

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS



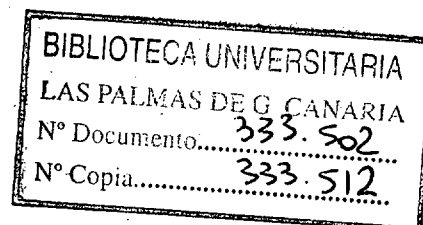
TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE RESISTENCIAS A CEFALOSPARINAS EN
ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS
COMO APORTACIÓN A LA PREVENCIÓN DE INFECCIONES
HOSPITALARIAS.**

MARÍA DEL MAR TAVIO PÉREZ

Las Palmas de Gran Canaria, 1990

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA SALUD



- TESIS DOCTORAL -

**ESTUDIO DE RESISTENCIAS A CEFALOSPORINAS
EN ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS
COMO APORTACION A LA PREVENCION DE
INFECCIONES HOSPITALARIAS.**



MARIA DEL MAR TAVIO PEREZ

1990

D. ZOILO GONZALEZ LAMA, PROFESOR TITULAR DE MEDICINA DEL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLINICAS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS
PALMAS DE GRAN CANARIA,

C E R T I F I C A :

Que DOÑA MARIA DEL MAR TAVIO PEREZ, Licenciada de Grado en
Medicina y Cirugía por la Universidad de La Laguna, ha realizado
bajo mi dirección el presente trabajo de investigación con vistas a
optar al Grado de Doctor en Medicina, por título:

ESTUDIO DE RESISTENCIAS A CEFALOSPORINAS
EN ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS
COMO APORTACION A LA PREVENCION DE
INFECCIONES HOSPITALARIAS.

Realizado el presente trabajo, queda conforme con su presentación
para que sea juzgado.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expide el presente
certificado en Las Palmas de G. C. a veintinueve de agosto de 1.990.



FDO.: DR. D. ZOILO GONZALEZ LAMA.

A Orlando,

por su apoyo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS:

Mi agradecimiento al Profesor Doctor D. Zoilo González Lama, por sus enseñanzas y constante dedicación en la dirección de esta Tesis.

A los Profesores Doctor D. Antonio Sierra López, y en especial al Doctor D. Roberto Alvarez Marante, del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de La Laguna, agradeciéndoles su atenta e inestimable colaboración.

A los Profesores Doctor D. Raúl Hugo López Orge, Doctora Dña. Otilia Evora Santana Rodríguez y D. Pablo Lupiola Gómez, por todos aquellos momentos que, interrumpiendo sus propios trabajos, me dedicaron.

Al Profesor Doctor D. Bonifacio Nicolás Díaz Chico, por su intervención en la eficaz solución de los últimos trámites académicos.

Al Profesor Doctor D. Jesús Pérez Peña y demás miembros del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por su ayuda material y técnica en la parte del trabajo allí realizada.

Y a todos mis compañeros en la Unidad de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud del Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por su valiosa cooperación.

INDICE.

		Pág.
	<u>INTRODUCCION</u>	1
<u>Parte 1a.</u>	<u>ANTECEDENTES</u>	
Capítulo I.	Revisión histórica.	3
Capítulo II.	Antibióticos beta-lactámicos.	6
	II A. Estructura y características químicas.	
	II B. Farmacocinética.	
	II C. Efectos adversos.	
Capítulo III.	Antagonismo y Sinergismo.	23
	III A. Conceptos.	
	III B. Indicaciones de las asociaciones de antibióticos.	
Capítulo IV.	Mecanismos de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos.	25
	IV A. Papel de la permeabilidad.	
	IV B. La modificación de las PBPs.	
	IV C. Soporte genético de la resistencia a los antibióticos.	
Capítulo V.	Beta-lactamasas.	43
	V A. Concepto.	
	V B. Origen y naturaleza.	
	V C. Mecanismo de acción.	
	V D. Localización.	
	V E. Aspectos cinéticos.	

Capítulo VI.	Inducción y Desrepresión.	54
	VI A. Inducción fenotípica.	
	VI B. Desrepresión.	
	VI C. Mecanismo genético.	
	VI D. Implicaciones clínicas.	
	VI E. Diferencias entre inducción y mutación.	
Capítulo VII.	Inhibidores de las Beta-lactamasas.	60
	VII A. Mecanismo de Acción.	
	VII B. Inhibidores reversibles.	
	VII C. Inhibidores irreversibles.	
	VII D. Naturaleza.	
Capítulo VIII.	Clasificación de las Beta-lactamasas.	65
	VIII A. Beta-lactamasas de amplio espectro.	
	VIII B. Beta-lactamasas inducibles.	
Capítulo IX.	Taxonomía.	69
	IX A. Divisiones dentro del Reino <i>Procaryotae</i> .	
	IX B. Enterobacterias.	
	IX C. Características de las Enterobacterias.	
	IX D. Género <i>Escherichia</i> .	
	IX E. Género <i>Citrobacter</i> .	
	IX F. Género <i>Morganella</i> .	

IX G. Cuadros clínicos producidos
por enterobacterias oportunistas.

PARTE 2a:

MATERIAL Y METODOS.

Capítulo I.	Identificación bacteriana.	92
	IA. Sistema API-20E.	
Capítulo II.	Medios de cultivo.	94
	II A. Medios de aislamiento.	
	II B. Medios de propagación.	
	II C. Medio para Antibiógramas.	
	II D. Medio para la detección de Beta-lactamasas.	
	II E. Medio para la conservación de cepas.	
	II F. Medio para la extracción del ADN plasmídico.	
Capítulo III.	Estudio de Susceptibilidad a los antimicrobianos.	102
	III A. Test de difusión en agar.	
	III B. Test de dilución en agar.	
	III C. Estudio del efecto de la asociación de antibióticos.	
	III D. Antibiógrama cruzado.	

Capítulo IV.	Detección de las Beta-lactamasas.	109
	IV A. Método Acidimétrico.	
	IV B. Método Iodimétrico.	
	IV C. Método Microbiológico.	
Capítulo V.	Valoración de la actividad de las Beta-lactamasas.	116
	V A. Método Acidimétrico-Espectrofotométrico.	
Capítulo VI.	Caracterización de las Beta-lactamasas por su p.I.	118
Capítulo VII.	Procedimientos de detección y aislamiento de plásmidos.	121
	VII A. Método de Kado y Liu.	
	VII B. Método de la Lisis Alcalina.	
	VII C. Electroforesis en gel de Agarosa.	
	VII D. Determinación del peso molecular de los plásmidos.	
Capítulo VIII.	Detección de plásmidos que determinan resistencia a antibióticos.	129
	VIII A. Cura de plásmidos.	
	VIII B. Transferencia conjugativa.	
	VIII C. Transformación.	

Capítulo IX.	Métodos de Inducción de Beta-lactamasas.	136
	IX A. Obtención de extractos enzimáticos inducidos y no inducidos.	
	IX B. Estudio del efecto inductor en la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos.	
Capítulo X.	Método de Selección de mutantes desreprimidos.	141
PARTE 3a:	<u>RESULTADOS Y DISCUSION.</u>	142
	ANEXO I.	263
PARTE 4a:	<u>CONCLUSIONES.</u>	336
PARTE 5a:	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	342

INTRODUCCION

INTRODUCCION.

Las nuevas resistencias descritas en los últimos años a las cefalosporinas de 3ª generación constituyen un handicap al uso de estos nuevos antibióticos. En gran parte debidas a su extensivo uso, sobre todo hospitalario.

Se describe frecuentemente que la parte más importante en el origen de estas resistencias en enterobacterias la tienen las beta-lactamasas, en unos casos las beta-lactamasas de amplio espectro de carácter transferible y en otros las beta-lactamasas no transferibles e inducibles o sintetizadas de forma constitutiva a altos niveles. Jugando un papel secundario en estos gérmenes los mutantes de permeabilidad y las Proteínas fijadoras de las penicilinas.

Por ello nos propusimos conocer cuál era el origen de estas resistencias en aislamientos de patógenos oportunistas a nivel hospitalario, en concreto en el Hospital Insular de Las Palmas. Y centramos nuestra atención en las posibles cepas aisladas de muestras clínicas de distintos servicios del Hospital, con multirresistencia a las cefalosporinas y penicilinas, con el propósito de adentrarnos en las causas y mecanismos de dichas resistencias en las bacterias seleccionadas para los géneros *Citrobacter* y para las especies *Escherichia coli* y *Morganella morganii*. Para que conociendo su origen y su causalidad prevenir la aparición de estas

cepas multirresistentes o en otro caso la extensión de estas resistencias.

ANTECEDENTES

CAPITULO I. REVISION HISTORICA 58,170

Fue a principios de los años treinta cuando Fleming hizo las primeras observaciones acerca del no crecimiento de colonias de *Staphylococcus aureus* en las zonas circundantes a las contaminadas por colonias de *Penicillium*. La culminación de los estudios acerca de estos hallazgos fue la consecución de la Penicilina. A partir de este punto innumerables estudios se llevaron a cabo para aislar este compuesto y determinar sus características químicas.

En los años cincuenta la síntesis del ácido 6-aminopenicilánico y su acilación para crear una variedad de penicilinas, junto con el desarrollo de una Microbiología eficiente y de métodos enzimáticos para producir este intermediario clave, condujeron a un importante desarrollo de las penicilinas semi-sintéticas.

Por su parte, las cefalosporinas llevaron una evolución paralela. Fue el conocimiento de las propiedades terapéuticas de la Penicilina, lo que decidió a Giuseppe Brotzu en 1945 a buscar organismos productores de antibióticos y así se aisló una cepa de *Cephalosporium acremonium* que producía una sustancia con actividad contra un número de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Estos estudios se continuaron en Oxford por

Abraham, dicho equipo consiguió aislar una sustancia que llamaron Cefalosporina C. Esta sustancia muy pronto despertó gran interés, pues además de gozar de algunas de las propiedades deseables de las penicilinas, contaba con una resistencia a las beta-lactamasas a las que ni la Penicilina G ni la Penicilina N fueron sensibles. Numerosas investigaciones fueron llevadas a cabo por diversas compañías farmacéuticas en la búsqueda de las cefalosporinas semi-sintéticas. Cientos de ellas han sido sintetizadas desde entonces pero sólo unas pocas han encontrado su lugar en la medicina.

A la par, con estas investigaciones y otras se han ido conociendo los mecanismos implicados en la resistencia bacteriana a los antibióticos beta-lactámicos.

CAPITULO II. ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS.

A. PENICILINAS ³⁷

- Estructura Química.

Las penicilinas resultan de la condensación de un anillo beta-lactama (anillo principal) y otro de tiazolina (anillo secundario), este compuesto fundamental es el ácido 6-aminopenicilánico Figura 1A.

Las penicilinas inhiben las enzimas d-alanilcarboxipeptidasas y peptidoglicano-transpeptidasas, impidiendo la formación de los enlaces cruzados en la síntesis de la pared celular bacteriana. Por tanto, actúan en la fase de crecimiento de las bacterias, ya que las bacterias en la fase de reposo no sintetizan la pared.

B. CEFALOSPORINAS ³⁸

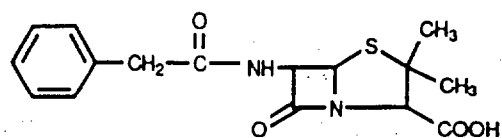
- Estructura química.

La molécula base es la Cefalosporina C, que en esencia se compone del ácido 7-aminocefalosporánico y dos cadenas laterales o radicales: un grupo acetilo y un residuo aminoadípico Figura 1A.

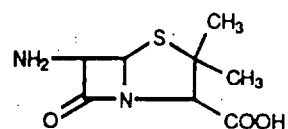
La farmacodinamia de las cefalosporinas es similar a la de las penicilinas: inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana de los microorganismos sensibles al impedir la biosíntesis

de mureína (peptidoglicano), por competición con las transpeptidasas y carboxipeptidasas encargadas de la formación de los puentes de pentaglicina responsables de la unión de acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico.

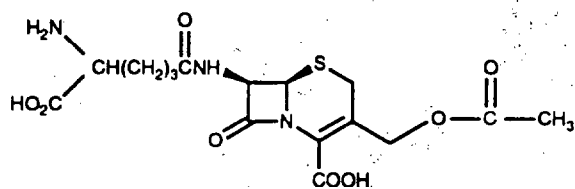
Las peptidasas que reconocen a las penicilinas y cefalosporánidos- quiénes las inhiben competitivamente -, son denominadas por "proteínas fijadoras de penicilinas" (PBPs) ^{55,58}.



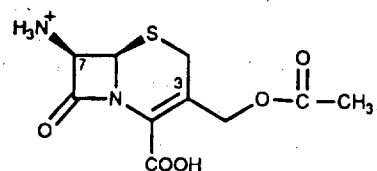
Penicilina G



Acido 6-amino-penilánico



Cefalosporina C



Acido 7-amino-cefalosporánico

FIGURA 1A.

- Antibióticos Beta-lactámicos resistentes a la acción de las beta-lactamasas⁴⁶.

Dos criterios son esenciales en la valoración de un antibiótico beta-lactámico:

Que conserve su afinidad para acilar las enzimas de membrana implicadas en la síntesis de la pared celular bacteriana; y que tenga una estructura química tal que evite su acilación con las beta-lactamasas (en tal caso no es sustrato de la beta-lactamasa) o evitar una vez acilado ser desacilado (aquí el recambio no es completo y la beta-lactamasa es inactivada).

Partiendo de estos dos criterios distinguimos:

A. Beta-lactámicos que evitan la acilación.

A.1 Beta-lactámicos Monocíclicos.

Dentro de este grupo se encuentran los monobactams, que a pesar de evitar la acilación presentan actividad química gracias a un radical en el nitrógeno del anillo beta-lactama.

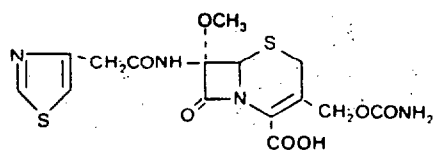
B. Beta-lactámicos que evitan tanto la acilación como la desacilación.

Poseen grupos funcionales que interfieren con el

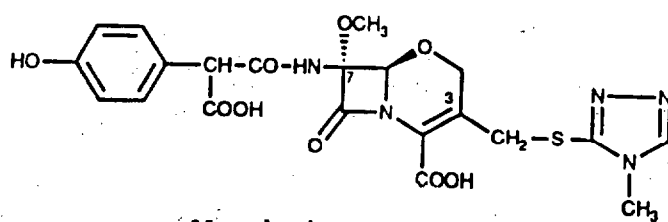
mecanismo catalítico de las beta-lactamasas. Con ello el tiempo que se requiere para el recambio de una sola molécula de beta-lactámico es largo, y la beta-lactamasa pierde su capacidad catalítica y por tanto, es incapaz de detoxificar a las células de las moléculas del antibiótico beta-lactámico en un tiempo suficiente para prevenir la inhibición y la inactivación de las peptidasas de membrana.

Dentro de este grupo están las Cefamicinas, y entre ellas destaca la Cefoxitina, que tiene un fuerte efecto inductor de las enzimas Clase C, estas beta-lactamasas tienen una mayor afinidad por el inductor (mayor acilación) y una mayor capacidad hidrolítica (mejor desacilación). Esta acilación específica junto con una permeabilidad disminuida constituyen el mecanismo de resistencia a las Cefamicinas de 3ª generación.

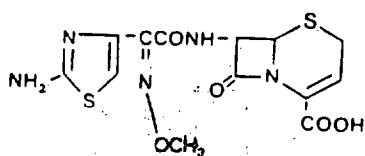
Una nueva Cefamicina, Moxalactam contiene un sustituyente 7 α -metoxi y una cadena lateral carboxilato que le proporciona resistencia tanto a las enzimas Clase A como a las de Clase C ^{46,58} Figura 2A.



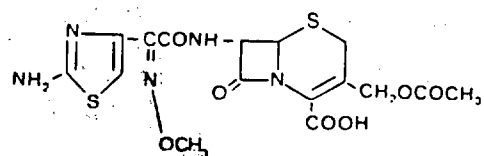
Cefoxitina



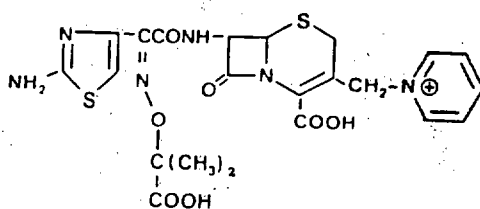
Moxalactam



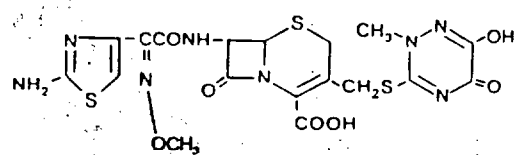
Cefizoxima



Cefotaxima



Ceftazidima



Ceftriaxona

FIGURA 2A.

B.2 Las Cefalosporinas 7 β -oxima ⁴⁶.

Incluye Ceftizoxima, Ceftazidima, Cefotaxima, Ceftriaxona y Cefuroxima, Figura 2A. Este grupo funcional les proporciona una gran afinidad por las peptidasas de membrana y una mayor resistencia a la beta-lactamasas. Además son menos inductores de las enzimas de Clase C.

Un monobactamo que resiste tanto la acilación como la desacilación es el Aztreonam.

C. Beta-lactámicos que resisten la desacilación ⁴⁶.

- Acido Clavulánico (A.C.), que por tanto actuará como inhibidor irreversible. Aunque en sí mismo es un antibiótico débil. Las enzimas Clase C no lo reconocen.

- Las Sulfonas de los penames.

Son homólogos al A. Clavulánico en su espectro y en su mecanismo de acción. De entre ellas, la de más interés es la Sulbactama. Aunque comparte características con el A. Clavulánico, no es idéntica: mientras que el A.C. es 100 veces más activo frente a las enzimas Clase A que la Sulbactama (SL.), ésta sin embargo es 100 veces más activa frente a enzimas Clase C que el A.C. Esto indica que la fragmentación del complejo acil-enzima formado por la Sulbactama es menos probable que para el A.C.

(menor potencia para las enzimas con determinados niveles de acilación) y sin embargo reconocen mejor la enzimas cromosómicas (más rápida acilación) que el A.C.

C. FARMACOCINETICA 101.

- Absorción.

Los antibióticos beta-lactámicos se administran vía parenteral aunque algunos derivados tienen buena absorción vía oral.

- Unión a las proteínas plasmáticas.

Existen diferencias notables en el grado de unión de los distintos antibióticos beta-lactámicos a las proteínas plasmáticas. Si tenemos en cuenta que los beta-lactámicos son sustancias hidrófilas, en general su grado de unión a las proteínas plasmáticas será bajo con lo que su difusión hística será alta.

- Distribución.

En general es buena. Excepto en el Sistema Nervioso Central (S.N.C.) en condiciones normales, sin embargo la inflamación meníngea hace posible el uso de las penicilinas en el tratamiento de infecciones a este nivel. Es importante señalar la utilidad de las cefalosporinas de 3ª generación, especialmente la Cefotaxima, Moxalactam y Ceftazidima, en las meningitis por Gram-negativos, puesto que alcanzan un nivel suficiente en el Líquido Cefalorraquídeo (LCR).

Todos los antibióticos beta-lactámicos atraviesan la barrera placentaria llegando a la circulación fetal. A pesar de ello y en base a su escasa toxicidad son de elección para el tratamiento de infecciones durante el embarazo.

- Vida media.

El tiempo que tarda en reducirse a la mitad la concentración plasmática alcanzada por estos antibióticos es otro parámetro de gran importancia, puesto que condicionará el intervalo de administración. En este caso el grado de unión a las proteínas plasmáticas juega un papel importante ya que esta unión retrasa los procesos de eliminación, fundamentalmente la filtración glomerular. La vida media se ve modificada en circunstancias fisiopatológicas en que se acompañen de variaciones en los mecanismos de eliminación y biotransformación. La mayoría de los antibióticos beta-lactámicos se eliminan por orina y por ello la presencia de Insuficiencia Renal conducirá a un aumento de la vida media. Aunque algunas cefalosporinas tienen su vía de eliminación más importante en la bilis, tal es el caso de la Ceftriaxona, Cefotetan y sobre todo Cefoperazona, ello supone que serán efectivas para el tratamiento de las infecciones localizadas a nivel de vías biliares, pero también el que puedan dar lugar a efectos adversos por modificación de la flora intestinal y alteraciones en la coagulación por hipoprotrombinemia secundaria al déficit de vitamina K, por la reducción de dicha flora intestinal.

Es de destacar que una dipeptidasa renal localizada en las células del túbulo proximal renal hidroliza al Imipenem, haciendo que éste se encuentre en forma de metabolito inactivo en la orina. La administración simultánea de Cilastatin, un inhibidor de la dipeptidasa, aumenta la recuperación urinaria del Imipenem hasta un 70% ⁵⁸.

D. EFECTOS ADVERSOS 101

- Penicilinas.

Sus efectos adversos más importantes son las reacciones de hipersensibilidad de gravedad variable. Su incidencia es del 1-5%, las reacciones anafilácticas sólo aparecen en un 0'2% de los pacientes, siendo mortales en 0'001% de los casos.

Además, hay otros posibles pero poco frecuentes, como:

Gastrointestinales, sobre todo diarreas por sobreinfección por bacterias resistentes, más frecuentes con preparados de amplio espectro o de eliminación biliar.

Aumento de las transaminasas.

Alteraciones hematológicas.

Hipopotasemia, sobre todo en compuestos con alto contenido en sodio. Nefritis intersticial. Encefalopatía.

- Cefalosporinas.

Reacciones de hipersensibilidad que pueden ser cruzadas con las penicilinas. Se han descrito 5-10% en pacientes alérgicos a las penicilinas.

Nefrotoxicidad, descrita para la Cefaloridina, y menos frecuente y a dosis más altas para la Cefalotina. Las restantes cefalosporinas carecen de nefrotoxicidad, aunque hay que tener en cuenta la potenciación de este efecto adverso cuando se asocian a un aminoglucósido.

Y otros tales como:

Intolerancia al alcohol, dolor muscular y tromboflebitis en la administración parenteral, fenómenos hemorrágicos especialmente si se administran en pacientes debilitados y desnutridos, sobreinfecciones, aumento de las transaminasas, test de Coombs positivo, eosinofilia.

En las Tablas IA y IIA se muestran Clasificaciones de los antibióticos beta-lactámicos según diferentes criterios.

TABLA IA. CLASIFICACION DE ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS.

- Familia de los Beta-lactámicos 14,30,101.

1. Penicilinas, nuevos Penemes, Clavames y Carbapenemes.

Penicilinas naturales

Penicilina G y
derivados

Acido-resistentes

Penicilina V
Feneticilina
Propicilina

Penicilinas antiestafilocócicas

Meticilina
Nafcilina

Isoxazolilpenicilinas:

Oxacilina
Cloxacilina
Dicloxacilina
Flucloxacilina

Aminopenicilinas

Ampicilina.
Epicilina.
Amoxicilina.

Amidinopenicilinas

Mecillinam
Pívmecillina

Carboxipenicilinas

(Con amplio espectro
anti-pseudomonas)

Carbenicilina

Carfecilina

Carindacilina

Ticarcilina

Acilureidopenicilinas

Mezlocilina

Azlocilina

Piperacilina

Acilpenicilinas

Apalcilina

Inhibidores de beta-lactamasas

A. Clavulánico

(Clavame)

Sulbactama

(Peneme)

Carbapenemes

Imipenem

Monobactams

Aztreonam

Carumonam

Nocardicinas

2. Cefalosporinas, nuevos Cefemes, Cefamicinas y Oxacefemes.

Cefalosporinas de 1ª generación

Cefalotina
Cefaloridina
Cefazolina
Cefapirina
Cefalexina
Cefradina
Cefacetrilo
Cefaloglicina

Cefalosporinas de 2ª generación

-Cefamicinas:

Cefoxitina
Cefmetazol

Cefuroxima
Cefamandol
Cefacetrina
Cefadroxilo
Cefonicid
Cefaclor
Cefotiam

Cefalosporinas de 3ª generación :

- Aminotiazol-cefalosporinas

Ceftazidima

Cefotaxima

Cefmenoxima

Cefodicima

Cefpiroma

Ceftriaxona

Ceftizoxima

- Alfa-piperacín-dión cefalosporina

Cefoperazona

- Alfa-sulfo-fenil cefalosporina

Cefsulodina

- Oxacefamicinas

Moxalactam

TABLA IIA. CLASIFICACION BIOLOGICA DE LAS CEFALOSPORINAS.

(O'Callaghan, 1979) 14,126

USO CLINICO HUMANO

VETERINARIO

OTROS

(GRUPO 6)

Nitrocefina

Cefoxazol

Padac

Cefalonium

Centa

USO CLINICO HUMANO

Parenteral

Oral

Sensible

Resistente

Sensible

Resist.

Beta-lactamasas

Beta-lactam.

Beta-lac.

Beta-lac

(GRUPO 5)

(GRUPO 3)

(GRU.4)

Cefuroxima

Cefalexin

F17027

Cefamandol

Cefaclor

Cefonicid

Cefradina

Cefotaxima

Cefadroxilo

Metabólicamente

Cefmenoxima

Estables

Inestables

Ceftizoxima

(GRUPO 1)

(GRUPO 2)

Ceftriaxona

Cefalotina

Cefaloridina

Cefodicima

Cefapirina

Cefazolina

Cefsulodina

Cefacetrilo

Cefotiam

Cefoperazona

Ceftazidima

Cefoxitina

Cefotetán

Cefmetazol

Moxalactam

CAPITULO III. ANTAGONISMO Y SINERGISMO.

A. CONCEPTO ³⁹

La interacción de dos antibióticos actuando frente a una misma bacteria y que puede objetivarse tanto "in vivo" como "in vitro", puede ser:

- Sinérgica.
- Antagónica.
- Indiferente.
- Aditiva.

Sinergismo o sinergia, para Garrods y cols. (1981) ocurre cuando la actividad de los dos antibióticos, actuando juntos, excede significativamente la de cualquiera de los dos actuando solos a la misma concentración.

Antagonismo, ocurre cuando el efecto de un antibiótico se reduce en presencia del otro.

Indiferencia, cuando el efecto combinado de los dos antibióticos es "igual" a la del componente más activo actuando por separado, según Jawetz (1952). Según Garrods y cols. (1981) cuando la presencia de un antibiótico no modifica la actividad del otro.

Adición, cuando se observa un pequeño incremento de la actividad de una asociación en comparación con la de los dos antibióticos por separado.

B. INDICACIONES DE LAS ASOCIACIONES DE ANTIBIOTICOS.

El uso de las asociaciones se indica:

-Para impedir o retrasar la aparición de resistencias bacterianas.

-Para tratar infecciones bacterianas mixtas cuyos agentes causales no son sensibles a un único antibiótico.

-Para tratar enfermos con infecciones simultáneas de diversos aparatos, órganos y sistemas, originadas por agentes de distinta sensibilidad a los antibióticos.

-Para conseguir una respuesta clínica más rápida en infecciones monomicrobianas.

-Para tratar infecciones graves de etiología desconocida en espera del informe bacteriológico.

-Para reducir la toxicidad potencial de un antibiótico (la asociación de dos sulfamidas es menos tóxica que la administración de la dosis doble de una) ^{39,55}.

CAPITULO IV. MECANISMOS DE RESISTENCIA A **LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS.**

El espectro de acción de cada antibiótico beta-lactámico va a estar limitado por tres factores (Tabla IIIA):

- La permeabilidad: Las PBPs están situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática, por lo que los antibióticos deberán atravesar las envolturas más externas de la bacteria. Este aspecto es más importante en las bacterias Gram-negativas ya que, la presencia de una membrana externa por fuera del glucopéptido dificulta la penetración de diversos solutos. En ellas, los antibióticos beta-lactámicos, dada su naturaleza hidrófila no pueden atravesar esta barrera a través de la bicapa lipídica por difusión, y penetran fundamentalmente a través de canales constituidos por porinas. En Gram-negativos, la modificación de la permeabilidad es por mutaciones que afectan a los canales proteicos OmpF y OmpC. En las bacterias Gram-positivas esta penetración es fácil gracias a que sólo poseen la envoltura externa glucopéptida

48,88,165.

- Afinidad de las PBPs: Una disminución de la afinidad de las PBPs por el antibiótico, debido a mutación, determinará el requerimiento de mayor concentración de antibiótico para saturar las localizaciones de las PBPs a las que sí es afín.

- Inactivación por las beta-lactamasas: Para que un antibiótico beta-lactámico sea eficaz sobre las bacterias de una determinada especie es necesario que pueda acceder a las PBPs sin ser antes inactivado por las beta-lactamasas ^{14,165}.

En las Tablas IIIA y IVA se muestra la importancia de estos mecanismos según la especie y género bacteriano.

**TABLA IIIA. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS
ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS 143**

Mecanismo	Especies bacterianas	
	Gram-positivos	Gram-negativos
Beta-lactamasas	<i>S. aureus</i>	<i>Neisseria</i> , <i>Branhamella</i> , <i>Haemophilus</i> , enterobacterias, ..
Impermeabilidad (porinas)		<i>P. aeruginosa</i> , enterobacterias.
Modificación de las PBPs.	<i>S. aureus</i> M-R, <i>S. faecium</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>S. pneumoniae</i> .	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> .

PBPs= Proteínas fijadoras de las penicilinas.

**TABLA IVA. INCIDENCIA DE LOS MECANISMOS DE
RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS 143**

Mecanismo	Gram-positivos	Gram-negativos
Enzimático (beta-lactamasas).	+	+++
Disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana.	-	++
Alteración de las PBPs.	+++	+

PBPs= Proteínas fijadoras de las penicilinas.

A. PAPEL DE LA PERMEABILIDAD EN LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS.

Todas las bacterias excepto los Mycoplasmas, tienen una pared celular con un componente común, la mureína o el peptidoglicano, que contribuye a la rigidez mecánica, y además las bacterias Gram-negativas tienen otra capa adicional, la membrana externa, localizada por fuera de la capa de peptidoglicano. Esta es muy importante en la fisiología de la bacteria ya que constituye una barrera defensiva ante agentes como lisozima, beta-lisinas, proteínas de leucocitos y además en enterobacterias les protege de la acción de las sales biliares y de la degradación por enzimas digestivas, actuando como una fuerte barrera de permeabilidad frente a muchos antibióticos. También puede enlentecer la entrada de las moléculas de antibióticos, de manera que las enzimas bacterianas tengan suficiente tiempo para destruir las pequeñas cantidades que penetren ¹²².

Además esta membrana tiene una gran hidrofobicidad, que es importante para evitar a la bacteria ser fagocitada.

La membrana externa se compone de:

- Lipopolisacáridos o LPS, unidos entre sí por iones Mg^{++} , que aseguran su estabilidad. Los LPS o endotoxinas son los responsables del "shock" por bacilos Gram-negativos cuando éstos se lisan en la sangre.

- Las proteínas, que en su mayoría sólo las encontramos en esta membrana y no en otras membranas naturales. Sólo contiene unas pocas especies de proteínas.

Las principales o "proteínas mayores" incluyen las porinas o "canales proteicos no específicos" (OmpF, OmpC y otras), que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrófilas; la proteína OmpA, cuya pérdida por mutación produce inestabilidad en la estructura de la membrana externa y defectos en la función de conjugación, y la lipoproteína mureína, de función principalmente estructural, que actúa estabilizando la arquitectura del complejo membrana externa-peptidoglicano 48,103,121,122.

Se han estudiado más extensamente en *E. coli* K12, en *Pseudomonas* y *Salmonella typhimurium*. En el estudio de las resistencias se han descrito mutantes de las porinas de la membrana externa en *E. coli* K12, en *S. typhimurium*, en *Serratia marcescens* y otros Gram-negativos (parece bastante frecuente la mutación de las porinas en *Serratia marcescens*); también se han descrito mutantes de *E. coli* con niveles disminuidos de OmpC y OmpA en pacientes tratados con Ceftazidima. Se han descrito mutantes deficientes en las porinas OmpF y OmpC resistentes a Carbenicilina, y otros resistentes a Cefaloridina y Cefazolina, generalmente aislados de cepas de laboratorio. En todos los casos de las moléculas de antibiótico que tenían buena penetración en cepas no mutantes se necesitaron disminuciones 100

veces o más en los coeficientes de permeabilidad para producir un incremento significativo en la CMI ¹²¹. Numerosos trabajos relacionan la permeabilidad disminuida con la hiperproducción de beta-lactamasas como causantes de los altos niveles de resistencia en enterobacterias mutantes desreprimidas ²⁵. En *Pseudomonas aeruginosa* resistentes al Imipenem, diversos trabajos muestran que la disminución de la permeabilidad por la alteración en las porinas como parte en la causa de dicha resistencia, aunque también en otros se demuestra el papel de la disminución de la afinidad de ciertas PBPs ¹⁸⁸.

Por sus características moleculares unos beta-lactámicos penetran mejor que otros, así, el Imipenem y el Moxalactam, por su hidrofilia penetran muy bien. Las cefalosporinas de 1ª generación penetran bien a través de la membrana externa pero son débiles frente a la acción de las beta-lactamasas. Las cefalosporinas de 3ª generación presentan radicales que les confieren nuevas propiedades antibacterianas, pero que aumentan el volumen de la molécula y atraviesan lentamente la membrana externa; éste es el caso de la Ceftazidima, cuyo flujo a través de la membrana es inferior que el de las cefalosporinas de 1ª generación

14.

B. LA MODIFICACION DE LAS PBPs COMO MECANISMO DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS ⁹²

Como explicabamos en el anterior apartado, las funciones enzimáticas de las PBPs de más alto peso molecular son esenciales en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular. Y los beta-lactámicos ejercen su efecto bactericida mediante la inhibición de estas PBPs actuando como análogos de la acil-D-alanil-D-alanina componente del peptidoglicano.

Por tanto, la resistencia a beta-lactámicos puede ser adquirida por alteraciones en estas proteínas diana. Vamos a describir las alteraciones de las PBPs implicadas en la resistencia intrínseca de organismos Gram-positivos y Gram-negativos y su relevancia clínica:

-En organismos Gram-positivos.

Se han descrito mutantes de *Bacillus subtilis* resistentes a algunas penicilinas (Cloxacilina) y disminución de la afinidad de la PBP-2. Sin embargo, en un mutante de *Bacillus megaterium* resistente a Cloxacilina hubo disminución de la afinidad de la PBP-1, compensada parcialmente por el incremento de afinidad de la PBP-3.

Mutantes de *Clostridium perfringens* resistentes a Penicilina y disminución de la afinidad de la PBP-1.

Transformantes obtenidos a partir de cepas de *Streptococcus pneumoniae* de Sudáfrica resistentes a Penicilina,

mostraron una disminución de la afinidad por este antibiótico, de las PBP-2a y de las PBPs-1a y 1b. Perdieron las PBP-2b y mostraron una nueva PBP-2a de mayor peso molecular (PBP-2a'). Parece por éste y otros estudios que la adquisición de resistencia a penicilinas en pneumococos está asociada a cambios en la afinidad por este antibiótico de las PBPs, así como al cambio en sus patrones.

Cepas resistentes a Penicilina de la especie *Streptococcus faecium* (aislamientos clínicos y mutantes) muestran PBP-5 de baja afinidad, responsables de los altos niveles de resistencia a Penicilina en esta especie. Además se han visto diferencias en los patrones de las PBPs entre las cepas resistentes y las sensibles a Penicilina de la especie de *Streptococcus mitis*. La baja afinidad de las PBPs parece ser un factor importante en la resistencia de los *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes. Entre otros hechos, se sabe que la expresión del fenotipo de resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* se incrementa cuando se incuban a 30°C o en medios que tienen alta osmolaridad o bajo pH. Brown y Reynolds demostraron que este fenotipo se correlaciona con la presencia de una producción aumentada de PBPs de baja afinidad similares electroforéticamente a la PBP-3, y con la presencia de una nueva, la PBP-2', que parece ser de codificación plasmídica y por tanto producida de una manera constitutiva.

- En organismos Gram-negativos.

Las investigaciones en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* han mostrado que cinco o seis loci cromosómicos regulan la resistencia intrínseca a los antibióticos beta-lactámicos. En el examen de sus PBPs Dougherty y col. demostraron una disminución de las PBP-1 y PBP-2, reguladas probablemente por estos loci. Pero además, parece probable que en estas cepas *Neisseria gonorrhoeae* y en otras bacterias Gram-negativas las mutaciones que afecten a una o más PBPs puedan combinarse con mutaciones que afecten a la penetración del antibiótico a través de la membrana externa. A este respecto, un estudio realizado con aislamientos clínicos de *Ps. aeruginosa* mostró el efecto combinado de la impermeabilidad de la membrana externa y la disminución de afinidad de las PBPs, como agentes responsables de la resistencia de esta cepa a beta-lactámicos. En concreto en un serotipo se observó una disminución de la afinidad de la PBP-3, y asimismo en el otro fenotipo se mostró la incrementada presencia de la PBP. También se ha visto que la alteración en la PBP-2 es causa de resistencia al Imipenem en *Pseudomonas aeruginosa*.

Se ha relacionado la aparición de cepas de *Haemophilus* resistentes a la Ampicilina, beta-lactamasas negativas, con la alteración de las PBPs 3 y 6, 3 y 4, o 4 respectivamente en tres cepas, sumándose en estas cepas la impermeabilidad de la membrana externa por mutación de las proteínas de ésta.

Se han obtenido más recientemente cepas mutantes de *E. coli* resistentes a algunas cefalosporinas mediante la modificación de cuatro aminoácidos (aa_s) diferentes en la secuencia de la PBP-3.

Hasta el momento parece bastante probado que en organismos Gram-negativos la modificación de las PBPs puede contribuir a la resistencia a los beta-lactámicos. Pero también que la disminución de la permeabilidad de la membrana externa puede producir resistencia moderada a antibióticos beta-lactámicos. Cambios en la afinidad de las PBPs a los nuevos beta-lactámicos resistentes a la hidrólisis contribuyen junto con la impermeabilidad de membrana a aumentar la resistencia a ellos por medio de enlentecer su acción 8,14,92,151,188.

En un estudio muy reciente de Oliva, Bennet y Chopra parece probarse que además las PBPs podrían participar en los procesos de inducción. El estudio realizado en una cepa de *E. coli* clonada con el gen ampC de *Citrobacter freundii* inducible con ácido 6-aminopenicilánico, se demostró que la presencia de la PBP-2 jugaba un papel importante en la inducción por el mencionado compuesto del gen ampC 129.

C. SOPORTE GENETICO DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS.

Genéticamente la resistencia bacteriana a los antibióticos puede resultar de la alteración de la información genética endógena (mutación) o de la adquisición de información genética exógena (plásmidos o transposones).

- La mutación. Esta puede suponer una disminución de la permeabilidad frente a ciertos antibióticos. También una disminución de la afinidad por ellos de las diana, como ya hemos visto. Así como la aparición de mutantes productores de cefalosporinas a alto nivel ^{6,84}

- Plásmidos o Transposones.

La adquisición de uno de ellos supone la síntesis de nuevas proteínas. Ello supondrá la aparición de resistencia a ciertos antibióticos a través de: variación de las diana del antibiótico, la alteración en el transporte del antibiótico, o su inactivación ⁶.

Los plásmidos.

Son moléculas de ADN bicatenario circular, extracromosómicos, dotados generalmente de replicación autónoma y que son transmisibles de forma estable en el curso de las generaciones. Su principal característica es su capacidad de replicación autónoma. Un mecanismo de estricto control regula en ellos la replicación, el número de copias fijo por cada copia del cromosoma y el reparto equitativo de las copias plasmídicas en las células hijas en la división celular. La incompatibilidad es una consecuencia de este mecanismo de control y ocurre cuando no es posible la coexistencia simultánea estable de dos plásmidos en ausencia de selección externa, o dicho de otra forma, cuando la introducción de un segundo plásmido desestabiliza la herencia del primero ^{6,125}.

En general, los plásmidos de los organismos procariotas no son indispensables para la vida de la bacteria. Sin embargo, contienen una gran variedad de caracteres. Son de importancia en la patología infecciosa los plásmidos R o factores R. Estos son plásmidos que confieren resistencia a antibióticos de familias diferentes. Aunque es frecuente el caso de plásmidos diferentes que coexisten en la misma bacteria, la conjunción de estos dos fenómenos añadida a la resistencia intrínseca determina cepas resistentes a numerosos antibióticos.

Distinguimos en Gram-negativos entre plásmidos conjugativos y no conjugativos.

Plásmidos conjugativos son aquéllos que son autotransferibles de una célula a otra, ésto es posible porque cada plásmido codifica todas aquellas funciones que le son necesarias para ser transferido. La transferencia puede ser intra o entre especies e intra o intergéneros. Los plásmidos conjugativos tienen un peso molecular superior a 30 kb.

Los Plásmidos no conjugativos tienen pesos moleculares comprendidos entre 1 y 70 kb, pero generalmente de 7-10 kb, y rara vez codifican la resistencia a más de dos familias de antibióticos. Numerosos plásmidos de este tipo son crípticos: no codifican ninguna función apreciable y no son detectables por técnicas físicas. El control de la replicación de estos plásmidos es escaso, de manera que hay un elevado número de copias por copia del cromosoma (>2:1). Estos plásmidos no admiten otro tipo de transferencia mas que mediante la movilización por otro plásmido presente en la misma bacteria, ya que no codifican las funciones necesarias para esa autotransferibilidad.

La Transferencia de plásmidos puede realizarse por conjugación o por movilización. La conjugación se ha descrito en bacilos Gram-negativos, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium perfringens* y *Bacteroides fragilis*. La transferencia por conjugación exige una replicación del ADN a transferir. Este mecanismo permite que la bacteria donadora conserve su copia genética de la información transferida. Los plásmidos no conjugativos pueden ser transferidos con duplicación

igualmente del ADN según el mecanismo de movilización, bien por donación (transferencia sin asociación entre el plásmido conjugativo complementario y el plásmido vector) o bien por conducción (con cointegración de dos estructuras por recombinación homóloga o por transposición). Respecto a este último caso, los transposones permiten la transferencia por la formación de una estructura cointegrada, del plásmido no conjugativo y no movilizable, de una bacteria donadora a una receptora.

Pero conjugativos o no, los plásmidos pueden ser transmitidos también por transformación (incorporación directa a la bacteria receptora del ADN) o por transducción (a través de un bacteriófago) ⁶.

Los transposones 6.

Los plásmidos R autotransferibles están constituidos estructural y funcionalmente por un factor de transferencia provisto de la información para su control (y por tanto, de los mecanismos de regulación de la división y de la incompatibilidad) para el mantenimiento, la movilización y la transferencia. Esta es una estructura relativamente estable. Los genes de resistencia al contrario, son con frecuencia codificados por secuencias de ADN de pequeño tamaño, capaces de pasar de un replicón a otro, y se conocen como transposones.

Estos determinantes de resistencia son capaces de "saltar" de un plásmido a otro, del cromosoma a un plásmido, y de un plásmido al cromosoma. Este fenómeno participa en la diseminación de la resistencia a antibióticos, y determina verdaderas epidemias de estos genes. Los transposones, cuyo tamaño varía de 2,5 a 20 kb, contienen además la codificación de las enzimas implicadas en los mecanismos de transposición (transposasa, resolvasa) y su regulación (represora), así como otras características (producción de toxinas,...).

Conjugación.

La conjugación es un proceso altamente específico donde el ADN es transferido desde una bacteria donadora a una receptora por un mecanismo que exige un contacto físico entre ambas y la presencia de pilis. Este proceso está usualmente codificado por plásmidos conjugativos, que pueden aislarse en gran número de bacterias Gram-negativas y que incluyen miembros de más de 20 grupos de incompatibilidad. Todos los plásmidos que pertenecen a distintos grupos de incompatibilidad muestran escasa homología de su ADN. La habilidad conjugativa requiere además una extensa región del ADN plasmídico (1/3 del genoma) ¹⁸⁷.

Ello puede ocurrir tanto en medio líquido como en medio sólido, aunque el medio sólido al asegurar un íntimo contacto entre gran número de bacterias, es particularmente útil en casos donde la transferencia puede fallar ⁶.

Transformación ⁶.

Es una técnica muy útil para transferir los plásmidos no conjugativos y no movilizables. Esta técnica es complementaria de la conjugación en la medida en que es mucho menos eficaz para la transferencia de grandes plásmidos, que por otra parte suelen ser conjugativos.

La mayoría de las especies bacterianas no son de forma natural transformables; para que lo sean es necesario someterlas a un proceso para hacerlas "competentes". Sin embargo,

algunas pocas bacterias lo son de forma natural, en este caso la diferencia esencial entre uno y otro tipo de transformación es que mientras en la natural se transfiere sólo una cadena simple del ADN, en la transformación, caso de la transformación "artificial", se transfiere el ADN con su doble cadena intacta.

CAPITULO V. BETA-LACTAMASAS.

A. CONCEPTO 132,165

Las beta-lactamasas son enzimas bacterianas que actúan hidrolizando el enlace amida del anillo beta-lactámico y a consecuencia de ello el antibiótico pierde su actividad.

Los antibióticos beta-lactámicos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactams comparten en su estructura una lactama de cuatro miembros, el anillo beta-lactámico. Este tipo de antibióticos actúa interfiriendo la síntesis de la pared celular bacteriana, saturando e inactivando las proteínas fijadoras de Penicilina (PBPs: Penicillin Binding Proteins) de la membrana citoplasmática.

Recordemos que la membrana citoplasmática de las bacterias gram-positivas y gram-negativas está constituida por una doble capa de fosfolípidos, cuya permeabilidad está limitada para las moléculas polares e influida por las variaciones en la longitud y grado de saturación de los ácidos grasos que la componen. En medio de estos fosfolípidos existen proteínas que facilitan la difusión y también el transporte activo a través de la membrana.

Las proteínas fijadoras de Penicilina o PBPs, proteínas diana de la acción de los beta-lactámicos, constituyen las transpeptidasas y carboxipeptidasas implicadas en la síntesis del

peptidoglicano. Estas proteínas se encuentran en la membrana citoplasmática, de manera que cuando el antibiótico beta-lactámico se une a ellas se detiene la síntesis del peptidoglicano y, por lo tanto, se detiene el crecimiento bacteriano. Esta fijación se debe a la analogía entre el dipéptido de alanina y la molécula del antibiótico beta-lactámico.

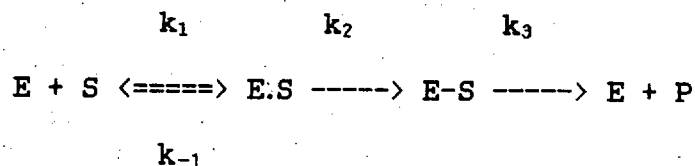
B. ORIGEN Y NATURALEZA.

Las beta-lactamasas son enzimas ampliamente distribuidas entre diversos géneros y especies bacterianas, pero sólo en bacterias.

Desde un punto de vista bioquímico se caracterizan por ser polipéptidos de una sola cadena con algo más de un centenar de aa_s. y de pequeño peso molecular. Respecto a su actividad son peptidasas especializadas ¹³².

C. MECANISMO DE ACCION ²³

Estas son enzimas altamente eficientes que catalizan la hidrólisis de antibióticos beta-lactámicos, actuando sobre penicilinas, cefalosporinas y monobactams. Sin embargo, todas ellas comparten muchas características en cuanto a su modo de acción. Su ecuación química general sería:



En esta ecuación, inicialmente enzima (E) y sustrato (S) se combinan de forma reversible para dar un complejo enzima sustrato (E.S). El siguiente paso, común para las beta-lactamasas es la formación por enlace covalente de un complejo intermediario con acilación (E-S). Finalmente, la desacilación de este complejo conduce a la liberación del enzima y de un producto que es el antibiótico con su anillo beta-lactámico abierto.

Originalmente ¹⁴³, las beta-lactamasas fueron el primer mecanismo de resistencia natural frente a los beta-lactámicos siendo el caso de las cefalosporinasas en bacterias Gram-negativas y de la resistencia adquirida con penicilinasas en *S. aureus*. El uso de antibióticos de amplio espectro como las cefalosporinas (Cefalotina, por ejemplo) y Ampicilina, condujo a la aparición de penicilinasas mediadas por plásmidos en Gram-negativas, tales como las TEM-1.

Con la llegada de los antibióticos beta-lactámicos no-hidrolizables por las beta-lactamasas y que actuaban como débiles inductores, han aparecido un nuevo tipo de resistencias, a partir de las especies bacterianas que presentaban beta-lactamasas inducibles se produjo una selección de variantes que producen altos niveles de estas enzimas, de una forma constitutiva y que constituyen los mutantes desreprimidos. De manera que los patrones de susceptibilidad se modificaron con aparición de resistencias a los nuevos beta-lactámicos incluyendo las cefalosporinas de tercera generación y monobactams.

