qacE* entre els codons 94 i 95. Sembla, doncs, que *qacE* és un casset interromput per la inserció del segment abans citat. Aquest resultat en *qacEΔ1* ha truncat la forma *qacE*, fusionant en *frame* seqüències que codifiquen 21 aminoàcids no relacionats respecte del fragment inserit. Aquesta proteïna més llarga, QacE 1, sembla que és una proteïna parcialment funcional exportadora de diverses substàncies tòxiques. Aquests resultats estan d'acord amb el model d'evolució proposat per Bissonnette i col.<sup>9</sup>, en l'evolució de l'extrem 3' del segment conservat. Els membres de la família *qacE* i *qacEΔ1* es troben àmpliament distribuïts en bacteris gramnegatius i grampositius per raó de la seva localització en integrons. L'àmplia distribució d'aquesta família de determinants de resistència a múltiples tòxics pot ser deguda a la pressió selectiva imposada en l'ús clínic d'agents antisèptics i desinfectants com el clorur de benzalconi i altres compostos d'amoni quaternari, així com acriflavina i altres. Una observació que dona suport a aquest suggeriment és que *qacC* i *qacE/qacEΔ1* es troben freqüentment en conjunció amb diversos determinants de resistència als antibiòtics<sup>94</sup>.

Mentre que la majoria dels integrons de la classe 1 tenen l'estructura descrita anteriorment, darrerament s'han descrit tres integrons inusuals pertanyents a aquesta classe: In6, In7<sup>133</sup> i un integró descrit en el plasmidi pSAL-1 de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis que conté el gen *bla*<sub>DHA-1</sub> i el seu regulador *ampR*<sup>140</sup>. Aquests integrons són inusuals perquè contenen una segona còpia del segment 3'-CS. Tots aquests integrons tenen un segment comú de 2,1 kb localitzat entre les dues repeticions 3'-CS, que inclou l'*orf513* (figura 12), la qual en l'integró de pSAL-1 s'anomena *orf341*, producte de la delecció d'una base que crea un codó *stop* i s'obté una proteïna de 341 aminoàcids.



**Figura 12.** Comparació dels diferents integrons compostos. Les fletxes indiquen les pautes obertes de lectura (*orf*). A, estructura conservada de tots els integrons compostos. Amb fletxes ratllades s'indica els extrems conservats 5'-CS i 3'CS propis dels integrons de la classe 1, i s'hi observa la duplicació del 3'-CS, característic dels integrons compostos. B, regió variable dels integrons compostos. ● *attC*; Hipotètica regió de recombinació.

Els integrons de la classe 2 es troben en el Tn7 i en derivats d'aquest com el Tn1825, Tn1826 i Tn4132<sup>108, 137</sup>. Aquests integrons tenen en el segment conservat 5' una estructura similar als integrons de la classe 1. La *IntI2* mostra un 40% d'identitat

amb la integrasa de la classe 1<sup>108</sup>. El gen *intI2* es troba interromput per un codó *stop* en el Tn7, Tn1825, Tn1826 i Tn4132<sup>108</sup>. Adjacent a aquesta regió, els integrons d'aquesta classe es caracteritzen per presentar un nombre limitat de gens casset que codifiquen resistència a trimetoprim (*dfrA1*), estreptotricina (*sat*), estreptomycin-espectinomicina (*aadA1*) i/o *orf* de funció desconeguda<sup>107, 134</sup>. La combinació d'aquests cassets serà característica de cada integró de classe 2. A continuació d'aquests cassets hi ha el segment conservat 3' que conté cinc gens implicats en els moviments de la transposició (*tns*)<sup>100</sup>.

Darrerament s'ha descrit en una soca d'*Acinetobacter baumannii* un integró híbrid que conté el segment 5' conservat dels integrons de la classe 2 juntament amb els gens casset *dfrA1* i *sat* (que normalment es troben en els integrons de la classe 2), un tercer gen casset, l'*ant(3'')-Ia*, que és idèntic als prèviament descrits en els integrons de la classe 1, i a continuació, el segment 3' conservat dels integrons de la classe 1 (que conté els gens *qacEΔI* i *sull*)<sup>100</sup>.

En els integrons pertanyents a les classes 3 a la 9, sols s'ha descrit un representant de cada classe.