Actualmente, aparece una nueva modalidad de resistencia a los beta-lactámicos no hidrolizables, tales como las cefalosporinas de tercera generación que son mediadas por beta-lactamasas de amplio espectro identificadas sobre todo en especies de *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella spp.* y *E. coli*. Una característica de este enzima (SHV-2) es la adquisición de un amplio espectro frente a los nuevos beta-lactámicos. Algunas especies

bacterianas pueden mostrar una gran capacidad genética para adaptarse a los más nuevos antibióticos, probablemente usados de forma abusiva, por procedimientos de selección a lo que además se suma una extensión de estas resistencias por una deficiente higiene.

Además en los fenotipos resistentes pueden intervenir otros mecanismos.

D. LOCALIZACION DE LAS BETA-LACTAMASAS 123

Las beta-lactamasas de bacterias Gram-positivas se localizan tanto intra como extracelularmente, dependiendo del tipo de microorganismo, así por ejemplo en *B. cereus* al menos el 85-90% del total de la actividad de las beta-lactamasas se encuentran extracelularmente. Esta localización supone una fuerte resistencia frente a los antibióticos beta-lactámicos, ya que pueden ser interceptados antes de alcanzar la célula. Así que las beta-lactamasas más efectivas serán aquellas que posean una alta afinidad por sus sustratos potenciales (por tanto, un valor de K_m bajo). Sin embargo, esta localización condiciona una dilución del enzima en el medio extracelular y consiguientemente una posible menor concentración del enzima. Quizás por ello, las bacterias Gram-positivas presentan una segunda línea de defensa, la presencia de beta-lactamasas intracelulares, que aunque se encuentran en pequeñas cantidades usualmente, tienen una posición estratégica, junto a las proteínas diana de los beta-lactámicos.

En las bacterias Gram-negativas las beta-lactamasas se encuentran, casi exclusivamente en el espacio periplásmico. En ocasiones, su presencia en este espacio es muy densa, de manera que constituyen una barrera física aún para los compuestos que no son fácilmente destruidos por las beta-lactamasas de la bacteria. Esta localización estratégica

del enzima hace que para la destrucción del antibiótico, antes de que éste pueda actuar, no se necesite una alta afinidad por el sustrato.

E. ASPECTOS CINETICOS DE LA ACCION DE LAS BETA-LACTAMASAS.

***Perfil de sustrato.**

El perfil de sustrato junto con el grado de hidrólisis de las beta-lactamasas sobre los antibióticos constituyen las características más definitivas de estas enzimas. Los parámetros más exactos para valorar estas enzimas son los valores de la V max. (valores de hidrólisis máxima) y Km (afinidad por la unión con el enzima). Sin embargo, a efectos prácticos se utiliza el cálculo de las tasas de hidrólisis y de la actividad específica ^{22,23}.

***Eficacia hidrolítica ²³.**

Se evalúa comparando la hidrólisis de cada sustrato frente a la hidrólisis de la Benzilpenicilina o de la Cefaloridina que se utilizan como compuestos de referencia. Los resultados son comparables con los valores de CMI para cada sustrato (antibiótico) y determinar si la inestabilidad frente a las beta-lactamasas es responsable o no de su ineficacia frente a la bacteria.

***Inhibición de las beta-lactamasas.**

Las características del comportamiento frente a los inhibidores son importantes junto con los perfiles de sustrato para distinguir entre las diferentes beta-lactamasas. Las diferencias entre las enzimas con respecto a la inhibición por Acido Clavulánico (A.C.) y Aztreonam (ATM) se ha visto que son muy significativas:

las cefalosporinas son más fuertemente inhibidas por el Aztreonam que por el Acido Clavulánico (que no las inhibe). También la Cloxacilina (CX) ha sido reconocida como un buen inhibidor de las cefalosporinas.

Como hemos mencionado algunos antibióticos beta-lactámicos actúan como potentes inhibidores o inactivadores de una variedad de beta-lactamasas.

Hay inhibidores, como el Acido Clavulánico, que por sí mismos presentan escasa actividad antibacteriana. Su función primaria es proteger las cefalosporinas y penicilinas de la acción de ciertas beta-lactamasas, dejando libre al antibiótico para unirse a las PBPs.

Hay otros inhibidores que tienen una gran actividad antimicrobiana, porque además son buenos inhibidores, tales como Cefotaxima, Moxalactam y Aztreonam ^{22,23,88}.

***Concentración de enzima.**

La síntesis de las beta-lactamasas puede estar codificada por genes cromosómicos o por elementos extracromosómicos llamados plásmidos. Las beta-lactamasas codificadas extracromosómicamente pueden extenderse y hacer progresar las resistencias a los antibióticos debido a la fácil transferencia del material genético que las codifica. Estos genes pueden ser movilizados intragenéticamente por recombinación o transposición e intergenéticamente por transformación, transducción o conjugación

***Producción enzimática: Inducible o Constitutiva.**

-Inducible.

Son inducibles aquellas beta-lactamasas sintetizadas a bajo nivel que en presencia de ciertos agentes (los inductores) se sintetizan en cantidades muy superiores, hasta 500 a 1000 veces. En un principio se estudió el fenómeno de inducción en Gram-positivos, sin embargo hoy ha adquirido más importancia el estudio de este fenómeno en *Enterobacteriaceae*, puesto que algunos de los nuevos antibióticos beta-lactámicos de uso clínico, tienen importante efecto inductor, especialmente se ha observado con Cefoxitina y en menor grado por cefalosporinas de amplio espectro, también se ha descrito como potente inductor al Imipenem que a diferencia de los anteriores ello no supone la alteración de la sensibilidad in vitro ni in vivo de la bacteria a éste antibiótico ⁷⁹,
82,104,159.

-Constitutiva.

Este tipo de producción está implicada clínicamente en organismos resistentes, e incluyen enzimas como TEM, PSE, OXA y SHV. Las beta-lactamasas producidas de forma constitutiva pueden estar codificadas tanto cromosómica como plasmidicamente. Y en general, las beta-lactamasas mediadas por plásmidos son constitutivas ^{14,23}.

En la Tabla VA resumimos los criterios de identificación de las beta-lactamasas.

TABLA VA. CRITERIOS DE IDENTIFICACION DE LAS BETA-LACTAMASAS

	P.	C.	A.E.
S. aureus	TEM	SHV-2, CTX-1	
Localización			
- exocelular	+	-	-
- periplásmica	-	+	+
Biogénesis			
- inducible	+	+	-
- constitutiva	-	+	+
Actividad enzimática			
- débil	+	+	-
- fuerte		++	++
Perfil enzimático			
	Penicili- nasas.	Penicili- nasas A.E.	Cefalospo- rinasa. Beta-lactamasas de A.E.
Inhibición			
- Cloxacilina	+	+	+++
- A. Clavulánico	+	+	-
- Sulbactama	+	+	+/-
P. isoeléctrico	8,9	5,4-5,6	>7
Genética			
- Cromosómica	-	-	+
- Plasmídica			
- Transposón	-	+	-

P.=Penicilinasas; C.=Cefalosporinasas; A.E.= Amplio Espectro ¹⁴³.

CAPITULO VI. INDUCCION FENOTIPICA Y

DESREPRESION.

A. INDUCCION FENOTIPICA.

Sólo las beta-lactamasas de Clase C y las penicilinasas de *S. aureus*, son inducibles.

Actualmente, tienen importancia desde un punto de vista clínico las de esta Clase C o I. Estas enzimas son de codificación estrictamente cromosómica. Usualmente, se sintetizan a muy bajo nivel en *E. coli* y *Shigella sonnei*, o de forma inducible en muchas, aunque no en todas las especies de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Pseudomonas aeruginosa*, algunos *Proteus* indol positivo y especies de *Providencia*. En éstos la síntesis de beta-lactamasas aumenta en presencia del inductor y revierte a los niveles iniciales tras 6-20 horas de la eliminación del inductor o de la destrucción del enzima 23,100,163.

B. DESREPRESION.

En contraste con la inducción, la desrepresión es un hecho estable que ocurre espontáneamente en este grupo de organismos que poseen beta-lactamasas Clase I. La frecuencia de mutación o de variantes desreprimidas en la síntesis de beta-lactamasas ocurre en una frecuencia de 10^{-7} - 10^{-8} células bacterianas en muchas cepas de *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*

Pseudomonas aeruginosa, y en otras enterobacterias con menos frecuencia ¹⁴⁴.

In vivo la aparición de este tipo de resistencia ocurre más frecuentemente cuando hay un foco de infección relativamente inaccesible a un antibiótico, con un alta carga bacteriana, donde las concentraciones que alcance el antibiótico estarán cerca su valor de CMI, constituyendo una situación ideal para la selección de mutantes que están presentes como subpoblaciones minoritarias en especies bacterianas típicamente productoras de beta-lactamasas inducibles ^{40,47,54}.

La resistencia a múltiples beta-lactámicos producida por la desrepresión de las beta-lactamasas Clase I está mediada por dos mecanismos:

1. El clásico mecanismo hidrolítico.
2. El mecanismo no hidrolítico de barrera que impide el acceso a las proteínas de unión a las penicilinas (PBPs) localizadas en la membrana citoplasmática. En ocasiones un exceso de antibiótico puede hacer que éste se una al enzima por un fenómeno llamado "trapping" formando un complejo inactivo ^{14,87, 144}.

C. MECANISMO GENETICO DE LA INDUCCION Y DE LA MUTACION.

La mayoría de las especies de enterobacterias llevan un gen de beta-lactamasas ampC, en su cromosoma. En *E. coli* y *Shigella*, la expresión del ampC no es inducible y las beta-lactamasas son sintetizadas de manera constitutiva a bajos niveles, en éstas las mutaciones que conducen a una síntesis aumentada de la síntesis de beta-lactamasas conducente a las resistencias a modernas cefalosporinas ocurren con menor frecuencia que en otras especies de enterobacterias, 10^{-9} o menos ^{118,185}.

Estos fenómenos de inducción y mutación han sido estudiados fundamentalmente en *Enterobacter cloacae* y en *Citrobacter freundii*. Según los estudios realizados la codificación de las beta-lactamasas Clase I residiría en el gen ampC. Este gen estaría gobernado en su expresión por un gen regulador, el ampR. Un tercer gen ampD actuaría como regulador negativo en la expresión del ampC. Así que una mutación en el gen ampD conduciría a la hiperproducción de cefalosporinasas de forma mantenida en los mutantes. Y el gen ampR controlaría en presencia de un inductor el incremento en la producción de beta-lactamasas. Un mecanismo similar podría actuar en otros bacilos Gram-negativos, enterobacterias y pseudomonas ¹²³.

Aunque ampR no está presente en *E. coli*, cuando experimentalmente se introducen los genes ampR y ampC de una cepa de *Citrobacter freundii* mutante desreprimida, la síntesis de

beta-lactamasas en *E. coli* se hace inducible, por tanto todos los componentes restantes necesarios para este proceso deben estar codificados en el cromosoma de *Escherichia coli* 14,28,66,76,84, 85,86,124.

D. IMPLICACIONES CLINICAS.

La inducción de beta-lactamasas lleva consigo:

*El rápido desarrollo de resistencias durante el tratamiento con nuevos antibióticos beta-lactámicos estables a beta-lactamasas.

*La aparición de cepas mutantes resistentes a múltiples antibióticos.

*La aparición de antagonismo ante antibióticos beta-lactámicos.

*Sensibilidad falsa en las pruebas de laboratorio usadas para detectar resistencias a nuevos antibióticos beta-lactámicos y como consecuencia la selección inapropiada de antibióticos.

La aparición de subpoblaciones de mutantes desreprimidos supone, particularmente si existen cuerpos extraños, y con mayor frecuencia en huéspedes comprometidos bajo tratamiento de larga duración, el que estas subpoblaciones resistentes puedan reemplazar a la población primitiva sensible y crear serios problemas para encontrar una terapia alternativa ⁴¹.

47,54,156,161,162,163,185.

Las cefalosporinas de amplio espectro constituyen un factor de riesgo para la subsiguiente adquisición de organismos resistentes a las cefalosporinas de 3ª generación ^{69,120}.

E. DIFERENCIAS ENTRE INDUCCION Y MUTACION ⁸¹

Inducción	Mutación
Modificación de la regulación enzimática.	Hecho genético.
Incremento de la cantidad de enzima	
Variable y frecuentemente poca cantidad de enzima.	Gran cantidad de enzima.
Transitoria	Definitiva
Reversible	Irreversible
Debida a beta-lactámicos y otras moléculas inductoras.	Fenómeno espontáneo
Escasa o nula incidencia en la CMI.	Conduce a un alto nivel de resistencia a la mayoría de los beta-lactámicos.
Sin consecuencias clínicas aún conocidas.	Selección de mutantes resistentes y fallo terapéutico.

CAPITULO VII. INHIBIDORES DE LAS BETA-LACTAMASAS.

A. MECANISMO DE ACCION.

Los inhibidores de las beta-lactamasas pueden ser clasificados según su mecanismo de inhibición enzimática, en reversibles e irreversibles. Esta diferencia es importante puesto que nos da idea de la permanencia en la actuación de éstos.

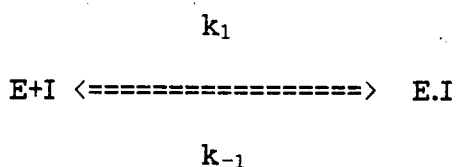
Podemos atendiendo a esto distinguir dos tipos:

B. INHIBIDORES REVERSIBLES

Son aquellos inhibidores que se unen al enzima de manera que la actividad del enzima puede recuperarse.

Este tipo de inhibición, presenta un equilibrio dinámico, tal que puede disminuir con la dilución del inhibidor o con la presencia de moléculas que compiten con éste por el sitio activo del enzima.

Su ecuación de equilibrio correspondería a :



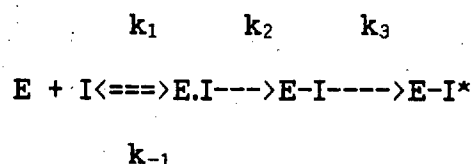
Dentro de éstos inhibidores, hay algunos que se unen al sitio activo del enzima, y son frecuentemente beta-

lactámicos. En su mayoría, los inhibidores reversibles son realmente sustratos con alta afinidad por el enzima pero bajas tasas de hidrólisis. Estos inhibidores se caracterizan por una constante de equilibrio K_m cuyo valor corresponde al cociente de los valores de las constantes k_1/k_{-1} 18,19.

C. INHIBIDORES IRREVERSIBLES.

Algunos enzimas experimentan una inactivación irreversible cuando se tratan con agentes que se unen a ellas covalentemente y modifican permanentemente su grupo funcional, lo que inactiva la molécula del enzima.

Estos inhibidores usualmente requieren un periodo de tiempo finito para actuar. En este caso la ecuación química correspondiente sería:



Donde E es el enzima, I es el inhibidor, $E \cdot I$ es un complejo reversible que puede disociarse en enzima libre e inhibidor o puede transformarse en un complejo covalente (acil enzima), $E-I$, y $E-I^*$ que representan formas inactivadas del enzima. Una subclase dentro de éstos son los llamados inactivadores suicidas, moléculas que se unen al sitio activo del enzima y que

posteriormente se inactiva a través de una acción catalítica del propio enzima ^{18,19}.

D. NATURALEZA DE LOS INHIBIDORES.

Desde un punto de vista clínico, los inhibidores más importantes son los de naturaleza beta-lactámica, destacando entre ellos:

- Ácido Clavulánico.
- Ácido Olivánico.
- Sulfona del ácido penicilánico (Sulbactam).
- Ácido 6-beta-bromopenicilánico.
- Sulfona del ácido 6- α -cloro-penicilánico.
- Carpetimicinas.

Todos ellos actúan como inactivadores, y tienen en común que:

- Poseen un protón en posición 6- α , de acidez adecuada.

- La acidez 6- α y la estructura beta-lactámica favorecen la formación de un doble enlace, frecuentemente en C₆ o en C₅, que da lugar a un acil-enzima muy estable que no se hidroliza. Este comportamiento es explicable ya que la reacción bioquímica de las beta-lactamasas con los antibióticos beta-lactámicos es una acilación, y un compuesto que es atacado por las enzimas puede a la vez ser inhibidor de estas ¹⁸.

Otro inhibidor que tiene interés desde un punto de vista clínico es Aztreonam. Es el primer monobactamo de amplio espectro válido para uso clínico, por sí mismo es un potente

antibiótico pero además es un magnífico inhibidor de las cefalosporinas, formando con ellas un complejo acil covalente estable, cuyo resultado es su hidrólisis (actuando como inhibidor irreversible) pero la reacción es lo suficientemente lenta como para que sea un inhibidor efectivo ¹⁹.

Experimentalmente para el estudio y caracterización de las beta-lactamasas se usan otros inhibidores tales como: Cloxacilina, que actúa bioquímicamente como el Aztreonam, el p-Cloromercuriobenzoato (pCMB), cuya actividad inhibitoria indica la presencia de residuos de serina, y la sal disódica del Acido Etilendiamino-tetracético (EDTA) cuya inhibición indica que el enzima requiere iones metálicos para su actividad ²².

CAPITULO VIII. CLASIFICACION DE LAS BETA-LACTAMASAS.

Desde que se fue conociendo de manera progresiva la importancia de las beta-lactamasas en la resistencia a los beta-lactámicos, se han hecho diferentes intentos en su clasificación. En principio se clasificaron diferenciando las beta-lactamasas de organismos Gram-negativos de las de Gram-positivos. Así, en estafilococos es posible diferenciar cuatro tipos de beta-lactamasas A, B, C y D aplicando criterios serológicos y enzimáticos. Todas ellas son penicilinasas y, con la excepción del tipo D, son inducibles y extracelulares. Sus genes codificadores se encuentran en plásmidos de bajo peso molecular y por tanto, son beta-lactamasas plasmidicas que habitualmente se transfieren por transducción. También pueden tener plásmidos de alto peso molecular que además de codificar beta-lactamasas pueden transferir resistencia a otros antimicrobianos, éstos sí pueden ser transferidos por conjugación y se han encontrado tanto en *Staphylococcus aureus* como en *S. epidermidis*.

Los microorganismos Gram-negativos producen una gran variedad de beta-lactamasas, cuyo número se ha incrementado de forma significativa en los últimos años, no sólo por la mejora en los métodos de detección, sino también por la respuesta bacteriana a la gran profusión de beta-lactámicos.

Richmond y Sykes elaboran una clasificación basada en los perfiles de sustrato y que diferencia cinco clases de beta-lactamasas.

En 1975 la Dra. Matthew describe la técnica de caracterización de beta-lactamasas en base a la determinación de su punto isoelectrico (p.I.), técnica que utiliza como revelador una cefalosporina cromogénica (Nitrocefina). Al mismo tiempo describe once tipos de beta-lactamasas codificadas plasmidicamente en bacterias Gram-negativas. Con todo ello, se realiza una nueva clasificación (1979) que tiene en cuenta la codificación genética de las beta-lactamasas y su perfil de sustrato, y que se va completando sucesivamente con la incorporación de nuevas características, como el peso molecular Tabla VIA.

En la década de los 80 surgen nuevas clasificaciones entre ellas está aquella basada en las homologías que presentaran en sus secuencias de aa, y su tamaño molecular (Ambler, 1980. Jaunin y Gundstrom, 1981) que establece tres clases A, B, C, y que ha sido muy utilizada ^{20,21} Tabla VIIA.

Medeiros añade nuevas enzimas a la clasificación de Richmond, Sykes y Matthew, en concreto: beta-lactamasas tipo TEM, TLE-1, ROB-1, LCR-1 Y OHIO-1, e isoxazolilpenicilinas OXA-4, 5, 6, 7. Dentro del grupo de las PSE incluye CARB-3 y AER-1 y algunas otras.

TABLA VI A.

CLASIFICACION DE RICHMOND, SYKES Y MATTHEW (1976) 14.

T	I-C	ACT.	INHIBIDA POR			ORIGEN P.M. ENCONTRADA	EN LAS CEPAS
			A.C.	CX.	pCMB		
Ia	I	CEF.***	R	S	R	CROM.	Enterobacter Citrobacter
Ib	C	CEF.*	R	S	R	CROM. <24	E. coli
Ic	I	CEF.**	R	S	R	CROM.	P. vulgaris
Id	I	CEF.*	R	S	R	CROM.	Ps. aeruginosa
II	C	PEN.**	S	S	R	CROM. <30	P. mirabilis (Tipo TEM)
III	C	PEN.>CEF.	S	S	S	PLAS. <30	Ampliamente en Gram(-)
IV	C	PEN.=CEF.	S	R	R	CROM. <30	Klebsiella Bacteroides
V	C	PEN.*	S	R	S	PLAS. <30	Enterobacte- rias y Pseu - domonas. Tipos OXA, PSE

T : Tipo.

I.: Inducible.

C.: Constitutiva.

ACT.: Actividad.

CEF.: Cefalosporinasas.

PEN.: Penicilinasas.

A.C.: Acido Clavulánico; CX.: Cloxacilina;

pCMB.: para-Cloro-mercurio-benzoato.

R.: Resistente a la acción inhibitoria.

S.: Sensible a la acción inhibitoria.

CROM.: Origen Cromosómico.

PLAS.: Origen Plasmídico.

P.M. (Peso Molecular) en miles.

TABLA VIIA.
CLASIFICACION DE K. BUSH (1989) ^{20,21}

G	ACT.	INHIBIDA POR					P.M.	p.I.	CLASE
		A.C.	SUL.	AZT.	CX.	pCMB			
I	CEF.	-	*/-	***	***	+/-	>30	B	C
IIa	PEN.	***	***	*/-	*	+/-	<30	A	A
IIb	PEN=	***	**	-	*	+/-	<30	A/B	A
	CEF.								
IIb'	A.E.	***	**	*	*	+/-	<30	A	A
IIc	CB=P	***	***	-	-	+/-	<35	N	A ?
IId	CX>P	***	***	-	-	+/-	<30	N	D ?
IIe	CEF	***	**	*/-	**	+/-	>30	A/B	A ?
III	MT	-	-	-	-	+	ND	A/B	B ?
IV	PEN	-	-	-	*/-	+/-	>30	A	ND

G = Grupo; ACT.= Actividad.

CEF.=Cefalosporinasas; PEN=Penicilinasas; A.E.=Amplio Espectro

(CB.=P.) = Hidrólisis de Carbenicilina = Hidrólisis de Penicilina.

(CX.>P.) = Hidrólisis de Cloxacilina > Hidrólisis de Penicilina.

MT.= Metaloenzimas, inhibidas por EDTA.

P.M.: Peso molecular en miles.

p.I.: B =Básico; A =Acido. N =Neutro.

Clase: ND.= No Determinado.

Más recientemente Karen Bush (1989) completa la clasificación de Richomnd, Sykes y Matthew, añadiendo nuevas enzimas descritas, además incluye al Aztreonam respecto de su efecto inhibidor como parámetro en la clasificación y diferencia sólo cuatro clases de beta-lactamasas Tabla VIIA.

Destacamos de las beta-lactamasas descritas hasta el momento dos grupos de beta-lactamasas por su importancia desde un punto de vista clínico:

- Las beta-lactamasas de amplio espectro, Tipo III de la clasificación de Richmond y Sykes.

- Las beta-lactamasas inducibles, Tipo I de la clasificación de Richmond y Sykes y Grupo 1 de la clasificación de K. Bush 20,21,23,112.

A. BETA-LACTAMASAS DE AMPLIO ESPECTRO.

Se han determinado más de 30 beta-lactamasas diferentes mediadas por plásmidos o transposones en base a su perfil de sustrato, reacciones con inhibidores y puntos isoeléctricos. En la mayoría de las enterobacterias resistentes a la Ampicilina, la enzima plasmídica más común es la TEM-1 (p.I. 5,4) mientras que en *Klebsiella spp.* predominan las SHV-1 (p.I. 5,6), ambos tipos hidrolizan la Ampicilina más que la Carbenicilina, Oxacilina y Cefalotina, y presentan actividad contra Cefotaxima, Ceftazidima y Aztreonam. Todas ellas presentan un residuo de serina en el centro activo del enzima, en la posición 68 para las tipo TEM y en la posición 66 para las tipo SHV. Según sus fenotipos se pueden agrupar en 12 variedades ⁶⁹ Tabla VIIIA.

Tienen escasa actividad frente a Cefoxitina e Imipenem. Y aunque todas tienen altos valores de CMI frente a Cefotaxima y Ceftazidima, sin embargo, no tienen igual actividad frente a éstos antibióticos, ello se comprende si tenemos en cuenta que otro factor en la resistencia a estos antibióticos en organismos Gram-negativos es la falta de permeabilidad en la membrana externa.

Estas enzimas fueron inicialmente descritas en aislamientos hospitalarios resistentes de *Klebsiella spp.* Todas ellas codificadas por plásmidos o transposones, en definitiva por genes transmisibles, que pueden ser transferidas estas resistencias

que codifican, junto con las resistencias a aminoglucósidos como Amikacina, Gentamicina, Netilmicina, Tobramicina. Son sensibles a la acción de inhibidores tales como el Acido Clavulánico y Sulbactama. Unas de otras sólo se diferencian por pequeños cambios en la secuencia de sus aa_s 31,40,133,140.

TABLA VIII.A.

BETA-LACTAMASAS DE AMPLIO ESPECTRO 140

BETA-LACTAMASA	CR	CTX	CAZ	ATM	IPM
R-	4	0'02	0'2	0'06	0'12
TEM-1	32	0'05	0'06	0'12	0'12
TEM-2	32	0'05	0'2	0'06	0'12
CTX-1(TEM-3)	64	2	8	1	0'12
TEM-4	256	8	16	2	0'12
CAZ-1(TEM-5)	128	2	32	1	0'12
TEM-6	8	0'5	128	32	0'25
TEM-7	16	0'5	32	1	0'06
RHH-1(TEM-9)	32	1	128	32	0'12
CAZ-2	64	1	32	2	0'12
SHV-1	16	0'01	0'2	0'06	0'12
SHV-2	256	4	2	1	0'12
SHV-3	128	2	2	0'5	0'12
SHV-4	256	4	64	32	0'12
SHV-5	256	4	32	32	0'12

Valores de CMI en $\mu\text{gr./ml.}$

B. BETA-LACTAMASAS INDUCIBLES.

Fueron descritas inicialmente por Matthew y Harris (1976), son producidas prácticamente por todos los microorganismos Gram-negativos a niveles basales, están codificadas cromosómicamente y son generalmente específicas de especie e incluso de subespecie. Sus puntos isoelectricos son básicos. La actividad de estas beta-lactamasas es baja pero se incrementa de forma importante con la presencia de un agente inductor que actúa modificando la regulación de la transcripción del gen que la codifica.

Hidrolizan de forma preferente las cefalosporinas incluyendo a los nuevos beta-lactámicos, que sin embargo, son resistentes a las beta-lactamasas plasmídicas, que se presentan en *Enterobacter*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. De manera que pueden desarrollarse a partir de ellas cepas resistentes a los nuevos beta-lactámicos ya sin precisar de la presencia del inductor (mutantes desreprimidos) que emergen en estrecha relación con el uso en los tratamientos de las cefalosporinas de última generación, condicionado por el poder inductor de los nuevos beta-lactámicos 47,99,161,185.

CAPITULO IX. TAXONOMIA

La Clasificación, Nomenclatura y la Identificación son tres áreas de la taxonomía estrechamente relacionadas.

La Clasificación agrupa a los organismos en grupos taxonómicos basándose en sus similitudes y relaciones.

La Nomenclatura asigna nombres a estos grupos atendiendo a reglas internacionales.

La Identificación es el proceso que determina a qué grupo taxonómico pertenece un nuevo aislamiento.

A. DIVISIONES DENTRO DEL REINO PROCARYOTAE.

Células aisladas o asociaciones de células similares constituyen los componentes de este Reino, de propiedades celulares. Que además no cuentan con membrana nuclear y en los que el núcleo tampoco cuenta con proteínas básicas. No tienen sistema de microtúbulos. Sus ribosomas son del tipo 70s, y no presentan retículo endoplásmico. Móviles o inmóviles. Generalmente cuentan con una pared celular rígida. Su localización es ubicua.

Podemos considerar dentro del Reino *Procaryotae* cuatro divisiones:

- DIVISION I. *GRACICULITES*.

Comprende todas las bacterias Gram-negativas de interés en la patología humana y animal. Presentan una compleja pared celular consistente en una membrana externa y otra interna, una delgada capa de peptidoglicano (que contiene ácido murámico presente en todas excepto en un pequeño grupo) y otros componentes variables. Formas variadas, esféricas, ovales, en vara curvada o recta, con hélices o filamentos. Se reproducen por fisión binaria, aunque algunos pocos grupos presentan gemación y otros fisión múltiple. Móviles o inmóviles. Fototróficas o no. Aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas. Algunas son parásitos intracelulares obligados.

- DIVISION II. *FIRMICUTES*.

Incluye entre otras bacterias Gram-positivas de interés en patología humana.

- DIVISION III. *TENERICUTES*.

Son bacterias que carecen de pared celular y son incapaces de sintetizar el peptidoglicano, sólo tienen membrana citoplasmática. En la edición de 1984 del Manual de Bergey se identifican con las comunmente llamadas Mycoplasmas y que incluyen la Clase *Mollicutes*.

- DIVISION IV. *MENDOSICUTES*.

Procariotas con paredes celulares "defectuosas" que sugieren la pérdida del peptidoglicano convencional (con ácido

murámico), son paredes de macromoléculas proteicas y otros heteropolisacáridos 49,108.

B. ENTEROBACTERIAS 145

Las enterobacterias constituyen una amplia familia de bacilos Gram-negativos, aerobios y anaerobios facultativos, relacionados por sus propiedades bioquímicas y genómicas, algunas son huéspedes habituales del tubo digestivo del hombre y de los animales.

En relación con su acción patógena puede distinguirse un grupo reducido de especies que se consideran patógenos estrictos, capaces de producir cuadros patológicos en huéspedes normales, sin embargo la gran mayoría son patógenos potenciales capaces de expresar su acción patógena sólo cuando las condiciones ecológicas del huésped han variado. Así que las enterobacterias las vamos a encontrar en el origen de un gran número de infecciones oportunistas, y junto con las *Pseudomonas* y bacilos Gram-negativos no fermentadores, constituyen la causa más importante de las infecciones hospitalarias.

C. CARACTERISTICAS DE LAS ENTEROBACTERIAS.

- Características bioquímicas ¹⁴⁵.

No producen oxidasas.

Reducen los nitratos.

Fermentan la glucosa.

- Estructura antigénica.

Pueden presentar diferentes antígenos:

*Antígeno somático o antígeno O. Se encuentra en el polisacárido de la membrana externa y es termoestable. Se compone de una fracción central compuesta por oligosacáridos y KDO (ácido keto-desoxi-manulosoctónico), común a la mayoría de los Gram-negativos y explica la presencia de reacciones cruzadas.

* Antígeno capsular o antígeno K.

Es un antígeno superficial, de naturaleza polisacárida que constituye una cápsula en algunas enterobacterias y en otras una capa mucosa, y que recubre el antígeno O. Son responsables de la O-inaglutinabilidad. Tiene propiedades antifagocitarias.

* Antígeno de las fimbrias o antígeno F.

Son antígenos proteicos. Son heterogéneos serológicamente y permiten clasificar las cepas en serotipos F.

En las enterobacterias es relativamente frecuente la aparición de variaciones genotípicas por mutación o por mecanismos de transferencia genética, que pueden afectar tanto la

constitución genética como los caracteres bioquímicos. Ello explica por un lado las dificultades para su clasificación y por otro sus posibilidades patógenas en cuanto a las aparición de cepas resistentes y multirresistentes a los antibióticos.

- Clasificación de la Edición del Manual de Bergey de 1984 17

Sólo especificaremos las especies en aquellos géneros a los que pertenecen las cepas motivo de esta tesis:

<u>GENEROS</u>	<u>ESPECIES</u>
Escherichia	Escherichia coli
	Escherichia blattae
Shigella	
Edwarsiella	
Citrobacter	Citrobacter freundii
	Citrobacter diversus
	Citrobacter amalonaticus
Salmonella	
Klebsiella	
Enterobacter	
Hafnia	
Serratia	
Proteus	
Providencia	
Morganella	Morganella morganii
Yersinia	
Erwinia	
Obersumbacterium	
Kluyvera	
Cedecea	
Tatumella	
Xenorhabdus	
Rahnella	

D. GENERO ESCHERICHIA. Escherichia coli 17,187

El género *Escherichia* está constituido por enterobacterias con forma de bacilos rectos, móviles por flagelos peritricos o inmóviles. Anaerobios facultativos que tienen metabolismo tipo fermentativo y tipo respiratorio. Su temperatura óptima es de 37°C.

Son organismos quimioorganotrofos, oxidasa-negativos. Pueden usar el acetato como única fuente de carbono pero no el citrato. Pueden fermentar la glucosa y otros carbohidratos con producción de piruvato, que después es convertido en ácido láctico, acético y ácido fórmico. Parte del ácido fórmico es transformado por medio de un sistema hidrogenoliasa en CO₂ y H₂. Fermentan la lactosa la mayor parte de las cepas, aunque algunas cepas no.

*** Determinantes de su acción patogénica 130,146.**

-Antígenos.

Según el estado del lipopolisacárido de su membrana externa, las cepas pueden adoptar forma rugosa o forma mucosa.

Además de los flagelos la mayoría de las cepas tienen fimbrias que recubren su superficie. Algunas de estas fimbrias tienen funciones adhesivas. Se han descrito dos variedades principales de fimbrias basadas en su capacidad de hemaglutinación:

Las fimbrias tipo I cuya hemaglutinación es inhibida por la manosa (manosa-sensibles: MS). El otro tipo es manosa-resistente. Las fimbrias tipo I se encuentran en la mayoría de las cepas de *E. coli* que se aíslan en heces normales (70-80%). Se considera que facilitan la adherencia al moco del intestino grueso y al moco urinario del que forma parte la proteína de Tamm-Horsfall. Las fimbrias MR funcionan como factores de virulencia que pueden ser específicas de especie y órgano-específicas en sus características adhesivas.

Los antígenos O y K presentan propiedades antifagocitarias e inhibidoras de las sustancias bactericidas del suero y son responsables de virulencia en las cepas invasivas.

- Toxinas.

Algunas cepas de *E. coli* producen enterotoxinas. Dos han sido más estudiadas, una es la llamada termolábil que está estrechamente relacionada con la toxina del *Vibrio cholerae* y actúa activando la adenilciclase conduciendo a un aumento de la secreción de moco y agua. Y una toxina termoestable que también aumenta la secreción de agua a la luz intestinal quizás por activación de la guanilciclase.

Ambas pueden aparecer juntas o por separado en las cepas de *E. coli* enterotoxigénicas asociadas a un número limitado de serovariedades O:K:H y grupos O de *E. coli* enterotoxigénicas que frecuentemente presentan fimbrias MR. Estas

toxinas alteran el funcionalismo del enterocito. Además, hay cepas de *E. coli* que tienen un carácter enteroinvasivo y penetran en los enterocitos mediante antígenos de superficie.

- Fermentos.

Algunas cepas producen hemolisinas cuya importancia patológica es desconocida.

* Cuadros clínicos que pueden producir.

- Trastornos intestinales.

Cuadros Diarreicos. *E. coli* es una causa frecuente de diarreas. *E. coli* enteropatógenos, son los causantes de los brotes epidémicos de diarreas infantiles generalmente en instituciones sanitarias, de elevada mortalidad. *E. coli* enterotoxigénicos, son los agentes productores de las gastroenteritis en niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo y de la "Diarrea del viajero". Producen las toxinas T1 Y TM o sólo una.

E. coli enterohemorrágico, el serotipo de *E. coli* O 157 H7 se ha asociado a cuadros y brotes de colitis hemorrágicas por una citotoxina, en Estados Unidos.

E. coli enteroinvasivo, productores de diarreas de tipo disenteriforme en niños y adultos, tanto como casos esporádicos como en brotes.

- Trastornos extraintestinales.

Es el agente más frecuente de las infecciones

urinarias. Las producen un número limitado de serovariedades O:K:H, que poseen adhesina MR y que son frecuentemente hemolíticas.

También es agente en infecciones biliares, peritoneales y meníngeas. Infecciones de heridas y mucosas.

Procesos generalizados, bacteriemias y sepsis. Estas infecciones extraintestinales ocurren cuando hay circunstancias predisponentes: obstrucción y estasis de vías urinarias y biliares, disminución de los mecanismos defensivos.

E. GENERO CITROBACTER. Citrobacter freundii 131

Forma de bacilos rectos, que aparecen solos o en pareja. Usualmente no encapsulados. Móviles por flagelos peritricos. Las colonias en agar nutritivo son uniformes, algo convexas, translúcidas u opacas, grisáceas de superficie brillante bien delimitadas. Pueden aparecer formas mucoides o rugosas. Son oxidasa-negativas. Catalasa-positivas. Químioorganotróficas. Pueden usar el citrato como única fuente de carbono. Reducen el nitrato a nitrito. La lisina no es descarboxilada. Fermentan la glucosa con producción de ácido y gas. El test del rojo metilo es positivo. El test de Voges-Proskauer es negativo.

No producen fenilalanina desaminasa, ni desoxirribonucleasa, ni gelatinasa ni lipasa.

Características diferenciales del género *Citrobacter* y *Escherichia*¹³¹

Características	<i>Citrobacter</i>	<i>Escherichia</i>
Lisina-decarboxilasa	-	+
Citrato (Simmon's)	+	-
Test de Voges-Proskauer	-	-
Crecimiento en medio KCN	+/-	-
Producción de indol	+/-	+
Ornitina descarboxilasa	+/-	+
Hidrólisis de ONPG	+	+
Mol%G+C del ADN	50-52	48-52

Características diferenciales entre las diferentes especies del género *Citrobacter* ¹³¹

Características	<i>C. freundii</i>	<i>C. diversus</i>	<i>C. amalonaticus</i>
Producción de indol	-	+	+
Producción de H ₂ S	+	-	-
Arginina dihidrolasa	+/-	+	+
Ornitina descarboxilasa	+/-	+	+
Crecimiento en el KCN	+	-	+
Uso del malonato	-	+	-
D-Adonitol	-	+	-
Mol%G+C del ADN	50-51	51-52	51-52

F. GENERO MORGANELLA. *Morganella morganii* 136

Forma de bacilos rectos, móviles por flagelos peritricos, aunque algunas cepas por encima de 30°C no forman flagelos. Después de 48 horas en medio con 1% de agar a 22°C crecen formando una película que se extiende en toda la superficie. Son anaerobios facultativos. Desaminan oxidativamente la fenilalanina y el triptófano. Fermentan sólo algunos azúcares y producen ácido a partir de la manosa. Usan el tartrato de Jordan pero no el citrato de Simons. Aparecen en heces. Actúan como invasores oportunistas secundarios, habiéndose aislado de tracto respiratorio, hueso, infecciones del tracto urinario.

Características de *Morganella morganii* 136

Test	Resultado
Fenilalanina desaminasa	+
Ureasa	+
Indol	+
Crecimiento en KCN	+
Ornitina descarboxilasa	+
Lisina descarboxilasa	-
Arginina dihidrolasa	-
Test de Rojo metilo	+
Test de Vosger Proskauer	-
Reducción de nitrato a nitrito	+/-
Aclaramiento de tirosina	+
Test de oxidasa	-
Hidrólisis de ONPG	-
Deoxirribonucleasa	-
Lipasa	-
Uso del tartrato de Jordan	+
Producción de H ₂ S	-
Movilidad	+
Licuefacción de la gelatina	+

Uso del citrato de Simons	-
Uso del malonato o del acetato	-
Producción de ácido a partir de:	
Glucosa, manosa	+
Trealosa	+/-
Lactosa, sacarosa, L-arabinosa, L-ramnosa, rafinosa, celobiosa, α -metil-glucosamina, melobiosa, salicina, esculina, mucato.	-
Producción de gas a partir de la glucosa	+/-

G. CUADROS CLINICOS PRODUCIDOS POR

ENTEROBACTERIAS OPORTUNISTAS ¹⁴⁷

Las enterobacterias, dejando aparte las especies patógenas, se encuentran en el origen de gran número de infecciones oportunistas y junto con las *Pseudomonas* constituyen el más importante problema en los hospitales (40-70% de las infecciones hospitalarias). Las enterobacterias oportunistas en su mayoría son parte de la flora normal del tubo digestivo o proceden del medio externo. Su acción patógena sólo se manifiesta cuando hay una disminución de los mecanismos defensivos en el huésped.

Corresponden en su mayoría a los bacilos coliformes, grupo heterogéneo de bacterias fermentadoras rápidas y lentas de la lactosa, que incluyen los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* y *Citrobacter*, además de algunas no fermentadoras como *Morganella*, *Proteus*, *Providencia* y *Edwardsiella*.

Producen por lo general infecciones extradigestivas en huéspedes con las condiciones ecológicas y defensivas disminuidas. Generalmente son procesos localizados pero también pueden ser generalizados. Las más frecuentes son las infecciones urinarias, seguidas de las respiratorias, las de las heridas, las abdominales, meningitis y sepsis.

MATERIAL Y METODOS

CAPITULO I: IDENTIFICACION BACTERIANA.

A. SISTEMA API 20E 4,36

Las cepas recogidas a partir de cultivos procedentes de diferentes muestras clínicas que por las características de sus colonias en Agar de MacConkey podrían pertenecer a la familia *Enterobacteriaceae*, se identificaron por el sistema API 20E, tras una noche de incubación a 37°C. El sistema está comercializado en tiras de plástico con 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados. Estos son reconstituídos cuando se les inocula una suspensión del cultivo del organismo a estudiar en suero salino estéril. Tras el inóculo, las cúpulas de los microtubos con Arginina, Lisina, Ornítina, H₂S y Urea se llenan con aceite de parafina. Y la tira así preparada se incuba en una bandeja de plástico que tiene unos pocillos que contienen agua y se incuban a 37°C durante 18-24 horas. Con esta técnica podemos conocer la especie de enterobacteria ensayada.

CAPITULO II: MEDIOS DE CULTIVO.

A. MEDIOS DE AISLAMIENTO.

*** Agar sangre.**

Se rehidratan 40 gr. del medio base suministrado por DIFCO en 1 litro de agua destilada o desionizada, calentándolo hasta su total disolución. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos, pH 7'3 a 25°C. Una vez estéril se mantiene en un "baño maría" a 45°C hasta que esté a esa temperatura y se le añade sangre en condiciones de esterilidad. Se agita hasta tener una solución homogénea y se dispensa en placas de 10 cm. de diámetro dejando que solidifiquen sobre superficie lisa.

Se utiliza como medio base Agar con soja triptica constituido por:

Triptona	15gr.
Peptona de soja	5gr.
Cloruro sódico	5gr.
Agar	15gr.

*** Agar MacConkey.**

Se rehidrata el medio, suministrado por DIFCO disolviendo 50 gr. de éste en 1 litro de agua destilada o desionizada completamente. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El medio se distribuye en placas de 10 cm. de diámetro. Y se dejan solidificar sobre superficie lisa.

Su composición es:

Bacto peptona	17gr.
Proteosa peptona	3gr.
Lactosa	10gr.
Sales biliares	1'5gr.
Cloruro sódico	5gr.
Agar	13'5gr.
Rojo neutro	0'03gr.
Cristal violeta	0'001gr.
Su pH 7'1 a 25°C.	

B. MEDIOS DE PROPAGACION.

*** Caldo de Cerebro y Corazón.**

Este medio, también de DIFCO, se prepara rehidratando 37 gr. por litro y calentándolo hasta su total disolución. Se distribuye en matraces o en tubos. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se incuban a 37°C durante una noche para estar seguros de su esterilidad. Su composición es:

Infusión de cerebro de ternera	200gr.
Infusión de corazón vaca	250gr.
Proteosa-peptona	10gr.
Dextrosa	2gr.
Cloruro sódico	5gr.
Fosfato disódico	2'5gr.
pH 7'4 a 25°C.	

*** Agar de Cerebro y Corazón.**

Suministrado por DIFCO, se prepara rehidratando 52 gr. del medio por cada litro de agua destilada o desionizada completamente. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se distribuye en placas de 10 cm. de diámetro que se dejan solidificar sobre superficie lisa. Su composición es igual a la del caldo pero además lleva Agar. Su pH 7'4 a 25°C.

C. MEDIO PARA LA REALIZACION DE

ANTIBIOGRAMAS.

*** Agar de Mueller Hinton.**

Suministrado por DIFCO. Se prepara rehidratando 38 gr. del medio por litro de agua destilada o desionizada completamente. Se calienta hasta que se disuelve completamente y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se compone de:

Infusión de carne	300gr.
Acidos de Casamino (técnicos)	17,5gr.
Almidón	1'5gr.
Agar	17gr.

**D. MEDIO PARA LA DETECCION DE BETA-
LACTAMASAS.**

*** Medio base con rojo fenol.**

Se rehidratan 16 grs. del medio de DIFCO por cada litro de agua destilada o desionizada completamente, y se calienta hasta que se disuelva. Se distribuye en tubos en cantidades de 10 ml. y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Es el método que usamos para la detección de beta-lactamasas por el método Acidimétrico con células intactas. Se compone de:

Extracto de carne	1gr.
Proteosa-peptona	10gr.
Cloruro sódico	3gr.
Rojo fenol	0,018gr.
pH 7'4 a 25°C.	

E. MEDIO PARA LA CONSERVACION DE LAS CEPAS.

*** Congelación a -70°C 6.**

Este método asegura la conservación de las cepas durante mucho tiempo, especialmente si contienen plásmidos que nos interese que conserven. Para ello:

- Sembramos las cepas a conservar en Agar de Cerebro y Corazón inclinado y las incubamos durante 18 horas a 37°C .

- Preparamos tubos con 5 ml. de Caldo de Corazón y Cerebro estériles y los incubamos a 37°C durante 18 horas, para asegurar que no están contaminados.

- Les añadimos un 15% de glicerol y agitamos. Y añadimos la mezcla a los tubos con el Agar sembrados la noche anterior.

- Se distribuye el volumen líquido de cada tubo en porciones de 1 ml. en diferentes tubos estériles.

- Se congelan a -70°C .

F. MEDIO PARA EXTRACCION DEL ADN PLASMIDICO.

*** Medio de Luria Bertani. (LB)**

Para prepararlo utilizamos Bacto-Triptona y Extracto de Levadura, suministrados por DIFCO además de Cloruro sódico en las proporciones que a continuación se indican.

Estos componentes se mezclan y disuelven en 1 litro de agua destilada o desionizada hasta su total disolución, se distribuye en cantidades de 3 ml. en diferentes tubos que se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 minutos. El medio así preparado se compone de:

Bacto-Triptona	10gr.
Extracto de Levadura	5gr.
Cloruro sódico	10gr.

ANTIBIOTICOS UTILIZADOS**LABORATORIO**

Acido Clavulánico(AC)	BEECHAM
Aztreonam(ATM)	SQUIBB
Carbenicilina(CB)	BEECHAM
Cefalotina(CR)	LILLY S.A.E.
Cefoxitina(FOX)	MERCK SHARP & DOHME
Cefpiroma(HR-810)	HOECHST
Cefotaxima(CTX)	ROUSSEL
Ceftazidima(CAZ)	GLAXO S. A.
Ceftizoxima(ZOX)	GLAXO S. A.
Ceftriaxona(CRO)	ROCHE S. A.
Cefuroxima(CXM)	ROCHE S. A.
Ciprofloxacina(CPX)	GLAXO S. A.
Cloxacilina(CX)	ANTIBIOTICOS S. A.
Fleroxacina(FRX)	HOFFMANN
Imipenem(IPM)	MERCK SHARP & DOHME
Mezlocilina(MZ)	BAYER
Benzilpenicilina(P)	C.E.P.A.
Sulbactama(SL)	PFIZER S. A.

OTROS AGENTES UTILIZADOS:

para-Cloromercuriobenzoato (pCMB) de SIGMA
Sal disódica del Acido Etilendiaminotetracético
(EDTA) de BOH CHEMICALS LTD.

CAPITULO III: ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDADES A LOS ANTIMICROBIANOS.

A. TEST DE DIFUSION EN AGAR ¹¹

La susceptibilidad bacteriana a los antibióticos puede ser medida in vitro usando los principios de la difusión en agar. Los antibióticos son comúnmente aplicados en las placas del test en forma de discos de papel de filtro secos. Cuando el disco impregnado con el antibiótico se dispone en la superficie del agar ocurre simultáneamente que el antibiótico difunde a través del agar, de manera que a mayor distancia del disco su concentración en el agar será menor. Mientras el antibiótico difunde progresa la multiplicación bacteriana. La multiplicación bacteriana es más rápida que la difusión del antibiótico y aquellas bacterias no inhibidas por el antibiótico seguirán multiplicándose. Ningún crecimiento aparecerá en el área en la que el antibiótico se encuentre en concentraciones inhibitorias.

El agar para los métodos de difusión de disco se ha estandarizado en el agar de Mueller-Hinton (DIFCO). Este medio sin suplementos es suficiente para permitir el crecimiento de las enterobacterias estudiadas en este caso. Los discos de papel de filtro conteniendo los antibióticos se conservaron en refrigeración a una temperatura de 50°C. Se siguió el método standard, descrito por Bauer, Kirby, Sherris y Turk (1966). A partir de 4-5 colonias

aisladas de un cultivo previo de 24 horas, se prepara una suspensión en suero salino estéril hasta obtener una turbidez similar a la del patrón de turbidez nº 0,5 McFarland.

Para inocular el agar se utiliza un hisopo estéril humedecido en la suspensión bacteriana, y con él se impregna de forma homogénea todo el agar. Tras unos 5 minutos se disponen los discos de antibiótico. Después de incubar a 37°C durante 16-18 horas se miden los halos en los que no haya crecimiento bacteriano.

Los discos con antibiótico fueron suministrados por DIFCO. Y la interpretación de las medidas de los halos se hizo según las recomendaciones de NCCLS M2-A3 (1984) para enterobacterias, que podríamos resumir de la siguiente forma:

- Cefalosporinas en general se considerarán sensibles cuando los halos sean ≥ 22 mm, y resistentes si son ≤ 14 mm. Esto también es válido para Eritromicina (E), Cloramfenicol (C) y Acido Nalidíxico (NA)

- Aminoglucósidos se considerarán sensibles cuando los halos de inhibición tengan un diámetro ≥ 15 (excepto para AN, que deberán ser ≥ 17 mm), resistentes cuando sean ≤ 12 mm (≤ 14 para AN).

- Penicilinas, se considerarán sensibles cuando los halos sean ≥ 15 (excepto para AM ≥ 14 y para CB ≥ 23 mm) y resistentes cuando sean ≤ 11 mm (excepto para CB, ≤ 17 mm)

B. TEST DE DILUCION EN AGAR ¹⁸²

Los tests de dilución son usados para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de los agentes antimicrobianos requeridos para inhibir o exterminar ciertos microorganismos. Una serie de diluciones del antibiótico son inoculadas con el microorganismo e incubados. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es la más baja concentración de antibiótico en la que no hay crecimiento visible.

Las distintas diluciones de cada antibiótico empleadas se obtienen a partir de una solución con una concentración inicial diluyendo ésta sucesivamente a la mitad, obteniendo una serie de concentraciones decrecientes en base dos. Cada una de estas diluciones se mezcló con agar de Mueller-Hinton a temperatura de 50°C, vertiéndose dichas combinaciones en placas.

Por cada volumen de cada dilución del antibiótico se añadieron 9 volúmenes de agar. Una vez solidificado el agar, las placas se guardaron a 4°C no más de una semana antes de inocu-larlas con las distintas cepas.

La concentración de antibiótico más alta empleada fue de 1024 µgr./ml. (µgr.=microgramo/os), excepto para Cefalotina y Cefoxitina, para las que se requirió una concentración inicial de 16384 µgr./ml. La más baja concentración ensayada fue de 0,06 µgr./ml.

Para la preparación de los inóculos se escogieron 4-5 colonias idénticas de cada cepa, sembradas 24 horas antes en agar MacConkey, y se diluyeron en 5 ml. de suero fisiológico estéril, ajustando su turbidez a la turbidez del patrón del sulfato de bario nº 0,5 McFarland, esta turbidez correspondería a la 5×10^7 UFC/ml. para miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Las placas de agar con cada antibiótico y una de agar sin antibiótico como control para cada serie, fueron inoculadas con aparato replicador de inóculos semejante al descrito por Steers, que deja en cada punto una gota de 10 μ l. (μ l= microlitros). Así que el inóculo final fue de 5×10^5 UFC/ml. Las placas se inocularon en orden creciente de concentración de antibiótico desde 0,06 μ gr./ml.

C. ESTUDIO DEL DESPLAZAMIENTO DE LA
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA POR EL
EFEECTO DE LA ASOCIACION DE ANTIBIOTICOS
(SINERGISMO Y ANTAGONISMO) ¹⁵⁵

La técnica consiste en que previa determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los dos antibióticos que van a asociarse respecto de la bacteria en cuestión, se realizan una combinación en la relación 1/4 del antibiótico cuya interacción queremos conocer con las cefalosporinas en estudio (puesto que las CMI para la Cefalotina fue en todos los casos igual o superior a 4096, y para la FOX de 512 lo que supondría un excesivo valor de inhibidor que podría falsear los resultados, en este caso se usó como concentración inicial 64 µg/ml.) y partiendo de la solución madre, se hacen diluciones seriadas decrecientes en base 2. De esta forma ensayamos las siguientes combinaciones:

- Cefalotina + A. Clavulánico; + Sulbactama; + Cloxacilina; + Carbenicilina; + EDTA; + pCMB.
- Cefoxitina + A. Clavulánico; + Sulbactama; + Cloxacilina; + Carbenicilina; + EDTA; + pCMB.
- Ceftazidima + A. Clavulánico; + Sulbactama; + Cloxacilina; + Carbenicilina; + EDTA; + pCMB.
- Cefotaxima + A. Clavulánico; + Sulbactama; + Cloxacilina; + Carbenicilina; + EDTA; + pCMB.

- Ceftriaxona + A. Clavulánico; + Sulbactama; + Cloxacilina; + Carbenicilina; + EDTA; + pCMB.

También se ensayó como inhibidor el Aztreonam.

Definimos Sinergismo cuando la CMI de la cefalosporina disminuye cuatro veces o más en presencia del agente. Y Antagonismo cuando se incrementa cuatro veces o más la CMI de la cefalosporina.

D. ANTIBIOGRAMA CRUZADO.

- Técnica mixta de dilución-difusión en medio sólido ^{39,68}.

Consiste en adicionar al medio, aún fundido, no solamente la cepa a estudiar sino también un antibiótico a concentración fija, y una vez solidificado colocar en la superficie los discos de antibacterianos cuyas interacciones con el añadido en dilución se desean conocer, observando los halos de inhibición en comparación con placas testigo no adicionadas del antibiótico. Este método es cualitativo. Con él se estudió tanto el posible efecto sinérgico como antagónico. Este método se explicará más detenidamente en el Capítulo IX de esta parte. Se ensayaron las siguientes concentraciones:

Cefoxitina (1 μ gr/ml. y 32 μ gr./ml.)

Imipenem (0'03 μ gr/ml.)

CAPITULO IV: DETECCION DE LAS BETA-

LACTAMASAS ¹⁷³.

Las técnicas de detección para las beta-lactamasas dependen del antibiótico ensayado, del tipo de enzima y de la urgencia del resultado.

En la práctica la detección de las beta-lactamasas es solamente cualitativa, basándose las diferentes técnicas en la modificación del anillo beta-lactámico, con la formación de ácido penicilinoico para las penicilinas y cefalosporinoico para las cefalosporinas.

Los principales métodos de detección están basados en:

- La modificación del pH que produce esta reacción en el medio: Método Acidimétrico.

- La modificación electrónica de la molécula acompañada del cambio de la absorción de la luz: Método Cromogénico y Espectrofotométrico.

- La reducción del iodo, que es desplazado de su unión al almidón produciendo una pérdida de color: Método Iodimétrico.

- La inactivación del antibiótico: Método Microbiológico.

A. METODO ACIDIMETRICO.

1- Reacción en tubo ³⁰.

Se prepara una solución extemporánea de Benzilpenicilina y rojo fenol:

- 5 millones de unidades de Benzilpenicilina en 4,5 ml. de agua destilada con 0,5 ml. de rojo fenol al 0,5%, de manera que la solución se ajusta con NaOH a un pH de 8,5.

- Con cada una de las cepas en estudio se hizo una suspensión bacteriana del orden de 10^9 UFC/ml. a partir de un cultivo de 18 horas.

- La técnica consiste en añadir tres gotas de reactivo a la suspensión bacteriana. Juntamente se disponen un control negativo: tres gotas de reactivo y 0,5 ml. de suero fisiológico, y un control positivo: tres gotas de reactivo a una suspensión bacteriana de una cepa de referencia productora de beta-lactamasa.

Se incuban los tubos a temperatura ambiente.

- La lectura:

La reacción es positiva cuando el color violeta de la solución vira a amarillo en menos de 2 minutos.

La reacción es negativa cuando el color violeta de la solución no vira al amarillo en pocos minutos. Tras horas de incubación a temperatura ambiente puede observarse este viraje

por la hidrólisis espontánea de la Benzilpenicilina.

2- Variación del test de Escamilla ⁴².

Se prepara en este caso también una solución alcalina de rojo fenol pero en una solución que contiene 16 grs. por litro del medio base de rojo fenol (suministrado por Laboratorios DIFCO) cuya fórmula es:

-Proteosa peptona no. 3	10 gr./l.
-Cloruro sódico	5 gr./l.
-Extracto de carne	1 gr./l.
-Rojo fenol	0,018 gr./l.

A pH 7,4 (25°C).

Disolviendo 16 gramos de este medio en 1 litro de agua destilada y desionizada.

Este es distribuido en cantidades de 10 ml. en diferentes tubos, que luego se esterilizan en el autoclave a 15 libras de presión y 121°C durante 15 minutos.

En estos tubos con el medio ya estéril se añaden 1,6 ml. de una solución de Benzilpenicilina (previamente preparada en agua estéril a una concentración de 200.000 UI/ml).

Posteriormente se siembra cada cepa a estudiar en un tubo a partir de cultivos de las mismas de 18 horas. Y se incuban a 37°C durante 24 horas junto con dos controles negativos, uno con Benzilpenicilina y sin siembra, el otro sin Benzilpenicilina y con siembra.

- La lectura.

Tras 24 horas de incubación a 37°C si hay beta-lactamasas ocurrirá que los controles no habrán variado su color rojo, pero si el tubo/os donde haya crecido la cepa/as productoras de beta-lactamasas que tendrán un color amarillo debido a que dichas enzimas han destruido la Benzilpenicilina produciendo acidificación del medio.

B. METODO IODIMETRICO 173

Los ácidos penicilinoico y cefalosporoico reducen el iodo, de manera que esta reacción puede apreciarse si la realizamos en presencia de un indicador.

El método Iodimétrico es más útil para penicilinas que para cefalosporinas.

1- Técnica en tubo.

- Reactivos.

Se preparó almidón soluble al 1% en agua destilada, y se hirvió hasta que estuvo totalmente disuelto.

Reactivo de iodo que se preparó con 2,03 gr. de iodo y 53,2 gr. de ioduro potásico en 100 ml. de agua destilada.

Solución de Benzilpenicilina 10.000 UI en tampón fosfato 0,1 M a pH 7. Esta solución se distribuyó en varios tubos en cantidades de 0,5 ml. y en ellos se resuspendieron las cepas hasta obtener una turbidez correspondiente a 10^9 UFC/ml. Las cepas procedían de cultivos en medio sólido de 18 horas. Usamos dos controles negativos, uno es la solución de Benzilpenicilina sola y el otro es cada cepa en tampón fosfato sin Benzilpenicilina.

- Lectura.

Se leen los resultados tras 1 hora a temperatura ambiente y añadiendo 2 gotas de la solución de almidón y una gota del reactivo de iodo. De manera que:

* La presencia del color azul durante más de 10 minutos supone que no se ha reducido el iodo y por tanto que la penicilina presente en el tubo no ha sido hidrolizada.

* La rápida decoloración es indicativo de la actividad de las betalactamasas sobre la penicilina.

* La prueba se considerará válida siempre que los controles negativos usados no presenten decoloración.

Utilizamos este método para valorar cualitativamente la actividad de 100 μ l. de los distintos extractos enzimáticos frente a la Benzilpenicilina. Por la comparación de sus resultados con los obtenidos con células intactas se puede conocer el papel de la permeabilidad en la resistencia bacteriana respecto de las beta-lactamasas ⁵³.

C. METODO MICROBIOLOGICO 132

Se siembra en césped 10^9 UFC/ml. de una cepa sensible a los antibióticos en estudio, en este caso se usó la cepa de *Escherichia coli* K-12 sensible a las cefalosporinas, sobre una placa de cultivo de agar de Mueller-Hinton. Se secan en la estufa durante 30 minutos a 37°C . Después se colocan los discos de antibióticos en estudio, seis discos del mismo antibiótico en cada placa. Al primero de los discos le añadimos 50 μl . de suero fisiológico estéril, al segundo 50 μl . de extracto enzimático inactivado a 70°C durante 30 minutos, al tercer, cuarto, quinto y sexto discos, les añadimos 5, 10, 25, 50 μl . de extracto enzimático respectivamente. Después se incuban las placas a 37°C durante 24 horas.

- Lectura.

Tras 24 horas de incubación se miden los halos de inhibición, considerando que existe actividad de beta-lactamasa cuando el halo de inhibición del disco de antibiótico más el enzima sin inactivar es menor que la media menos dos veces la desviación típica de los halos obtenidos en los controles.

CAPITULO V: VALORACION DE LA ACTIVIDAD DE LAS BETA-LACTAMASAS.

A. METODO ACIDIMETRICO-ESPECTROFOTOMETRICO.

Basado en que la hidrólisis del anillo beta-lactámico produce en su ruptura grupos ácidos en cuya presencia varía de forma proporcional la absorbancia del rojo fenol.

Para ello se usó una solución de rojo fenol al 0'0025% en tampón fosfato 1 mM a pH 7.

El cambio en la absorbancia a 560 nm fue registrado mediante un espectrofotómetro durante 10 minutos a temperatura ambiente de 25°C, empleando 100 μ l. del extracto enzimático y una concentración de cada antibiótico de 0'1 mM. Se utilizó como sustrato patrón la Benzilpenicilina 0'1 mM ^{168,173}.

Estableciendo con los resultados la siguiente relación:

$$\text{micromoles/m.} = \frac{\Delta \text{ D.O./m.}}{\text{A. máx.} - \text{A. mín.}} \cdot V \cdot \frac{\text{no } \mu\text{gr./ml}}{\text{p.m.}}$$

V, es el volumen de la mezcla 3 ml.

El resultado son los micromoles de antibiótico hidrolizados por minuto, que estableciendo como valor 100 el de la Benzilpenicilina conocemos como tasa de hidrólisis. Cuando relacionamos la tasa de hidrólisis de cada cepa para cada antibiótico

con la cantidad de proteína de los 100 μ l. de extracto enzimático usado es lo que conocemos como Actividad Específica ¹⁶⁸.

*** Cuantificación de las proteínas por el método de Lwory ¹⁰.**

Es un método colorimétrico que depende de la cantidad de color obtenida de la reacción del reactivo Fenol de Folin-Ciocalteu con los residuos tirosilil de la proteína desconocida comparando el color de las muestras con los valores de color de una curva patrón de una proteína estandard, albúmina bovina. Este ensayo permite la cuantificación de valores de proteína 1-20 μ gr./ml.

El reactivo de Folin fue suministrado por Sigma, y se diluyó al 50% en agua destilada para su uso.

CAPITULO VI: CARACTERIZACION DE LAS BETA-LACTAMASAS POR SU PUNTO ISOELECTRICO.

Definimos como Punto Isoeléctrico (p.I.) para una proteína como aquel valor de pH al que la molécula no posee carga eléctrica y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico.

Se emplearon dos métodos:

1. El método clásico Vecoli y cols. ¹⁷⁸ en gel de poliacrilamida (165 x 215 x 2 mm.) que contiene pH de 10 a 3'5 anfolites.

Con una corriente constante de 1600 V y a 40°C. durante 90 minutos.

Los electrodos son tiras de papel de filtro de 2 mm. de espesor empapadas una con la solución catódica (de NaOH 1 M) y otra con la anódica (ácido ortofosfórico 1 M), tal que proporcionan un gradiente de pH de 9'5-3'5 y se disponen una en cada extremo del gel. Las diferentes muestras de extractos enzimáticos se disponen sobre uno de los extremos del gel.

Esta técnica consiste en hacer emigrar las proteínas en un campo eléctrico y en un medio que también contiene un gradiente de pH, de manera que las diferentes proteínas emigrarán hasta el punto en que coincida el pH con su punto isoelectrico (p.I.)

Finalmente, se procede al revelado del gel

mediante Nitrocefina (Glaxo) con el que se empapa un papel de filtro que colocaremos sobre el gel, apareciendo poco a poco las diferentes beta-lactamasas de cada extracto enzimático como bandas horizontales en el gel que se fotografian, para que posteriormente según el pH del punto del gel donde se encuentren conocer su p.I.

127.

2. El segundo método usado es una variación del Isoelectroenfoque rápido con Microelectroforesis por Phastsystem de Pharmacia ⁶⁴, también en gel de poliacrilamida con gradiente de pH de 3-9 y 500 V/cm.

En este caso disponemos 10 µl. de cada una de las muestras de extractos enzimáticos en los soportes de poliacrilamida y hacemos emigrar las proteínas sometidas a una diferencia de potencial. Junto con las muestras se dispusieron extractos enzimáticos de cepas que contenían beta-lactamasas de p.I. conocido.

Tras finalizar la electroforesis se revela con Nitrocefina como antes. Y se comparan las bandas que aparecen con las de los extractos enzimáticos de las cepas patrón.

Como cepas de referencia de p.I. conocido utilizamos las variantes de *E. coli* K12 J53-2 que tenían las siguientes beta-lactamasas:

Plásmido	Beta-lactamasa	p.I.
RIII	TEM-1	5'4
RP4	TEM-2	5'6

P453	SHV-1	7'7
PUD18	SHV-3	7'0
PUD20	SHV-2	7'7-7'6

CAPITULO VII: PROCEDIMIENTO DE DETECCION Y AISLAMIENTO DE PLASMIDOS DE VARIOS TAMAÑOS.

Se utilizaron dos métodos, el descrito por Kado C.I. y Liu S.T., 1981 y el método de lisis alcalina basada en el método de Birnboim y Doly (1979).

La diferencia fundamental entre estos dos métodos consiste en que mientras el método de Kado y Liu utiliza para la lisis la temperatura, el método de Birnboim y Doly utiliza la lisozima, ambos combinan a cada uno de estos agentes la acción del SDS, detergente iónico que completa la lisis. Ambos nos permiten un rápido aislamiento del ADN plasmídico a partir de las colonias bacterianas.

A. METODO DE KADO Y LIU ⁷²

Las cepas se cultivaron en 3 ml. de LB durante una noche a 30°C.

Tras la incubación, se centrifugaron las muestras en una microcentrífuga de tubos Eppendorf.

Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado bacteriano en 200 µl de tampón TAE. Y se le añadió luego a cada muestra 400 µl de la solución de lisis Kado y se incubaron a 55°C para todas excepto para las cepas de *E. coli* que fueron incubadas a 65°C.

Tras este tiempo de incubación se añadió 600 μ l. de la solución TEK-fenol-cloroformo, agitando hasta obtener una solución homogénea. Y se centrifugaron durante 7 minutos en la Microcentrifuga de tubos eppendorf.

Se recuperó de las muestras centrifugadas el sobrenadante que fue transferido a nuevos tubos eppendorf, a los que se les añadió 100 μ l. de solución de acetato sódico 3 M a pH 4,8. Se mantuvo los tubos en hielo durante 10 minutos y posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos.

Se recuperó el sobrenadante y se añadieron a cada tubo 800 μ l. de etanol al 96% a -20°C . Se mantuvieron 1 hora a -20°C y después se centrifugaron 5 minutos.

Se eliminó el sobrenadante y se añadió alcohol al 70% a temperatura ambiente. Tras centrifugar de nuevo durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el ADN de cada muestra fue resuspendido en 50 μ l. de agua bidestilada estéril y fría.

B. METODO DE LA LISIS ALCALINA ⁹³

A partir del sedimento constituido por las colonias de cultivos de 1 noche y una vez eliminado el exceso de líquido, se resuspende cada muestra en 100 μ l. de una solución helada constituida por:

- Glucosa 50 mM.
- EDTA 10 mM.
- Tris.Cl 25 mM (pH 8)
- Lisozima 4 μ gr./ml.

Las suspensiones se mantienen 5-10 minutos a temperatura ambiente.

Después se agregan 200 μ l. de una solución helada constituida por:

- 0'2 N de NaOH.
- SDS al 1%.

Se agitan las muestras, y se mantienen 5-10 minutos a 0°C.

Añadimos 150 μ l. de solución helada de acetato potásico a pH 4'8, 3 M de potasio y 5 M de acetato.

Y se mantienen de nuevo a 0°C durante 5-10 minutos. Después centrifugamos las muestras en la Microcentrífuga Eppendorf 5 minutos a 14000 r.p.m.

Y de forma igual al proceso descrito por Kado y Liu recogemos el sobrenadante y continuamos el procedimiento.

Los medios y reactivos utilizados fueron:

- Medios:

LB o medio de Luria-Bertani, cuya composición se describe en el capítulo de "Medios".

- Tampón:

Acetato-potásico 5 M respecto al acetato, y 3 M respecto al potasio que se prepara:

- 60 ml. de acetato potásico 5 M
- 11'5 ml. de ácido glacial acético.
- 28 ml. de agua.

C. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 94,149

El método estándar usado para separar, identificar, y purificar fragmentos de ADN es la electroforesis a través de geles de agarosa. La técnica es simple, rápida y capaz de separar fragmentos de ADN que no pueden ser separados adecuadamente por otros métodos. La localización del ADN en el gel puede ser determinada directamente: las bandas del ADN en el gel son teñidas con bajas concentraciones del colorante bromuro de etidio y se examina el gel con luz ultravioleta.

El grado de emigración de ADN a través de los geles de agarosa depende de cuatro parámetros fundamentales:

- El peso molecular de los fragmentos del ADN. Su emigración a través del gel es inversamente proporcional al $\log_{10}$ de su peso molecular.
- La concentración de agarosa en el gel. Existe una relación lineal entre el $\log_{10}$ de la movilidad electroforética del ADN y la concentración del gel.
- La corriente eléctrica aplicada. A bajos voltajes el grado de emigración del ADN es proporcional al voltaje aplicado. Sin embargo, cuando la corriente eléctrica aplicada es alta la movilidad de los fragmentos del ADN de alto peso molecular se incrementa de forma significativa.

El nivel de separación efectiva entre los

fragmentos del ADN disminuye al aumentar el voltaje. La máxima resolución se obtiene a no más de 5 V/cm.

- Composición del ADN y temperatura.

El comportamiento del ADN en geles de agarosa (en contraste con los geles de poliacrilamida) no se afecta por la composición del ADN o la temperatura. En general se realiza la electroforesis temperatura ambiente.

- Preparación del gel de agarosa.

Utilizamos geles al 0'7% de agarosa tipo I. Disolvemos la agarosa en el volumen correspondiente del tampón Tris.acetato (TAE) 0'04 M de Tris-acetato, y 0'002 M de EDTA. Calentamos la muestra hasta que se disuelva bien la agarosa. Y la vertemos en un recipiente que actúa como molde al que adaptamos una pieza (peine) que cuando solidifica el gel deja unos pocillos de una capacidad de unos 15 μ l.

En estos pocillos una vez solidificado el gel pondremos las muestras de ADN que han sido previamente mezcladas con un buffer de carga (azul de bromofenol al 0'25%) en una proporción 1:4.

Se incorporan las muestras a los diferentes pocillos en un volumen que dependerá de la capacidad de éstos. Y se someten a la corriente eléctrica a 100 V.

Para visualizar los fragmentos de ADN separados se sumerge el gel en una solución de Bromuro de etidio (0'5 μ gr./ml.) de 30 a 45 minutos a temperatura ambiente.

Los geles se fotografían con luz ultravioleta y una película Polaroid sensible de 3000 ASA y un filtro No. 6-23A.

Los tampones y reactivos usados fueron:

Tris-acetato, 0'04 M Tris-acetato y 0'002 M de EDTA, preparado en solución concentrada 50x:

- 242 gr. de Tris base.
- 242 grs. de Tris base.
- 57'1 ml. de ácido glacial acético.
- 100 ml. de EDTA 0'5 M a pH 8.

Tampón de carga tipo IV, compuesto por:

- 0'25% de azul de bromofenol.
- 40% (peso/volumen) de sacarosa en H₂O.

D. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL ADN PLASMIDICO.

La electroforesis en geles de agarosa es útil para la detección y caracterización del ADN de plásmidos presentes en aislamientos clínicos y cepas de laboratorio de microorganismos Gram-negativos. La estimación del peso molecular de los plásmidos a partir del grado de emigración del ADN en estos geles es equiparable con los resultados obtenidos por microscopía electrónica del ADN de plásmidos purificados por centrifugación en gradiente de densidad. El método consiste en establecer una curva patrón de la relación entre el $\log_{10}$ de la emigración relativa a través del gel en cm., de los plásmidos cuyos pesos moleculares son conocidos, frente al $\log_{10}$ del peso molecular de cada plásmido. Como ADN de peso molecular conocido utilizamos:

- Cepas de *Escherichia coli* : PUZ 1, PUZ 2, R40 A y V 517.

- El *Bacteriófago Lambda* cortado con la enzima de restricción HIM III. Para ello se incubó a 37°C una mezcla que contenía el enzima y al ADN del *Bacteriófago Lambda* en una proporción 3/5 en un tampón adecuado. Al cabo de 1 hora detenemos la reacción sometiendo la muestra a 70°C o a una solución de EDTA concentrado.

Esta relación de pesos moleculares es lineal. Y sobre ella calculamos en función de su emigración el peso molecular de los plásmidos de las cepas en estudio 102,152,189.

CAPITULO VIII: DETECCION DE PLASMIDOS QUE DETERMINAN RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS.

A. CURA DE PLASMIDOS ⁶

La demostración de que una resistencia es de origen plasmídico o no, supone en primer lugar "curar" o hacerle perder a la cepa en cuestión los plásmidos que tiene (conocidos por las técnicas mencionadas) y verificar si existe o no correlación entre la pérdida de resistencia y la desaparición del ADN plasmídico.

Esta técnica es particularmente útil en el caso de plásmidos no autotransferibles o no movilizables. Para ello utilizamos sustancias que inhiben la replicación plasmídica y por tanto, simultáneamente ocasionan la pérdida de las resistencias codificadas en estos plásmidos.

La eficacia de estos agentes varía según los plásmidos en estudio y del agente utilizado. Puesto que el criterio de "cura" es la pérdida de propiedad fenotípica transferida por el plásmido, es importante eliminar otros fenómenos tales como la mutación; ya que las sustancias empleadas para ello suelen ser mutagénicas, es importante tener en cuenta que:

- Una frecuencia elevada de pérdida (% respecto de la población inicial) es un argumento en contra de la mutación, lo mismo que la ausencia de la reversibilidad de la pérdida.

La técnica empleada consistió en:

- Inicialmente calculamos el valor de CMI de cada cepa en cuestión frente a cada agente curante.

- Se prepararon una serie de diluciones de cada agente curante en Infusión de Cerebro y Corazón estéril a pH 7'6 en un volumen de 2 ml. El pH es crucial en esta técnica.

- Inoculamos en las diluciones seriadas de cada agente 100 μ l. de una dilución de 10^{-3} de un cultivo de 18 horas de la cepa a estudiar. Y se incubaron a 43°C en la oscuridad (a fin de evitar los fenómenos de fotorreactivación que conducen a la reparación del ADN y por tanto, a la persistencia del plásmido).

- Aislar del tubo con una concentración del agente inmediatamente inferior al valor de CMI e inoculamos con 100 μ l. de ésta en Agar de MacConkey e incubamos a 37°C durante 18 horas.

Se utilizaron como agentes "curantes":

- Naranja de Acridina a 1000, 500, 250 y 125 μ gr/ml.

- Bromuro de etidio a 1000, 500, 250 y 125 μ gr/ml.

B. TRANSFERENCIA CONJUGATIVA DE PLASMIDOS ⁶

La conjugación bacteriana, como ya definimos es la transferencia de material genético durante un contacto celular entre bacterias. Para reproducir in vitro un proceso que ocurre de forma natural se utilizó como cepa receptora a *E. coli* K-12 resistente cromosómicamente al Acido Nalidíxico con CMI de 128 µgr/ml. (antibiótico al que son sensibles las cepas en estudio) y no portadora de plásmido alguno.

El protocolo consistió en:

1- Preparación de las cepas donadoras y de la cepa receptora. Para ello se cultivan en un medio nutritivo rico, en concreto se usó Caldo de Cerebro y Corazón distribuido en tubos en cantidades de 5 ml. y estéril. Se incubaron a 37°C con agitación continua durante una noche, para obtener una densidad de 5×10^8 UFC/ml.

2- Puesto que la mayor eficacia en la transferencia se consigue en la fase de crecimiento exponencial de la donadora, se mezclan 50 µl. de la cepa donadora con 100 µl. de la receptora en placas conteniendo Agar de Cerebro y Corazón, y se incuban a 37°C durante una noche.

3- Tras este tiempo se diluye todo el cultivo en 10 ml. de agua destilada estéril y se dispensan 0'1 ml. de cada inóculo así preparado en una placa con medio de selección, extendiendo el inóculo con una pipeta Pasteur estéril adecuada para

no romper el agar y se incubó a 37°C durante 18 horas.

4- Medio de selección. Este medio es Agar de MacConkey que contiene el antibiótico al que la cepa de receptora es resistente (en una concentración inferior a su CMI) y también al antibiótico al que cada cepa donadora en cuestión sea resistente (en una concentración inferior a su CMI), los antibióticos utilizados fueron:

- Ampicilina	64 µgr./ml.
- Cefalotina	100 µgr./ml.
- Cefoxitina	50 µgr./ml.
- Ceftazidima	32 µgr./ml.
- Ceftizoxima	32 µgr./ml.
- Ceftriaxona	32 y 8 µgr./ml.
- Cefotaxima	32 µgr./ml.
- Aztreonam	32 y 8 µgr./ml.

Cuando mediante la conjugación se ha transferido material genético que codificaba resistencia a los antibióticos estudiados aparecerán colonias de transconjugantes en las placas de selección.

C. TRANSFORMACION DE ESCHERICHIA COLI
POR ADN PLASMIDICO MEDIANTE EL
PROCEDIMIENTO DEL CLORURO CALCICO.

Es un método frecuentemente usado para transformar bacterias con ADN plasmídico descrito por Mandel y Higa en 1972. La mayoría de las especies bacterianas precisan para que la transformación sea posible un proceso que las haga competentes. Mandel y Higa demostraron que esta competencia puede ser conseguida artificialmente. Para ello se utiliza una cepa sin sistema de restricción lo que garantiza una mayor eficacia, la *E. coli* HB101, que se hace competente a través de someterla a un shock térmico (de 0°C a 42°C) que quizás actúe desorganizando la estructura de la membrana externa para permitir la penetración del ADN y ello en presencia de cationes divalentes a una elevada concentración, el papel de estos iones es facilitar la adsorción del ADN a la superficie bacteriana por la neutralización de las cargas negativas de la molécula de ácido desoxirribonucleico a transferir ⁶.

146. El proceso consiste en ⁹⁵:

1. Mezclar 100 ml. de LB con 1 ml. de un cultivo de una noche de la cepa de *Escherichia coli* HB 101 y se incuba a 37°C en continua agitación hasta que alcance una turbidez de 5×10^7 UFC/ml.

2. Se introduce el cultivo en hielo durante 10 minutos y se centrifuga posteriormente a 4000g durante 5 minutos a 4°C.

3. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las bacterias en una solución estéril y fría de CaCl 50 mM y de Tris.Cl 10 mM a pH 8.

4. Dicha suspensión bacteriana se mantiene a 0°C durante 15 minutos, y se centrifuga posteriormente a 4000g 5 minutos a 4°C.

5. Se desecha de nuevo el sobrenadante y se resuspende el material en 1/15 del volumen original pero de solución 50 mM de CaCl y 10 mM de Tris.Cl a pH 8. y se distribuye en alícuotas de 0.2 ml. en tubos previamente enfriados. Se guardarán a 4°C durante 12-24 horas.

6. Tras las 24 horas a 4°C se añade el ADN en TAE a las diferentes alícuotas y se incuban 30 minutos a 0°C con 40 ng de ADN.

7. Se incuba a 42°C durante 2 minutos.

8. Se añade 1 ml. de LB a cada tubo y se incuba a 37°C durante una hora sin agitación.

9. A continuación se verifica que la receptora que hemos usado, *Escherichia coli* HB 101, ha adquirido la resistencia mediante la extensión de 50 µl. de la muestra sobre la superficie de diferentes placas de agar conteniendo los antibióticos cuya resistencia queremos ver si se ha transmitido por transformación en concentraciones subinhibitorias.

10. Se dejan a temperatura ambiente hasta que la superficie del agar está seca. Y se incuban las placas invertidas a 37°C, apareciendo las colonias transformantes en 12-16 horas.

CAPITULO IX: METODOS DE INDUCCION

DE LAS BETA-LACTAMASAS.

La regulación de la síntesis de beta-lactamasas es diferente entre la especies bacterianas, y según ello se clasifican en dos grupos. En algunas especies la beta-lactamasas son producidas a bajo nivel (por ejemplo, *E. coli*) y su síntesis no se afecta por la presencia de antibióticos beta-lactámicos. En otras, (por ejemplo, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* y *Pseudomonas aeruginosa*), las beta-lactamasas son sintetizadas a bajo nivel pero son inducidas en su expresión a niveles 100 veces superior cuando las células crecen en la presencia de agentes beta-lactámicos. Y ligada a esta inducibilidad está la capacidad de la mutación que conduce a la síntesis de estas beta-lactamasas en altos niveles y de forma constitutiva ^{50,84}.

La Ampicilina, cefalosporinas de 1ª generación, Cefoxitina e Imipenem son fuertes inductores para la mayoría de las cepas ^{32,57,79,82,90,104,105,158,159}.

A. OBTENCION DE EXTRACTOS ENZIMATICOS

INDUCIDOS Y NO INDUCIDOS.

La obtención de extractos enzimáticos inducidos se realizó con cultivos en agitación continua de una noche de las diferentes cepas en 200 ml. de Caldo de Corazón y Cerebro estéril. Añadimos el inductor, la Cefoxitina, en una concentración subinhibitoria al cultivo de cada cepa en fase exponencial de crecimiento, y se continuó la incubación 2 horas más a 37°C, posteriormente se centrifugaron a 4000 r.p.m. a 4°C durante 30 minutos. Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos las células depositadas en el fondo del tubo en tampón fosfato 0'1 M a pH 7 y de nuevo centrifugamos. Tras dos lavados el depósito fue resuspendido en tampón fosfato 1 mM y las células fueron rotas mediante ultrasonidos. Los extractos crudos así obtenidos se centrifugaron a 4°C y 20.000 r.p.m. durante 30 minutos, guardando el sobrenadante a -40°C. También se probó la inducción con Benzilpenicilina a una concentración estandard de 100 µgr./ml. para todas las cepas (el valor de CMI para las cepas inducidas frente a la Benzilpenicilina fue superior a 512 µgr./ml.). Y se obtuvieron de idéntica forma los extractos enzimáticos ^{83,115,128}.

Para la obtención de extractos enzimáticos no inducidos el proceso es igual pero sin añadir el inductor ⁸³.

B. ESTUDIO DEL EFECTO INDUCTOR EN LA
SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA A LOS
ANTIBIOTICOS.

- Inducción en el Antibiograma por el Método de Difusión en agar ³⁹.

Se hicieron placas con Agar de Mueller-Hinton que contenían concentraciones subinhibitorias de antibióticos de probado efecto inductor.

Cefoxitina a una concentración de 1 y 32 μ gr./ml. según el valor de CMI de cada cepa estudiada frente a este antibiótico.

Imipenem en una concentración de 0,03 μ gr./ml.

Estos antibióticos en tales concentraciones fueron incorporados a diferentes matraces conteniendo el Agar de Mueller-Hinton a 50°C, previamente esterilizado por autoclave a 120°C durante 20 minutos.

De igual forma que en el Antibiograma por el método de difusión, que ya hemos descrito se inocularán las placas con las cepas en estudio procedentes de cultivos de 18 horas ¹¹.

- Inducción en el Antibiograma por el Método de Dilución en agar ¹³⁹.

El método consiste en incorporar una concentración estándar e igual para todas las placas de inductor.

Cada una de las cuales llevará además el antibiótico respecto del que se quiere ver el efecto inductor sobre los valores de CMI de las cepas en estudio.

Las cantidades incorporadas de los diferentes inductores a cada placa fueron tal que la concentración de éstos en todas las placas será la misma:

- Cefoxitina en una concentración de 1 y 32 $\mu\text{gr./ml.}$ según el valor de CMI de cada cepa en estudio frente a este antibiótico.

- Imipenem en una concentración de 0'03 $\mu\text{gr./ml.}$

Asimismo, se incorporaron los antibióticos en solución a las placas, a la vez que los inductores, pero en concentraciones decrecientes en base 2.

De manera que las combinaciones que se estudiaron fueron:

- Cefoxitina + Cefalotina.
- Cefoxitina + Ceftazidima.
- Cefoxitina + Cefotaxima.
- Cefoxitina + Ceftriaxona.
- Cefoxitina + Ceftizoxima.
- Cefoxitina + Aztreonam.

- Imipenem + Cefalotina.
- Imipenem + Ceftazidima.
- Imipenem + Cefotaxima.
- Imipenem + Ceftriaxona.
- Imipenem + Ceftizoxima.
- Imipenem + Aztreonam.

Por el mismo método estudiamos el efecto de la Penicilina a una concentración fija de 10 μ gr./ml. en los valores de CMI frente a las distintas cefalosporinas.

Los inóculos con una turbidez del nº 0'5 del patrón McFarland, se incorporaron a las placas mediante un replicador de Steer, y las placas así inoculadas se incubaron a 37°C durante 22 horas. La CMI fue la concentración más baja en la que no hubo crecimiento bacteriano apreciable ¹⁸².

CAPITULO X: METODO DE SELECCION DE

MUTANTES DESREPRIMIDOS 7. 186

Mutantes, que muestren una expresión constitutiva (desreprimida) o no-inducible de Beta-lactamasas cromosómicas tipo I pueden obtenerse a partir de aislamientos clínicos de diversas especies de enterobacterias.

Las subpoblaciones se seleccionaron por el método descrito por Ashby y col. (1987), para ello se escogen cepas de enterobacterias sensibles a las cefalosporinas de 3ª generación procedentes de aislamientos clínicos y que conozcamos que poseen beta-lactamasas Clase I.

Se preparan tandas de tubos con medio nutritivo LB con concentraciones de Cefoxitina y de Imipenem de 1/2 CMI y de valor igual a la CMI para cada cepa.

Un cultivo de una noche de cada una de estas cepas se diluye 1:100 cada uno de estos tubos con medio LB y antibiótico. Todos los tubos así preparados se incuban a 37°C con agitación continua durante 8 horas.

Las bacterias que crecieron en estos medios se sembraron en placas de Agar de MacConkey sin antibiótico y se incubaron a 37°C durante 18 horas, para hacerles el Antibiograma por el método de Dilución en Agar a las diferentes cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación ensayadas en este estudio, así como al Imipenem y al Aztreonam.

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

El objetivo de esta tesis ha sido, conocer qué patrones de resistencia presentaban las cepas de origen hospitalario en los géneros *Citrobacter*, *Escherichia* y *Morganella*. Además, ello determinaba una labor de atención a la posible aparición de cepas que presentasen una inusual resistencia a las cefalosporinas y conocer qué mecanismos la producían.

Para el estudio se partió de las cepas de enterobacterias aisladas de diferentes tipos de muestras clínicas procedentes de distintos servicios del Hospital Insular de Las Palmas.

Las cepas recogidas en los tres géneros mencionados, siguieron una distribución típica de enterobacterias oportunistas: un alto porcentaje procedían de cultivos de orina (todos ellos con > 100.000 UFC/ml.), y en menor proporción provenían de muestras de tracto respiratorio superior, y muestras de exudado de heridas, además de otros orígenes menos frecuentes. Ninguno de los aislamientos de *Escherichia coli* procedía de muestras de heces, y todas las cepas eran patógenos oportunistas. Gráficos 1, 2 y 3.

Siguiendo las características definidas en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey 17,108,130,131.

Así identificamos:

- 32 cepas del género *Citrobacter*.
- 90 cepas del género *Escherichia*, especie

Escherichia coli.

- 40 cepas del género *Morganella*, especie

Morganella morganii.

Estas cepas se identificaron por el método bioquímico API-20E tras 18 horas de incubación, tal y como describimos en el capítulo I de Material y Métodos.

De ellas se seleccionaron 6 cepas para estudiar las características y el origen de sus resistencias a los antibióticos beta-lactámicos.

GRAFICO 1. TIPO DE MUESTRAS CLINICAS.
En aislamientos de *Citrobacter* spp.

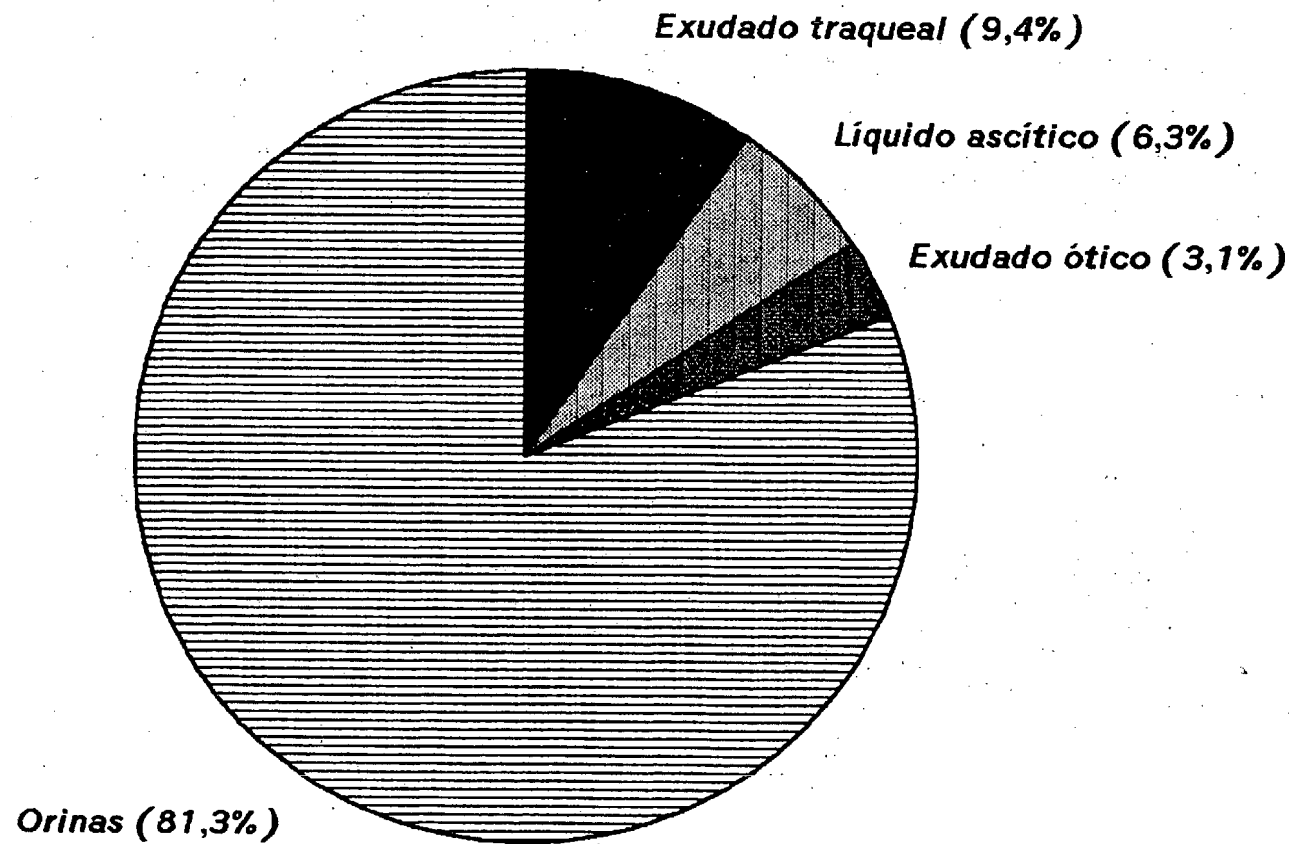


GRAFICO 2. TIPO DE MUESTRAS CLINICAS.
En aislamientos de *Escherichia coli*.

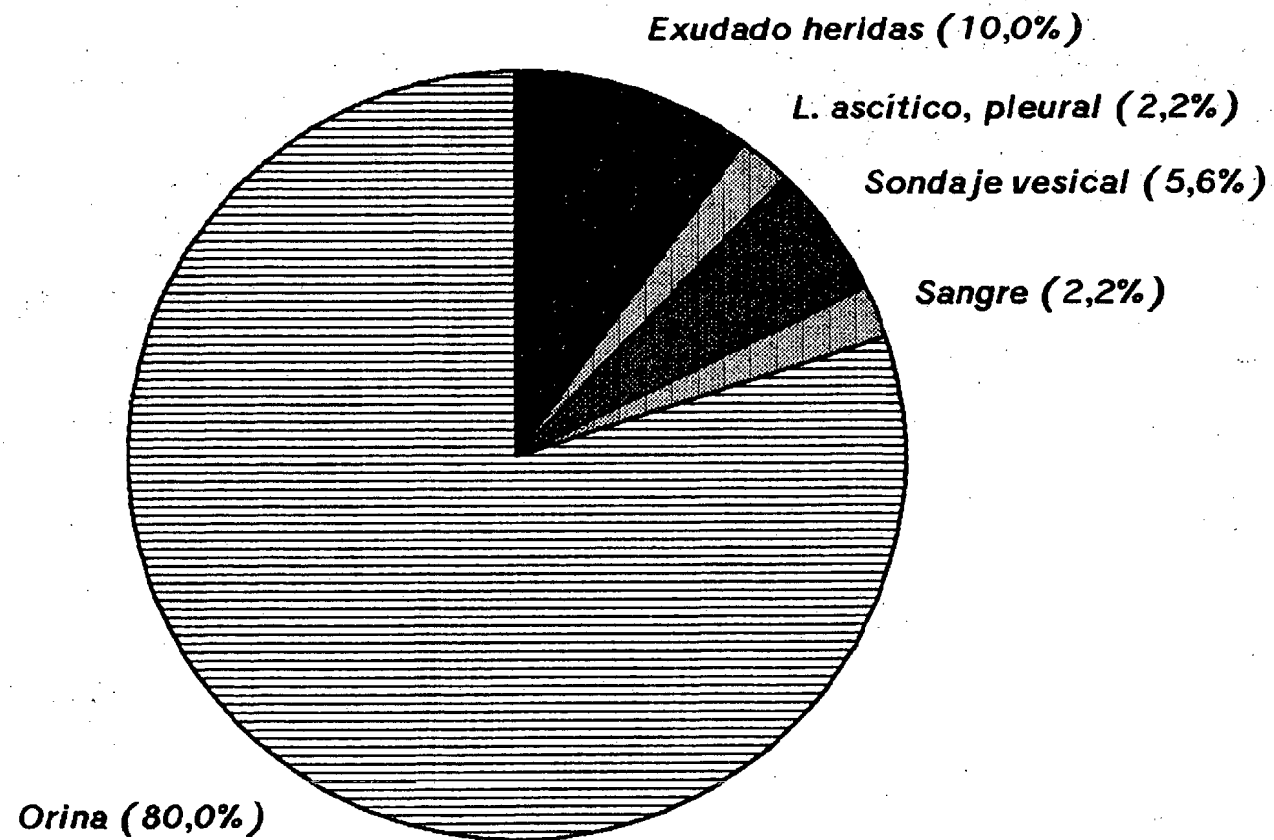
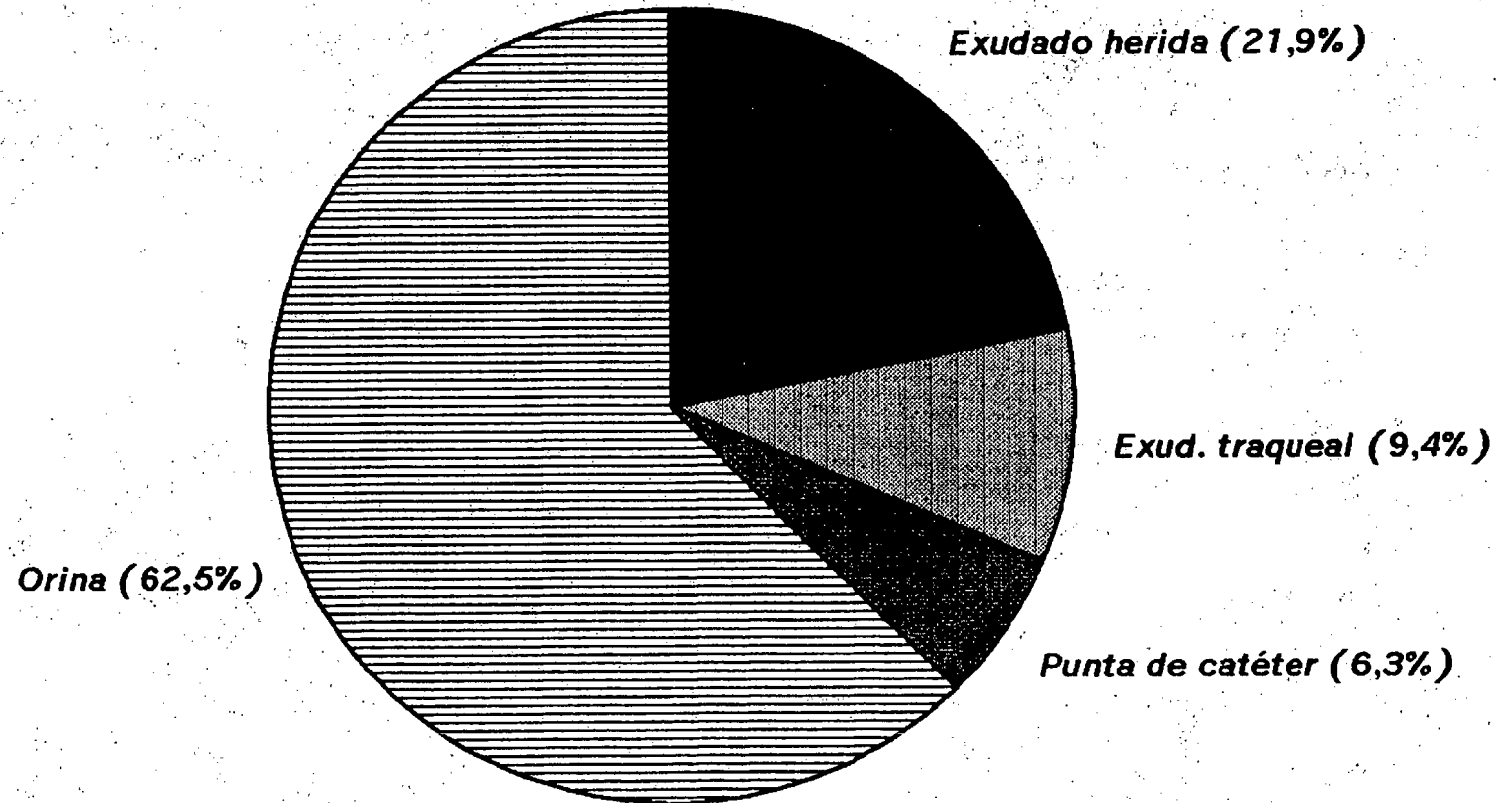


GRAFICO 3. TIPO DE MUESTRAS CLINICAS.
En aislamientos de *Morganella morganii*



IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS

POR METODO API-20E.