L'integró de la classe 3 conté un gen casset que codifica una metal·lo-lactamasa (*bla<sub>IMP</sub>*; carbapenemasa) detectada en una soca de *Serratia marcescens*, aïllada al Japó<sup>3</sup>. Aquest gen casset es va descriure posteriorment en integrons de la classe 1<sup>63</sup>. La integrasa d'aquest integró, la IntI3, presenta un 61% d'identitat amb la IntI1<sup>3, 124</sup>. En aquest integró, el segment 3' no ha estat caracteritzat<sup>3</sup>.

L'integró de la classe 4 ha estat descrit únicament en el cromosoma petit de *Vibrio cholerae*. Conté el gen *intI4* que codifica una integrasa que incorpora seqüències repetides en tàndem (*Vibrio cholerae repeated*, VCR) similars als gens casset trobats en els integrons de la classe 1, però, a diferència d'aquests, no porten gens de resistència als antibiòtics<sup>21, 55, 77</sup>, encara que s'han descrit dos cassets de virulència i nou cassets que confereixen funcions metabòliques<sup>21, 117</sup>.

L'integró de la classe 5 s'ha descrit associat a *Vibrio mimicus*<sup>21, 86</sup>. La seqüència d'*intI5* mostra un 75% d'identitat amb *intI4*. També s'ha seqüenciat parcialment un altre *intI5* amb la qual cosa entre ambdós s'han vist algunes diferències en relació amb la seqüència aminoacídica. En aquest darrer cas, aquest integró també es trobava associat a *Vibrio mimicus* (nombre d'accés AF179595). Ambdós integrons contenen un únic gen casset i en tots dos casos té una funció desconeguda.

El gen codificador de la integrasa 6, *intI6*, s'ha trobat associat a *Treponema denticola*. S'ha observat que IntI6 presenta un 46% d'identitat amb IntI1. En aquest integró s'ha detectat un gen casset anomenat *orf43*, de funció desconeguda<sup>86</sup>.

Així mateix, l'integró de la classe 7 expressa una nova integrasa: la IntI7. S'ha detectat associat a *Geobacter sulfurreducens* i presenta un 45% d'identitat amb la IntI1. En aquest integró s'ha detectat un gen casset anomenat *orf66*, de funció desconeguda<sup>86</sup>.

L'integró de la classe 8 conté la IntI8 i es troba associat a *Shewanella putrefaciens*. La IntI8 presenta un 50% d'identitat amb la IntI1. En aquest integró no s'ha detectat cap gen casset ni tampoc la regió de recombinació específica característica dels integrons, l'*attI*<sup>86</sup>.

Els integrons de les classes 6, 7 i 8 s'han detectat a partir de mostres de DNA aïllades del medi ambient, la qual cosa reforça la hipòtesi que els integrons són peces genètiques molt comunes entre les poblacions bacterianes i que no estan inexcusablement associades a la patogènia ni a la resistència antimicrobiana<sup>86</sup>.

Recentment s'ha descrit l'integró de la classe 9, associat a *Vibrio cholerae* serogrup O1 i O139. IntI9 mostra un 53% d'identitat amb la IntI2<sup>56</sup>. Aquest integró presenta el casset *dfrA1*, la seqüència del qual és un 99,8% idèntica al casset *dfrA1*

localitzat en els integrons de les classes 1 i 2. Posteriorment a aquest casset hi ha quatre més de funció desconeguda<sup>56</sup>.

En un treball realitzat per Goldstein i col.<sup>44</sup>, sobre la incidència de les integrases de les classes 1, 2, 3 i 4 en bacteris comensals, detectades per tècniques d'hibridació de DNA i confirmat per PCR, ha mostrat que un 52% del total dels aïllats de la família *Enterobacteriaceae* contenia integrons de les classes 1 o 2. Es va observar que un 92% presentaven la integrasa de la classe 1, un 14% la integrasa de la classe 2, un 13% la integrasa de la classe 3 i en cap cas no es va detectar la integrasa de la classe 4. En diversos d'aïllats, es va observar que una mateixa soca presentava a la vegada diferents classes d'integrases (un 10% en soques d' *E. coli* i un 2% en soques de *Salmonella*).