CEPA 1A.

TEST	SUSTRATO	REACCION ENZIMATICA	RESULTADO
ONPG	Orto-nitro-fenil Galactósido	Beta-galactosidasa	+
ADH	Arginina	Arginina dihidrolasa	-
LDC	Lisina	Lisina descarboxilasa	-
ODC	Ornitina	Ornitina descarboxilasa	-
CIT	Citrato sódico	Uso del citrato	-
H2S	Tiosulfato sódico	Producción de H2S	+
URE	Urea	Ureasa	-
TDA	Triptófano	Triptófano desaminasa	-
IND	Triptófano	Producción de indol	-
VP	Piruvato sódico	Producción de acetoina	-
GEL	Gelatina de Kohn	Gelatinasa	-
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación	+
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación	+
INO	Inositol	Fermentación/oxidación	-
SOR	Sorbitol	Fermentación/oxidación	+
RHA	Ramnosa	Fermentación/oxidación	-
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación	+
MEL	Melobiosa	Fermentación/oxidación	+
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación	-
ARA	Arabinosa	Fermentación/oxidación	+

Test de Citocromo oxidasa -

Crecimiento en Medio Agar MacConkey +

Por tanto, es Enterobacteria del Género *Citrobacter* de la especie
Citrobacter freundii.

IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS

POR METODO API-20E.

CEPA 2A.

TEST	SUSTRATO	REACCION ENZIMATICA	RESULTADO
ONPG	Orto-nitro-fenil Galactósido	Beta-galactosidasa	+
ADH	Arginina	Arginina dihidrolasa	-
LD	Lisina	Lisina descarboxilasa	-
ODC	Ornitina	Ornitina descarboxilasa	-
CIT	Citrato sódico	Uso del citrato	-
H2S	Tiosulfato sódico	Producción de H2S	+
URE	Urea	Ureasa	-
TDA	Triptófano	Triptófano desaminasa	-
IND	Triptófano	Producción de indol	+
VP	Piruvato sódico	Producción de acetoina	-
GEL	Gelatina de Kohn	Gelatinasa	-
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación	+
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación	+
INO	Inositol	Fermentación/oxidación	-
SOR	Sorbitol	Fermentación/oxidación	+
RHA	Ramnosa	Fermentación/oxidación	+
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación	+
MEL	Melobiosa	Fermentación/oxidación	+
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación	+
ARA	Arabinosa	Fermentación/oxidación	+

Test de Citocromo oxidasa

-

Crecimiento en Medio Agar MacConkey

+

Por tanto, es una Enterobacteria del Género *Escherichia*, de la especie *Escherichia coli*.

IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS

POR METODO API-20E.

CEPA 3A.

<u>TEST</u>	<u>SUSTRATO</u>	<u>REACCION ENZIMATICA</u>	<u>RESULTADO</u>
ONPG	Orto-nitro-fenil Galactósido	Beta-galactosidasa	-
ADH	Arginina	Arginina dihidrolasa	-
LDC	Lisina	Lisina descarboxilasa	-
ODC	Ornitina	Ornitina descarboxilasa	+
CIT	Citrato sódico	Uso del citrato	-
H2S	Tiosulfato sódico	Producción de H2S	-
URE	Urea	Ureasa	+
TDA	Triptófano	Triptófano desaminasa	+
IND	Triptófano	Producción de indol	+
VP	Piruvato sódico	Producción de acetoina	-
GEL	Gelatina de Kohn	Gelatinasa	-
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación	+
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación	-
INO	Inositol	Fermentación/oxidación	-
SOR	Sorbitol	Fermentación/oxidación	-
RHA	Ramnosa	Fermentación/oxidación	-
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación	-
MEL	Melobiosa	Fermentación/oxidación	-
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación	-
ARA	Arabinosa	Fermentación/oxidación	-

Test de Citocromo oxidasa

-

Crecimiento en Medio Agar MacConkey

+

Por tanto, es una Enterobacteria del género *Morganella*, de la especie *Morganella morganii*.

IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS

POR METODO API-20E.

CEPA 1B.

TEST	SUSTRATO	REACCION ENZIMATICA	RESULTADO
ONPG	Orto-nitro-fenil Galactósido	Beta-galactosidasa	+
ADH	Arginina	Arginina dihidrolasa	-
LDC	Lisina	Lisina descarboxilasa	-
ODC	Ornitina	Ornitina descarboxilasa	-
CIT	Citrato sódico	Uso del citrato	-
H2S	Tiosulfato sódico	Producción de H2S	+
URE	Urea	Ureasa	-
TDA	Triptófano	Triptófano desaminasa	-
IND	Triptófano	Producción de indol	-
VP	Piruvato sódico	Producción de acetoina	-
GEL	Gelatina de Kohn	Gelatinasa	-
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación	+
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación	+
INO	Inositol	Fermentación/oxidación	-
SOR	Sorbitol	Fermentación/oxidación	+
RHA	Ramnosa	Fermentación/oxidación	+
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación	+
MEL	Melobiosa	Fermentación/oxidación	+
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación	-
ARA	Arabinosa	Fermentación/oxidación	+

Test de Citocromo oxidasa -

Crecimiento en Medio Agar MacConkey +

Por tanto, es una Enterobacteria del género *Citrobacter*, de la especie *Citrobacter freundii*.

IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS

POR METODO API-20E.

CEPA 2B.

TEST	SUSTRATO	REACCION ENZIMATICA	RESULTADO
ONPG	Orto-nitro-fenil Galactósido	Beta-galactosidasa	+
ADH	Arginina	Arginina dihidrolasa	-
LDC	Lisina	Lisina descarboxilasa	+
ODC	Ornitina	Ornitina descarboxilasa	+
CIT	Citrato sódico	Uso del citrato	+
H2S	Tiosulfato sódico	Producción de H2S	-
URE	Urea	Ureasa	-
TDA	Triptófano	Triptófano desaminasa	-
IND	Triptófano	Producción de indol	+
VP	Piruvato sódico	Producción de acetoina	+
GEL	Gelatina de Kohn	Gelatinasa	-
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación	+
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación	+
INO	Inositol	Fermentación/oxidación	-
SOR	Sorbitol	Fermentación/oxidación	+
RHA	Ramnosa	Fermentación/oxidación	+
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación	+
MEL	Melobiosa	Fermentación/oxidación	+
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación	+
ARA	Arabinosa	Fermentación/oxidación	+

Test de Citocromo oxidasa -

Crecimiento en Medio Agar MacConkey +

Por tanto, es una Enterobacteria del género *Escherichia*, de la especie *Escherichia coli*.

IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS

POR METODO API-20E.

CEPA 3B.

TEST	SUSTRATO	REACCION ENZIMATICA	RESULTADO
ONPG	Orto-nitro-fenil Galactósido	Beta-galactosidasa	-
ADH	Arginina	Arginina dihidrolasa	-
LDC	Lisina	Lisina descarboxilasa	-
ODC	Ornitina	Ornitina descarboxilasa	+
CIT	Citrato sódico	Uso del citrato	-
H2S	Tiosulfato sódico	Producción de H2S	-
URE	Urea	Ureasa	+
TDA	Triptófano	Triptófano desaminasa	+
IND	Triptófano	Producción de indol	+
VP	Piruvato sódico	Producción de acetoina	-
GEL	Gelatina de Kohn	Gelatinasa	-
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación	+
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación	-
INO	Inositol	Fermentación/oxidación	-
SOR	Sorbitol	Fermentación/oxidación	-
RHA	Ramnosa	Fermentación/oxidación	-
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación	-
MEL	Melobiosa	Fermentación/oxidación	-
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación	-
ARA	Arabinosa	Fermentación/oxidación	-

Test de Citocromo oxidasa

-

Crecimiento en Medio Agar MacConkey

+

Por tanto, es una Enterobacteria del género *Morganella*, de la especie *Morganella morganii*.

De las cepas aisladas e identificadas como enterobacterias de alguno de los mencionados géneros, se estudió por medio del método de dilución en agar sus susceptibilidades a diversas cefalosporinas, así como a dos nuevas quinolonas, tal como se describe en el Capítulo III de Material y Métodos. Los resultados se presentan en las Tablas I, II, III.

En las cepas de *Citrobacter spp.* fueron sensibles en un 90 % a las cefalosporinas: Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX), Ceftizoxima (ZOX), Cefpiroma (HR-810), Ceftriaxona (CRO); así como a un nuevo monobactamo: Aztreonam (ATM); a un nuevo peneme: Imipenem (IPM) y a nuevas quinolonas: Ciprofloxacina (CIP), Fleroxacina (FRX). Consideramos como valor de CMI a partir del que hay resistencia 32 µgr./ml. para estos antibióticos y frente a enterobacterias ¹¹.

En las cepas de *Escherichia coli* sus valores de CMI 90 fueron < 1 µgr./ml. para las cefalosporinas: CAZ, CTX, ZOX, CRO, así como al ATM, IPM, CPX y FRX. Y por tanto, sensibles en un 90% a estos antibióticos.

Igualmente las cepas aisladas de *Morganella morganii* fueron también sensibles a estos antibióticos, con valores de CMI 90, < 0'5 µgr./ml. para CTX, HR-810, CPX y FRX. Valores de CMI 90 < 2 para CAZ, ZOX, CRO, ATM e IPM.

Estos resultados son equiparables a los de otros autores en estudios frente a cepas de origen hospitalario ^{3,34,42}.

TABLA I.

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS SUSCEPTIBILIDADES A
DIVERSOS ANTIBIOTICOS EN 32 AISLAMIENTOS DE Citrobacter spp.**

ANTIBIOTICO	C.M.I.-50	C.M.I.-90	RANGO
CEFALOTINA	16	4096	16-4096
CEFOXITINA	16	256	2-512
CEFUROXIMA	4	256	4-512
CEFTAZIDIMA	1	2	0,06-256
CEFTIZOXIMA	0,06	0,12	0,06-256
CEFOTAXIMA	0,06	0,25	0,06-64
CEFTRIAXONA	0,5	2	0,06-256
CEFPIROMA	0,06	0,06	0,06-4
AZTREONAM	0,06	2	0,06-64
IMIPENEM	0,25	0,5	0,06-0,5
CIPROFLOXACINA	0,06	0,06	0,06-0,12
FLEROXACINA	0,06	0,12	0,06-0,12

Valores de CMI en μ gr./ml.

TABLA II.
ESTUDIO COMPARATIVO DE SUSCEPTIBILIDADES A
DIVERSOS ANTIBIOTICOS EN 90 AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli*.

ANTIBIOTICO	C.M.I.-50	C.M.I.-90	RANGO
CEFALOTINA	8	32	8-4096
CEFOXITINA	4	4	2-512
CEFUROXIMA	4	16	1-256
CEFTAZIDIMA	1	1	0,06-256
CEFTIZOXIMA	0,06	0,06	0,06-64
CEFOTAXIMA	0,06	0,25	0,06-32
CEFTRIAXONA	0,5	0,5	0,06-32
CEFPIROMA	0,06	0,06	0,06-2
AZTREONAM	0,06	0,06	0,06-32
IMIPENEM	0,12	0,25	0,06-1
CIPROFLOXACINA	0,06	0,12	0,06-0,25
FLEROXACINA	0,06	0,12	0,06-0,5

Valores de CMI en $\mu\text{gr.}/\text{ml.}$

TABLA III.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS SUSCEPTIBILIDADES A DIVERSOS
ANTIBIOTICOS DE 40 AISLAMIENTOS DE *Morganella morganii*.

ANTIBIOTICO	C.M.I.50	C.M.I.90	RANGO
CEFALOTINA	4096	4096	4-8192
CEFOXITINA	8	128	2-512
CEFUROXIMA	32	128	2-512
CEFTAZIDIMA	0,12	1	0,06-256
CEFTIZOXIMA	0,06	2	0,06-128
CEFOTAXIMA	0,06	0,12	0,06-64
CEFTRIAXONA	0'12	0'5	0'12-8
CEFPIROMA	0,06	0,5	0,06-0,5
AZTREONAM	0,06	2	0,06-64
IMIPENEM	0,5	2	0,5-2
CIPROFLOXACINA	0,06	0,06	0,06-0,12
FLEROXACINA	0,06	0,25	0,06-0,25

Valores de CMI en μ gr./ml.

43,44,45,52,63,74,110,117,154,175,177,183,190.

La única diferencia notable se observó en el conjunto de cepas de *Citrobacter spp.* respecto a CAZ, CTX y CRO para los que los autores distinguían entre:

Cepas de *Citrobacter freundii* que presentaban valores de CMI 90 $>16 \mu\text{gr./ml.}$

Cepas de *Citrobacter diversus* cuya CMI 90 fue $< 2 \mu\text{gr./ml.}$

La razón de que en nuestro caso el valor de CMI 90 fuese para CAZ y CRO $< 2 \mu\text{gr./ml.}$ es que incluimos en el mismo grupo todas las cepas del género *Citrobacter*, que incluyen *C. freundii*, *C. diversus* y *C. amalonaticus* con lo que el % de cepas sensibles influyó notablemente en el valor final de la CMI 90. Además de explicar la dispersión del RANGO 0'06-256.

No ocurrió igual con la cefalosporina de 1ª generación, Cefalotina CR, ni con las de 2ª generación, Cefoxitina (FOX) y Cefuroxima (CXM), obteniéndose que:

Las cepas de *Citrobacter spp.* se mostraron muy resistentes a la CR, FOX y CXM, como vemos por sus valores de CMI 90 $> 128 \mu\text{gr./ml.}$ 44,45,59,166.

Las cepas de *Escherichia coli* se mostraron también resistentes a la CR y menos a la CXM y FOX 59,166.

Las cepas de *Morganella morganii* mostraron para la CR un valor de CMI 90 de 4096 $\mu\text{gr./ml.}$, y de 128 $\mu\text{gr./ml.}$

para FOX y CXM, por tanto resistentes en un 90% a dichas cefalosporinas 44,45,59,166.

Encontramos algunas cepas con patrones de resistencia diferentes a los observados en la generalidad de las cepas de las especies respectivas, en las que además estudiamos su susceptibilidad por Antibiograma por el método de difusión en agar, tal como describimos en el capítulo III de Material y Métodos Tablas IV, V y VI.

Hay una buena concordancia entre los valores de CMI para cada antibiótico y el halo de inhibición en mm. que le corresponde, excepto para los valores de los halos de inhibición que se encuadran en la categoría llamada intermedia; así, en la cepa *Escherichia coli* 2A, que para ZOX y CTX tiene unos halos que son de 16 mm., sin embargo sus valores de CMI son de 128 y 64 μ gr./ml. respectivamente. Asimismo para ATM su halo es de 18 mm. lo que indicaría susceptibilidad, y sin embargo su CMI es de 32 μ gr./ml. Esto es consecuencia de la antes mencionada categoría "intermedia" y su significación:

Supone que la cepa en cuestión presenta subpoblaciones que son unas más resistentes que otras al mismo antibiótico y por ello la misma cepa puede presentar valores diferentes, de sensibilidad o de resistencia muy cercanos al límite⁹.

TABLA IV.
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS
EN LA CEPA DE *Citrobacter freundii* 1A.

Antibiótico	CMI en µgr./ml	Halos de inhibición en mm
CEFALOTINA	4096	0
CEFOXITINA	512	0
CEFUROXIMA	512	0
CEFTAZIDIMA	256	0
CEFTIZOXIMA	512	0
CEFOTAXIMA	64	12
CEFTRIAXONA	256	9
CEFPIROMA	2	26
AZTREONAM	64	12
IMIPENEM	1	27
CARBENICILINA	256	0
CLOXACILINA	1024	0
MEZLOCILINA	64	14

TABLA V.
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS
EN LA CEPA DE *Escherichia coli* 2A.

Antibiótico	CMI en µgr./ml	Halos de inhibición en mm
CEFALOTINA	4096	0
CEFOXITINA	512	0
CEFUROXIMA	1024	0
CEFTAZIDIMA	256	0
CEFTIZOXIMA	128	9
CEFOTAXIMA	64	16
CEFTRIAXONA	32	14
CEFPIROMA	2	20
AZTREONAM	32	18
IMIPENEM	1	28
CARBENICILINA	256	10
CLOXACILINA	512	0
MEZLOCILINA	32	9

TABLA VI.
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS
EN LA CEPA DE *Morganella morganii* 3A.

Antibiótico	CMI en µgr./ml	Halos de inhibición en mm
CEFALOTINA	8192	0
CEFOXITINA	512	0
CEFUROXIMA	256	0
CEFTAZIDIMA	256	0
CEFTIZOXIMA	128	0
CEFOTAXIMA	64	9
CEFTRIAXONA	16	16
CEFPIROMA	0'5	28
AZTREONAM	64	12
IMIPENEM	1	30
CARBENICILINA	64	14
CLOXACILINA	512	0
MEZLOCILINA	128	12

Los patrones de resistencia que presentan estas cepas son los descritos por otros autores en cepas productoras de cefalosporinas a un alto nivel ^{12,30,32,35,59,71}; resistentes a las cefalosporinas de 1ª, 2ª y 3ª generación y también a las ureidopenicilinas ¹⁹¹, sensibles a HR-810 ^{13,50,75,109,164}, sensibles a la acción del Imipenem ⁷; en *E. coli* muy resistentes a la combinación comercial Amoxicilina + A. Clavulánico, y a la Ampicilina, además de su resistencia a carboxi y ureidopenicilinas. Todo ello en contraste con la susceptibilidad a las cefalosporinas de amplio espectro y al Aztreonam de aquellas cepas sensibles de la misma especie ^{35,177}.

Se hizo un estudio comparativo con los patrones de resistencia de otras tres cepas sensibles de las mismas especies, a las que se dio el nombre de:

Citrobacter freundii 1B.

Escherichia coli 2B.

Morganella morganii 3B.

Estas cepas del que llamaremos grupo B, presentaban un patrón de sensibilidad a las cefalosporinas de 3ª generación, Aztreonam e Imipenem, pero que eran resistentes a las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación y a las penicilinas ensayadas. Las cepas 1B y 3B además son sensibles a Carbenicilina y Mezlocilina (las que luego veremos son cepas con beta-lactamasas inducibles) no ocurre lo mismo con la cepa 2B que es resistente a ellas ¹⁹¹ Tablas VII, VIII y IX.

TABLA VII.
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS
EN LA CEPA DE *Citrobacter freundii* 1B

Antibiótico	CMI en µgr./ml.	Halos de inhibición en mm
CEFALOTINA	2048	0
CEFOXITINA	512	0
CEFUROXIMA	4	22
CEFTAZIDIMA	0,25	26
CEFTIZOXIMA	0,06	30
CEFOTAXIMA	0,12	36
CEFTRIAXONA	0,12	32
CEFPIROMA	0,06	35
AZTREONAM	0,06	32
IMIPENEM	0,12	30
CARBENICILINA	16	22
CLOXACILINA	512	0
MEZLOCILINA	2	24

TABLA VIII.

SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS

EN LA CEPA DE *Escherichia coli* 2B.

Antibiótico	CMI en µgr./ml	Halos de inhibición en mm
CEFALOTINA	128	13
CEFOXITINA	2	25
CEFUROXIMA	4	20
CEFTAZIDIMA	0'25	30
CEFTIZOXIMA	0'06	36
CEFOTAXIMA	0'25	32
CEFTRIAXONA	0'12	33
CEFPIROMA	0'12	35
AZTREONAM	0'06	34
IMIPENEM	0'12	35
CARBENICILINA	64	0
CLOXACILINA	512	0
MEZLOCILINA	256	0

TABLA IX.

SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS
EN LA CEPA DE *Morganella morganii* 3B.

Antibióticos	CMI en µgr./ml	Halos de inhibición en mm
CEFALOTINA	2048	0
CEFOXITINA	32	17
CEFUROXIMA	128	11
CEFTAZIDIMA	0'5	33
CEFTIZOXIMA	0'5	39
CEFOTAXIMA	0'06	40
CEFTRIAXONA	0'12	41
CEFPIROMA	2	24
AZTREONAM	0'5	36
IMIPENEM	2	28
CARBENICILINA	8	29
CLOXACILINA	512	0
MEZLOCILINA	0'5	35

Una vez seleccionadas las cepas resistentes a las nuevas cefalosporinas, nuestro siguiente objetivo era conocer qué mecanismos determinaban sus resistencias en cada una de ellas.

Como es conocido los dos mecanismos más importantes descritos en las enterobacterias como origen de sus resistencias a los antibióticos beta-lactámicos son las beta-lactamasas y la disminución de permeabilidad en la membrana externa ^{85,165}.

Primero decidimos investigar qué tipo de beta-lactamasas presentaban. Y para caracterizarlas seguimos las recomendaciones de Bush K. ^{19,22,24}.

Se dividió el estudio en :

-Efecto de los inhibidores:

Acido Clavulánico (A.C.), Sulbactama (SL), Cloxacilina(CX), Carbenicilina (CB), Sal disódica del Acido Etilendiaminotetracético (EDTA), p-Cloromercuriobenzoato cristalino (pCMB), y Aztreonam (ATM). Los valores de CMI de las tres cepas del grupo A fueron ≥ 256 μ gr./ml. frente al A.C. y de 128 μ gr./ml. frente a SL. Frente al EDTA y al pCMB sus valores de CMI fueron ≥ 512 μ gr./ml. y de 128 μ gr./ml. respectivamente.

-Valoración de la actividad enzimática, Tasas de hidrólisis y Actividades específicas.

-Efecto de los inductores.

EFEECTO DE LOS INHIBIDORES.

La valoración del efecto de los inhibidores se realizó siguiendo dos protocolos diferentes:

1. Valorando el efecto sinérgico con cada antibiótico frente a cada cepa, utilizando el método del desplazamiento del valor de CMI por la asociación de antibióticos^{39,70}, tal como describimos en el Capítulo III de Material y Métodos.

Los resultados se muestran en las Tablas X, XI, XII, XIII, XIV, XV.

Consideramos que existe sinergismo cuando el cociente entre el valor de CMI del antibiótico solo con el valor de CMI de la asociación con el inhibidor es mayor o igual a 4 y que existe antagonismo cuando es menor que 4^{24,68,171}.

Destacamos por su importancia que actúa claramente de forma sinérgica para las tres cepas del grupo A estudiadas la Cloxacilina con todos los antibióticos. Y asimismo, que el A. Clavulánico no mostró sinergismo en ningún caso.

Sulbactama en algunos casos mostró efecto sinérgico, lo que en comparación con los resultados anteriores nos inclina a pensar en enzimas de origen cromosómico: el Acido Clavulánico actúa principalmente contra beta-lactamasas mediadas plasmidicamente, y Sulbactama y Cloxacilina contra las beta-lactamasas de origen cromosómico^{1,19,33,46,60,68,80,90,111,116}.

TABLA X.
ESTUDIO DE SINERGISMO Y ANTAGONISMO EN LA CEPA
***Citrobacter freundii* 1A.**

	SIN	A.C.	SL.	CX.	CB.	EDTA	pCMB
CEFALOTINA	4096	2048	2048	512	1024	1024	2048
CEFOXITINA	512	256	128	128	256	512	2048
CEFTAZIDIMA	256	128	64	64	64	256	512
CEFOTAXIMA	64	128	64	16	128	128	256
CEFTIZOXIMA	512	256	256	64	128	256	256
CEFTRIAXONA	256	128	64	32	32	32	128

Valores de CMI: SIN= Sin inhibidor, y de cada asociación en $\mu\text{gr./ml.}$

TABLA XI.
ESTUDIO DE SINERGISMO Y ANTAGONISMO EN LA CEPA
Escherichia coli 2A.

	SIN	A.C.	SL.	CX.	CB.	EDTA	pCMB
CEFALOTINA	4096	2048	1024	512	512	2048	8192
CEFOXITINA	512	512	128	64	128	1024	1024
CEFTAZIDIMA	256	128	32	16	32	32	128
CEFOTAXIMA	64	64	16	4	32	8	32
CEFTIZOXIMA	128	64	16	16	16	32	64
CEFTRIAXONA	32	64	16	8	8	4	16

Valores de CMI: SIN= Sin inhibidor, y de cada asociación en $\mu\text{gr./ml.}$

TABLA XII.
ESTUDIO DE SINERGISMO Y ANTAGONISMO EN LA CEPA
***Morganella morganii* 3A.**

	SIN	A.C.	SL.	CX.	CB.	EDTA	pCMB
CEFALOTINA	8192	8192	2048	512	1024	2048	8192
CEFOXITINA	512	256	16	64	64	256	1024
CEFTAZIDIMA	256	128	32	64	128	256	256
CEFTIZOXIMA	128	128	32	32	64	256	128
CEFOTAXIMA	64	128	32	4	64	32	256
CEFTRIAXONA	16	16	16	4	8	8	8

Valores de CMI: SIN= Sin inhibidor, y de cada asociación en $\mu\text{gr./ml.}$

TABLA XIII.

**CUADRO RESUMEN DEL EFECTO SINERGISTICO EN LA
CEPA *Citrobacter freundii* 1A.**

	A.C.	SL.	CX.	CB.	EDTA	pCMB
CR	< 4	< 4	8	4	4	< 4
FOX	< 4	4	4	< 4	< 4	< 4
CAZ	< 4	4	4	4	< 4	< 4
CTX	< 4	< 4	4	< 4	< 4	< 4
ZOX	< 4	< 4	8	4	< 4	< 4
CRO	< 4	< 4	4	4	4	< 4

Cada valor expresa el cociente entre el valor de CMI de cada antibiótico solo con el valor de CMI de ese antibiótico + inhibidor tal que un cociente mayor o igual que 4 supone una relación sinérgica entre ambos antibióticos frente a cada cepa ²⁴.

TABLA XIV.

CUADRO RESUMEN DEL EFECTO SINERGISTICO, EN LA
CEPA *Escherichia coli* 2A.

	A.C.	SL.	CX.	CB.	EDTA	pCMB
CR	< 4	4	8	8	< 4	< 4
FOX	< 4	4	8	4	< 4	< 4
CAZ	< 4	8	16	8	8	< 4
CTX	< 4	4	16	< 4	8	< 4
ZOX	< 4	8	8	8	4	< 4
CRO	< 4	< 4	4	4	8	< 4

Cada valor expresa el cociente entre el valor de CMI de cada antibiótico solo con el valor de CMI de ese antibiótico + inhibidor, tal que un cociente mayor o igual que 4 supone una relación sinérgica entre ambos antibióticos frente a cada cepa ²⁴.

TABLA XV.

CUADRO RESUMEN DEL EFECTO SINERGISTICO EN LA

CEPA *Morganella morganii* 3A.

	A.C.	SL.	CX.	CB.	EDTA	pCMB
CR	< 4	4	16	8	4	< 4
FOX	< 4	32	8	8	< 4	< 4
CAZ	< 4	8	4	< 4	< 4	< 4
CTX	< 4	< 4	16	< 4	< 4	< 4
ZOX	< 4	4	4	< 4	< 4	< 4
CRO	< 4	< 4	4	< 4	< 4	< 4

Cada valor expresa el cociente entre el valor de CMI de cada antibiótico solo con el valor de CMI de ese antibiótico + inhibidor, tal que un cociente mayor o igual que 4 supone una relación sinérgica entre ambos antibióticos frente a cada cepa ²⁴.

También ensayamos el efecto inhibidor del Aztreonam cuyos resultados se muestran en los Gráficos 4, 5 y 6, donde se observa que para las tres cepas, *Citrobacter freundii* 1A, *Escherichia coli* 2A y *Morganella morganii* 3A, el Aztreonam mostró un efecto sinérgico en todas las asociaciones de antibióticos 19,20,21,22,24 y superior al efecto de los otros inhibidores.

El segundo protocolo ensayado es sencillo y en nuestra experiencia los resultados fueron comparables a los del anterior. Consiste en incluir en el Antibiograma por el método de difusión en agar discos de Amoxicilina + Acido Clavulánico (AMC) y de Ampicilina (AM) y observar si las cepas se muestran resistentes a los dos antibióticos o por el contrario son resistentes a la AM pero sensibles a la acción de la asociación AMC^{9,51}. Los resultados se muestran en las Tablas XVI, XVII.

Las cepas *Citrobacter freundii* 1A, *Escherichia coli* 2A y *Morganella morganii* 3A, fueron resistentes a AM y también a AMC, con lo que no tuvo efecto inhibidor el Acido Clavulánico. En estas tablas también incluimos la sensibilidad de estas cepas a los aminoglucósidos, resultando que son sensibles a la Amikacina (AN), Gentamicina (GM), Tobramicina (TM) y Netilmicina (NET)⁶⁵. Son numerosas las referencias bibliográficas que muestran como plásmidos codificadores de beta-lactamasas de amplio espectro se transfieren conjuntamente resistencia a Aminoglucósidos, Sulfonamidas, Tetraciclina y Cloramfenicol^{12,73,77,78,91,135}

GRAFICO 4. COMPARACION DE INHIBIDORES.
En la cepa Citrobacter freundii 1A.

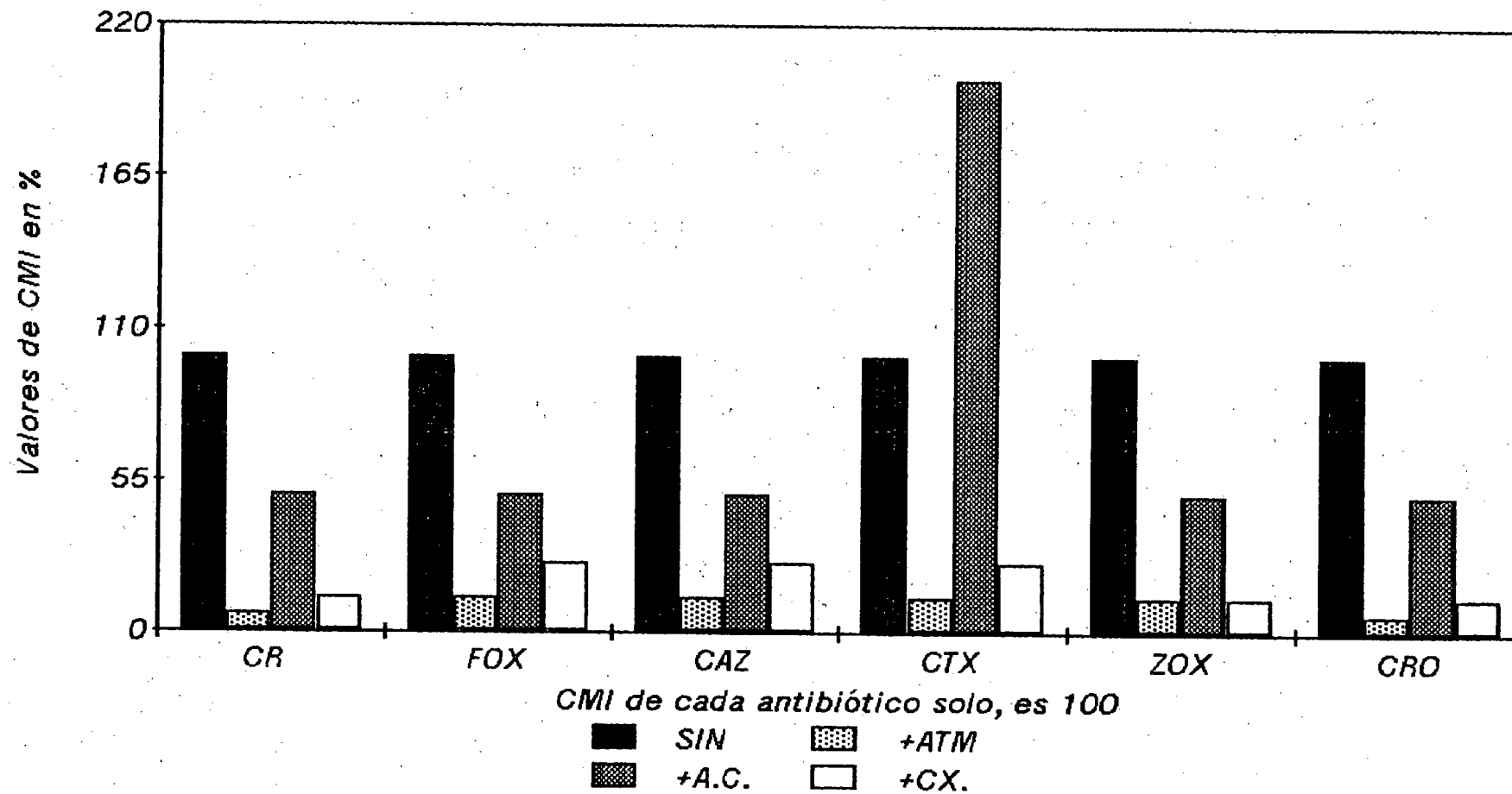


GRAFICO 5. COMPARACION DE INHIBIDORES.
En la cepa Escherichia coli 2A.

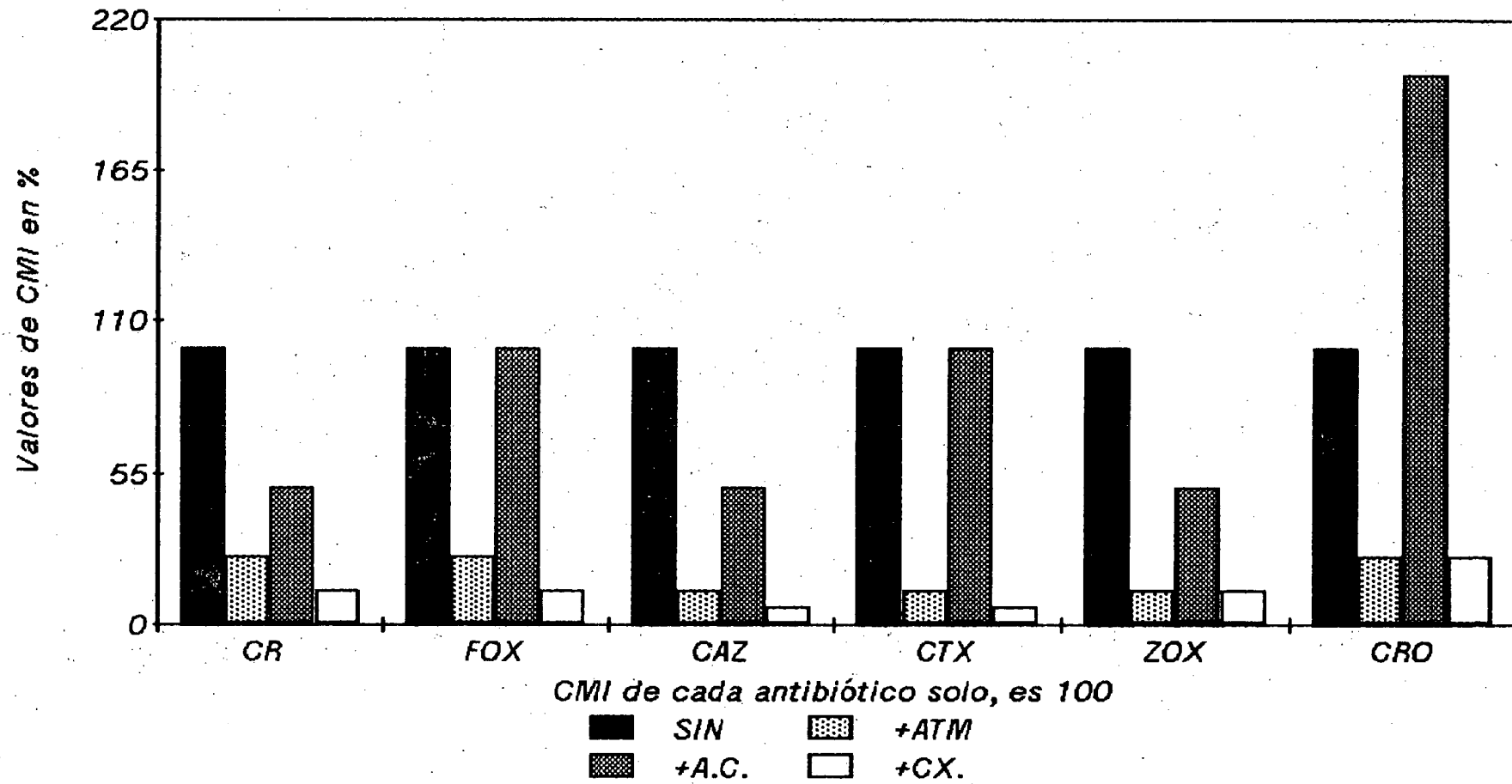


GRAFICO 6. COMPARACION DE INHIBIDORES.
En la cepa Morganella morganii 3A.

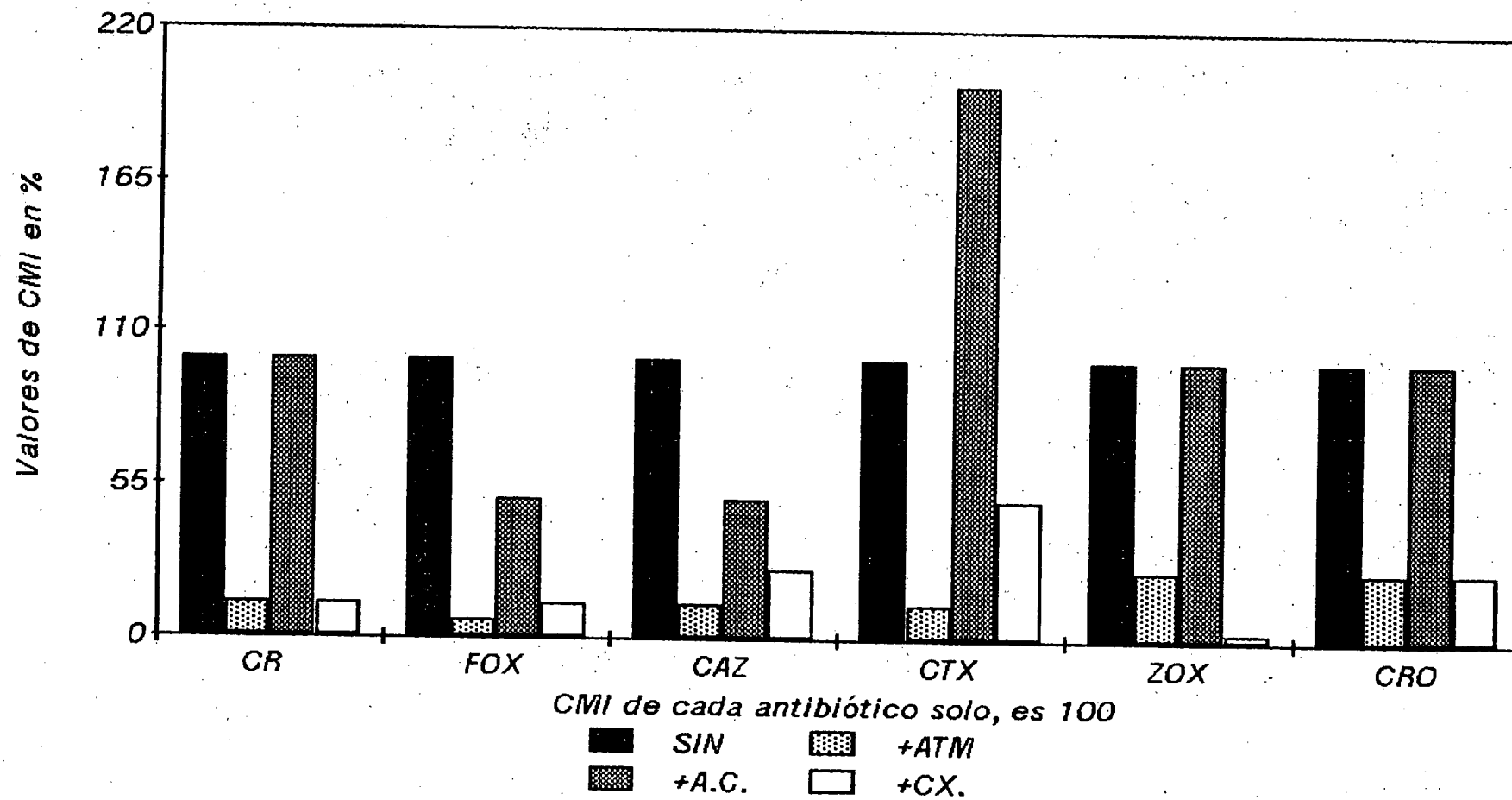


TABLA XVI.

**ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDADES A ANTIBIOTICOS BETA-
LACTAMICOS, AMINOGLUCOSIDOS, TETRACICLINA Y
SULFONAMIDAS.**

	<i>C. freundii</i> 1A	<i>E. coli</i> 2A	<i>M. morganii</i> 3A
AM	0	0	0
AMC	0	0	0
AN	27	23	23
TM	25	24	23
GM	23	22	24
NET	27	22	26
TE	28	22	22
SXT	34	24	20

Valor de los halos de inhibición en mm.

AM: Ampicilina.
AMC: Amoxicilina/A. Clavulánico.
AN: Amikacina.
SXT: Trimetropin/Sulfametoxazol.

NET: Netilmicina.
TM: Tobramicina.
TE: Tetraciclina.
GM: Gentamicina.

TABLA XVII.
ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDADES A ANTIBIOTICOS BETA-
LACTAMICOS, AMINOGLUCOSIDOS, TETRACICLINA Y
SULFONAMIDAS.

	<i>C. freundii</i> 1B	<i>E. coli</i> 2B	<i>M. morganii</i> 3B
AM	0	0	0
AMC	0	20	0
AN	24	23	22
TM	22	9	23
GM	24	20	24
NET	27	10	26
TE	23	0	25
SXT	29	0	25

Valor de los halos de inhibición en mm.

AM: Ampicilina.
 AMC: Amoxicilina/ A. Clavulánico.
 AN: Amikacina.
 SXT: Trimetropin/Sulfametoxazol.

TM: Tobramicina.
 NET: Netilmicina.
 TE: Tetraciclina.
 GM: Gentamicina.

Asimismo, comparamos estos resultados con los obtenidos para las cepas sensibles del grupo B, resultando que :

- *Citrobacter freundii* 1B y *Morganella morganii* 2B se mostraron resistentes a AM y AMC, y sensibles a AN, GM, TM y NET. Frente a estos antibióticos presentaron el mismo patrón que sus homólogas en el grupo A. La coexistencia de cefalosporinasas y resistencia a aminoglucósidos es muy rara ¹⁷².

- *Escherichia coli* 2B fue sin embargo resistente a AM, pero sensible a AMC. Asimismo fue sensible a GM y AN, pero resistente a TM, presentando un patrón diferente a su homóloga del grupo A (la cepa *Escherichia coli* 2A) Tabla XVII.

Con estos datos referentes a la acción de sinergismo de los inhibidores, las cepas del grupo A así como las cepas 1B y 3B deberían sus resistencias a cefalosporinasas. Puesto que:

- En las cepas del grupo A no hay sinergismo en las diferentes asociaciones con A. Clavulánico, pero sí con Cloxacilina y en menor medida con Sulbactam. El efecto inhibidor del Aztreonam fue notable.

- Están descritas en la literatura la existencia de cepas *C. freundii* y *M. morganii*, además de otros Gram-negativos de origen hospitalario, resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro por cefalosporinasas de alto nivel ⁵⁰.

- En las cepas 1B y 3B el A.C. no tuvo efecto inhibidor.

En la cepa *E. coli* 2A podría ocurrir el mismo tipo de resistencia que en las cepas 1A y 3A. Se han descrito estas enzimas en *E. coli*, sobre todo como causantes de resistencia a CR, por hiperproducción de cefalosporinasas que también podrían condicionar la resistencia a nuevas cefalosporinas, circunstancia más recientemente descrita en cepas de origen hospitalario ⁹⁷.

Es más frecuente su descripción como resultado de los experimentos in vitro de obtención de *E. coli* multirresistentes 5,66,67,106,107,113,114,118,123,157,167,181.

- Todas ellas son sensibles a los aminoglucósidos, lo que apunta a que sean resistencias de origen cromosómico, puesto que las resistencias de origen plasmídico a cefalosporinas (beta-lactamasas de amplio espectro) suelen estar junto con genes codificadores de resistencia a los aminoglucósidos y cotransferirse de forma conjunta, en general con un rango de frecuencia de 10^{-4} a 10^{-6} 15,16,26,27,119,137,140,141,180.

La cepa *Escherichia coli* 2B, inhibida su resistencia a la Amoxicilina por el Acido Clavulánico y con resistencia a TM, podría explicar su resistencia por penicilinasas de origen plasmídico. En aislamientos de *E. coli* la causa más frecuente de resistencia a Ampicilina y Cefalotina son las penicilinasas ⁹⁷.

Confirmamos la presencia de beta-lactamasas en estas cepas mediante el método Acidimétrico en sus dos tipos descritos en Material y Métodos, resultando positivo para todas las cepas ensayadas.

INDUCIBLES O CONSTITUTIVAS.

El segundo paso en nuestra investigación fue conocer si estas beta-lactamasas eran inducibles (en las clasificaciones actuales sólo son inducibles en enterobacterias las cefalosporinasas en cepas no desreprimidas) 20,21,112,143.

Para este estudio utilizamos dos protocolos de Antibiograma cruzado:

- Empleando a su vez dos variedades tal como describimos en Material y Métodos. Los resultados se muestran en los Gráficos 7, 8, 9, 10, 11, 12.

Tanto en los antibiogramas por el método de dilución en agar o por el método de difusión en agar en la cepas del grupo A, con FOX o IPM incorporadas ⁶⁸ en ambos casos en concentraciones de 32 μ gr./ml. y de 0'03 μ gr./ml. respectivamente para las cepas del grupo A, no hubo un aumento apreciable de los niveles de resistencia en las cepas referidas, *C. freundii* 1A, *E. coli* 2A, *M. morganii* 3A, según estos resultados el valor de la CMI para cada cepa frente a cada antibiótico no disminuyó en ningún caso y que tampoco hubo en ningún caso un aumento en mm. de los halos de inhibición en presencia de los inductores (FOX e IPM). Los cocientes entre el valor de CMI de cada cepa frente a cada antibiótico y el valor de CMI para la combinación de antibiótico + inductor fue siempre menor que 4 (en casi todos los casos fue igual a 1) y teniendo en cuenta que antagonismo e inducción son dos conceptos equivalentes podemos decir que no hubo inducción

GRAFICO 7. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

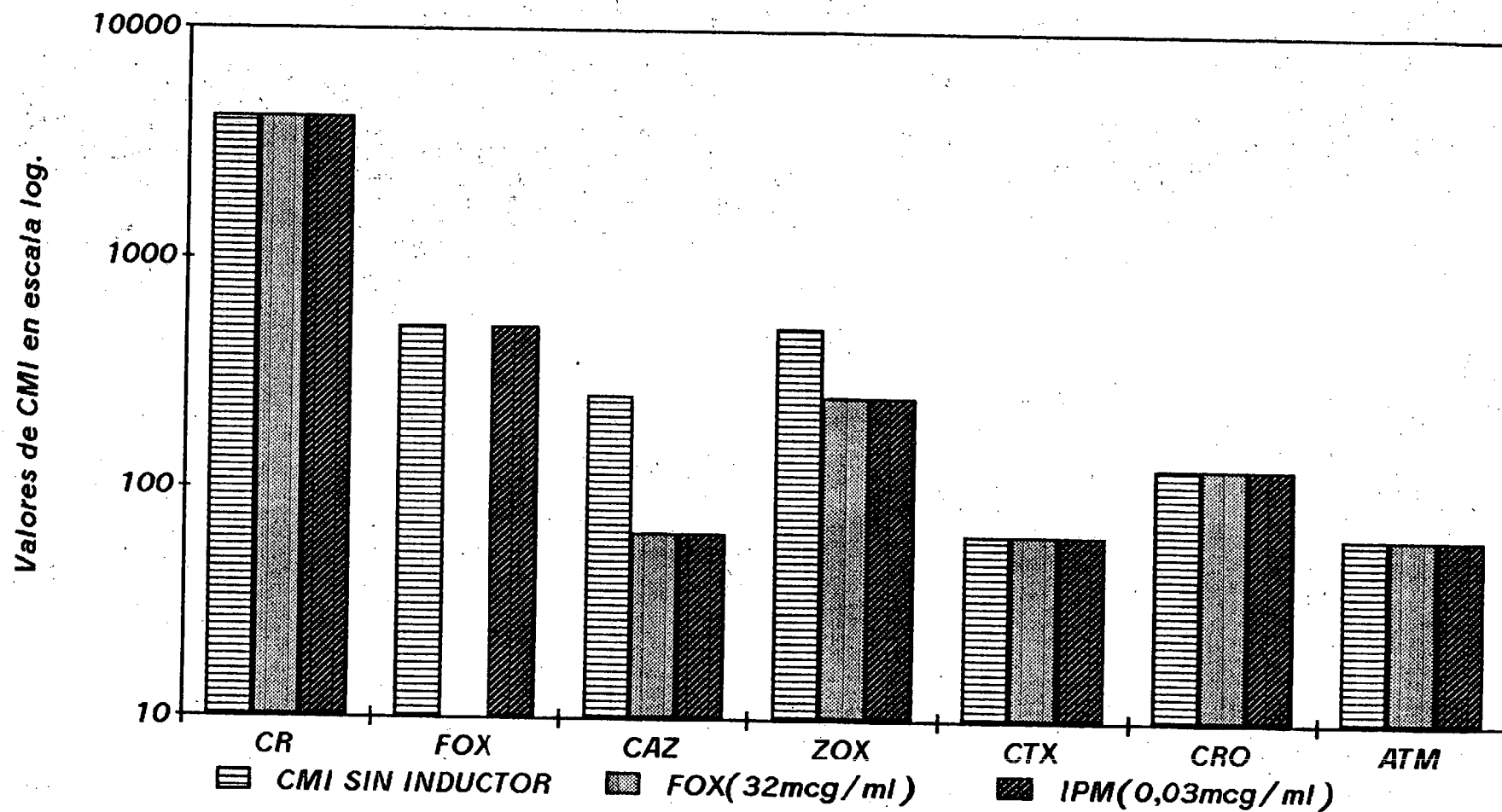


GRAFICO 8. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

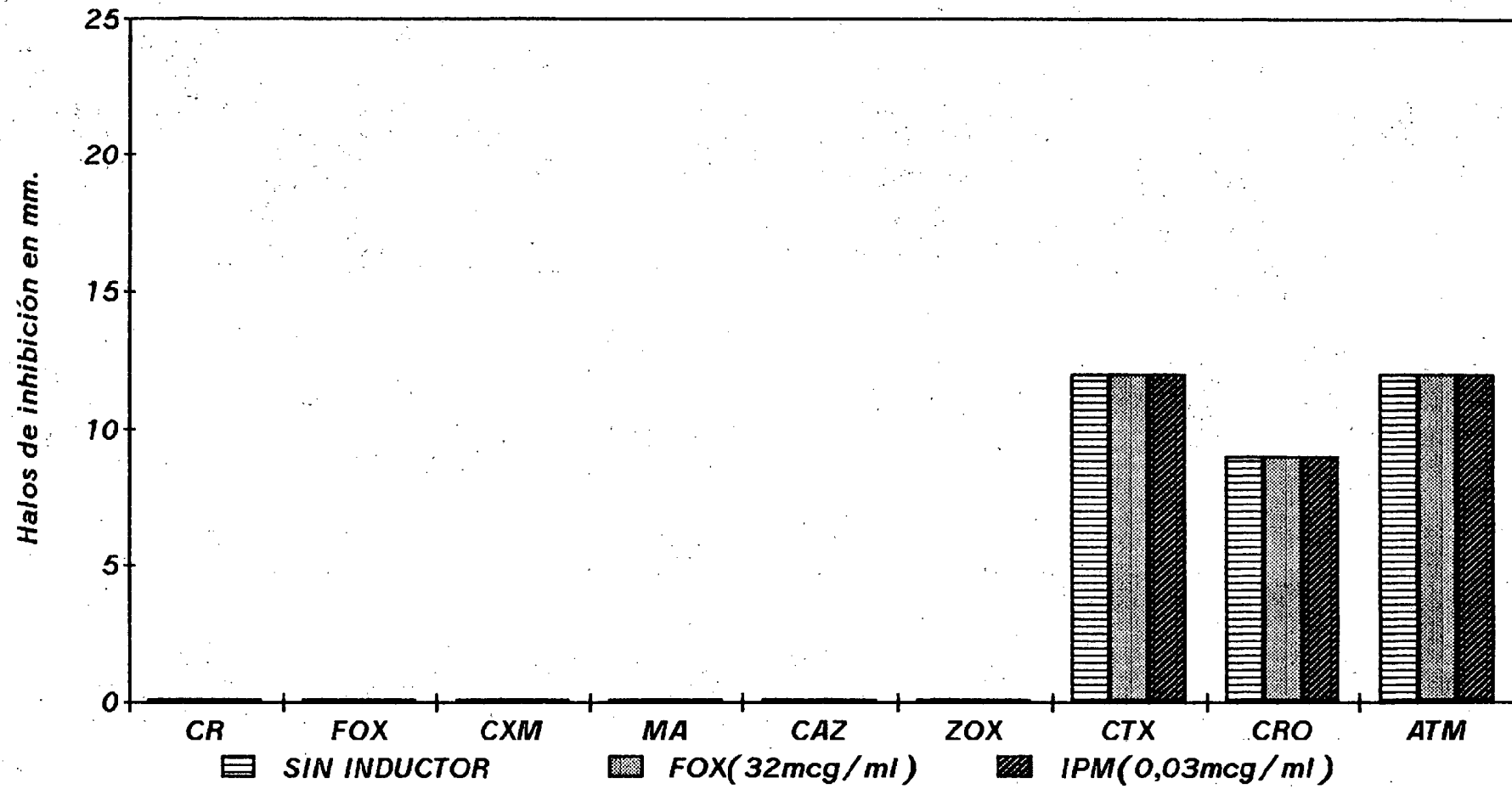


GRAFICO 9. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa Escherichia coli 2A.

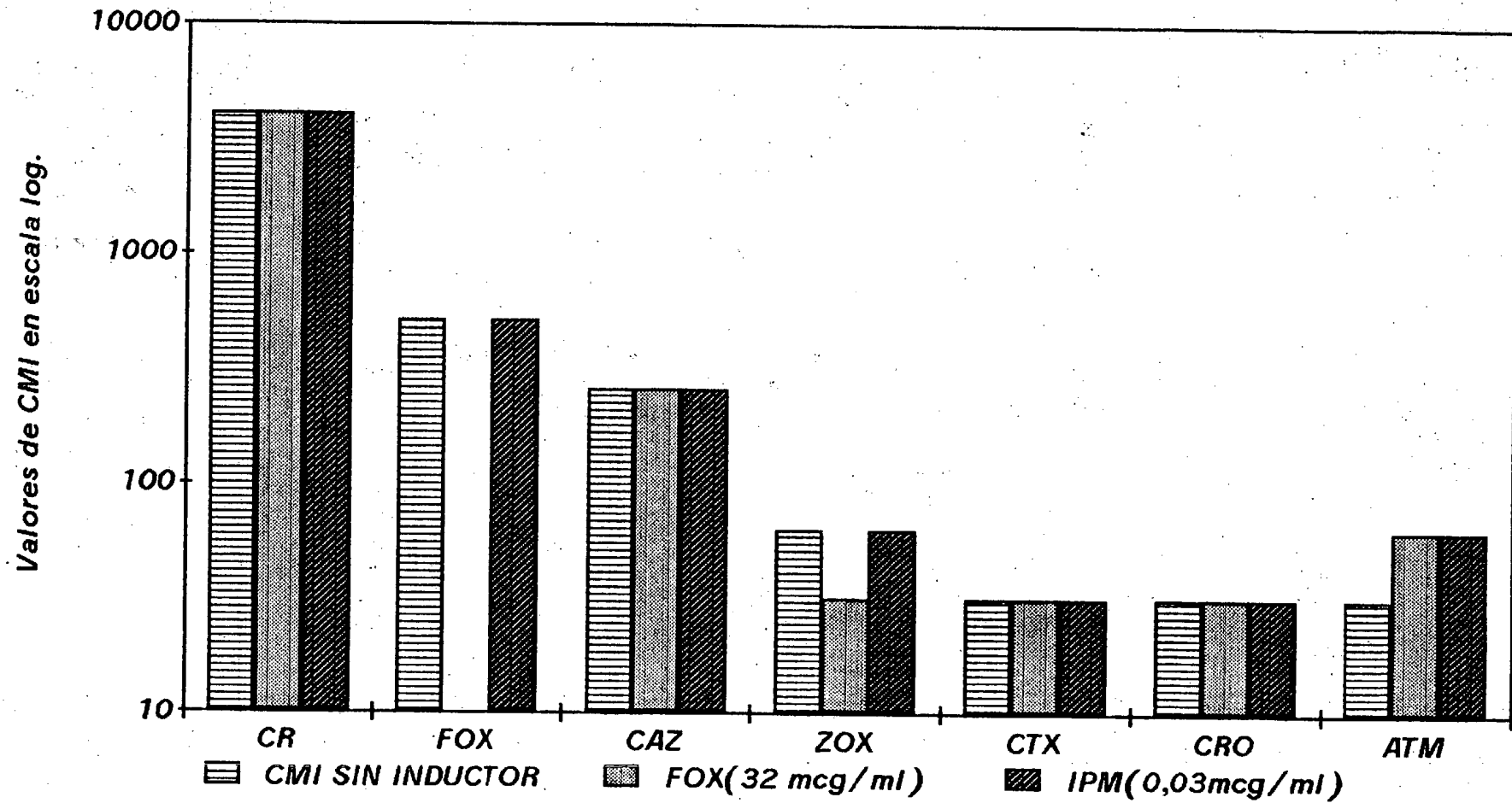


GRAFICO 10. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa Escherichia coli 2A.

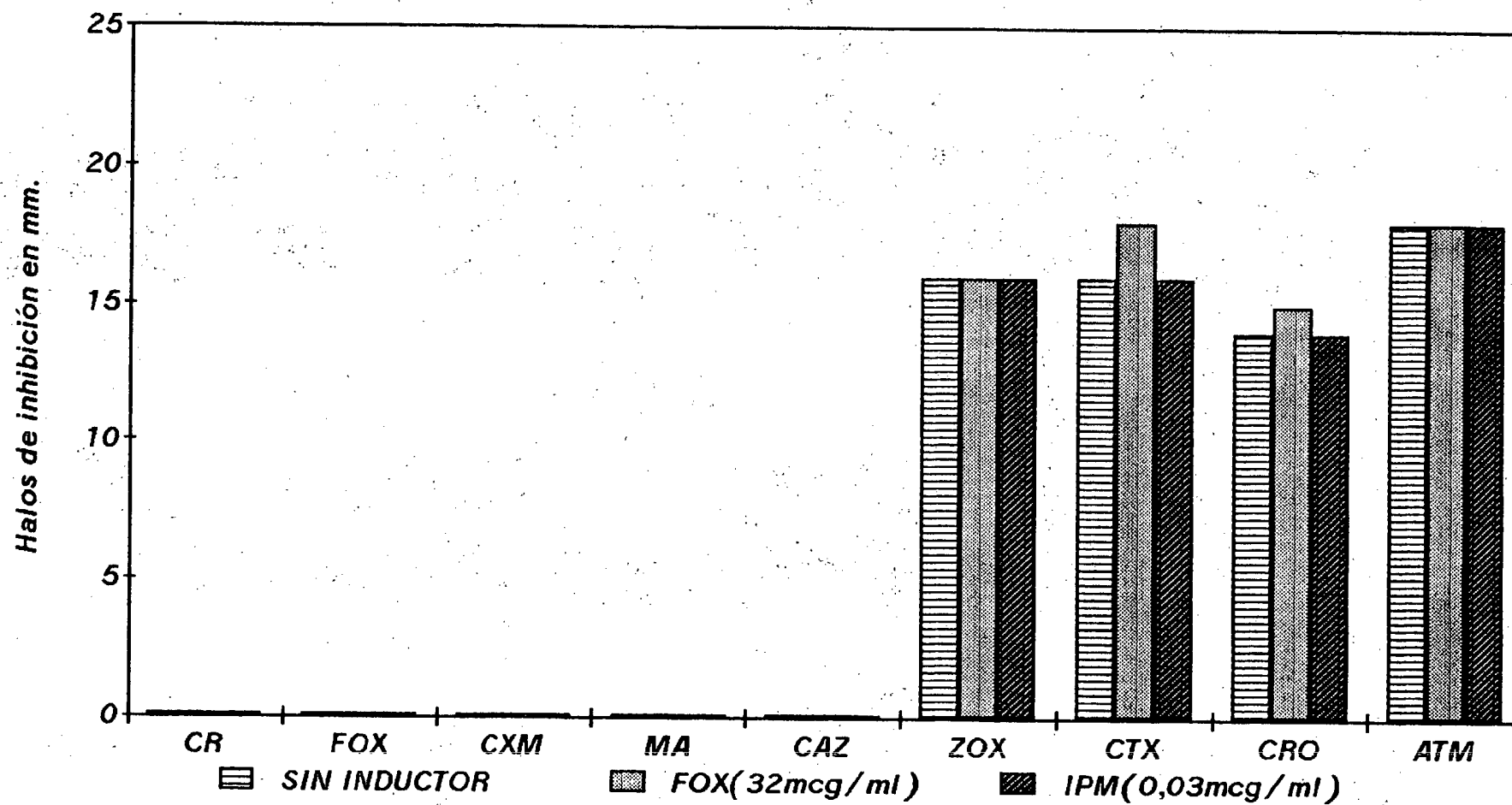


GRAFICO 11. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa Morganella morganii 3A.

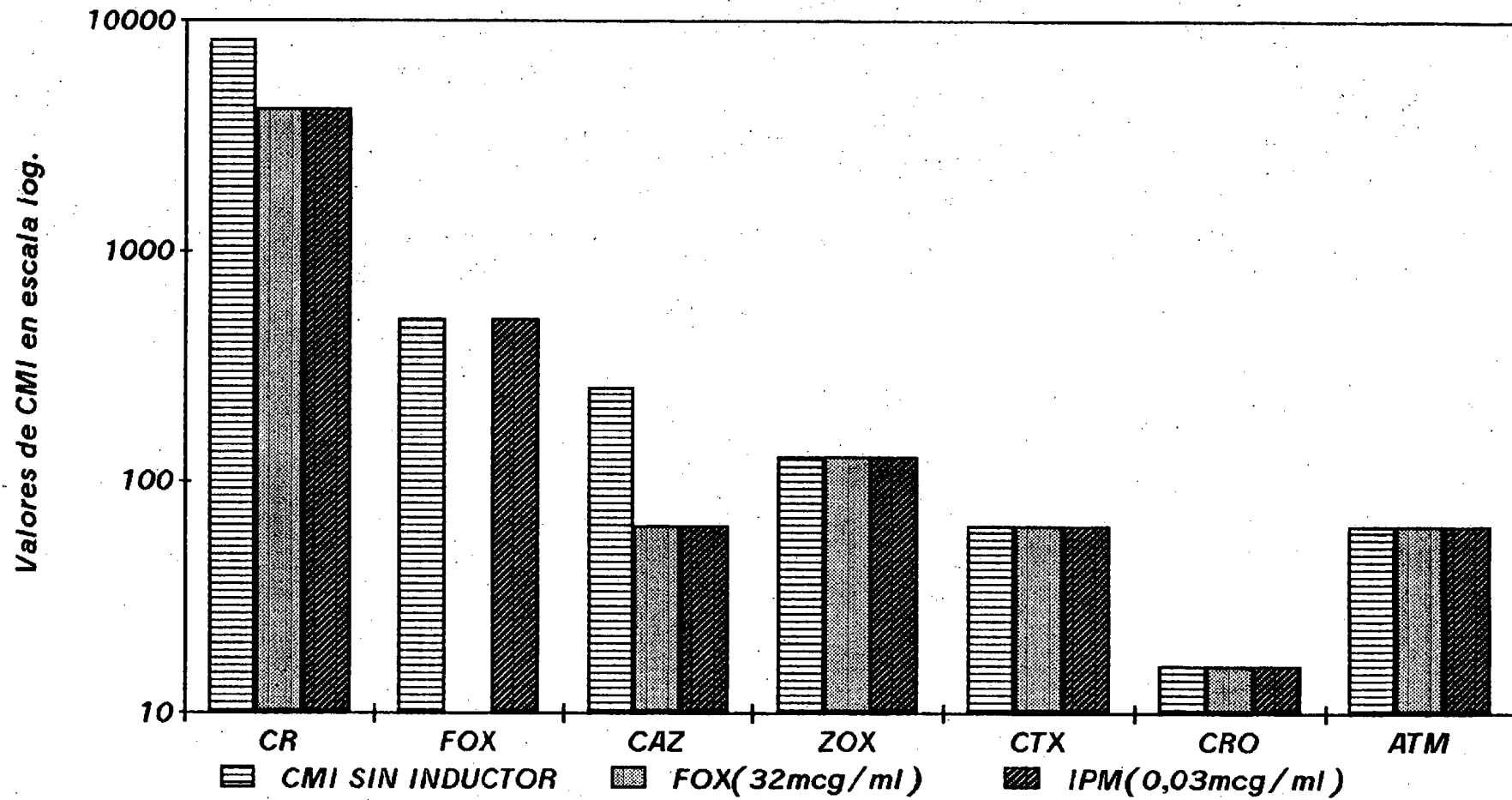
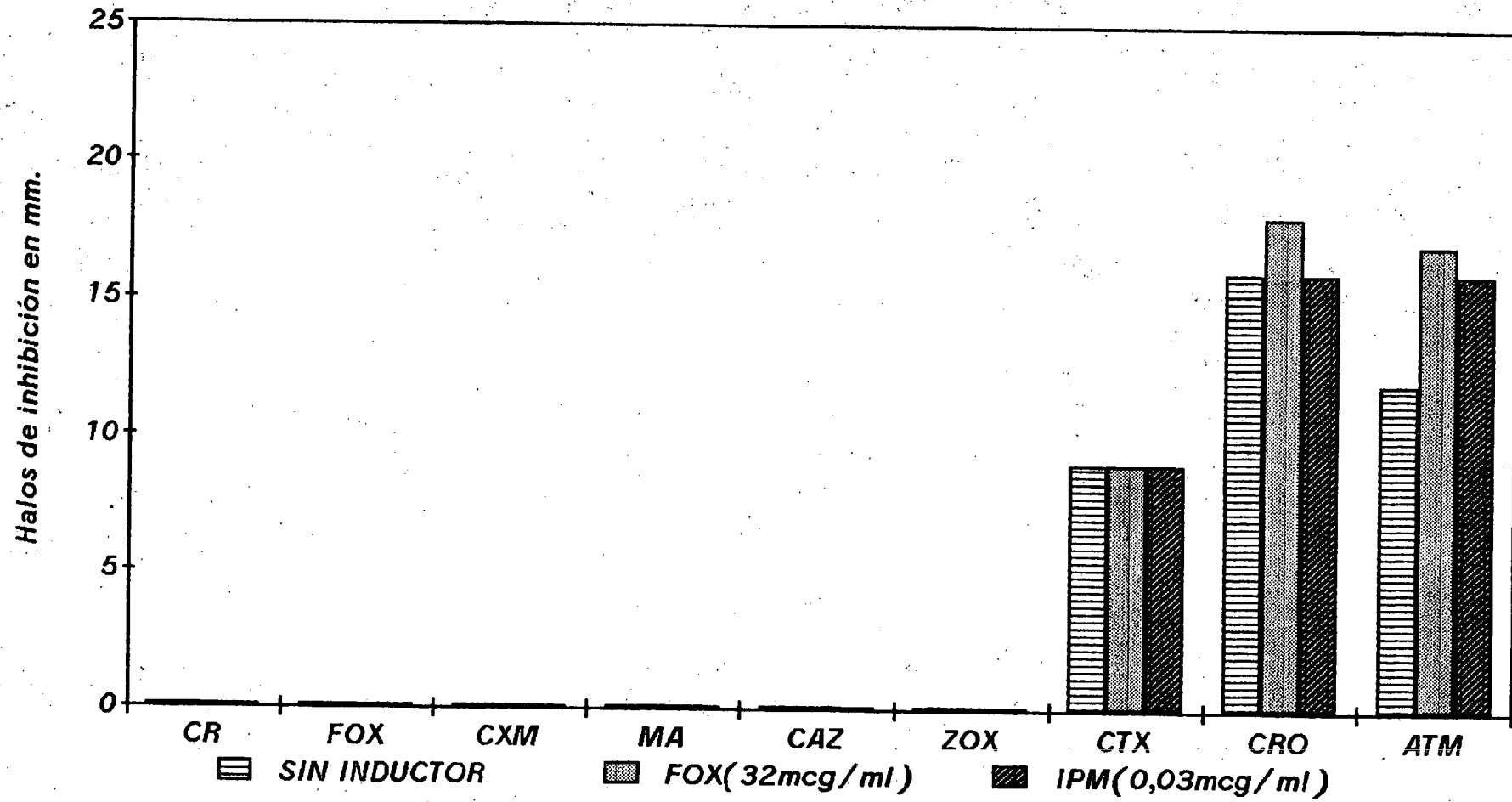


GRAFICO 12. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa *Morganella morganii* 3A.



ni con FOX ni con IPM. En una situación de resistencia por beta-lactamasas Tipo I en mutantes desreprimidos la producción de estas cefalosporinasas pasa a ser semiconstitutiva o totalmente constitutiva, no muestran resistencia a inductores fuertes como el IPM, pero sí a FOX que también es un inductor fuerte ^{35,89,139}.

Si comparamos estos resultados con los de las cepas del grupo B observamos que sí hubo un efecto antagónico y por tanto inductor de FOX e IPM. Como mostramos en los Gráficos 13, 14, 17 y 18, que corresponden a las cepas:

- *C. freundii* 1B.

- *M. morganii* 3B.

Así, en *C. freundii* 1B, sensible a CAZ, CTX, ZOX, CRO, ATM e IPM, se incrementó considerablemente la resistencia a estos antibióticos en presencia de FOX disminuyendo sus halos de inhibición en 4 o más mm. y especialmente en presencia de IPM, que mostró mayor efecto inductor que FOX ^{35,56,89} ; con IPM los halos de inhibición pasaron de valores superiores a 20 mm. a valores de 0 mm. o < 10 mm. Los valores de CMI para estos antibióticos también mostraron el mismo comportamiento, con un aumento de más del cuádruple (= antagonismo) en el valor de CMI en presencia de IPM Gráficos 13 y 14.

- En cuanto a *M. morganii* 3B, en este caso IPM también se mostró más efectivo como inductor que FOX, Gráficos 17 y 18. Esto es característico en las beta-lactamasas Tipo I de la Clasificación de Richmond y Sikes o cefalosporinasas.

- Sin embargo, destacamos que para CR y FOX no hubo inducción apreciable (disminución del valor de CMI al menos en 1/4) ni por FOX ni por IPM en ninguna de estas cepas, pero es precisamente para estas cefalosporinas frente a las que ambas cepas muestran una mayor resistencia con CMI > 2048 µgr./ml. frente a CR y con CMI de 32 µgr./ml y > 32 µgr./ml frente a FOX.

- *E. coli* 2B mostró un comportamiento diferente y no fue inducida por FOX ni por IPM, no variando en absoluto sus halos de inhibición para ninguna cefalosporina de las ensayadas ni los valores de CMI. Por tanto, parece que las beta-lactamasas que posee no son inducibles, pero tampoco tiene un alto nivel de resistencia a las cefalosporinas, Gráficos 15 y 16.

Estudiamos también el efecto de los inductores en la actividad de las beta-lactamasas, para ello utilizamos extractos enzimáticos inducidos con Cefoxitina (FOX) y con Benzilpenicilina (P) y la posible variación de la actividad de estos extractos mediante:

- El Método Microbiológico.

- El estudio de la Actividad específica con el método acidimétrico-espectrofotométrico ^{167,168}.

GRAFICO 13. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa *Citrobacter freundii* 1B.

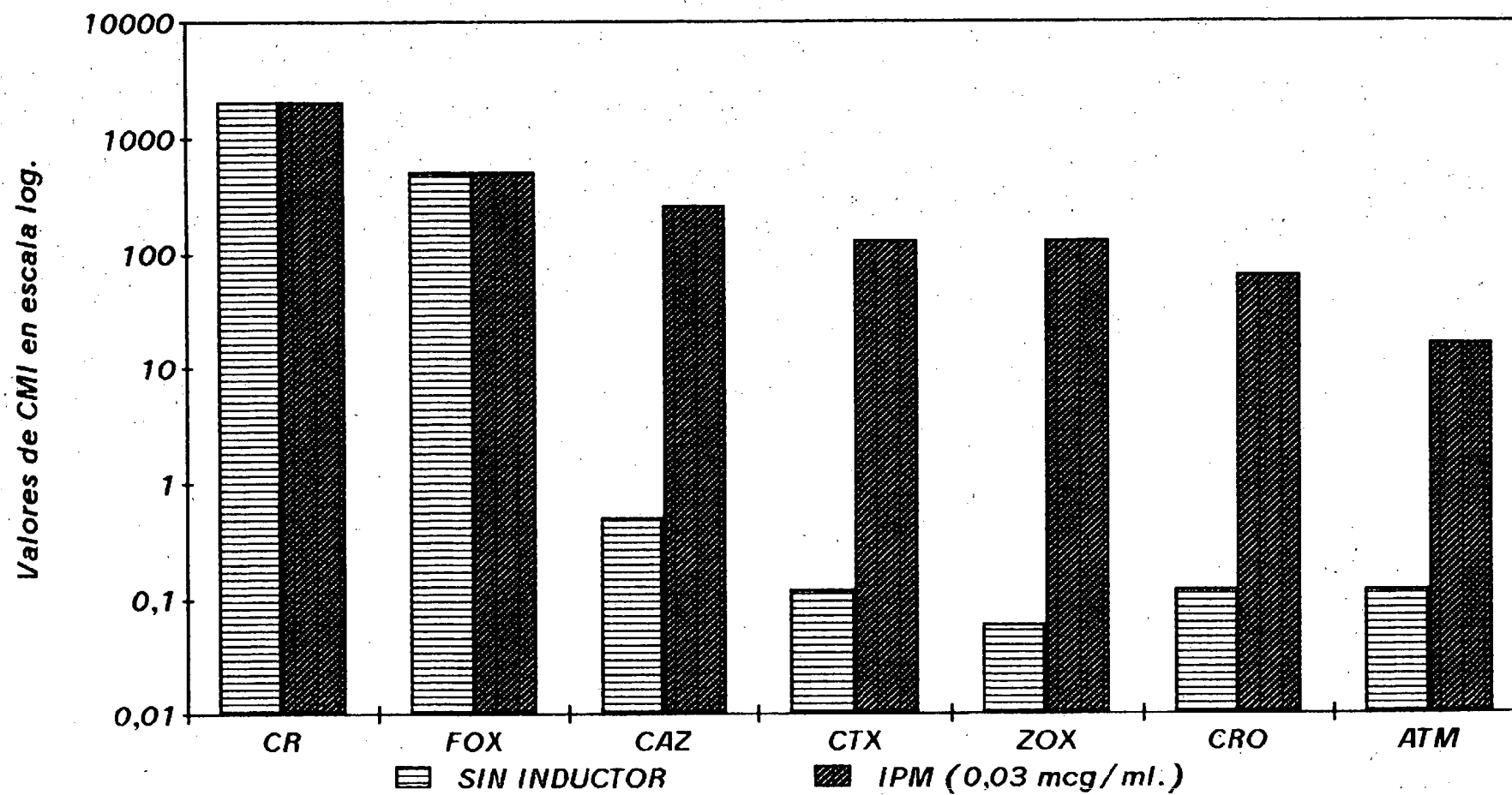


GRAFICO 14. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa *Citrobacter freundii* 1B.

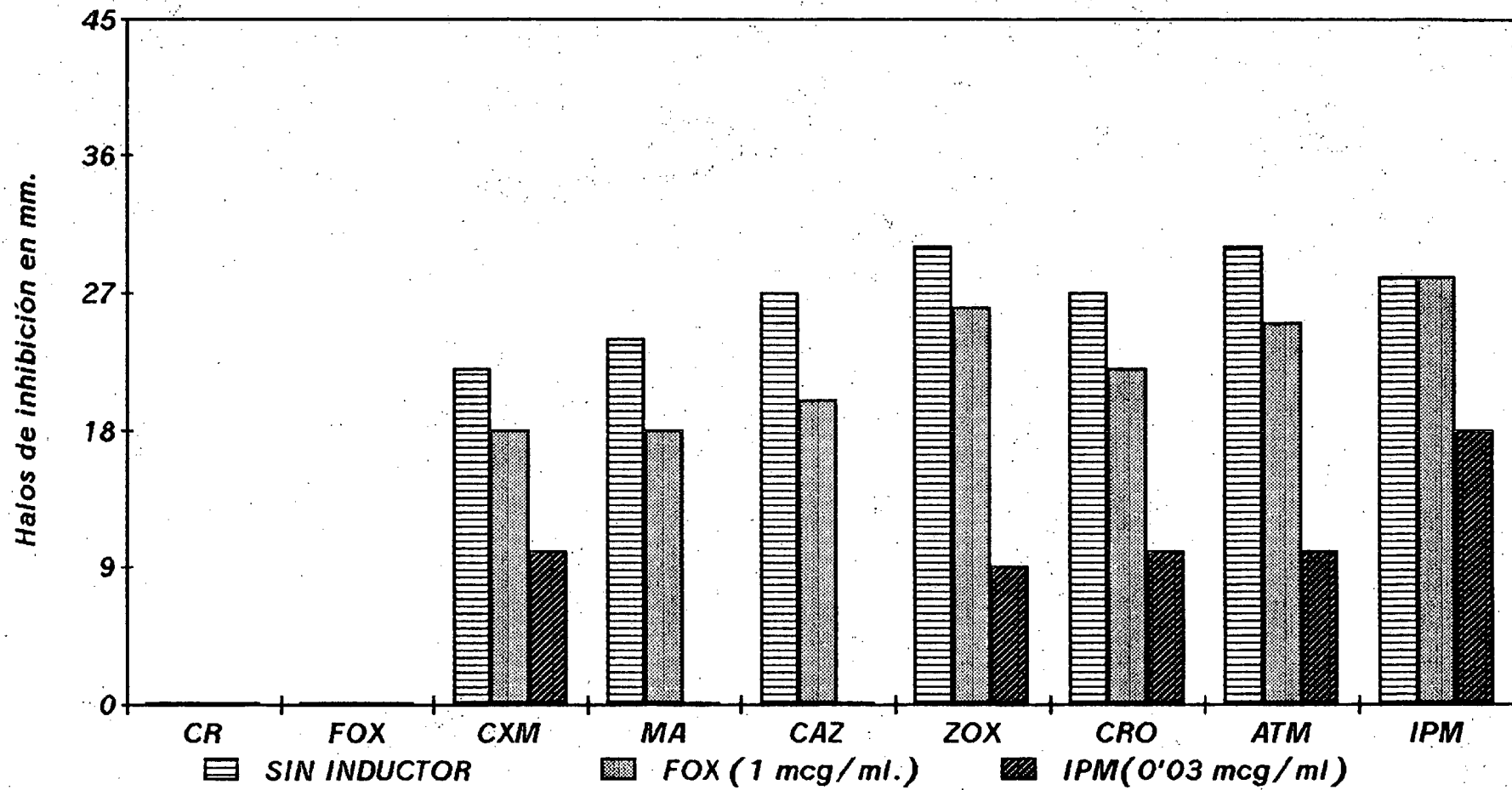


GRAFICO 15. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa *Escherichia coli* 2B.

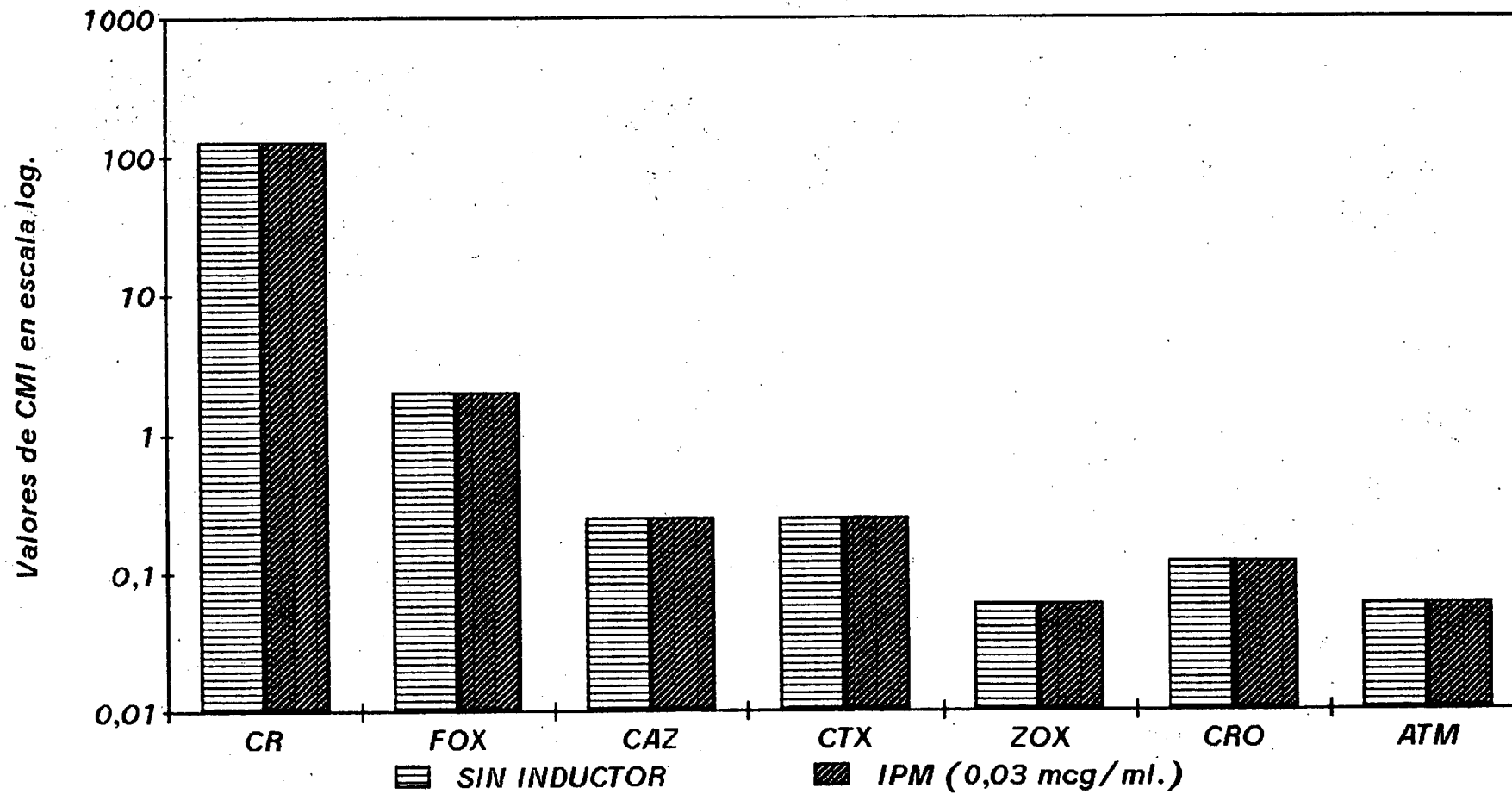


GRAFICO 16. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa *Escherichia coli* 2B.

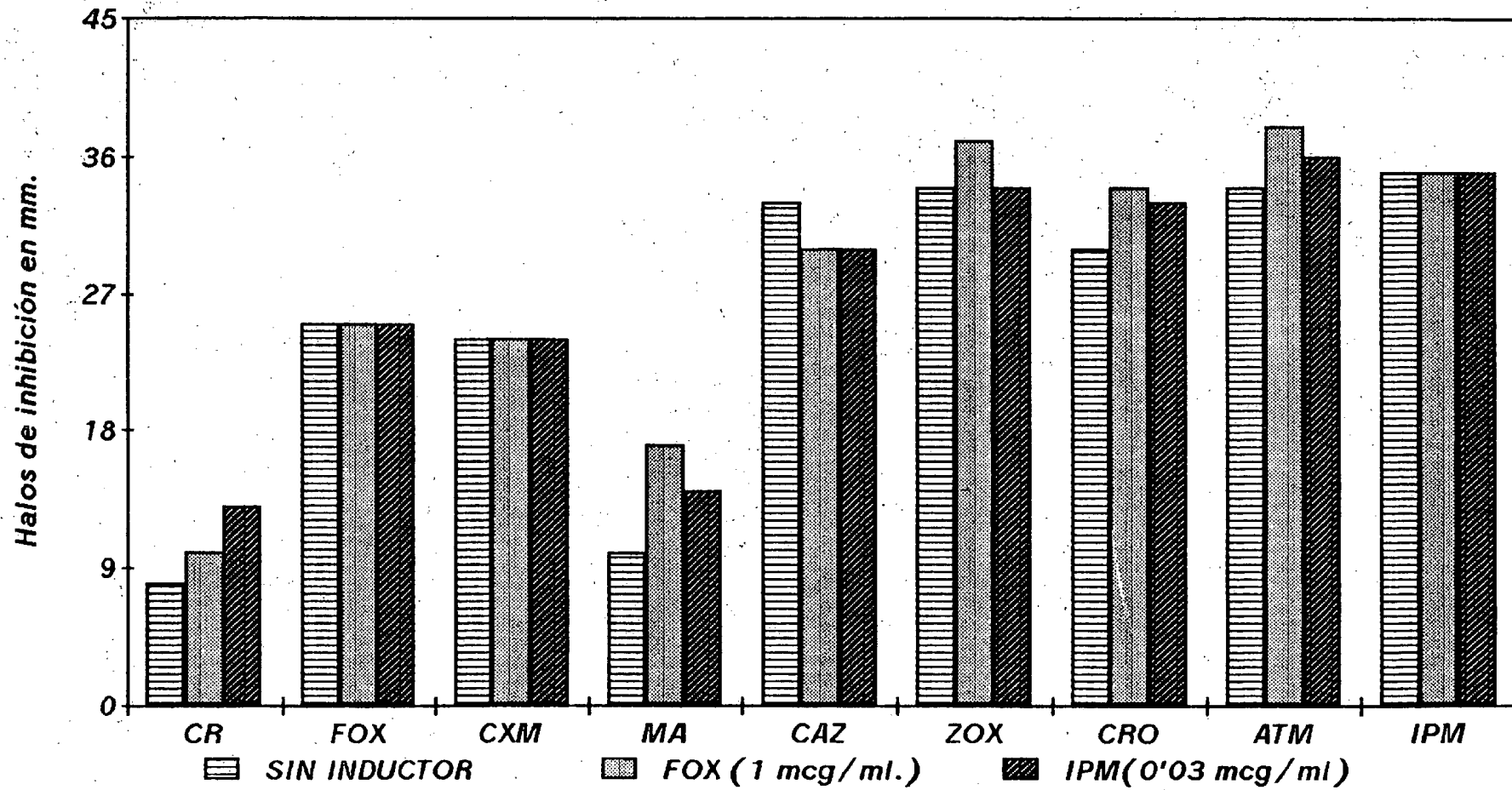


GRAFICO 17. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa *Morganella morganii* 3B.

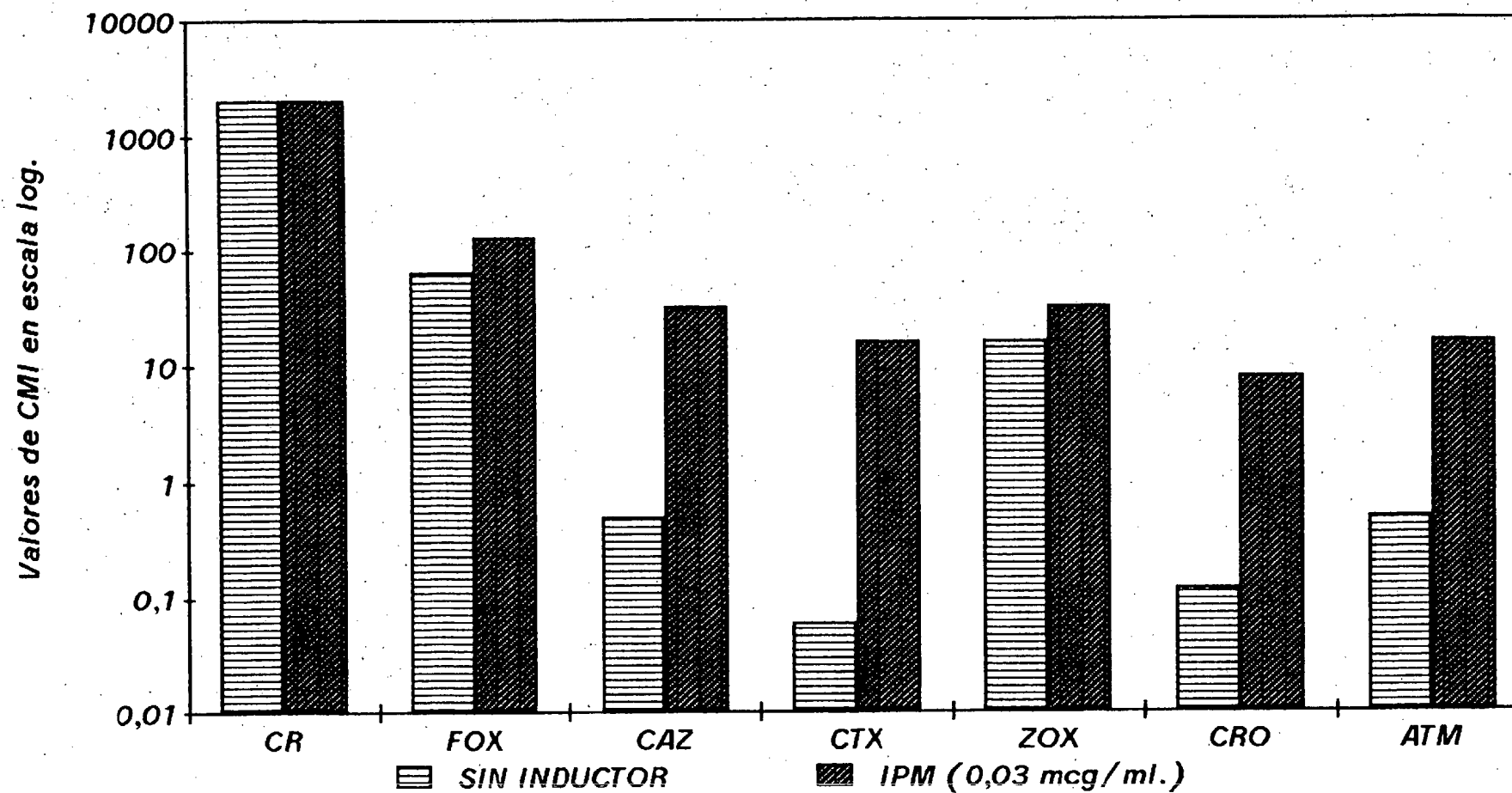
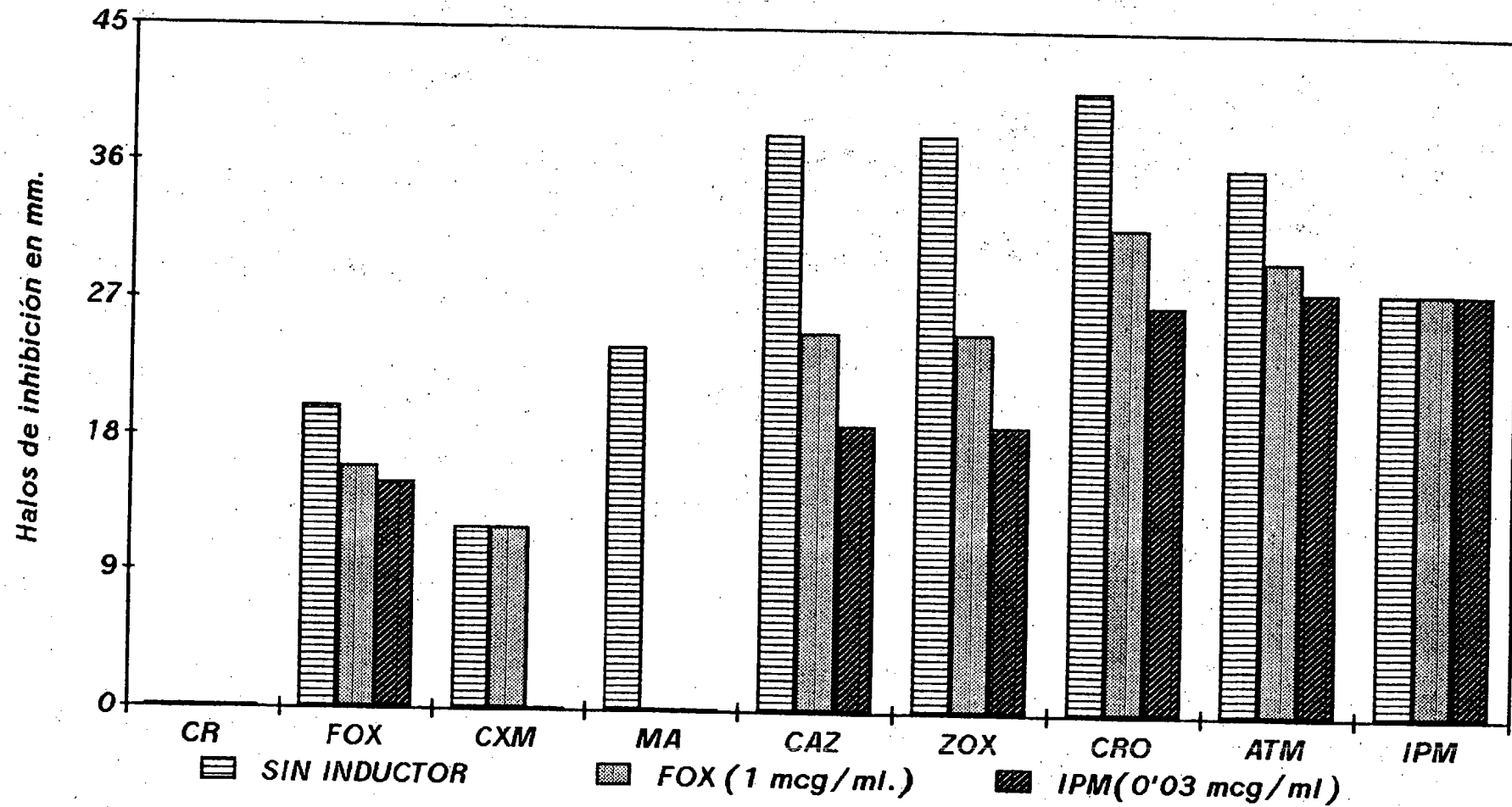


GRAFICO 18. EFECTO DE LOS INDUCTORES.
En la cepa Morganella morganii 3B.



Los resultados del Método Microbiológico se muestran en XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII. Se observa que para ninguna de estas tres cepas, *C. freundii* 1A, *E. coli* 2A, *M. morganii* 3A, aparece un aumento de la actividad en los extractos inducidos respecto de los no inducidos (existe actividad enzimática contra cierto antibiótico cuando en presencia de cierta cantidad de enzima se produce una disminución del halo por debajo del valor estandard: media- 2 x desviación típica de los halos control) ¹³².