Les diverses classes d'integrons són capaces d'adquirir els mateixos gens casset, la qual cosa indica que el *pool* de gens casset és compartit<sup>26</sup>, com és el cas del casset *bla*<sub>IMP</sub>, localitzat inicialment en la classe 3<sup>3</sup> i darrerament en la classe 1<sup>63</sup>. Un altre exemple és el gen casset *dfrA1* detectat en els integrons de les classes 1, 2 i 9<sup>56</sup>. Fins a l'actualitat en bacteris gramnegatius s'han descrit més de 60 gens casset de resistència en bacteris gramnegatius<sup>52, 144</sup>, sent alguns dels darrers els gens codificadors d'oxacil·linasa (*oxa20*), gens que confereixen resistència al cloramfenicol (*catB6* i *cmlA2*), gens codificadors de proteïnes d'amoní quaternari (*qacF* i *qacG*) i el gen que confereix resistència al trimetoprim (*dfrA15*). Això no obstant, també s'han descrit cassets que inclouen gens amb altres funcions com els que s'han trobat en el cromosoma de *Vibrio cholerae*<sup>22, 77, 117</sup>.

Clark i col.<sup>22</sup>, van descriure un superintegró en el cromosoma de *Vibrio cholerae* que contenia més de cent gens casset. Recentment, Rowe-Magnus i col.<sup>117</sup> han identificat estructures equivalents de superintegrons en un mínim de nou gèneres diferents pertanyents al grup dels proteobacteris (nombre d'accés AY038186).

#### 1.5.2.4. Tipus de gens casset descrits

Molts dels gens de resistència trobats en bacteris gramnegatius formen part de gens casset<sup>51, 52</sup>, com també s'han descrit cassets que inclouen gens amb altres funcions com els que s'han trobat en el cromosoma de *Vibrio cholerae*<sup>21, 77, 117</sup>.

A la taula 1 es detallen els gens casset dels quals es disposa de la seqüència. Els cassets s'identifiquen generalment pel nom del gen que codifiquen o en el cas que continguin pautes obertes de lectura de funció desconeguda, a aquest se li assigna la lletra que li correspon segons l'ordre de la seva identificació<sup>108</sup>. Els gens casset relacionats a la taula 3 representen una part important dels gens de resistència trobats en bacteris gramnegatius de la família *Enterobacteriaceae* i en el gènere *Pseudomonas*. S'han trobat diferents gens de resistència per a la majoria dels antibiòtics; en alguns casos el mecanisme pel qual confereixen la resistència és diferent. Per exemple, la resistència al cloramfenicol es pot donar per acetilació de l'antibiòtic (gen *catB*) i per reflux de l'antibiòtic (gen *cmlA*); en els aminoglicòsids la resistència pot ser deguda a la modificació de l'antibiòtic per acetilació (gens *aacA* i *aacC*) i per adenilació (gens *aadA* i *aadB*). Les  $\beta$ -lactamases codificades en els cassets conegudes fins ara pertanyen a tres classes: classe A (gens *bla<sub>P</sub>*), metal·lo- $\beta$ -lactamases de la classe B (*bla<sub>IMP-1</sub>*) i la classe D (gens *bla<sub>OXA</sub>*).

Taula 3. Gens casset descrits.

<b>Gens casset<sup>a</sup> que confereixen resistència a:</b>		
	<b>Gen</b>	<b>Proteïna</b>
<b>β-lactàmics:</b>		
-lactamases de la classe A	<i>bla<sub>P1</sub></i>	PSE-1/CARB-2 <sup>b</sup>
	<i>bla<sub>P2</sub></i>	-
	<i>bla<sub>P3</sub></i>	CARB-4
	<i>bla<sub>VEB-1</sub></i>	VEB-1
	<i>bla<sub>GES-1</sub></i>	GES-1
-lactamases de la classe B	<i>bla<sub>IMP-1-8</sub></i>	IMP-1 a IMP –8
	<i>bla<sub>VIM-1-3</sub></i>	VIM-1 a VIM –3
-lactamases de la classe D	<i>oxa1-3</i>	OXA-1 a OXA-3
	<i>oxa5</i>	OXA-5
	<i>oxa7</i>	OXA-7
	<i>oxa9-10</i>	OXA-9 i OXA-10
	<i>oxa13</i>	OXA-13
	<i>oxa15</i>	OXA-15
	<i>oxa19-21</i>	OXA-19 a OXA-21
	<i>oxa31</i>	OXA-31
	<i>oxa35</i>	OXA-35
<b>Aminoglicòsids:</b>		
Aminoglicòsid-adeniltransferasa	<i>aadA1a-b</i>	AAD (3'')
	<i>aadA2</i>	AAD (3'')
	<i>aadB</i>	AAD (2)