El Método Microbiológico nos permite además una valoración semicuantitativa de la actividad enzimática:

- Para todas las cepas del grupo A hubo actividad inhibitoria de los extractos enzimáticos frente a los antibióticos ensayados.
- Para las tres cepas 50 μ l. de enzima consiguieron una disminución en mm. de los halos de inhibición igual o superior a 50 % respecto del valor estandard, para FOX, CAZ, ZOX, para CTX >25%.
- Frente a CR todas con 5 μ l. consiguieron una disminución del halo en un 100%.
- Menos activas se mostraron frente a ATM y CRO, en las cepas 1A y 2A, con disminución respecto del valor estandard de menos del 25%. Sin embargo, frente a CRO el extracto enzimático de la cepa 3A consiguió una disminución respecto del valor estandard de un 100%.

TABLA XVIII.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA

Citrobacter freundii 1A, CON EXTRACTO NO INDUCIDO.

	Extracto enzimático en microlitros				Control	Media - 2σ
	5	10	25	50	50 de enzima inactiv.	
CR	0	0	0	0	19	16
FOX	12	9	0	0	22	23
CAZ	29	28	27	20	36	35
CTX	35	33	30	20	39	33
ZOX	36	36	26	0	41	40
CRO	34	31	27	25	34	32
ATM	33	32	27	25	36	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

TABLA XIX.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA

Citrobacter freundii 1A, CON EXTRACTO INDUCIDO.

	Extracto enzimático en microlitros				Control	Media - 2σ
	5	10	25	50	50 de enzima inactiva.	
CR	0	0	0	0	19	16
FOX	14	10	0	0	22	23
CAZ	30	30	27	20	36	35
CTX	36	30	30	20	39	33
ZOX	36	36	26	0	41	40
CRO	33	32	27	25	34	32
ATM	33	32	29	25	36	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

TABLA XX.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA

Escherichia coli 2A, CON EXTRACTO NO INDUCIDO.

Extracto enzimático en microlitros					Control Media - 2σ	
	5	10	25	50	50 de enzima inactiv.	
CR	0	0	0	0	19	16
FOX	13	11	0	0	22	23
CAZ	34	33	27	21	37	35
CTX	35	32	28	25	37	33
ZOX	40	30	0	0	41	40
CRO	34	34	34	29	37	32
ATM	38	38	38	35	38	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

TABLA XXI.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA
Escherichia coli 2A, CON EXTRACTO INDUCIDO.

	Extracto enzimático en microlitros				Control	Media - 2σ
	5	10	25	50	50 de enzima inactv.	
CR	0	0	0	0	19	16
FOX	10	10	0	0	22	23
CAZ	33	33	25	20	37	35
CTX	37	33	30	25	37	33
ZOX	40	36	0	0	41	40
CRO	34	34	34	29	37	32
ATM	38	38	38	35	38	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

TABLA XXII.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA

Morganella morganii 3A, CON EXTRACTO NO INDUCIDO.

	Extracto enzimático en microlitros				Control	Media - 2σ
	5	10	25	50	50 de enzima inactiv.	
CR	0	0	0	0	19	16
FOX	15	13	0	0	23	23
CAZ	21	15	0	0	35	35
CTX	36	34	20	0	39	33
ZOX	28	24	0	0	39	40
CRO	36	20	18	0	36	32
ATM	36	35	34	33	40	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

TABLA XXIII.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA

Morganella morganii 3A, CON EXTRACTO INDUCIDO.

	Extracto enzimático en microlitros				Control	Media - 2σ
	5	10	25	50	50 de enzima inactiv.	
CR	0	0	0	0	19	16
FOX	15	13	0	0	23	23
CAZ	19	17	0	0	35	35
CTX	39	38	20	0	39	33
ZOX	28	22	0	0	39	40
CRO	35	22	18	0	36	32
ATM	36	36	34	33	40	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

Se compararon estos resultados con los obtenidos para las cepas sensibles del grupo B. Tablas XXIV, XXV, XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, resultando que :

- Para la cepa *C. freundii* 1B, cuando utilizamos el extracto no inducido encontramos que sólo hubo una actividad inhibitoria del 100% con 5 µl. frente a CR. Para FOX con 50 µl. sólo consiguió producir una inhibición del 13%, y frente al resto de los antibióticos no hubo actividad apreciable o fue menor del 10%. Sin embargo, cuando ensayamos el extracto enzimático inducido de la misma cepa encontramos que la actividad inhibitoria con 50 µl. fue cercana o superior al 50% frente a FOX, CAZ, ZOX y superior al 25% frente a CTX.

- Frente a la cepa *M. morgani* 3A, ocurrió de forma similar al anterior, mostrando el extracto inducido una incrementada actividad inhibitoria frente a FOX, CAZ, ZOX y CTX, respecto a la actividad del extracto no inducido.

- Frente a la cepa *E. coli* 2B, el extracto inducido no mostró mayor actividad inhibitoria frente los antibióticos ensayados que el extracto no inducido.

A la vista de estos resultados la producción de beta-lactamasas es constitutiva en las tres cepas del grupo A, e inducible en las cepas del grupo B, excepto en la cepa *E. coli* 2B

56,89.

TABLA XXIV.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA

***Citrobacter freundii* 1B, CON EXTRACTO NO INDUCIDO.**

	Extracto enzimático en microlitros				Control	Media - 2σ
	5	10	25	50	50 de enzima inactiv.	
CR	0	0	0	0	20	16
FOX	28	28	28	26	24	23
CAZ	34	34	33	33	33	35
CTX	39	37	33	33	36	33
ZOX	43	43	43	42	43	40
CRO	35	34	32	32	35	32
ATM	33	33	33	33	33	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

TABLA XXV.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA
***Citrobacter freundii* 1B, CON EXTRACTO INDUCIDO.**

	Extracto enzimático en microlitros				Control	Media - 2σ
	5	10	25	50	50 de enzima inactiv.	
CR	0	0	0	0	20	16
FOX	25	24	16	13	22	23
CAZ	32	32	21	19	32	35
CTX	39	35	30	25	35	33
ZOX	38	35	28	23	41	40
CRO	34	32	30	28	34	32
ATM	35	35	35	35	34	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

TABLA XXVI.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA

Escherichia coli 2B, CON EXTRACTO NO INDUCIDO.

	Extracto enzimático en microlitros					Control	Media - 2σ
	5	10	25	50	50 de enzima inactiv.		
CR	0	0	0	0	20	16	
FOX	22	22	22	22	23	23	
CAZ	34	34	34	34	34	35	
CTX	36	36	36	36	37	33	
ZOX	38	38	38	38	39	40	
CRO	33	33	33	33	33	33	
ATM	35	35	35	35	34	34	

Valor de los halos de inhibición en mm.

TABLA XXVII.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA

Escherichia coli 2B, CON EXTRACTO INDUCIDO.

	Extracto enzimático en microlitros				Control	Media - 2σ
	5	10	25	50	50 de enzima inactiv.	
CR	0	0	0	0	20	16
FOX	22	22	22	22	23	23
CAZ	33	33	33	33	33	35
CTX	37	37	37	37	38	33
ZOX	41	41	41	41	43	40
CRO	33	33	33	32	35	32
ATM	37	37	37	37	37	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

TABLA XXVIII.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA

Morganella morganii 3B, CON EXTRACTO NO INDUCIDO.

	Extracto enzimático en microlitros				Control	Media - 2σ
	5	10	25	50	50 de enzima inactiv.	
CR	0	0	0	0	20	16
FOX	24	23	20	16	24	22
CAZ	33	32	32	32	33	33
CTX	38	38	38	38	38	37
ZOX	41	41	41	41	42	40
CRO	34	34	34	34	34	33
ATM	33	33	33	33	33	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

TABLA XXIX.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA

***Morganella morganii* 3B, CON EXTRACTO INDUCIDO.**

	Extracto enzimático en microlitros				Control	Media - 2σ
	5	10	25	50	50 de enzima inactiv.	
CR	0	0	0	0	18	16
FOX	25	23	16	13	25	22
CAZ	32	32	21	18	32	33
CTX	37	35	32	26	37	37
ZOX	40	35	0	0	41	40
CRO	34	34	33	30	32	33
ATM	32	32	32	32	32	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

También valoramos la actividad enzimática en términos de Actividad Específica (micromoles de sustrato hidrolizado / min. /mg. de proteína), para ello calculamos las tasas de hidrólisis de extractos enzimáticos inducidos con FOX y P, y no inducidos, de cada cepa del grupo A y del grupo B Gráficos 19, 20, 21, 22, 23, 24. Hallando a partir de ellos los valores de Actividad Específica.

La Actividad Específica fue frente a CR y FOX para las tres cepas del grupo A, mayor a la de la Benzilpenicilina tomada en nuestro caso como valor 100, ello es característico del perfil de hidrólisis que presentan la cefalosporinas, y algo menor para el Aztreonam (las enzimas Clase I tienen una gran afinidad por las cefalosporinas de amplio espectro, aunque las hidrolizan más lentamente que a las de 1ª y 2ª generación). A diferencia de las beta-lactamasas de amplio espectro en las que la hidrólisis de las penicilinas es superior a la de las cefalosporinas (son el otro gran grupo de beta-lactamasas, codificadas plasmídicamente, responsables en algunas ocasiones de las resistencias en bacterias Gram-negativas a algunas de las cefalosporinas de 3ª generación, y que son fuertemente inhibidas por el A. Clavulánico) ^{73,142}.

Hubo una notable diferencia entre estos valores, y los valores de Actividad Específica para la cepas del grupo B, especialmente frente a las cefalosporinas de 3ª generación ensayadas, tal que sus valores fueron de 100 a 200 veces inferiores a los de sus homólogos en el grupo A %.

GRAFICO 19. TASAS DE HIDROLISIS.
En la cepa Citrobacter freundii 1A.

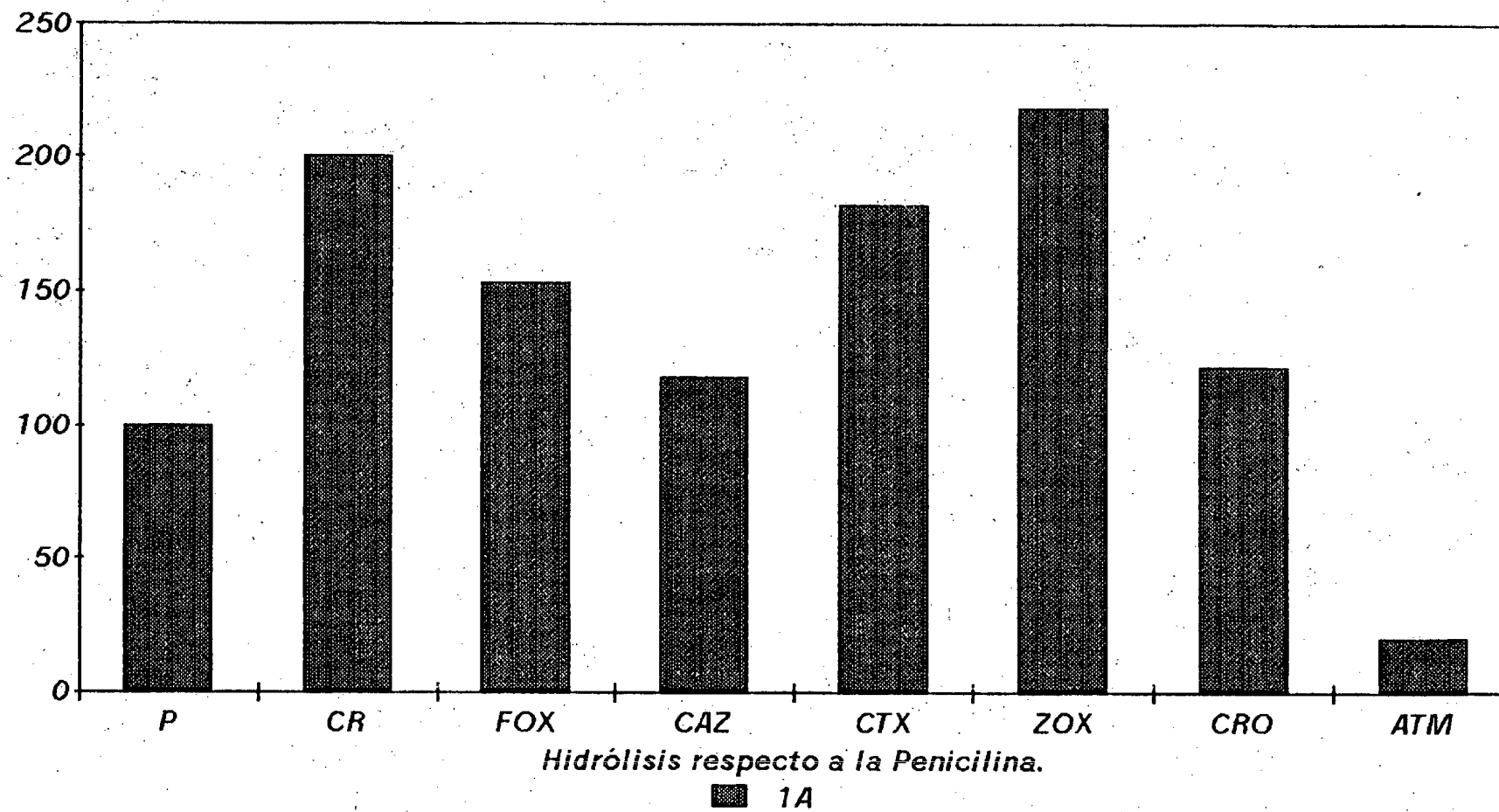


GRAFICO 20. TASAS DE HIDROLISIS.
En la cepa Escherichia coli 2A.

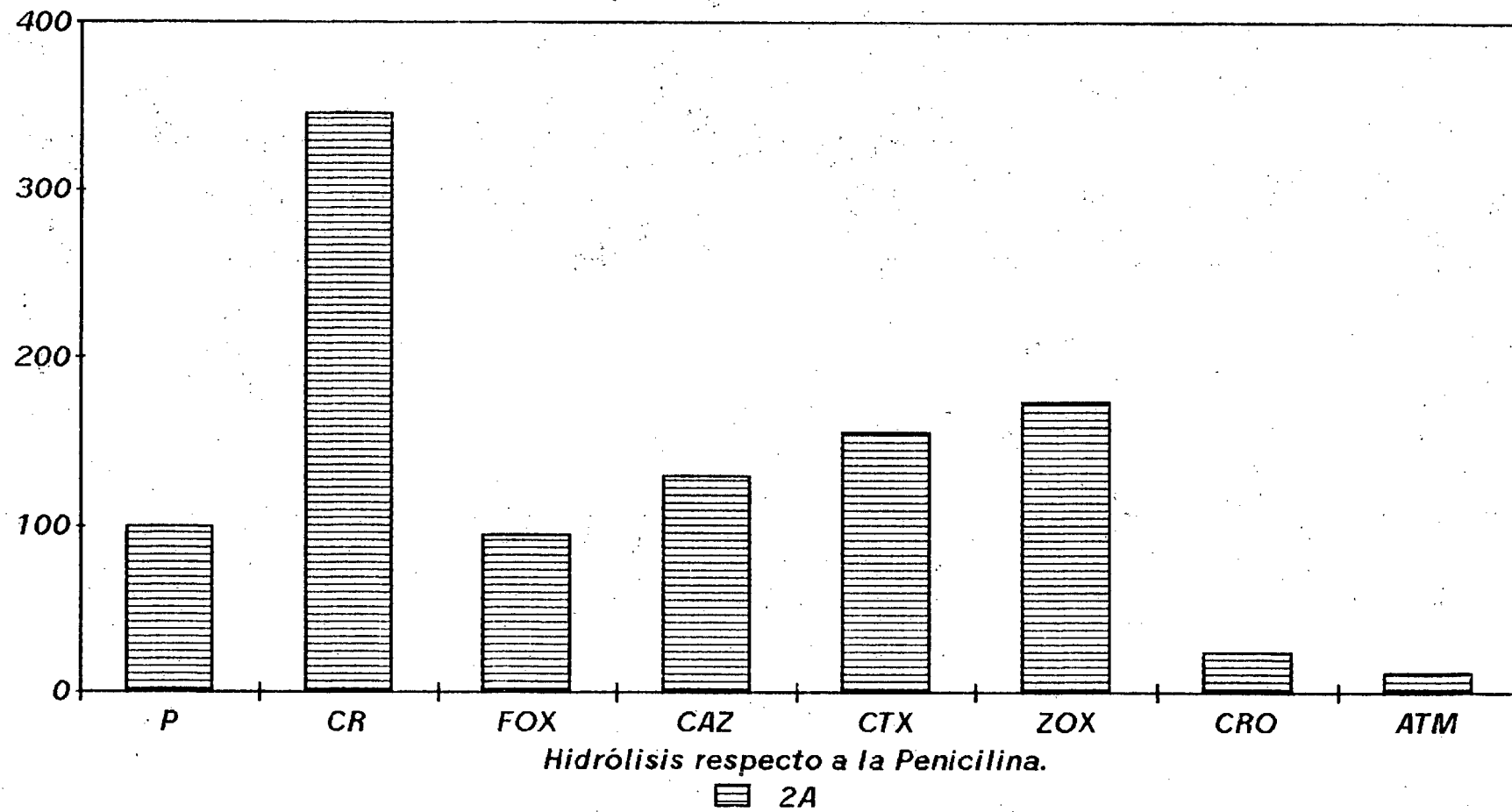


GRAFICO 21. TASAS DE HIDROLISIS.
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

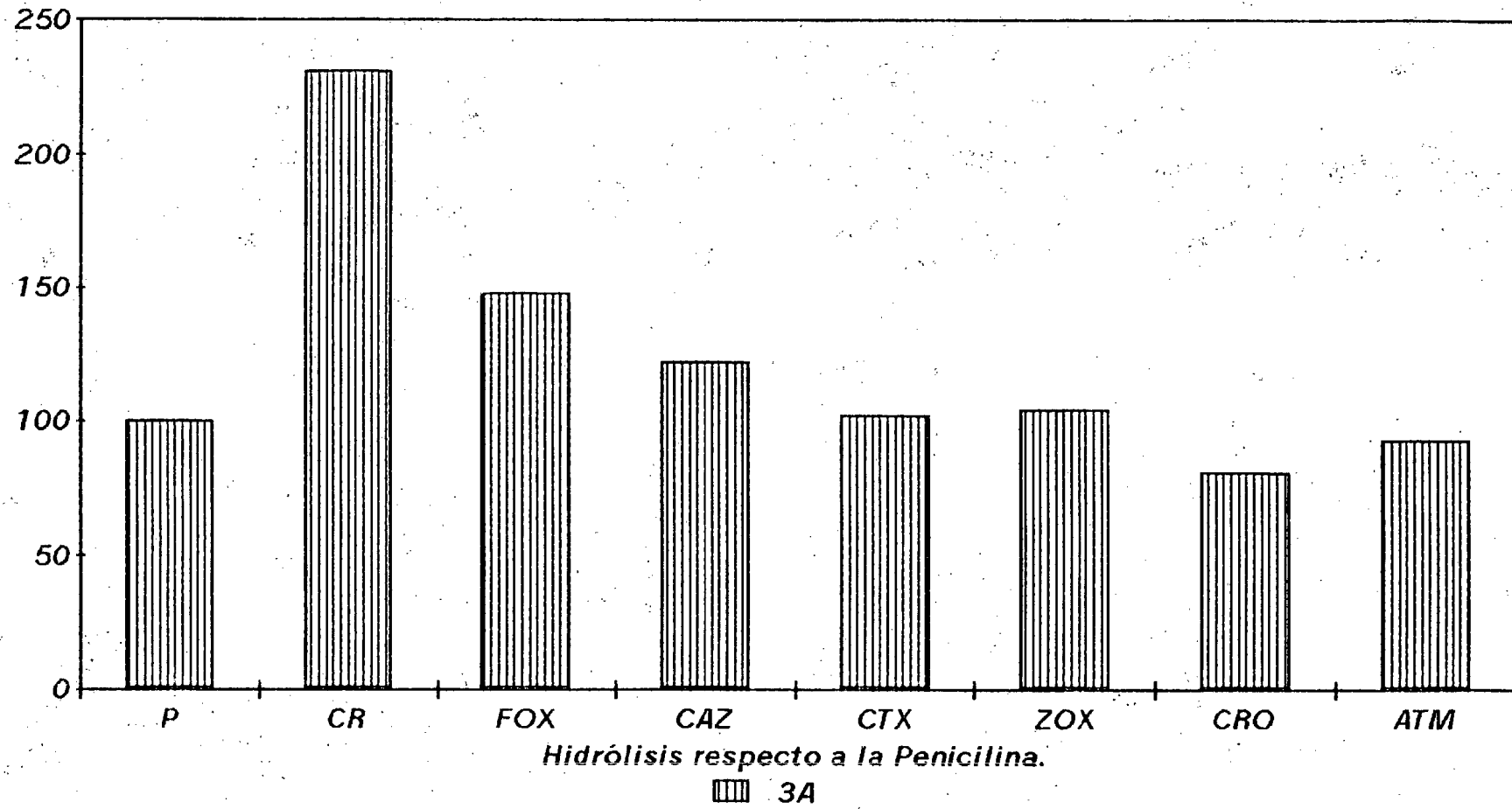


GRAFICO 22. TASAS DE HIDROLISIS.
En la cepa *Citrobacter freundii* 1B.

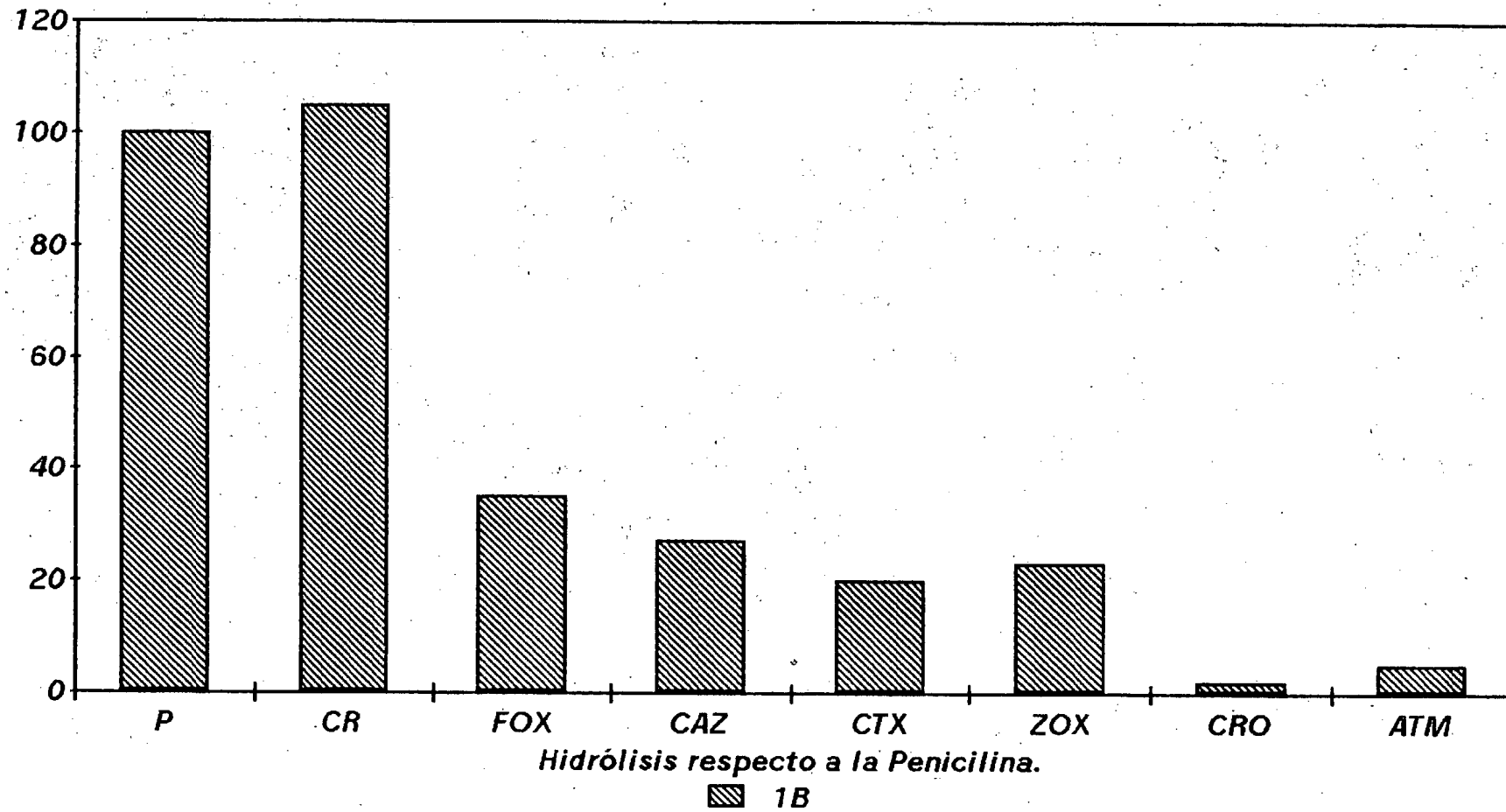


GRAFICO 23. TASAS DE HIDROLISIS.
En la cepa Escherichia coli 2B.

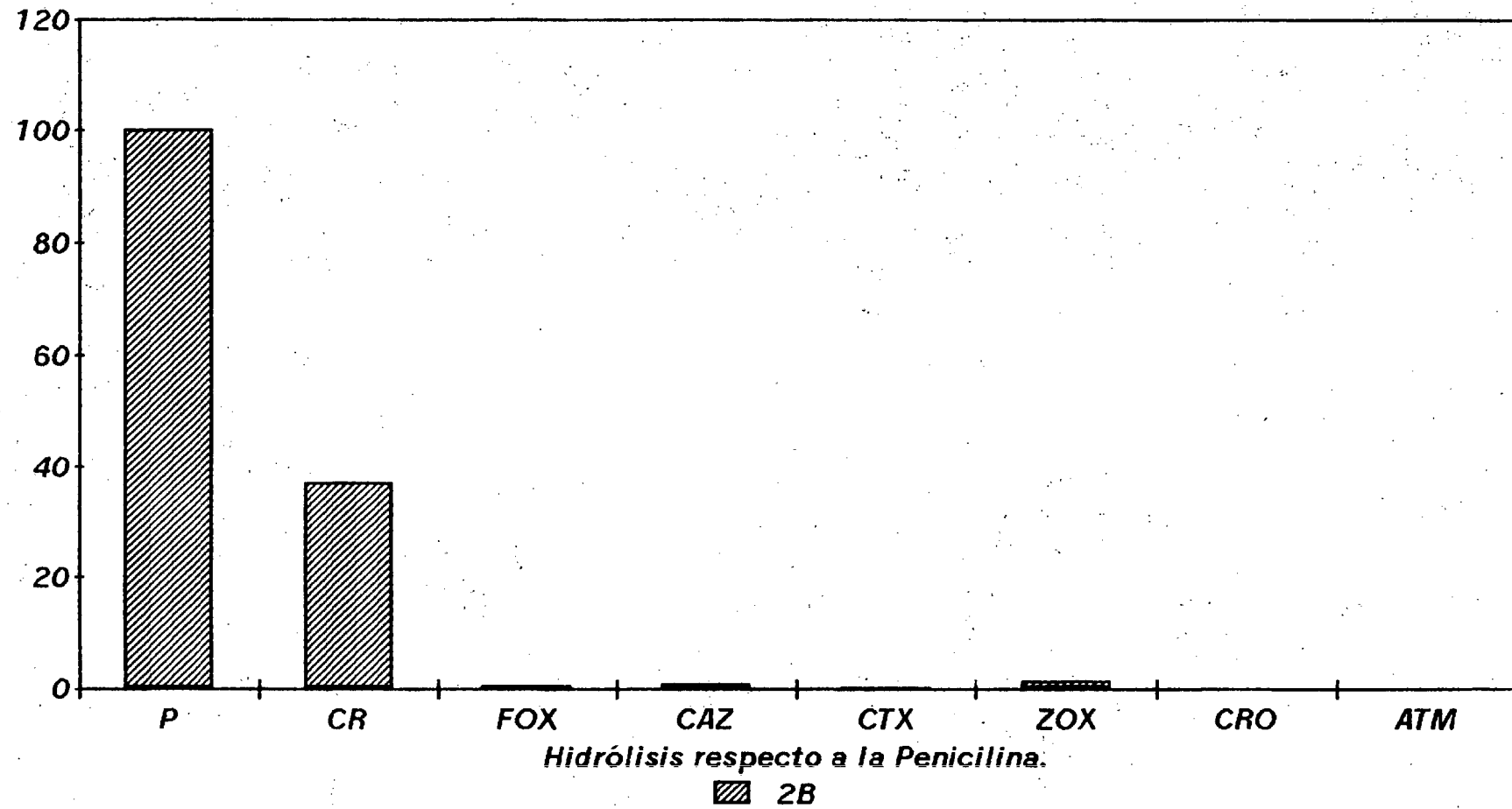
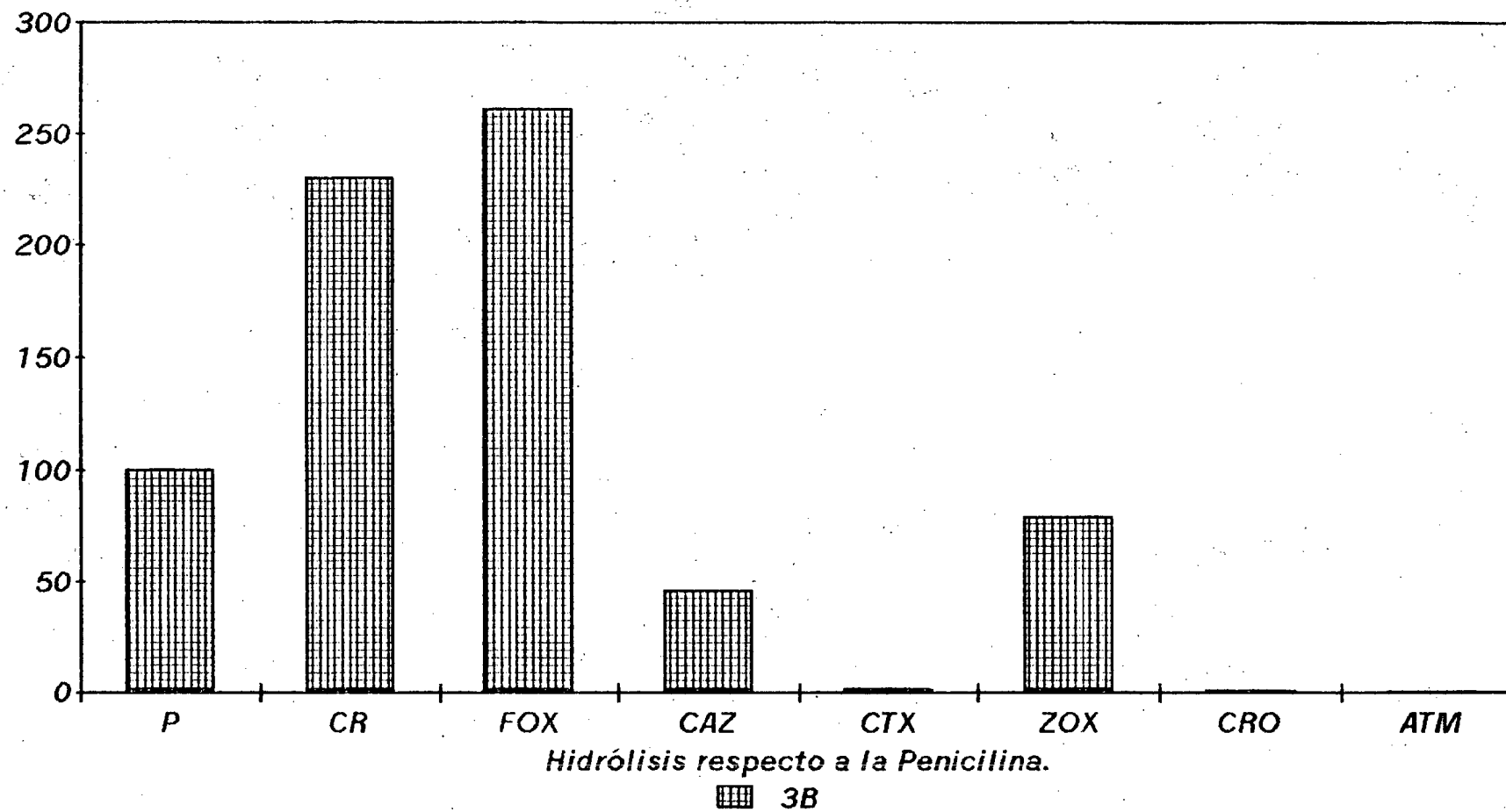


GRAFICO 24. TASAS DE HIDROLISIS.
*En la cepa *Morganella morganii* 3B.*



Los extractos inducidos con FOX y con P para las cepas del grupo A no mostraron una Actividad Específica superior a la de los extractos enzimáticos no inducidos, tal y como se aprecia por los coeficientes de inducción cuyos valores son inferiores a 2. Ello redunda en el significado de los resultados para estas mismas cepas del método microbiológico, es decir en la síntesis constitutiva de estas enzimas ^{35,128}.

Sin embargo, las cepas *C. freundii* 1B y la cepa *M. morganii* 3B mostraron un incremento notable en sus valores de Actividad Específica con los extractos enzimáticos inducidos con coeficientes de inducción superiores a 10 ^{56,89,117,157,192}. No ocurrió así para *E. coli* 2B, cuyos valores no se vieron incrementados con el uso de extractos inducidos.

Estos resultados, Tablas XXX, XXXI, XXXII, XXXIII, XIV, XV confirman los obtenidos por los métodos anteriormente expuestos.

Estudiamos por el mismo método utilizado para las tasas de hidrólisis, la variación que diferentes concentraciones de inhibidores producían sobre la hidrólisis de las cefalosporinas por las enzimas. Los resultados se muestran gráficamente en valores de % de inhibición para cada concentración de inhibidor ensayada frente al extracto enzimático de cada cepa durante 12 minutos, Consideramos que existe inhibición cuando con una concentración inferior a 20 micromoles de inhibidor

TABLA XXX.
ACTIVIDAD DE LAS BETA-LACTAMASAS
EN LA CEPA *C. freundii* 1A.

	NO INDUCIDO	INDUCIDO CON FOX	C.I.	INDUCIDO CON P	C.I.
CR	118	91	1'3	60	0'8
FOX	85	62	0'7	55	0'6
CAZ	62	67	1'1	64	1
CTX	75	63	0'8	59	0'8
ZOX	89	74	0'8	64	0'7
CRO	47	42	0'9	48	1
ATM	20	15	0'8	13	0'7

Actividad específica en microgramos de sustrato hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína.

C.I. o coeficiente de inducción resultante del cociente:
actividad de la beta-lactamasa después de inducción / actividad de la beta-lactamasa sin inducción.

TABLA XXXI.
ACTIVIDAD DE LAS BETA-LACTAMASAS
EN LA CEPA *E. coli* 2A.

	NO INDUCIDO	INDUCIDO CON FOX	C.I.	INDUCIDO CON P	C.I.
CR	417	329	0'78	305	0'73
FOX	184	170	0'92	126	0'7
CAZ	178	170	0'95	140	0'8
CTX	196	172	0'87	154	0'78
ZOX	193	177	0'92	150	0'78
CRO	27	41	1'5	32	1'2
ATM	13	10	0'8	9	0'7

Actividad específica en microgramos de sustrato hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína.

C.I. o coeficiente de inducción resultante del cociente:
 actividad de la beta-lactamasa después de la inducción /actividad
 de la beta-lactamasa sin inducción.

TABLA XXXII.
ACTIVIDAD DE LAS BETA-LACTAMASAS
EN LA CEPA *M. morganii* 3A.

	NO INDUCIDO	INDUCIDO CON FOX	C.I.	INDUCIDO CON P	C.I.
CR	154	179	1'2	171	1'1
FOX	102	92	0'9	78	0'8
CAZ	84	110	1'3	78	0'96
CTX	70	73	1'04	70	1
ZOX	72	67	0'4	53	0'73
CRO	56	33	0'6	37	0'66
ATM	64	33	0'5	37	0'57

Actividad específica en microgramos de sustrato hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína.

C.I. o coeficiente de inducción resultante del cociente:
actividad de la beta-lactamasa después de la inducción / actividad
de la beta-lactamasa sin inducción.

TABLA XXXIII.
ACTIVIDAD DE LAS BETA-LACTAMASAS
EN LA CEPA *C. freundii* 1B.

	NO INDUCIDO	INDUCIDO CON FOX	C.I.
CR	97	112	1'1
FOX	83	107	1'3
CAZ	11	115	10'5
CTX	7	86	12'2
ZOX	9	97	11
CRO	0'8	13	16'2
ATM	0'4	6	15

Actividad específica en microgramos de sustrato hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína.

C.I. o coeficiente de inducción resultante del cociente:
 actividad de la beta-lactamasa después de la inducción /actividad
 de la beta-lactamasa sin inducción.

TABLA XXXIV.
ACTIVIDAD DE LAS BETA-LACTAMASAS
EN LA CEPA *E. coli* 2B.

	NO INDUCIDO	INDUCIDO CON FOX	C.I.
CR	14	9	0'6
FOX	0'2	0'15	0'75
CAZ	0'3	0'23	0'76
CTX	0	0	0
ZOX	0'5	0'35	0'7
CRO	0	0	0
ATM	0	0	0

Actividad específica en microgramos de sustrato hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína.

C.I. o coeficiente de inducción resultante del cociente:
actividad de la beta-lactamasa después de la inducción / actividad
de la beta-lactamasa sin inducción.

TABLA XXXV.
ACTIVIDAD DE LAS BETA-LACTAMASAS
EN LA CEPA *M. morgani* 3B.

	NO INDUCIDO	INDUCIDO CON FOX	C.I.
CR	108	125	1'2
FOX	110	153	1'4
CAZ	12	115	9'5
CTX	2	47	23
ZOX	36	123	3,4
CRO	1'5	37	25
ATM	0'4	13	32'5

Actividad específica en microgramos de sustrato hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína.

C.I. o coeficiente de inducción resultante del cociente:
actividad de la beta-lactamasa después de la inducción / actividad
de la beta-lactamasa sin inducción.

se consigue un % de inhibición igual o superior al 50% tras 10 minutos de preincubación del enzima con el inhibidor = I-50
20,22,24,113,141 Gráficos del 28 al 99 del Anexo I.

De estos resultados destacamos que bastaron concentraciones 0'03 μ gr./ml. (< 1 micromol) de Cloxacilina para superar ese 50% de inhibición en todos los casos estudiados para las cepas del grupo A. En ningún caso ni con 20 micromoles de A. Clavulánico se obtuvo una inhibición del 50%. Mostrando así el mismo patrón que en el estudio de sinergismo ya expuesto.

En cuanto a Sulbactama en algunas ocasiones alcanzó este 50% de inhibición pero con concentraciones próximas a 10 micromoles. En estudios sobre cepas "salvajes" no mutantes productoras de cefalosporinas a bajo nivel hay diferencia entre la inhibición por SL. y A.C., precisando concentraciones de éste último 100 o 200 veces superior a las de Sulbactama para la I-50 ⁴⁵.

También ensayamos otros dos inhibidores, el EDTA y el pCMB, ambos en concentraciones de 10 micromoles exclusivamente, los resultados se muestran en la Tabla XXXVI. En ningún caso hubo un efecto inhibidor superior al 50% por ninguna de estas dos sustancias Tabla XXXVI.

Estos resultados siguen concordando con el perfil de inhibición que presentan las cefalosporinasas ^{20,21}.

Comparando estos resultados con los de los estudios de Sinergismo (Tablas XIII, XIV, XV) se observa que hay diferencia en cuanto al efecto inhibidor del EDTA, ya que mientras

que frente a las enzimas de *C. freundii* 1A y *E. coli* 2A no se muestra activo como inhibidor, sin embargo frente a las células bacterianas enteras (en el antibiograma) sí se observa efecto sinérgico en especial frente a algunas de las cefalosporinas ensayadas. Esta diferencia podría explicarse en que el EDTA además de poder actuar como inhibidor de ciertas beta-lactamasas, las que necesitan iones de metales para su actividad ^{20,21,22} y por su carácter quelante de cationes divalentes puede actuar como un agente permeabilizante al afectar a la estructura de los lipopolisacáridos de la membrana externa ¹³⁴, con lo que la diferencia de resultados podría tener su justificación en que el EDTA actuaría en estas cepas como permeabilizante pero no como inhibidor de sus beta-lactamasas.

Otro estudio que realizamos para la caracterización de las beta-lactamasas de estas bacterias fue el cálculo del punto isoelectrico (p.I.) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida por el método de Vecoli ^{56,178} y también mediante electroforesis en Phastsystem ⁶⁴, usando como revelador en ambos casos Nitrocefina ^{98,127}. Resultando que:

- *C. freundii* 1A, *E. coli* 2A, y *C. freundii* 1B mostraron una sola banda que tuvo en todas ellas un punto isoelectrico > 7'7 según el Phastsystem y según el método de Vecoli en gel de poliacrilamida 8'7 Figuras 2 y 3.

- La cepa *M. morganii* 3A, mostró una banda mayor de p.I. > 7'7 mediante el Phastsystem Figuras 2 y 3. En el

Isoelectroenfoque por el método de Vecoli también apreciamos esta beta-lactamasa y exactamente el valor de su p.I. fue: 7'8 ^{56,158}

Figura 1 y Tabla XXXVI.

- La cepa *M. morganii* 3B, presentó una sola banda de p.I. > 7'7 mediante el Phastsystem Figuras 2 y 3.

- La cepa *E. coli* 2B, presentó una sola banda de p.I. 5'4. Figuras 2 y 3.

Como vemos los resultados son equivalentes entre uno y otro método, con la diferencia de que en el Phastsystem necesitamos sólo 10 µl. de muestra y 20 minutos para realizarlo ⁶⁴.

TABLA XXXVI.

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES EN LA HIDROLISIS Y p.I.
POR ISOELECTROENFOQUE EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

CEPA	A.C.	SL.	CX.	CB.	EDTA	pCMB	p.I.
1A	-	+/-	*	*	-	-	8'7
2A	-	*	*	*	-	-	8'7
3A	-	+/-	*	*	-	-	7'8

El signo * indica que con una concentración 10 micromolar del inhibidor se consigue más del 50% de inhibición.

El signo +/- indica que la inhibición con 10 micromoles del inhibidor consigue con unos sustratos mejor que con otros el 50 % de inhibición.

p.I.

7'8 →



FIG. 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida para la detección de beta-lactamasas.
Columnas A y B: Beta-lactamasas de *M. morganii* 3 A.
(Cada columna contiene tres muestras del mismo extracto enzimático)

FIG. 2.

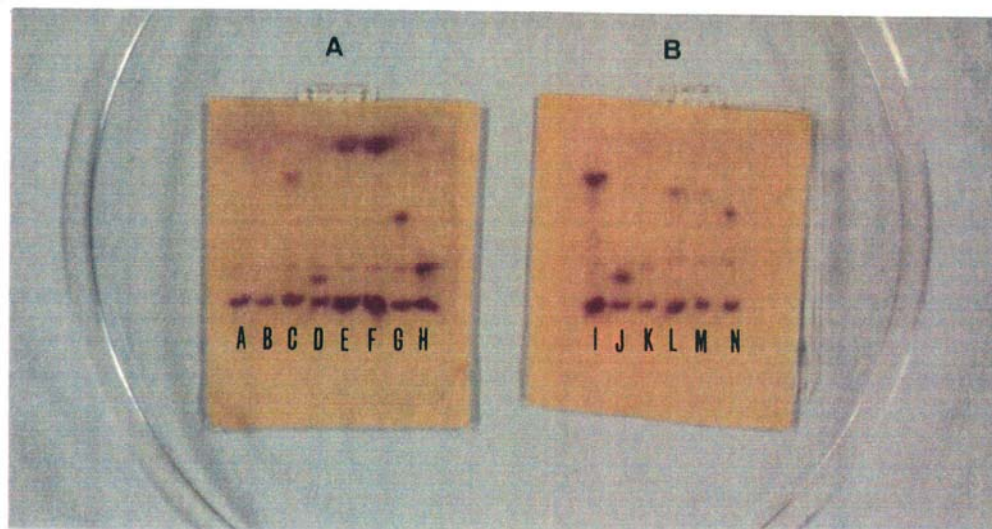
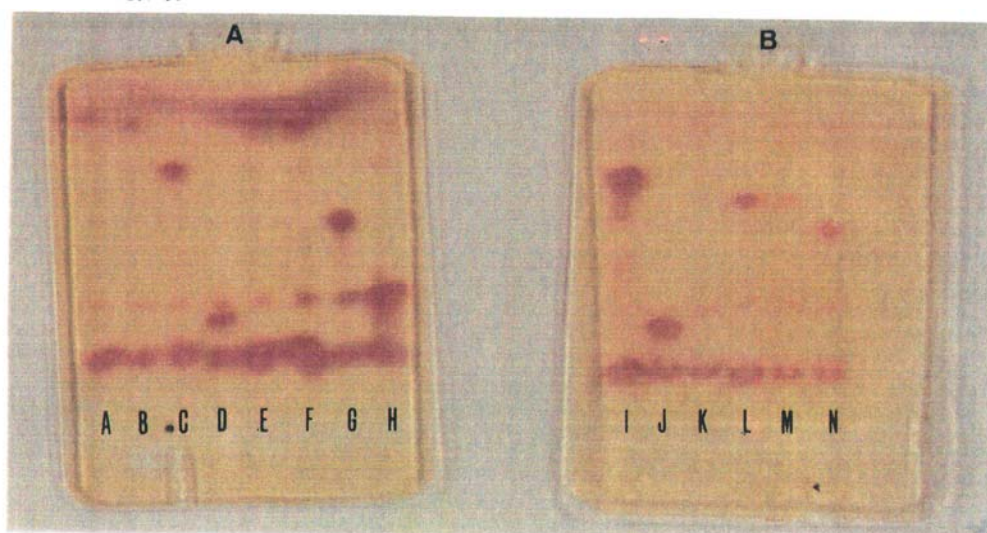


FIG. 3.



FIGS. 2 y 3. Microelectroforesis en Phastsystem.

Gel A. Columnas G y H, beta-lactamasas de las cepas de referencia de p.I. conocido.

G: Del plásmido *pUD 18*; H: Del plásmido *RP 4*.

A: Beta-lactamasas de *C. freundii* 18' (mutante obtenida in vitro).

B: Beta-lactamasas de *C. freundii* 18.

C: Beta-lactamasas de *M. morgani* 3B.

D: Beta-lactamasas de *E. coli* 2B.

E: Beta-lactamasas de *C. freundii* 1A.

F: Beta-lactamasas de *E. coli* 2A.

Gel B. Columnas J, L, M y N: beta-lactamasas de las cepas de referencia de p.I. conocido.

I: Beta-lactamasas de *M. morgani* 3A.

J: Del plásmido *R III*; L: Del plásmido *p 453*; M: Del plásmido *pUD 20*.

N: Del plásmido *pUD 18*.

PAPEL DE LA PERMEABILIDAD.

Queríamos valorar el papel de la permeabilidad en las tres cepas :

- *Citrobacter freundii* 1A.
- *Escherichia coli* 2A.
- *Morganella morganii* 3A.

Comparamos la actividad de los extractos enzimáticos con la de las células intactas tal como proponen diversos autores ⁵³. Para ello utilizamos el Método Iodimétrico, expuestos en la parte de Material y Métodos. Resultados en la Tabla XXXVII. Mostrándose igual de activas frente a la Benzilpenicilina las enzimas de los extractos enzimáticos como las células intactas de las cepas 1A, 2B, 3A, 1B y 2B. Sin embargo, la reacción fue algo más lenta con las células intactas que en presencia del extracto enzimático de la cepa *M. morganii* 3B.

Estudiamos la relación existente entre los valores de CMI y los de Actividades específicas, calculando los coeficientes de correlación lineal ^{13,184} ya que un coeficiente de correlación lineal muy próximo al valor absoluto de 1 para una cepa determinada, en tal relación, es un dato indicativo de que las resistencias expresadas fenotípicamente se justifican en la acción de las enzimas de esa cepa.

TABLA XXXVII.
METODO IODIMETRICO.

AGENTE	TIEMPO DE REACCION	VALORACION
Células de 1A	< 15 seg.	+
Enzimas de 1A	< 15 seg.	+
Células de 2A	< 15 seg.	+
Enzimas de 2A	< 15 seg.	+
Células de 3A	< 15 seg.	+
Enzimas de 3A	< 15 seg.	+
Células de 1B	< 15 seg.	+
Enzimas de 1B	< 15 seg.	+
Células de 2B	< 15 seg.	+
Enzimas de 2B	< 15 seg.	+
Células de 3B	1 min.	+
Enzimas de 3B	< 15 seg.	+

Respecto de los coeficientes de relación lineal en las cepas del grupo A y del grupo B :

- En <i>Citrobacter freundii</i> 1A	r=0'7
- En <i>Escherichia coli</i> 2A	r=0'75
- En <i>Morganella morganii</i> 3A	r=0'92
- En <i>Citrobacter freundii</i> 1B.	r=0'84
- En <i>Escherichia coli</i> 2B.	r=0'81
- En <i>Morganella morganii</i> 3B.	r=0'65

En los estudios de inducción ni la FOX ni la P mostraron en estas cepas carácter inductor, así que ensayamos el efecto de la P en el valor de la CMI de las diferentes cepas a cada antibiótico, ya que las penicilinas pueden tener efecto permeabilizante y es por tanto otra forma de valorar el papel de la permeabilidad ¹³². Para ello combinamos con las distintas concentraciones de antibióticos ensayados 32 µgr. de P. Los resultados tras 18 horas de incubación se muestran en los Gráficos 25, 26, 27. Tal como se observa :

- Tanto para la cepa *Citrobacter freundii* 1A, como para la cepa *E. coli* 2A, encontramos en presencia de la penicilina disminuyeron los valores de CMI de estas cepas frente a CAZ, CTX y FOX de forma notable.

GRAFICO 25. EFECTO DE LA PENICILINA.
En la cepa Citrobacter freundii 1A.

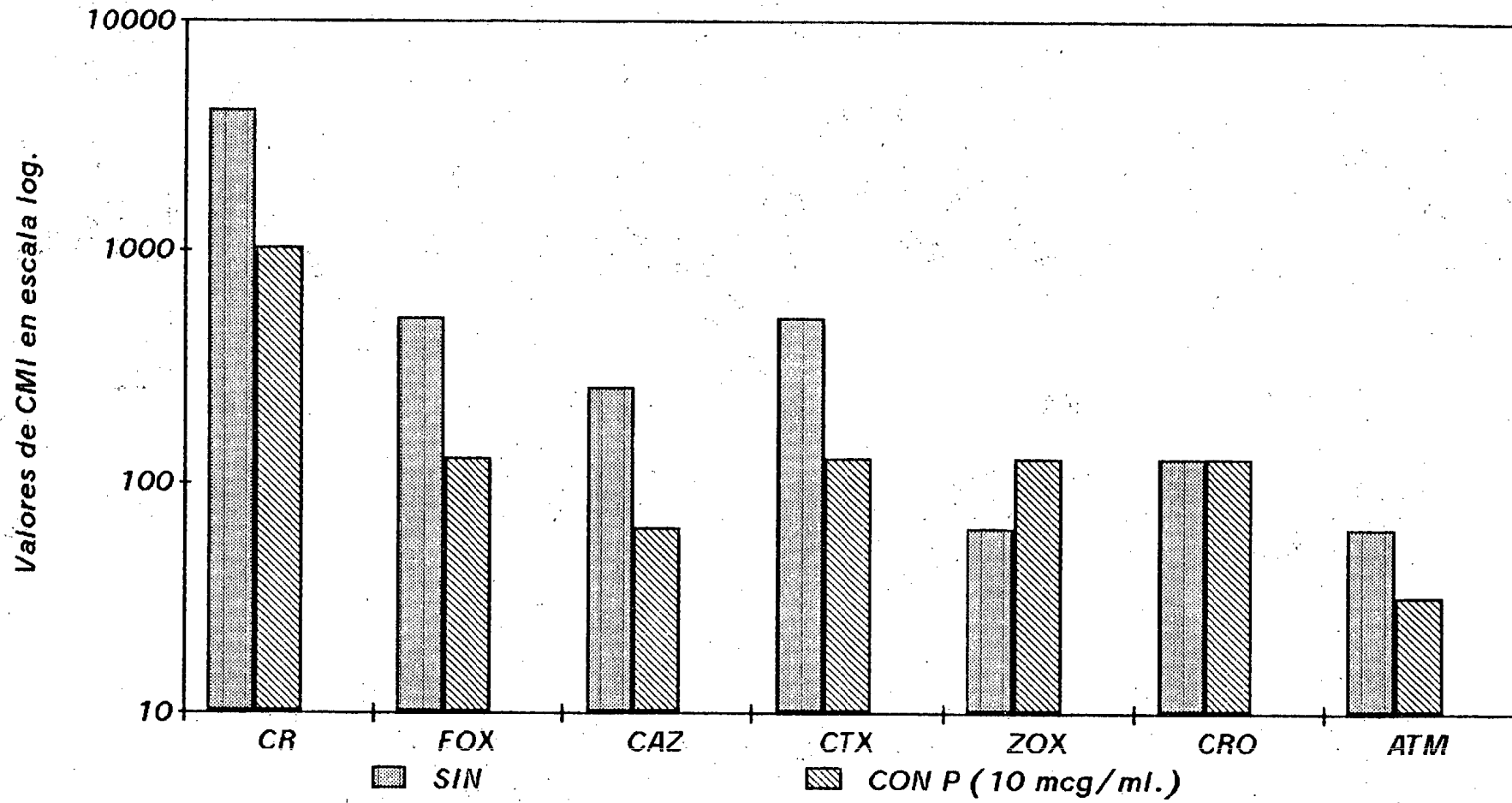


GRAFICO 26. EFECTO DE LA PENICILINA.
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

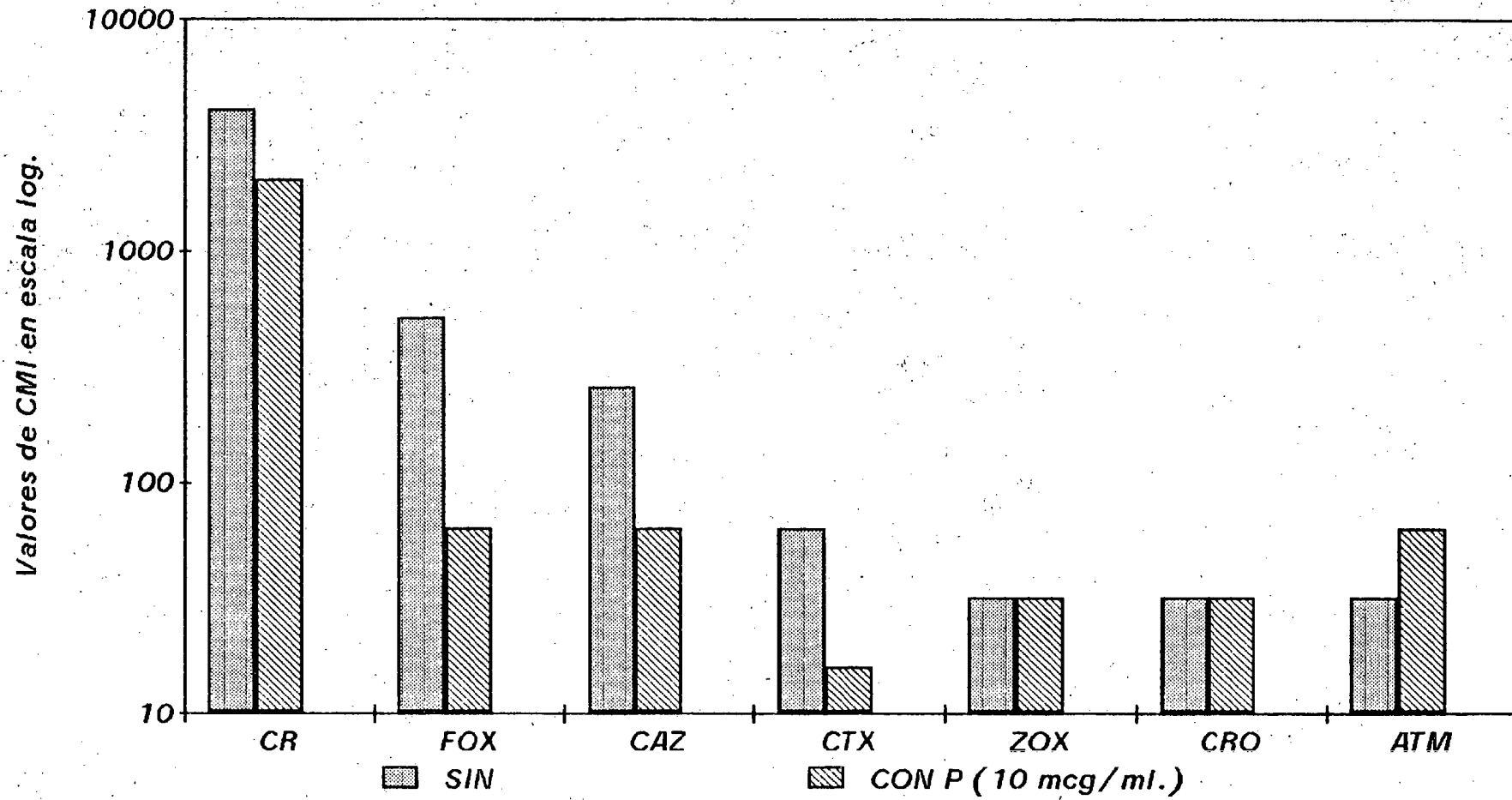
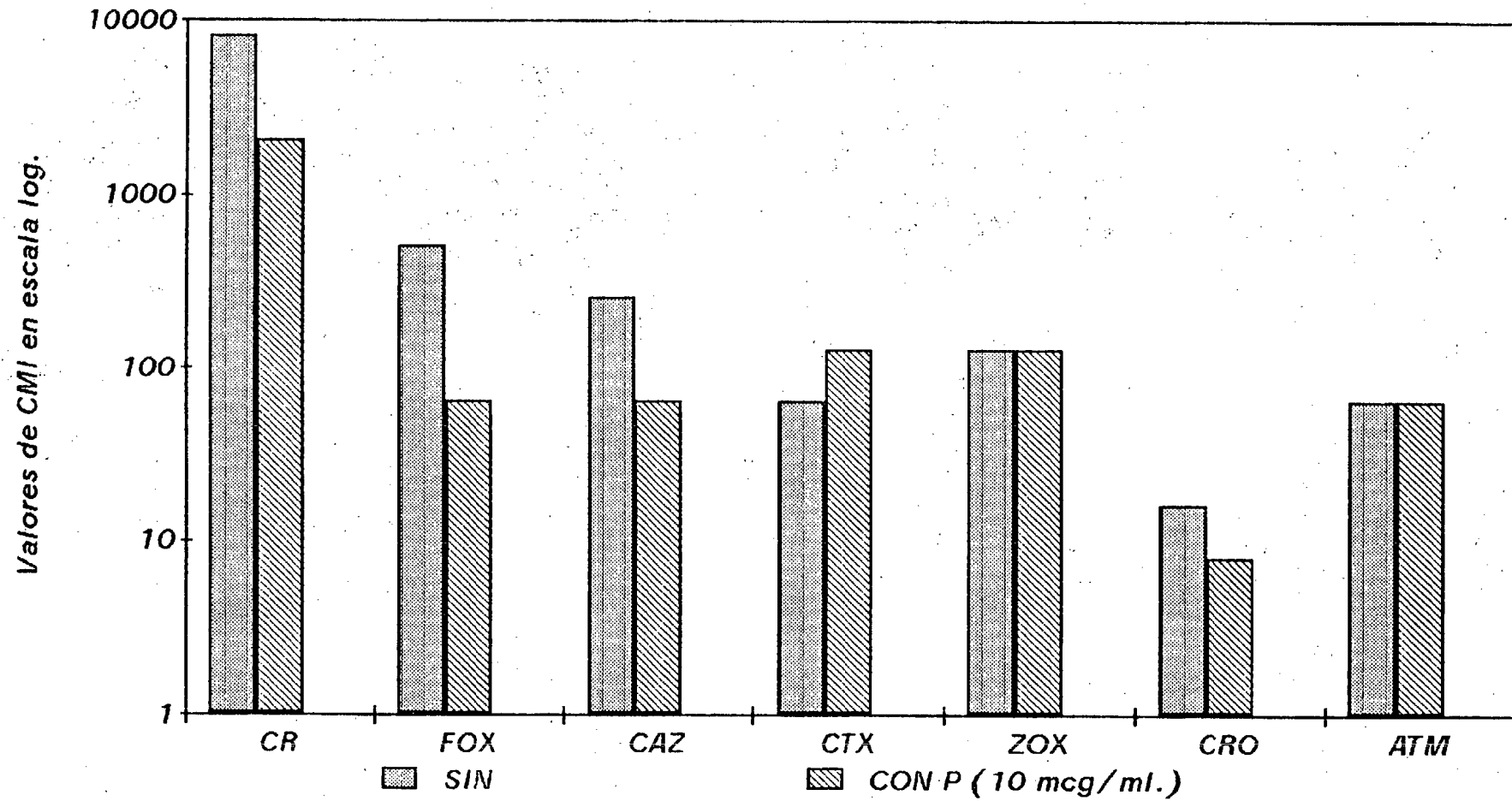


GRAFICO 27. EFECTO DE LA PENICILINA.
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*



- En *M. morganii* 3A, el efecto del la P sobre los valores de CMI fue escaso no aumentando sus valores pero tampoco disminuyéndolos.

Podemos decir, que en la cepa *C. freundii* 1A y en la cepa *E. coli* 2A, el papel de la permeabilidad es un factor más importante en el origen de la resistencia a las cefalosporinas y Aztreonam, que en la cepa *M. morganii* 3A. La conjunción de estos dos factores en cepas de enterobacterias mutantes hiperproductoras es posible ^{62,96}. Pero también puede colaborar el fenómeno de "trapping" o "efecto esponja", originado por el exceso de enzima presente en el espacio periplásmico, que crea una barrera no hidrolítica ^{53,62,87,96,160,176,179}. Estos dos factores explicarían esa diferencia que mantienen sus valores de r respecto de 1.

En resumen, la menor permeabilidad de membrana no es por sí misma suficiente para determinar la resistencia a los antibióticos (no fue capaz de variar el resultado del método iodimétrico) y afecta más a la resistencia a antibióticos como CRO y ATM que penetran peor a través de la membrana externa, como vimos por el Método Microbiológico ^{61,88,188}.

En *M. morganii* 3B su valor de $r = 0.65$ expresa una mayor actividad hidrolítica frente a FOX que a CR, debiéndose el mayor valor de CMI frente a CR a otros factores, penetración por las características de la molécula,...

ORIGEN.

En la caracterización de las beta-lactamasas, por todos los resultados previos parece que nos encontramos ante beta-lactamasas de origen cromosómico en las cepas en estudio excepto para *E. coli* 2B. Pero queríamos determinar de una forma más directa esta hipótesis, para ello estudiamos si estas cepas portaban plásmidos, y si las resistencias que presentaban a las cefalosporinas eran transmisibles:

- En el estudio del ADN plasmídico encontramos los resultados que muestran las Figuras 4, 5, 6, 7 y 8. En las resistencias a cefalosporinas de amplio espectro codificadas por plásmidos de alto peso molecular, superior a 50 Kb. y frecuentemente superiores a 80 Kb. ^{26,27,29,137,148,180} en nuestro caso en las cepas que presentaron plásmidos éstos eran de peso molecular inferior a 50 Kb., las cepas de *C. freundii* 1A y 1B no presentaron plásmidos. La cepa *E. coli* 2B fue la única que presentó un plásmido de peso molecular de 52 Megadaltons (Mg.). La cepa *M. morganii* 3A presentó un único plásmido de 33 Mg. y la cepa *E. coli* 2A presentó también un solo plásmido de 21'4 Mg. La cepa *M. morganii* 3B presentó tres plásmidos de 10'6, 4'7 y 3'8 Mg.

Para el cálculo del peso molecular seguimos el método comparativo con plásmidos de P.M. conocido ^{29,149,152,189}.



FIG. 4. Electroforesis en gel de agarosa al 0'7%.

Muestras de ADN de peso molecular conocido:

A: *Bacteriófago Lambda / HIM III*.

B: ADN de *E. coli* pUZ 2.

C: ADN de *E. coli* pUZ 1.

D: ADN de *E. coli* R40 A.

E: Pocillo control negativo.

F y G: ADN de *C. freundii* 1B.

H: ADN de *C. freundii* 1B'.

I y J: ADN de *C. freundii* 1A.

K: ADN de *E. coli* 2A.

L y M: ADN de *M. morganii* 3B.

N: ADN de *E. coli* 2B.

Ñ: ADN de *E. coli* K 12 transconjugante de *E. coli* 2B.

O: ADN de *E. coli* K 12.

P y R: ADN de *M. morganii* 3A.

S y T: ADN de *E. coli* 2A.

U: Pocillo control negativo.

V: ADN de *C. freundii* 1A.



FIG. 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0'7%.

Muestras de peso molecular conocido:

A: ADN de *E. coli* V 517.

B y C: ADN del *Bacteriófago Lambda* / HIM III.

D: ADN de *M. morganii* 3B.



FIG. 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0'7%.

A: ADN de *E. coli* K12

transconjugante de *E. coli* 2B

B: ADN de *E. coli* 2B.

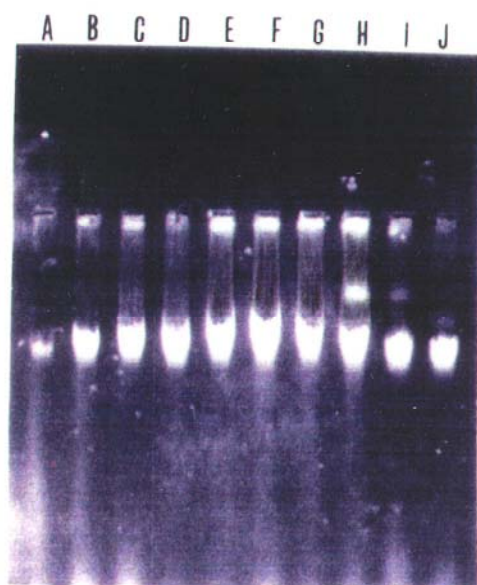


FIG. 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0'7%.

A: ADN de *E. coli* 2B tras curación.

B: ADN de *M. morganii* 3A tras curación.

C y D: ADN de *C. freundii* 1B.

E: ADN de *C. freundii* 1B' (mutante obtenida in vitro).

F y G: ADN de *C. freundii* 1A.

H: ADN de *E. coli* K12 transconjugante de *E. coli* 2B.

I: ADN de *E. coli* 2B.

J: ADN de *M. morganii* 3A.

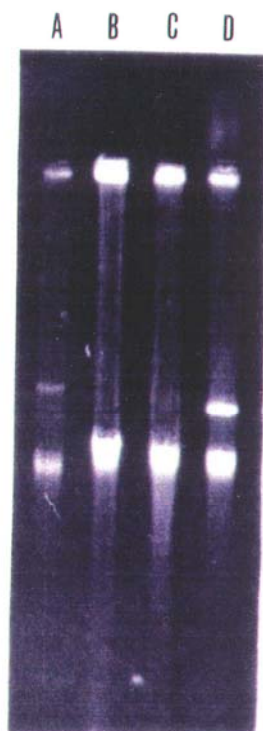


FIG. 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0'7%.

A: ADN de *M. morganii* 3A.

B: ADN de *M. morganii* 3A tras curación.

C: ADN de *E. coli* 2A tras curación.

D: ADN de *E. coli* 2A.

RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE CURACION

Los experimentos de curación se realizaron con todas las cepas del grupo A y la cepa *E. coli* 2B. Obteniéndose un crecimiento superior 100 colonias en las placas de MacConkey donde debían crecer las cepas curadas, cuando usamos Naranja Acridina y los resultados fueron negativos cuando usamos como agente "curante" el Bromuro de etidio, del estudio de sensibilidad antimicrobiana de estas colonias resultó :

- La cepa *E. coli* 2B perdió su plásmido que ya no apareció en la electroforesis de su ADN, y conjuntamente se alteró su patrón de resistencias, Tabla XXXVIII.

Sin embargo, tras tres intentos sucesivos no obtuvimos a partir de ninguna de las cepas del grupo A cepas sensibles a las cefalosporinas de 3ª generación, pero sí parece que hubo pérdida de los plásmidos que portaban las cepas 2A y 3A, tal como se aprecia en las Figuras 7 y 8 de los geles de agarosa.

Ahora el segundo paso era confirmar este carácter cromosómico en las cepas del grupo A en sus resistencia a las cefalosporinas y el carácter plasmídico en la cepa *E. coli* 2B en su resistencia a la Ampicilina y a la Cefalotina. Para ello realizamos experimentos para transferir su material genético.

TABLA XXXVIII.
PERDIDA DE RESISTENCIAS TRAS CURACION DE
PLASMIDOS EN LA CEPA *Escherichia coli* 2B.

Antibiótico	<i>E. coli</i> 2B inicial	<i>E. coli</i> 2B
		1000 µgr./ml de N.A.
Estreptomicina	0	16
Netilmicina	13	25
Amikacina	23	23
Tobramicina	9	21
Eritromicina	9	9
Clindamicina	0	0
Cloramfenicol	0	26
Gentamicina	20	20
Ampicilina	0	16
Ticarcilina	0	22
Cloxacilina	0	0
Cefalotina	0	19

Valor de los halos de inhibición en mm.

RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENETICO.

CONJUGACION:

Se utilizó como cepa receptora la *Escherichia coli* K-12 que es resistente al Acido Nalidíxico con un valor de CMI de 128 μ gr./ml. Y la selección de transconjugantes se realizó en placas de Agar MacConkey conteniendo Acido Nalidíxico a una concentración de 100 μ gr./ml y 100 μ gr./ml. para CR, 50 μ gr./ml. para FOX, para el resto de las cefalosporinas ensayadas una concentración de 32 μ gr./ml., y 64 μ gr./ml. para Ampicilina. Los resultados fueron:

1. Que a partir de las cepas 1A, 2A, 3A, 1B y 3B utilizadas como cepas donantes no se obtuvieron en las placas de selección ninguna colonia de sus posibles respectivos transconjugantes que hubiesen adquirido la resistencia a ninguna cefalosporina a las que estas cepas donantes son resistentes, tampoco a la Ampicilina.

2. Sin embargo, el proceso de conjugación sí se produjo para la cepa 2B, que transfirió su resistencia a la Tobramicina, Ampicilina y otras penicilinas y a la Cefalotina conjuntamente Tabla XXXIX.

TABLA XXXIX
PATRONES DE RESISTENCIA EN LOS TRANSCONJUGANTES.

	<u>E. coli K-12</u>	<u>Transconjugante de 2B</u>
A.N.	0	0
AM	18	0
TIC	25	0
CB	20	0
MZ	30	0
CR	18	0
TM	27	0
FOX	22	22
CAZ	30	30
ZOX	40	40
CRO	35	35
ATM	33	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

TRANSFORMACION:

Para este procedimiento se utilizó la cepa *Escherichia coli* HB-101, que tiene como marcador la resistencia a la estreptomicina. Esta cepa tras convertirse en competente por el procedimiento que se expuso en la parte de Material y Métodos se puso en contacto con el material genético extraído de las cepas donantes mediante el método de la lisis alcalina, y se comprobó que dicha extracción había sido efectiva mediante Electroforesis en gel de Agarosa. Los resultados fueron:

1. Que en ningún caso se obtuvieron colonias de cepas transformantes que hubiesen adquirido la resistencia a las cefalosporinas a partir del material genético de las cepas donantes: 1A, 2A, 3A, 1B, 3B.

2. Pero sí se obtuvieron transformantes para la cepa 2B en la resistencia a la Tobramicina, así como a Cefalotina y diversas penicilinas Tabla XL

TABLA XL.

PATRONES DE RESISTENCIA PARA LAS TRANSFORMANTES.

	<u>E. coli HB-101</u>	<u>Transformante de 2B</u>
S	0	0
AM	21	0
TIC	40	0
CB	35	0
MZ	34	0
CR	20	0
TM	25	0
FOX	33	33
CAZ	37	37
ZOX	40	40
CRO	42	42
ATM	40	40

Valores de los halos de inhibición en mm.

SELECCION DE MUTANTES.

Por último queríamos ver si era posible obtener poblaciones mutantes multirresistentes a partir de una cepa sensible *C. freundii*, y si era fácil su selección bajo la influencia de un inductor. Para ello seguimos el método descrito en Material y Métodos ⁷ obteniendo tras una primera exposición de la cepa *C. freundii* 1B (que como ya habíamos visto presentaba beta-lactamasas Clase I inducibles) a una concentración subinhibitoria de FOX obtuvimos en la placa con Agar MacConkey unas colonias cuya susceptibilidad a las diferentes cefalosporinas se estudió por Antibiograma por los métodos de Difusión y de Dilución en agar de Mueller Hinton. No pudimos seleccionar subpoblaciones mutantes desreprimidas con IPM ^{7,35}. Los resultados se muestran la Tabla XLI.

Por estos resultados parece que hemos seleccionado una subpoblación mutante desreprimida a partir de la cepa *C. freundii* 1B, lo cual verificamos con el estudio del Biotipo por API 20E que es igual al de la cepa inicial sensible.

Estudiamos también la actividad de las enzimas de esta nueva cepa la cepa 1B' mediante el Método Microbiológico Tabla XLII y mediante el cálculo de las tasas de hidrólisis y Actividades específicas con y sin inducción Gráfico 100 y Tabla XLIII.

TABLA XLI.

SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS

EN LA CEPA *Citrobacter freundii* 1B'

(mutante desreprimida seleccionada).

Antibiótico	CMI en µgr./ml.	Halos de inhibición en mm
CEFALOTINA	4096	0
CEFOXITINA	512	0
CEFUROXIMA	256	0
CEFTAZIDIMA	256	0
CEFTIZOXIMA	512	0
CEFOTAXIMA	128	0
CEFTRIAXONA	64	9
CEFPiROME	42	0
AZTREONAM	16	18
IMIPENEM	2	24
CARBENICILINA	64	9
CLOXACILINA	1024	0
MEZLOCILINA	16	17

IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS

POR METODO API-20E.

CEPA 1B.

TEST	SUSTRATO	REACCION ENZIMATICA	RESULTADO
ONPG	Orto-nitro-fenil Galactósido	Beta-galactosidasa	+
ADH	Arginina	Arginina dihidrolasa	-
LDC	Lisina	Lisina descarboxilasa	-
ODC	Ornitina	Ornitina descarboxilasa -	-
CIT	Citrato sódico	Uso del citrato	-
H ₂ S	Tiosulfato sódico	Producción de H ₂ S	+
URE	Urea	Ureasa	-
TDA	Triptófano	Triptófano desaminasa	-
IND	Triptófano	Producción de indol	-
VP	Piruvato sódico	Producción de acetoína	-
GEL	Gelatina de Kohn	Gelatinasa	-
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación	+
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación	+
INO	Inositol	Fermentación/oxidación	-
SOR	Sorbitol	Fermentación/oxidación	+
RHA	Ramnosa	Fermentación/oxidación	+
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación	+
MEL	Melobiosa	Fermentación/oxidación	+
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación	-
ARA	Arabinosa	Fermentación/oxidación	+

Test de Citocromo oxidasa

-

Crecimiento en Medio Agar MacConkey

+

Por tanto, es una Enterobacteria del género *Citrobacter*, de la especie *Citrobacter freundii*.

Su biotipo es igual al de la cepa inicial 1B, y diferente del de la cepa *C. freundii* 1A.

TABLA XLII.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA CEPA

Citrobacter freundii 1B', CON EXTRACTO NO INDUCIDO.

	Extracto enzimático en microlitros				Control Media - 2σ	
	5	10	25	50	50 de enzima inactv.	
CR	0	0	0	0	20	16
FOX	25	23	12	0	22	22
CAZ	32	32	20	9	32	33
CTX	39	35	32	15	35	33
ZOX	38	35	26	22	41	40
CRO	35	33	32	27	35	33
ATM	33	33	33	33	33	33

Valor de los halos de inhibición en mm.

TABLA XLIII.

ACTIVIDAD DE LAS BETA-LACTAMASAS

En la cepa *Citrobacter freundii* 1B'

ANTIBIOTICO	ACTIVIDAD ESPECIFICA
CEFALOTINA	207
CEFOXITINA	75
CEFTAZIDIMA	96
CEFOTAXIMA	70
CEFTIZOXIMA	53
CEFTRIAXONA	40
AZTREONAM	10

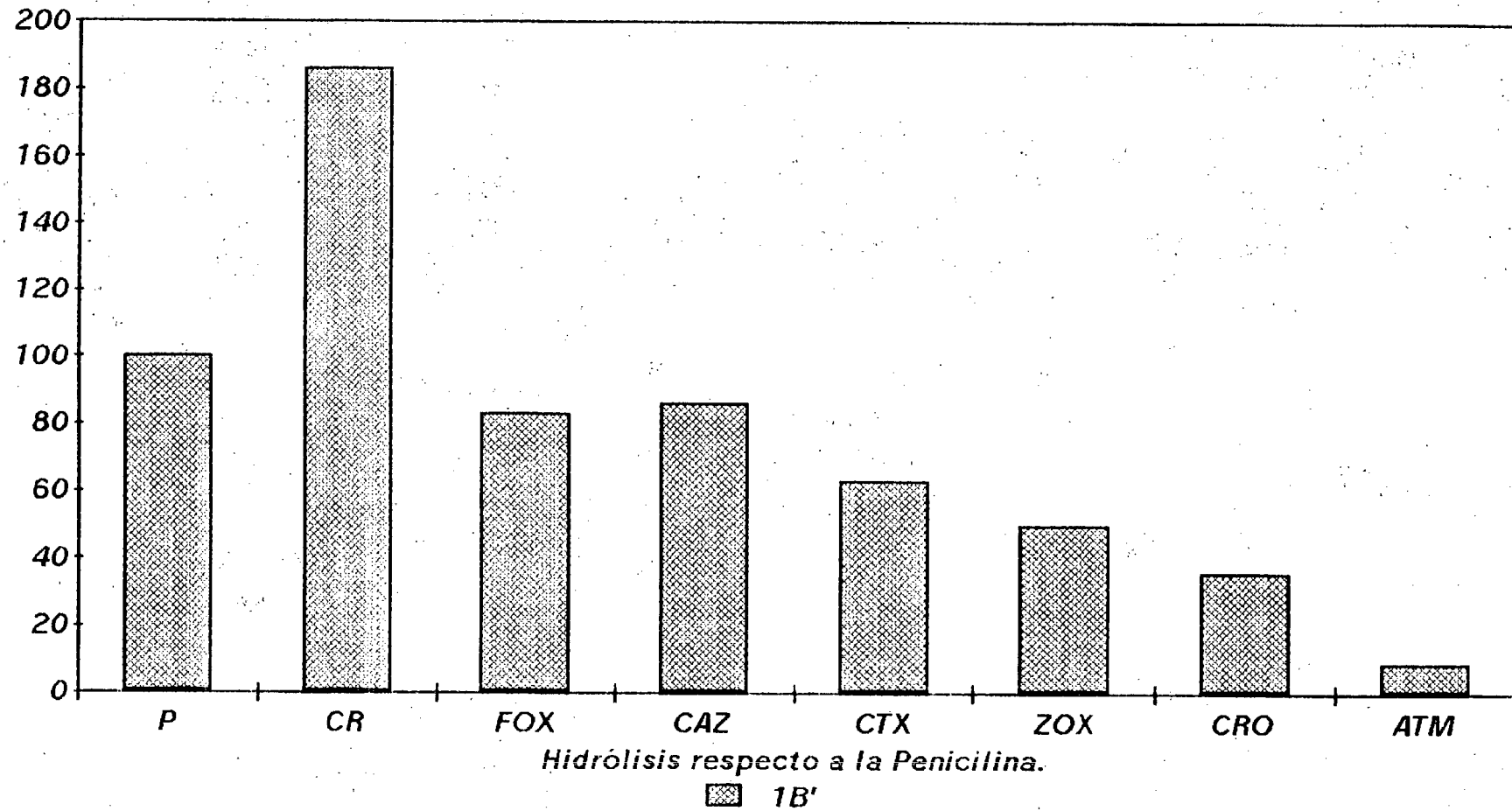
El coeficiente de correlación lineal $r = 0.84$

Actividad específica en microgramos de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína.

Según estos resultados en esta cepa mutante desreprimida obtenida in vitro, al igual que la de procedencia clínica (con valor de $r = 0.7$) tienen una alta correlación entre la actividad de sus beta-lactamasas y su fenotipo de resistencia a las Cefalosporinas y al Aztreonam. Aunque este valor no es 1, por lo que en esa diferencia podría expresarse el papel secundario de otros factores. Teniendo en cuenta que los resultados del Método Iodimétrico con enzimas y con células enteras no tienen diferencia en ambas cepas, del Método Microbiológico y los resultados del efecto del EDTA y la P en la cepa 1A, podemos decir que la permeabilidad en la especie *Citrobacter freundii* 1B' y el fenómeno de "trapping" (puesto que la hidrólisis de las cefalosporinas de 3ª generación no es tan alta como en la cepa 1A) y la permeabilidad en la cepa *C. freundii* 1A justificarían la diferencia de r del valor absoluto de 1 2,14,53,62.

Se comprueba además en esta cepa la producción de cefalosporinasas por la superior hidrólisis de la Cefalotina y Cefoxitina respecto de la Benzilpenicilina. Estas enzimas presentan una gran afinidad por las cefalosporinas de 3ª generación aunque generalmente las hidrolizan de forma más lenta 14,57,76,96, Gráfico 100

GRAFICO 100. TASAS DE HIDROLISIS.
En la cepa Citrobacter freundii 1B'.



ANEXO I

GRAFICO 28. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa Citrobacter freundii 1A.

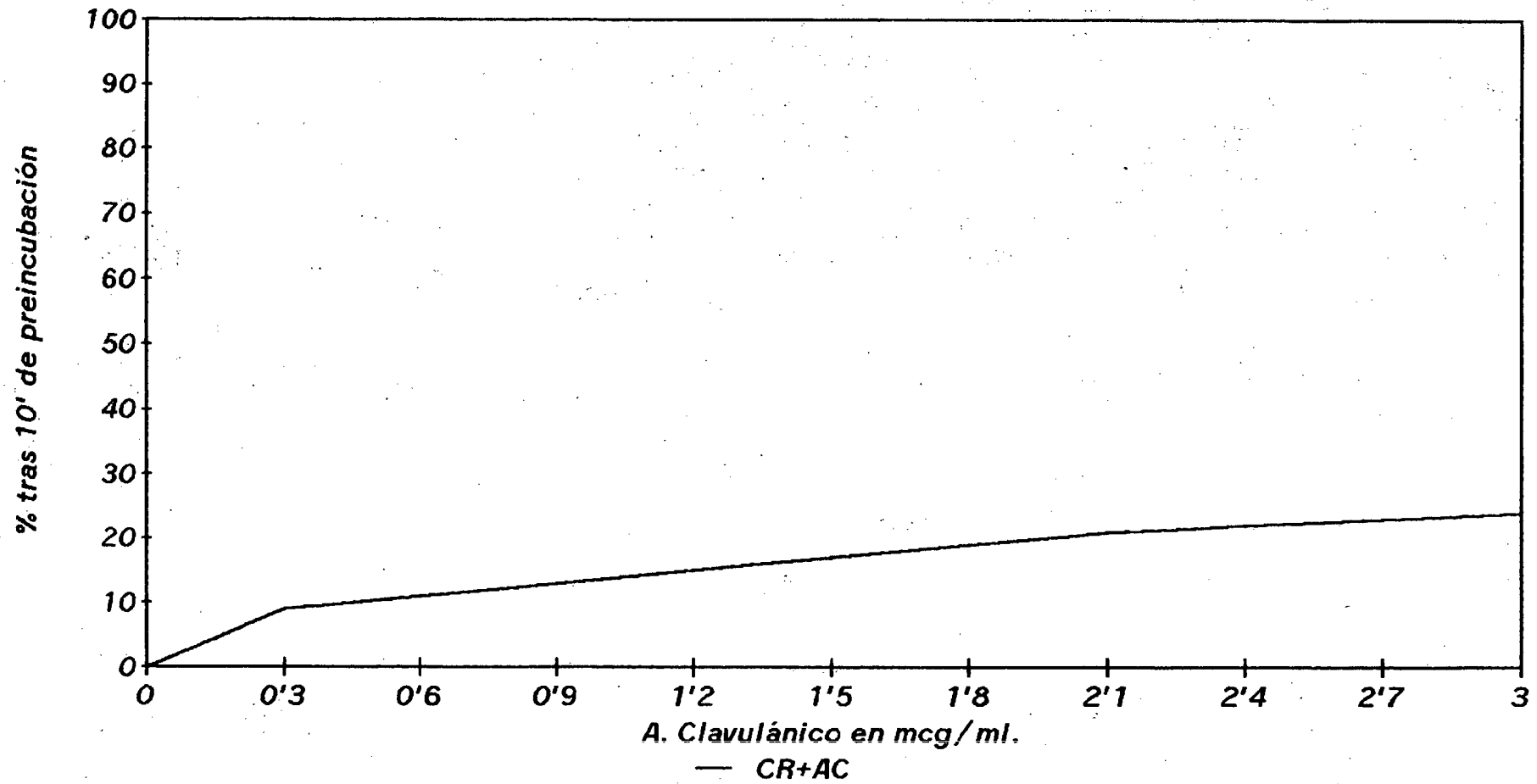


GRAFICO 29. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

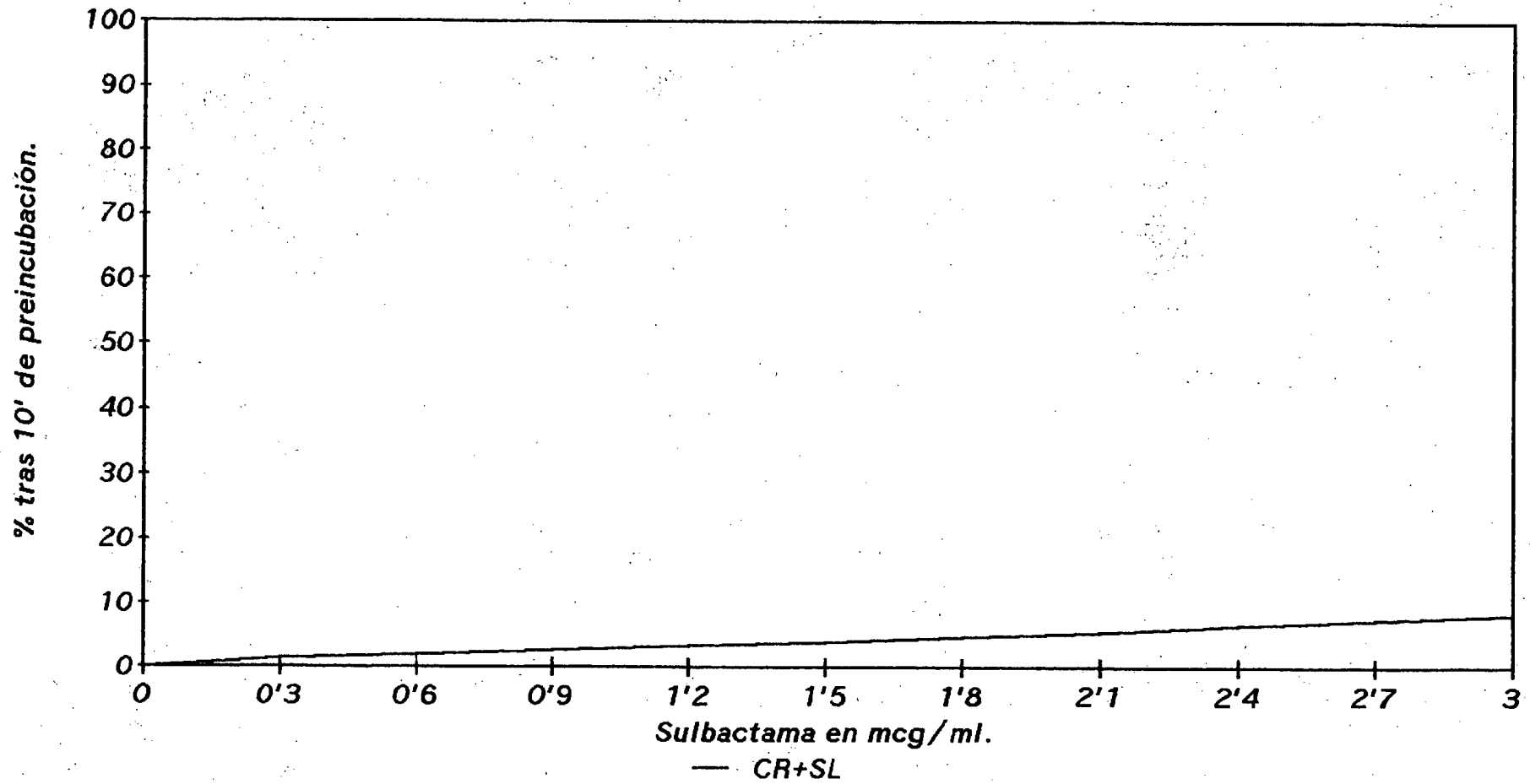


GRAFICO 30. PORCENTAJES DE INHIBICION.
En la cepa *Citrocter freundii* 1A.

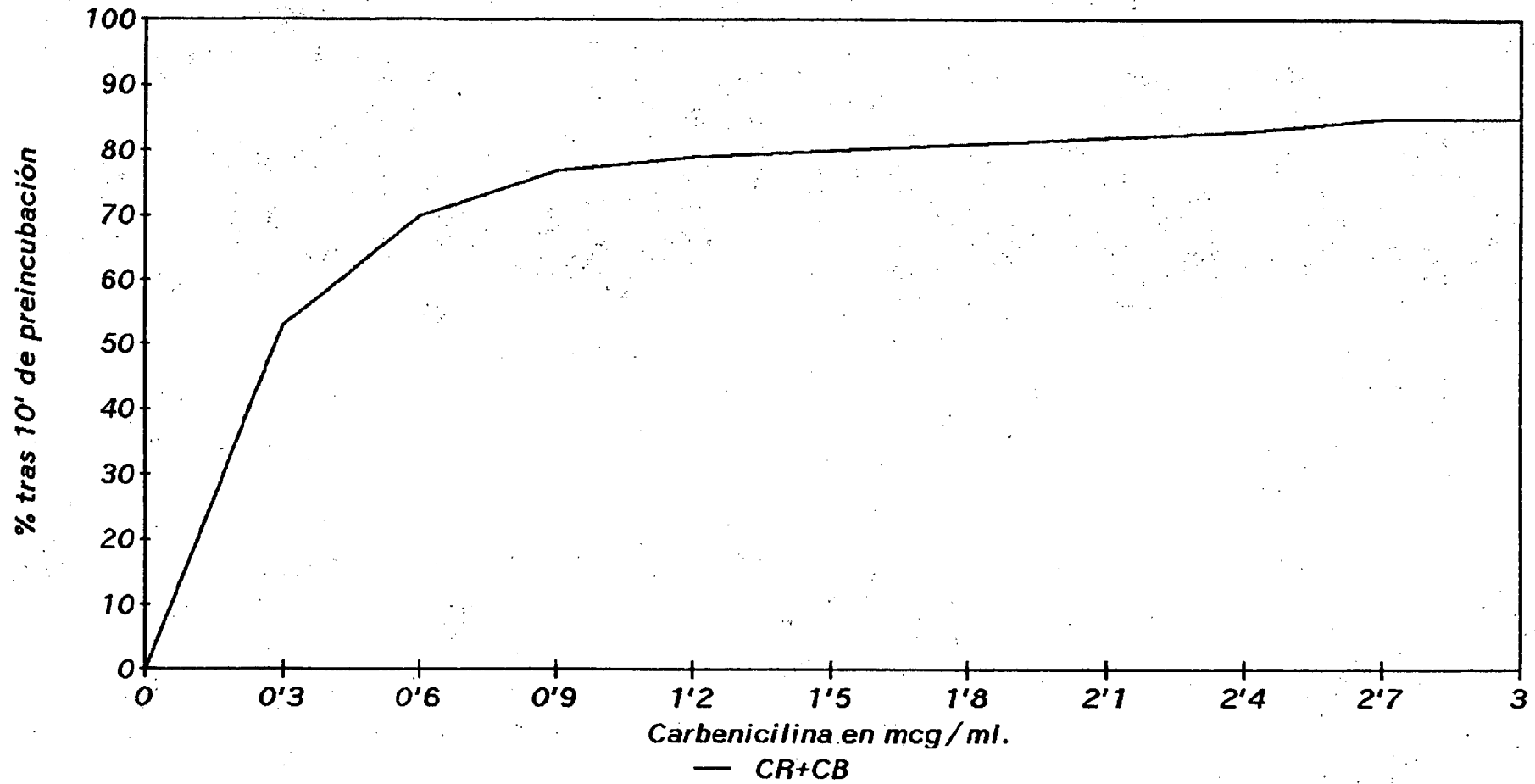


GRAFICO 31. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa Citrobacter freundii 1A.