## Introducció

<b>Gens casset<sup>a</sup> que confereixen resistència a:</b>		
Aminoglicòsid-acetiltransferasa	<i>aacA1<sup>b</sup></i>	AAC (6')-Ia
	<i>aacA</i>	AAC (6')-Ib
	<i>aacA7</i>	AAC (6')-I1
	<i>aacA</i>	AAC (6')-IIa
	<i>aacA</i>	AAC (6')-IIb
	<i>aacC1</i>	AAC (3)-Ia
<b>Cloramfenicol:</b>		
Cloramfenicol-acetiltransferases	<i>catB2-3</i>	CATB2 i CATB 3
	<i>catB5</i>	CATB5
Exportadors de cloramfenicol	<i>cmlA</i>	CmlA
<b>Trimetoprim:</b>		
Dihidrofulat-reductasa classe A	<i>dhfrA1</i>	DHFR Ia
	<i>dhfr5</i>	DHFR IV
	<i>dhfrA7</i>	DHFR VII
	<i>dhfrA12</i>	DHFR XII
	<i>dhfrA14</i>	DHFR Ib
Dihidrofulat-reductasa classe B	<i>dhfrB1-3</i>	DHFR IIa a DHFR IIc
<b>Estreptotricina:</b>		
Estreptotricina-acetiltransferasa	<i>sat</i>	SAT-2
<b>Antisèptics i desinfectants:</b>		
Exportador d'amoni quaternari	<i>qacE</i>	QacE
<b>Orf no identificats:</b>	<i>orfA, orfC, orfD,</i> <i>orfE, orfF</i>	

a, els cassets han estat anomenats posteriorment al gen que codificaven. La nomenclatura dels gens utilitzada en aquesta taula és la proposada per Recchia i col.<sup>108</sup>

b, els gens codificadors de les  $\beta$ -lactamases PSE-4 i CARB-3 difereixen entre elles en un nucleòtid respecte de la seqüència de *bla<sub>P1</sub>*.

c, el gen *aacA1* és part del gen casset que conté també un *orf*, l'*orfG*, seguit per *attC*.

Es desconeix encara l'origen dels integrons i dels gens casset. Tal com s'ha descrit anteriorment, els gens casset no tenen promotor i contenen la regió *attC*. Una possible explicació de l'absència del promotor podria ser el fet que els gens casset s'haguessin originat via transcripció inversa de l'mRNA<sup>109</sup>. D'altra banda, l'*attC* podria haver-se originat a partir de la transcripció de terminadors, que tenen les repeticions invertides<sup>108</sup>. Tot i que es desconeix com els gens de resistència s'han associat a l'*attC* i com aquests s'han reclutat dintre dels integrons, l'anàlisi del codó preferent indica una variabilitat d'origen àmplia dels gens casset<sup>117</sup>.



La potència dels integrons rau en la seva versatilitat, és a dir, en l'habilitat de reconèixer una alta varietat de seqüències de recombinació i en la seva aparent il·limitada capacitat d'intercanvi de gens casset. Aquesta flexibilitat permet una ràpida adaptació al flux impredecible dels nínxols ecològics. S'ha observat que els cassets examinats sembla que codifiquen funcions adaptatives més que no pas funcions indispensables<sup>117</sup>. Tot i que l'origen dels integrons i dels gens casset no està clar, hi ha evidències que mostren que els integrons continuen evolucionant. Molts integrons porten gens casset de resistència a antics antibiòtics, això no obstant, s'han descrit gens casset que codifiquen resistència enfront dels nous antibiòtics (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VEB-1</sub>, *oxa35*)<sup>5, 80, 149</sup>.

Rowe-Magnus i col.<sup>117</sup> postulen a partir de l'observació de la similitud del gen que codifica la integrasa dels integrons i dels bacteriòfags un possible origen ancestral dels integrons a partir d'un profag immobilitzat. Posteriorment, els integrons i els fags podrien haver divergit de manera que les seves funcions no se sobreposessin, excepte pel que fa a la maquinària de recombinació.