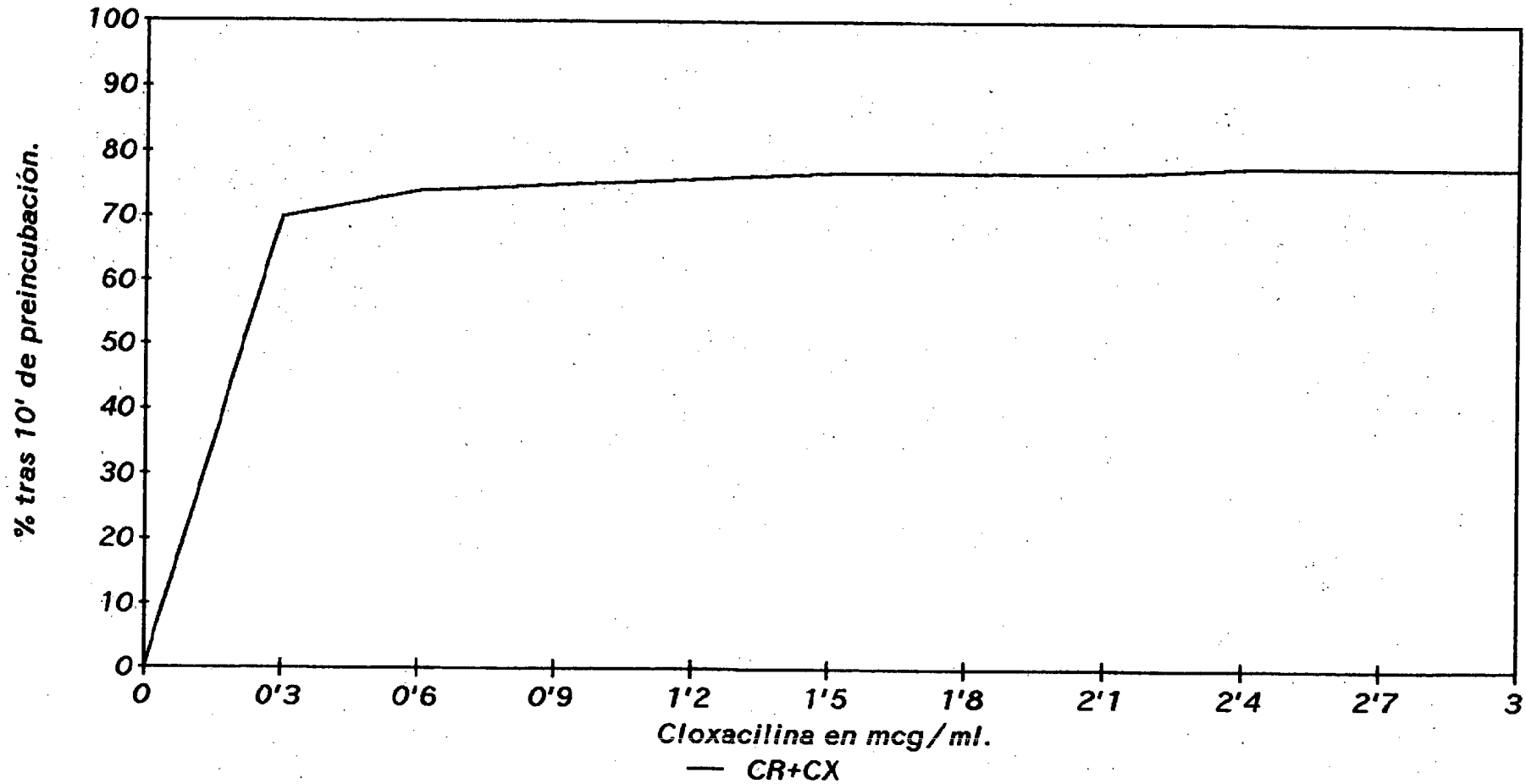


GRAFICO 32. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

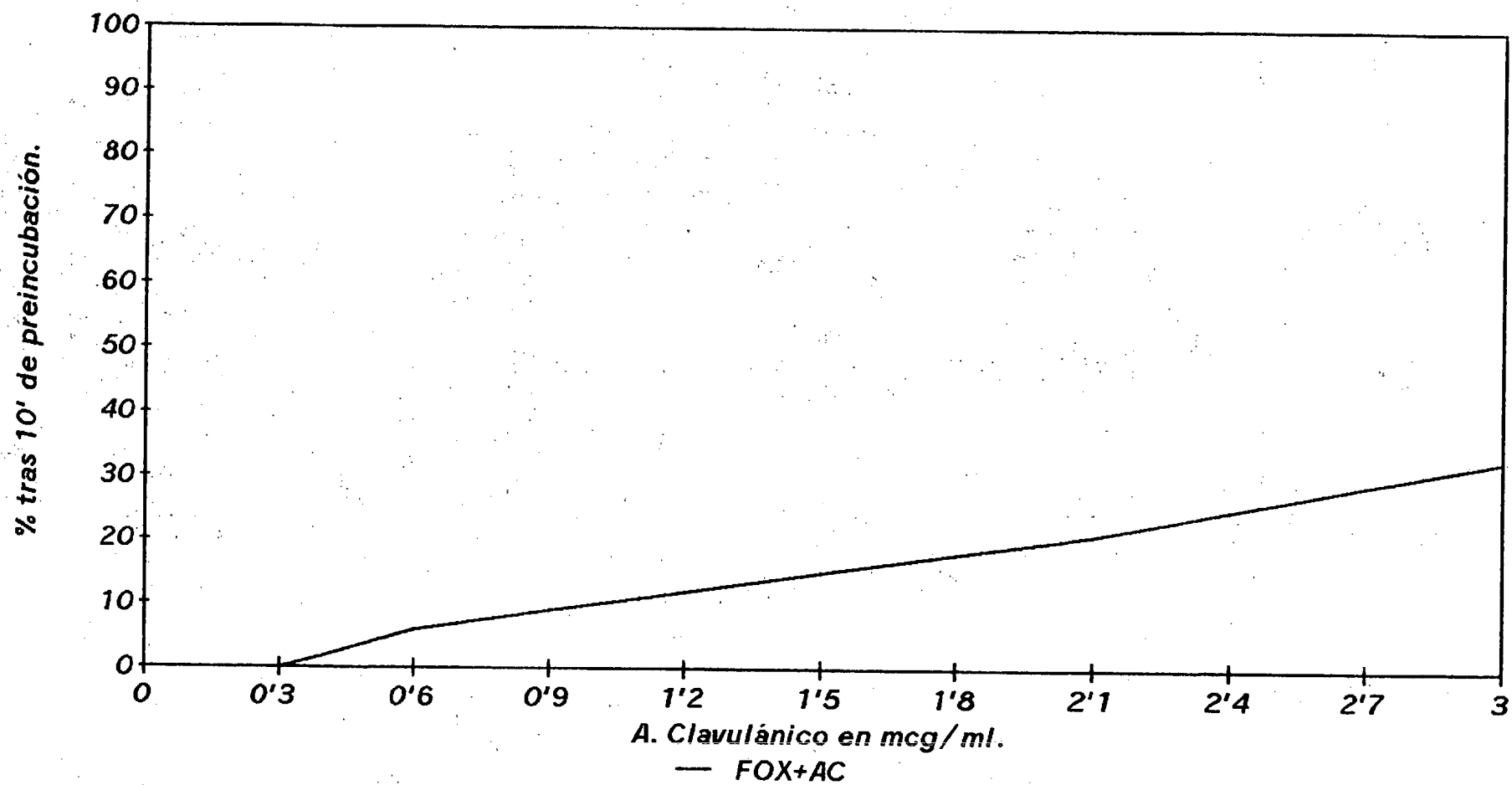


GRAFICO 33. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

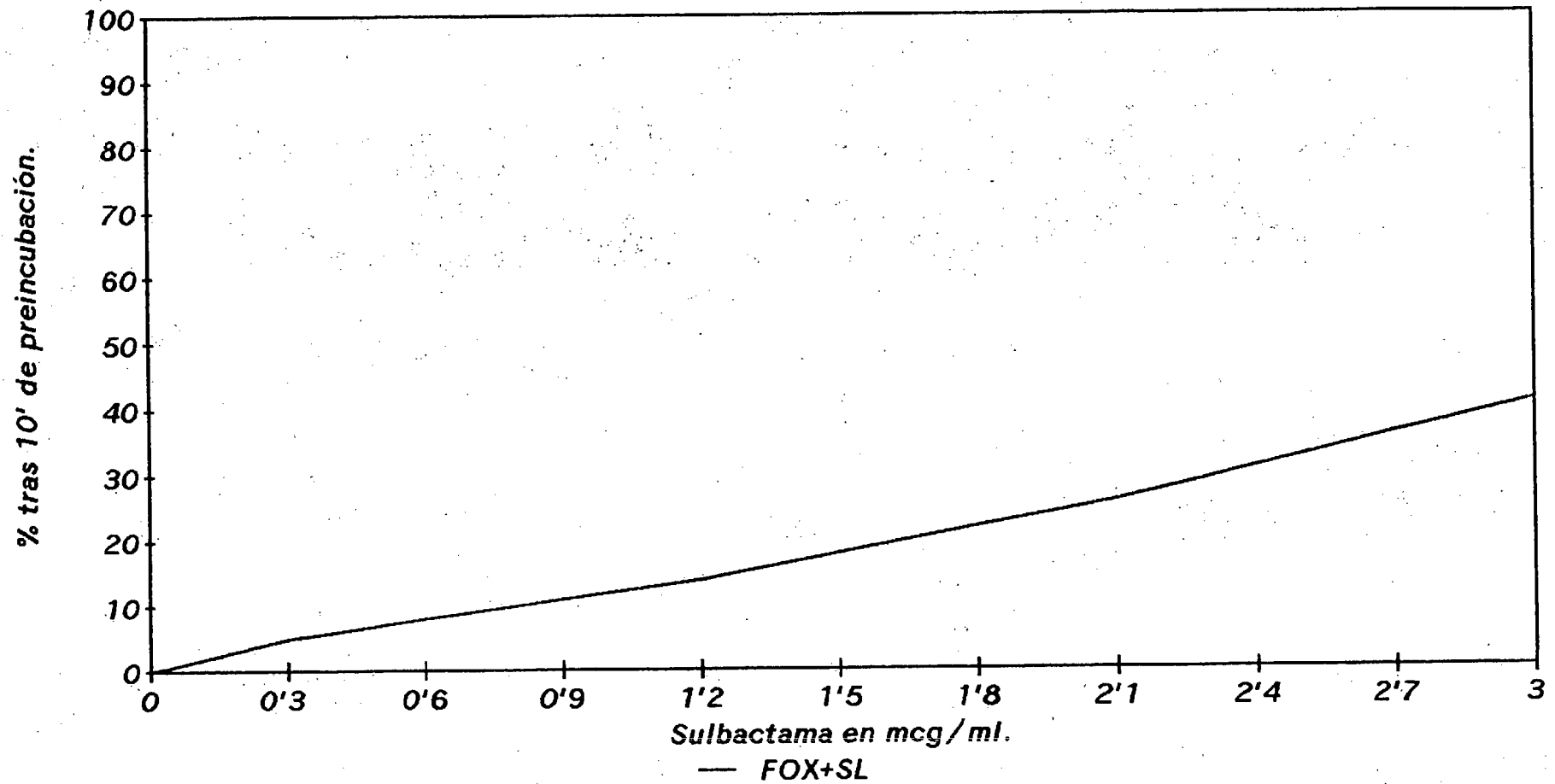


GRAFICO 34. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A

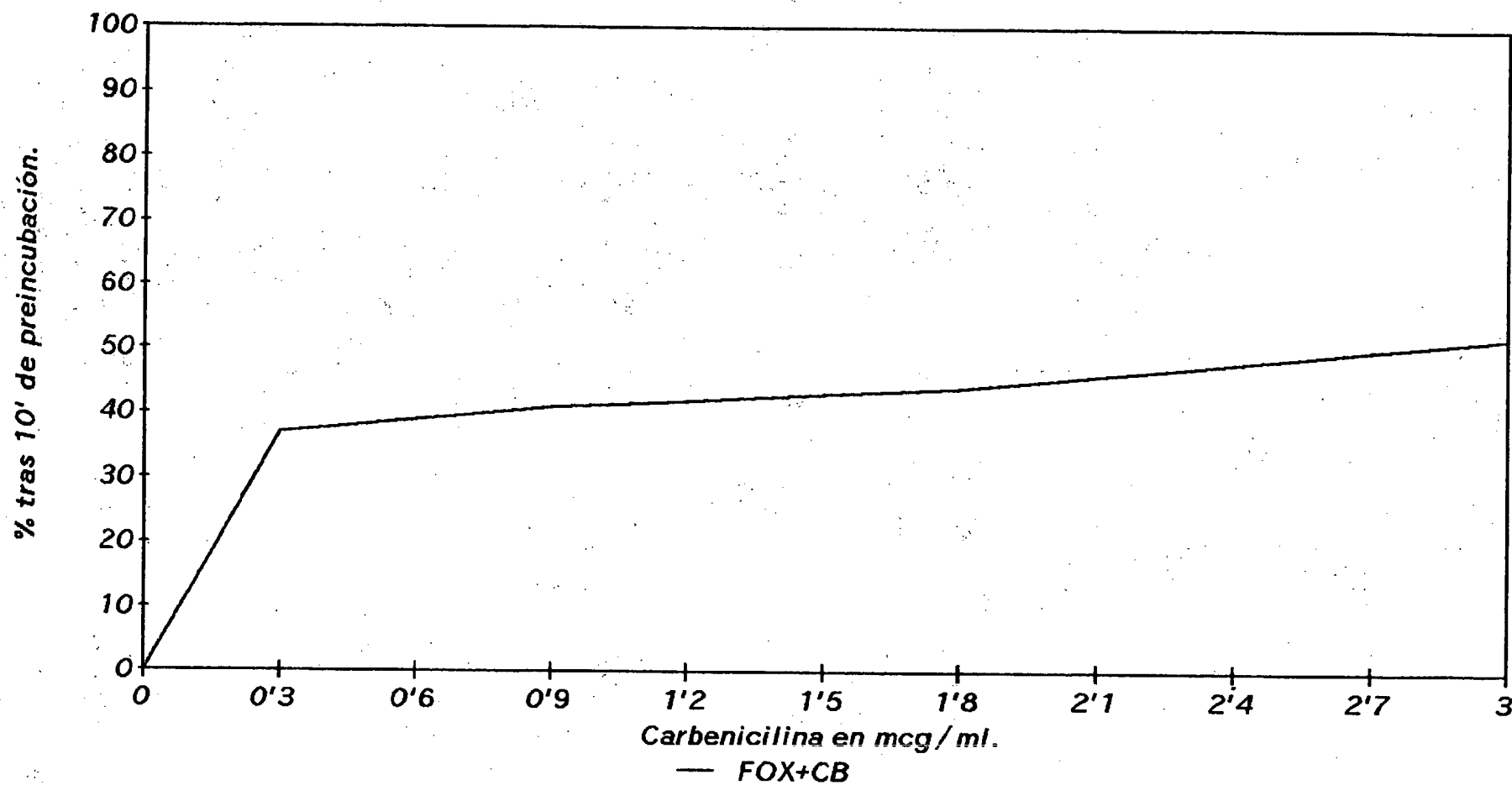


GRAFICO 35. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundli* 1A.

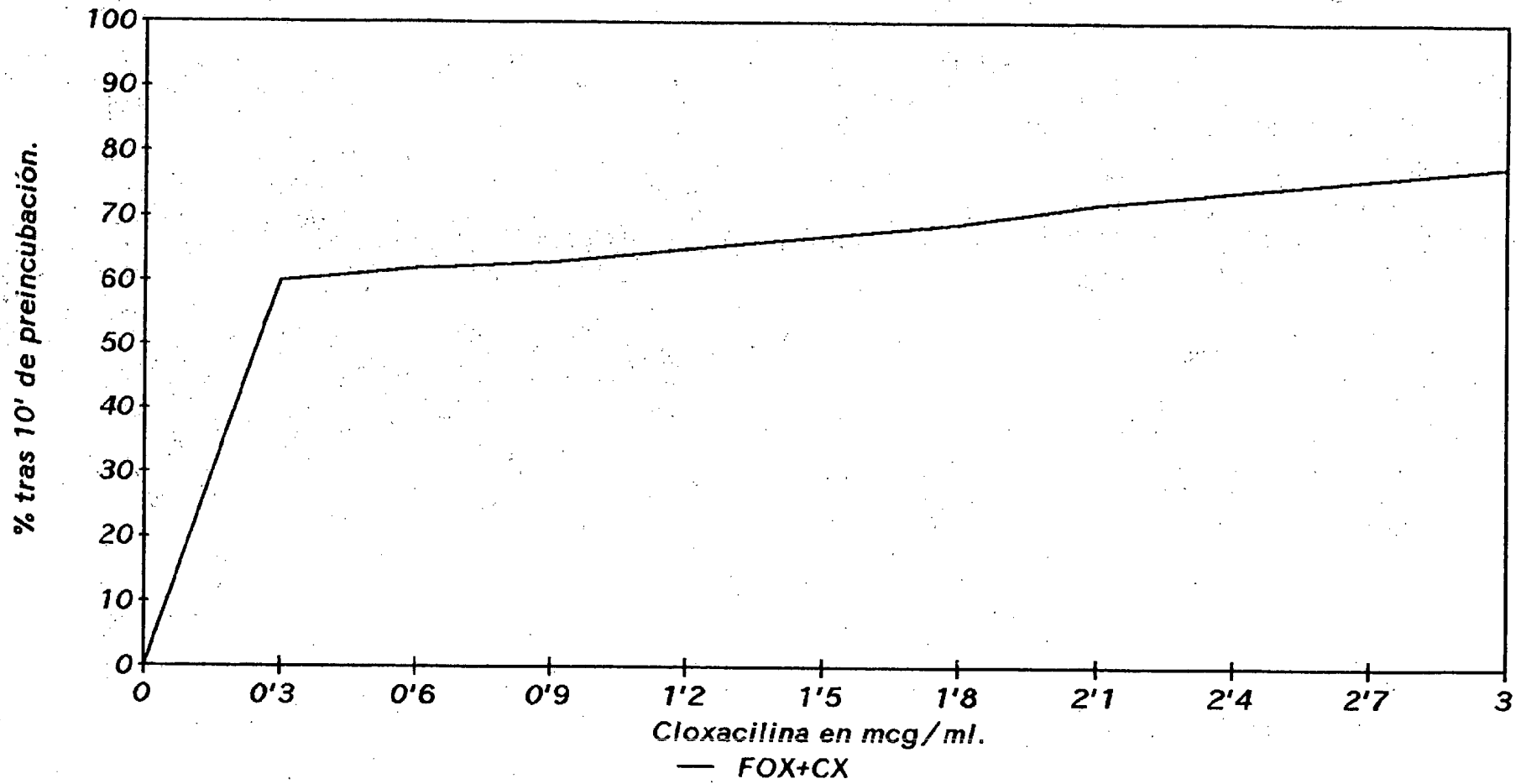


GRAFICO 36. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

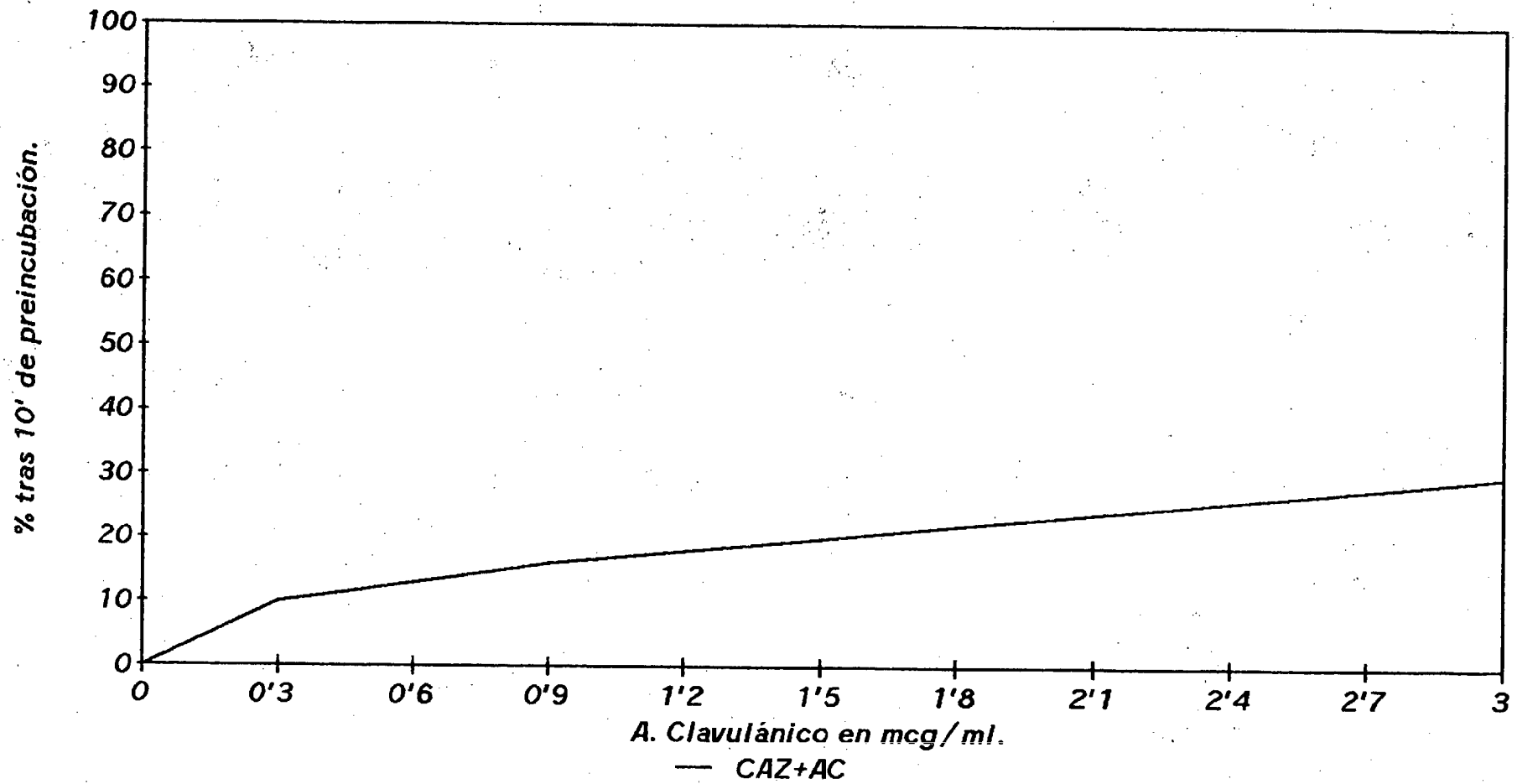


GRAFICO 37. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A

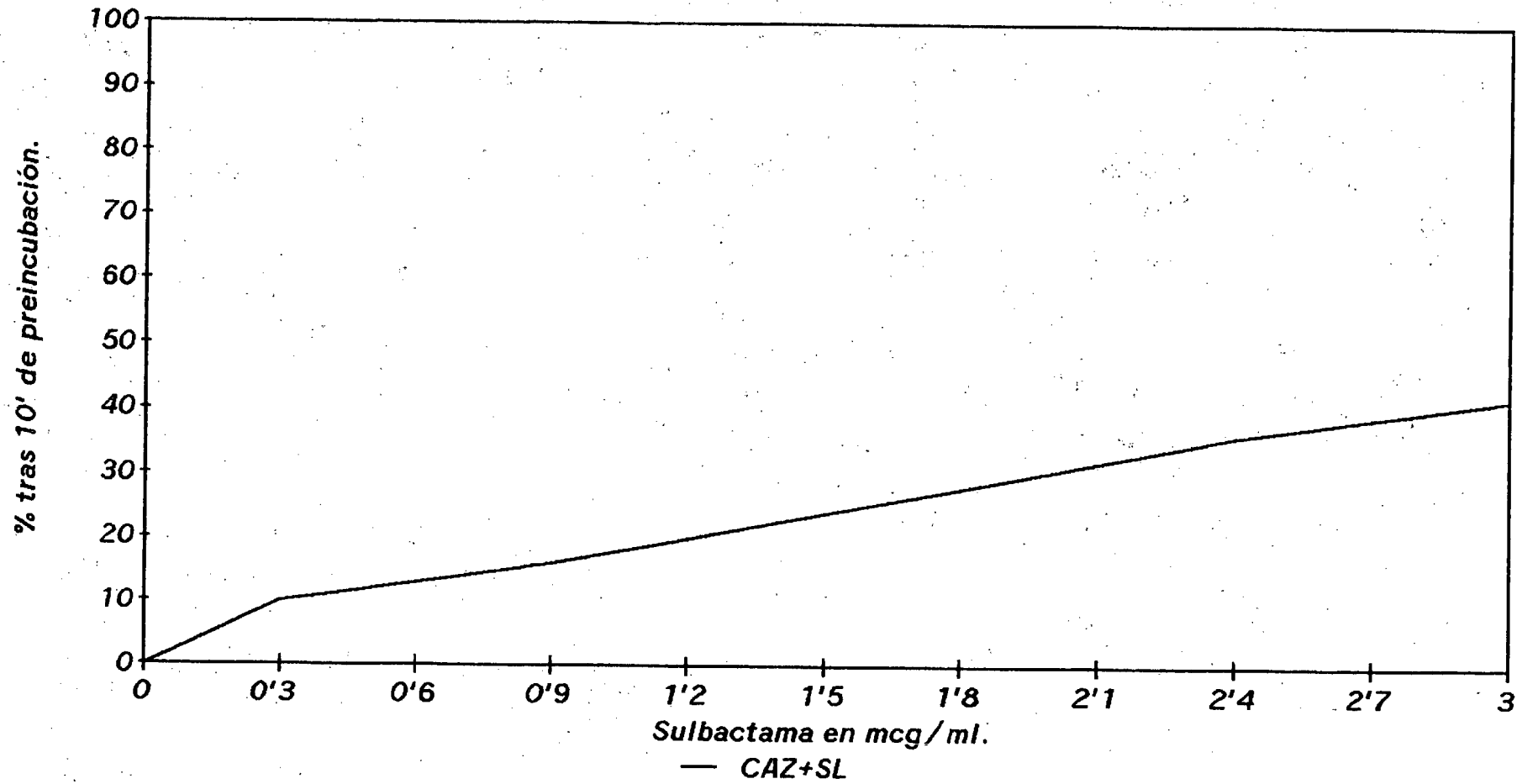


GRAFICO 38. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

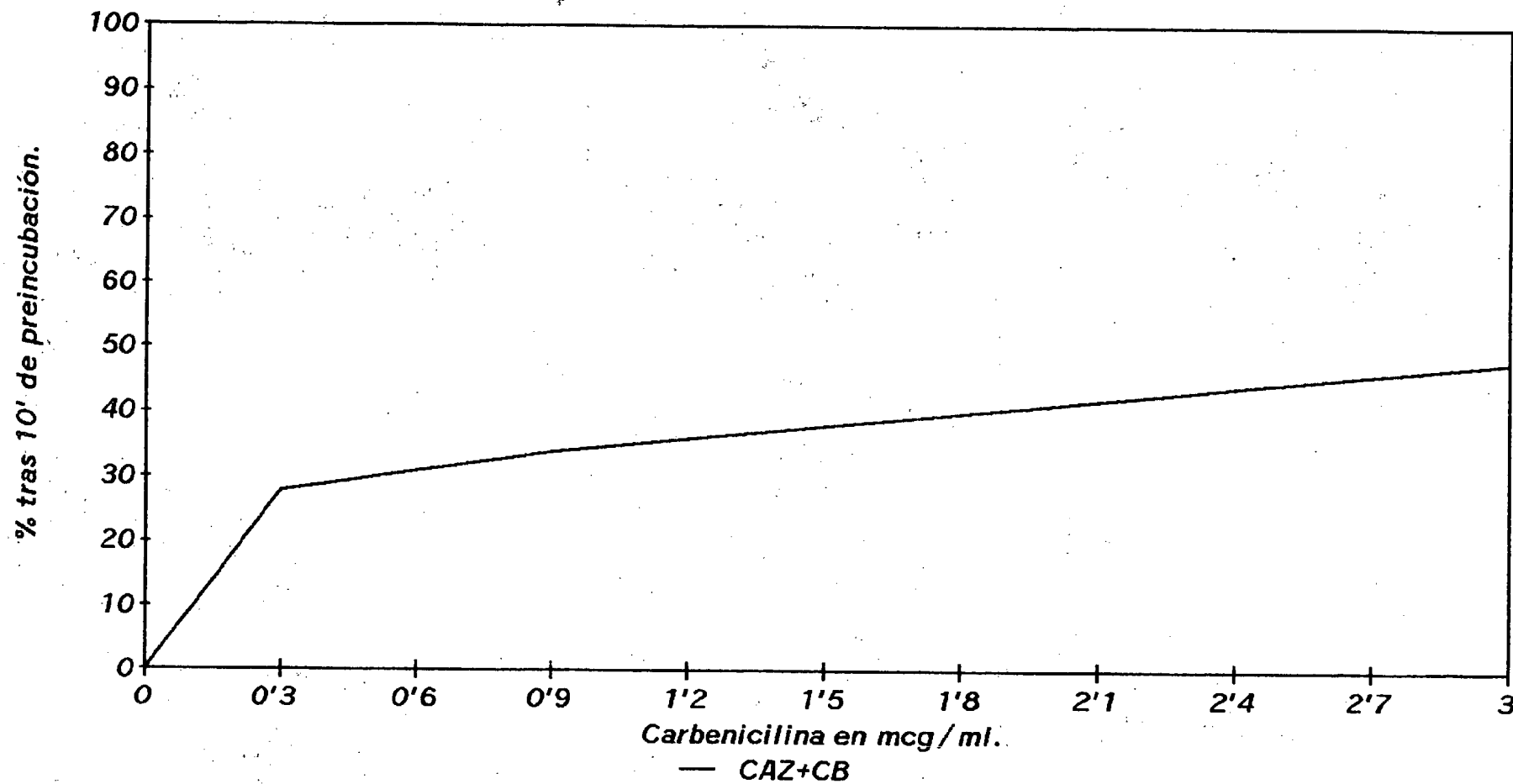


GRAFICO 39. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

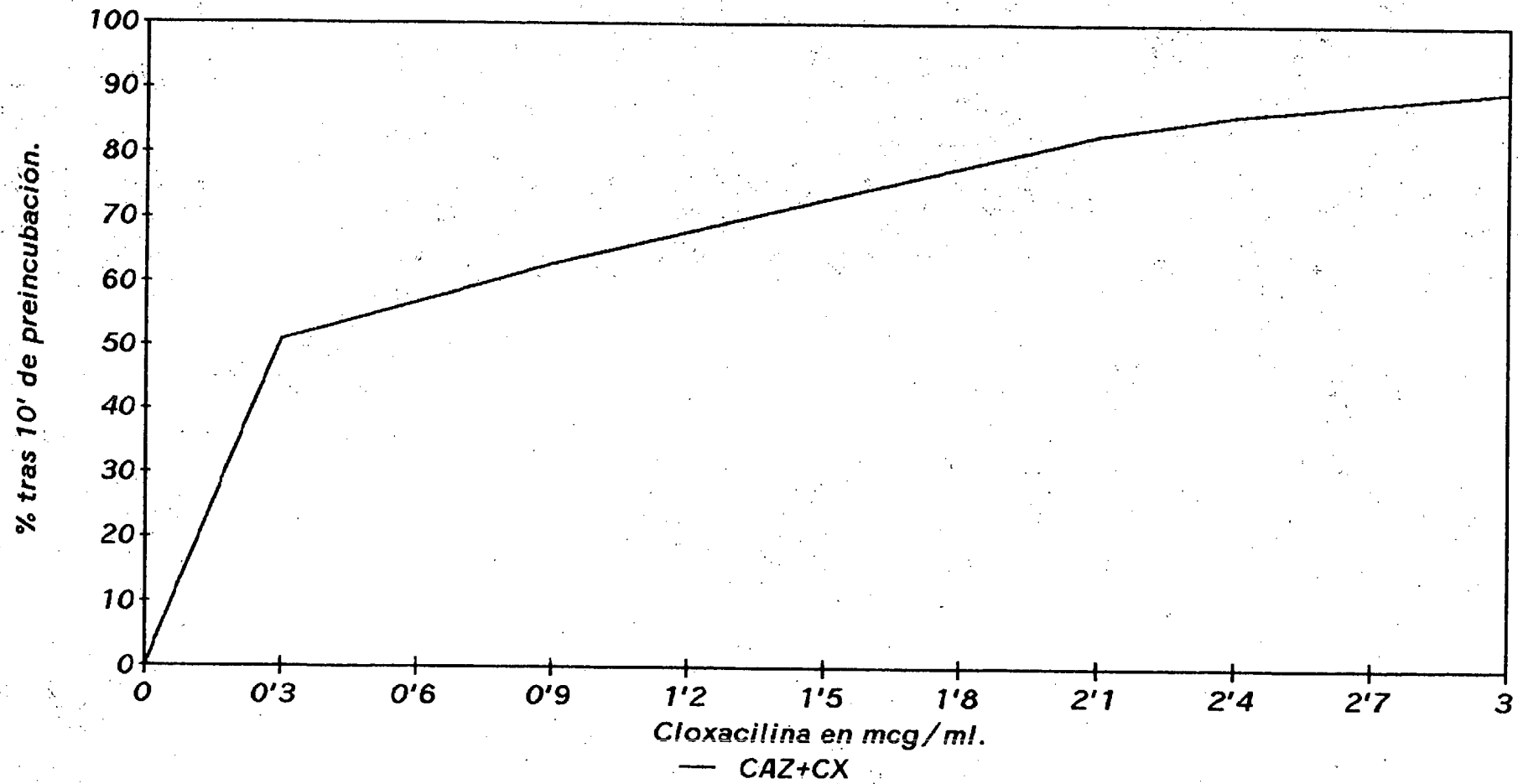


GRAFICO 40. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

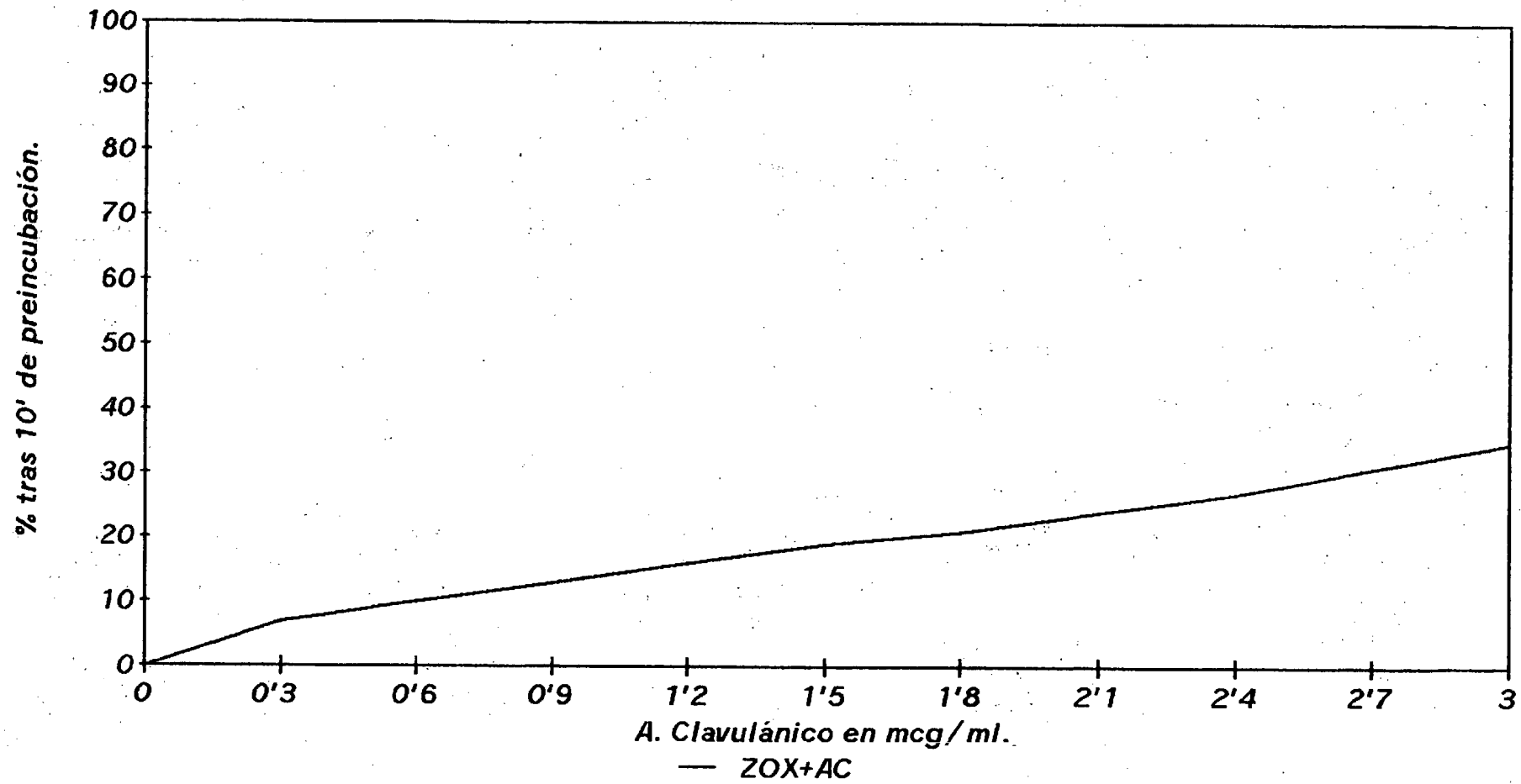


GRAFICO 41. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

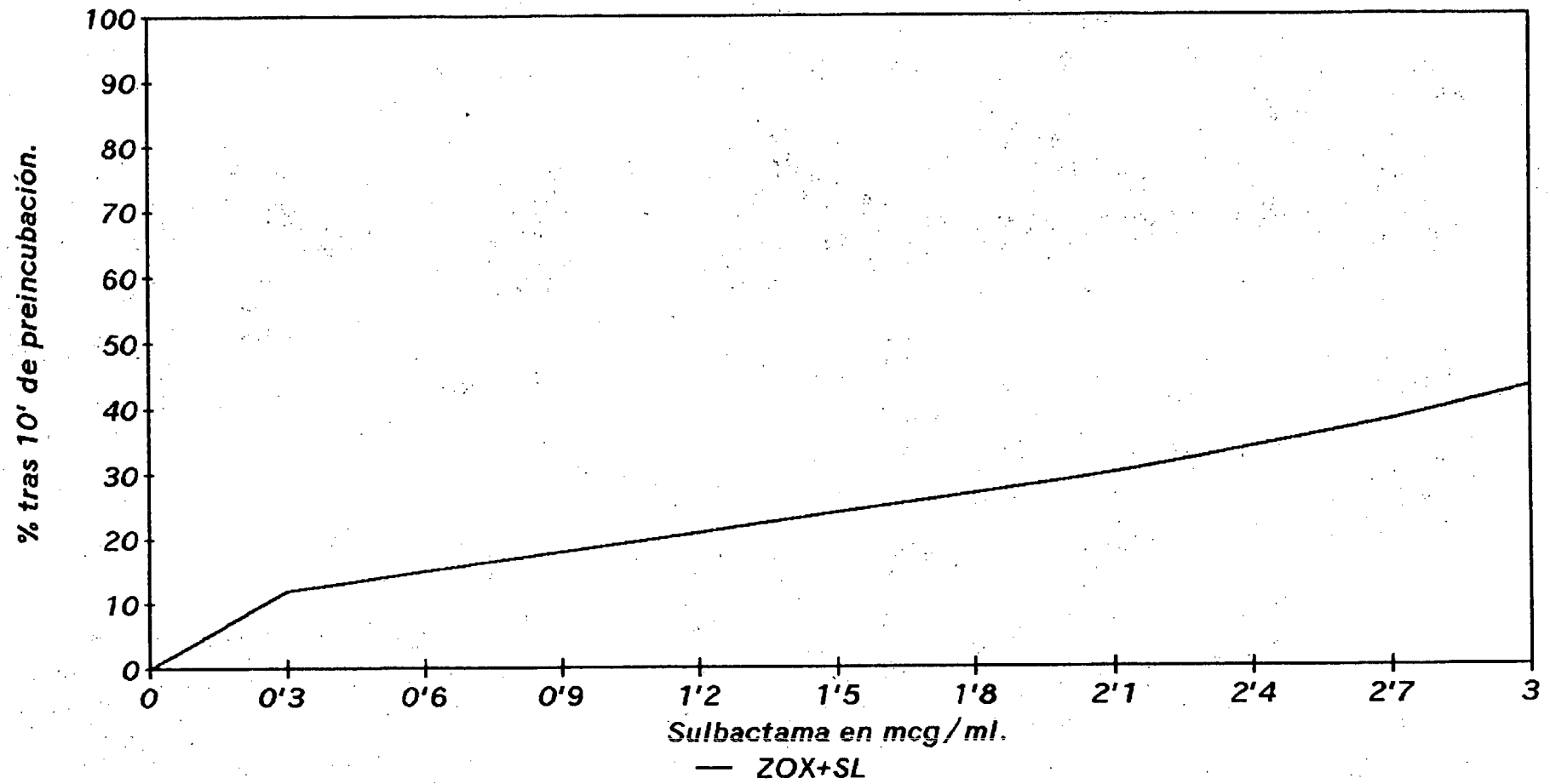


GRAFICO 42. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

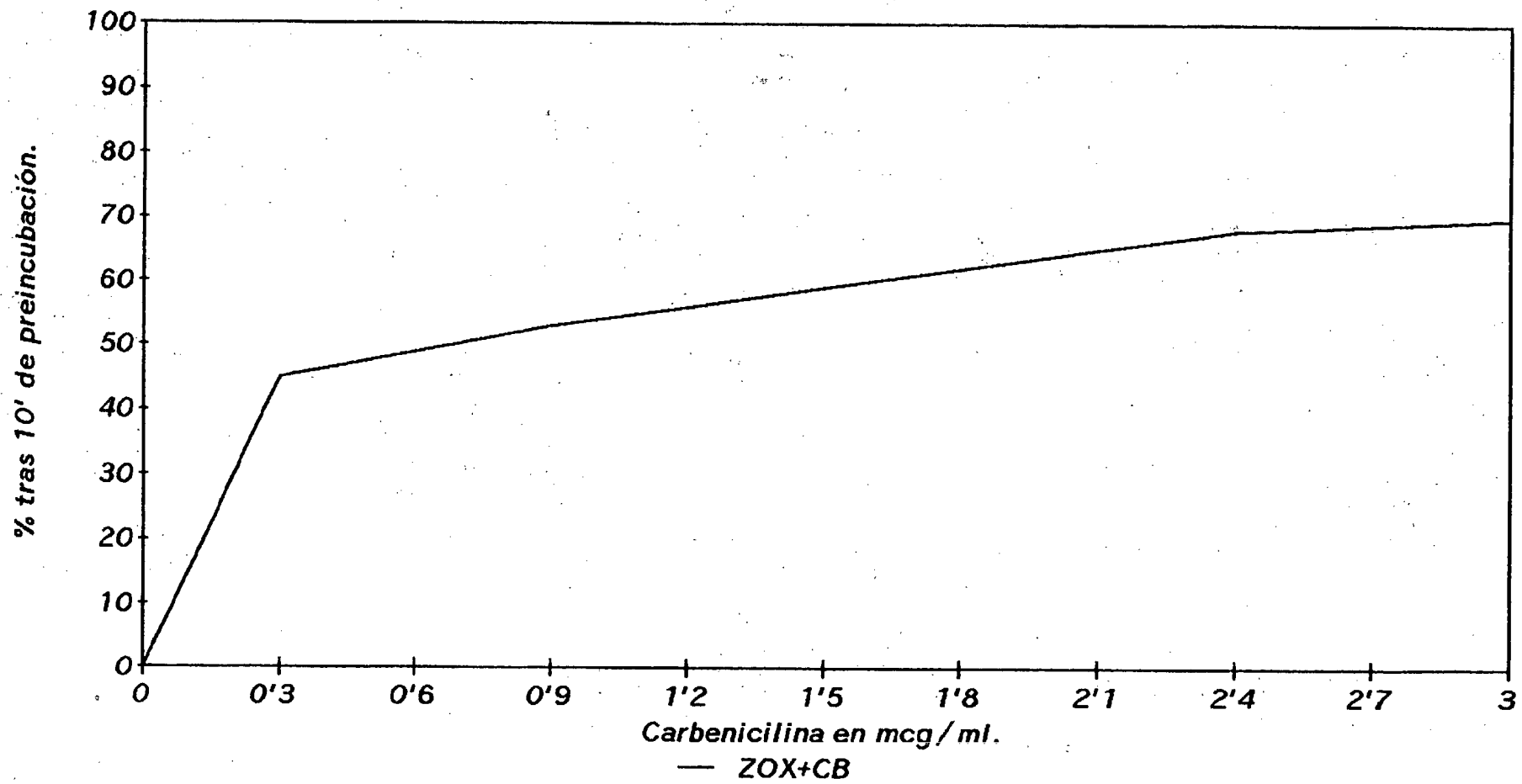


GRAFICO 43. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

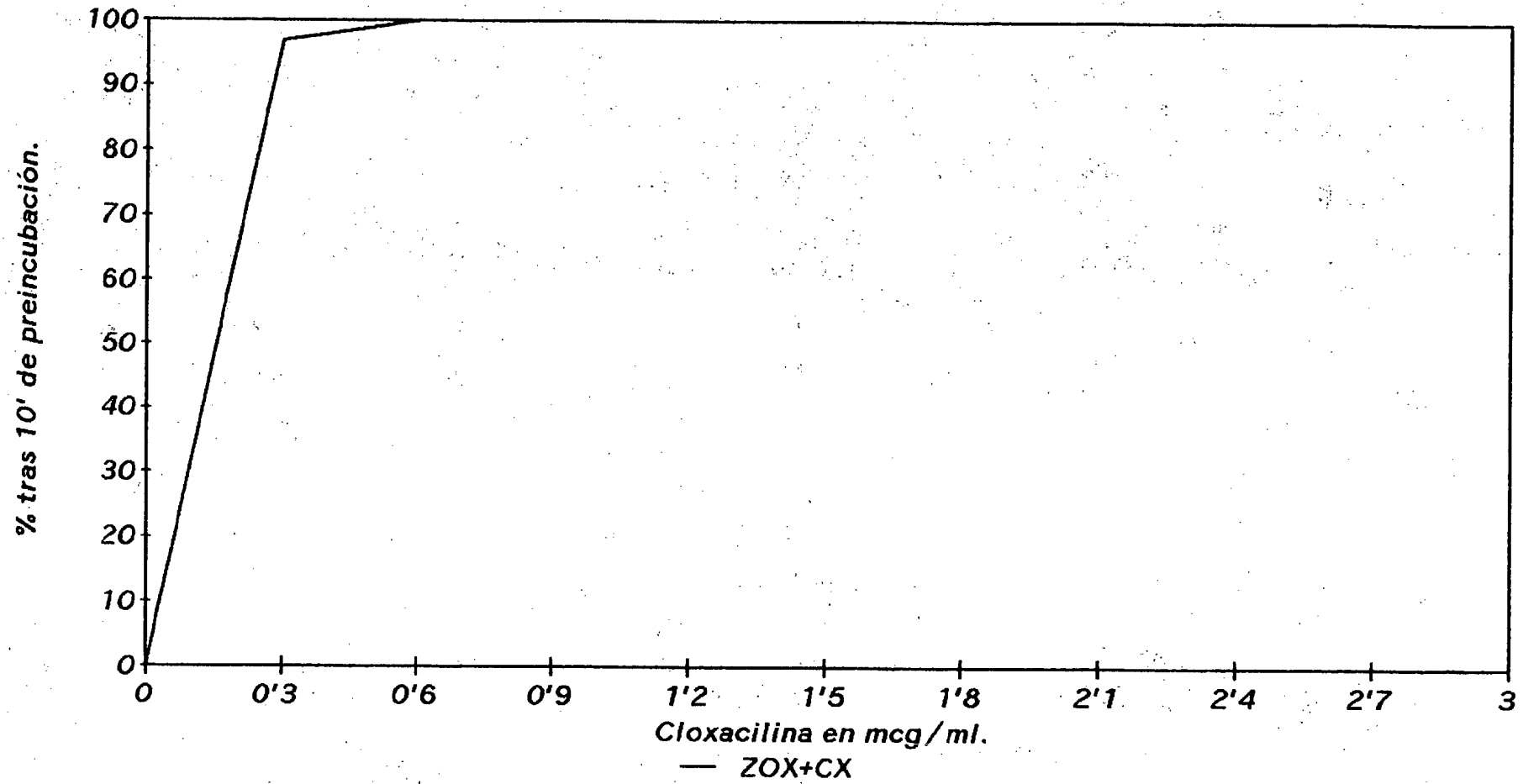


GRAFICO 44. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

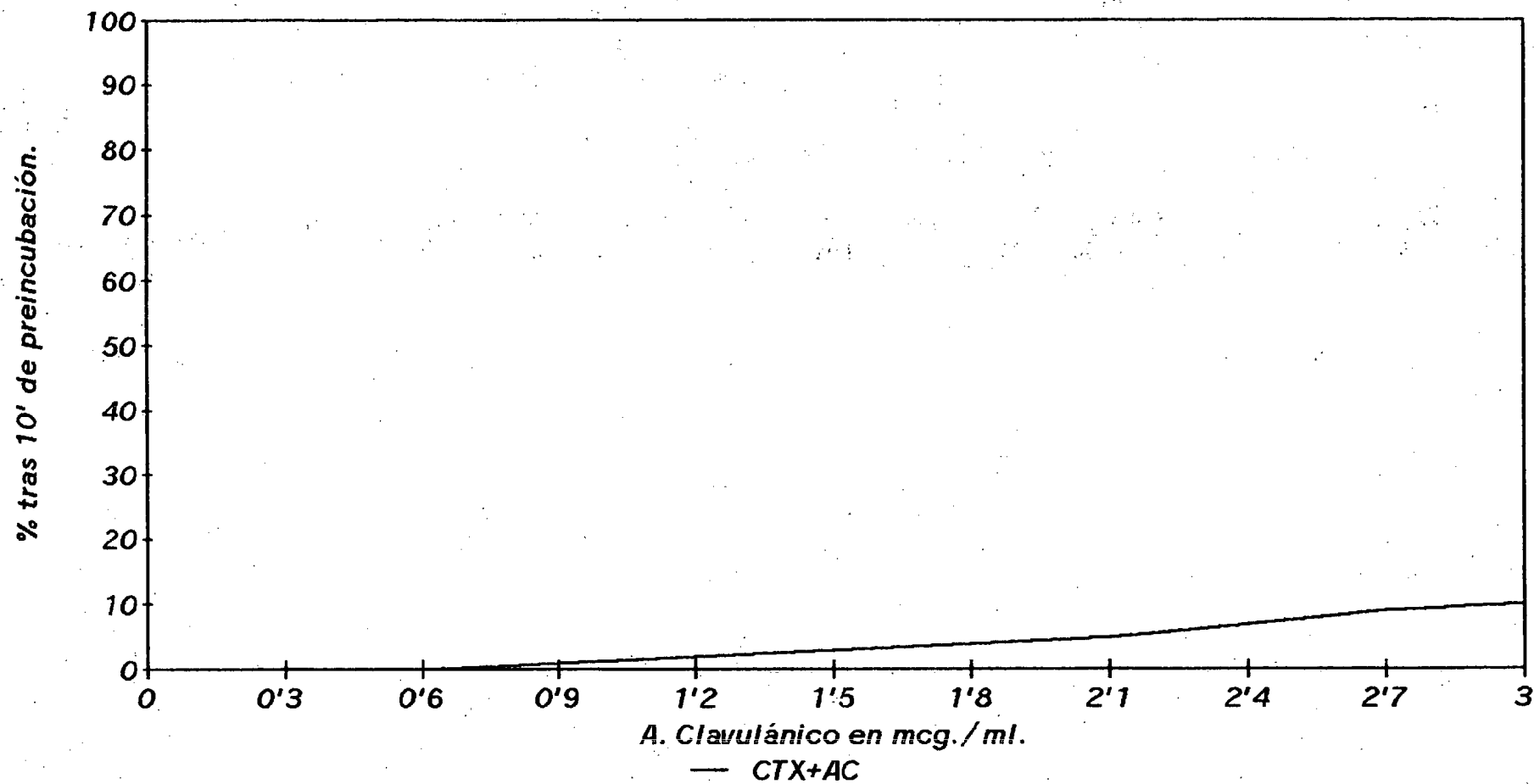


GRAFICO 45. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

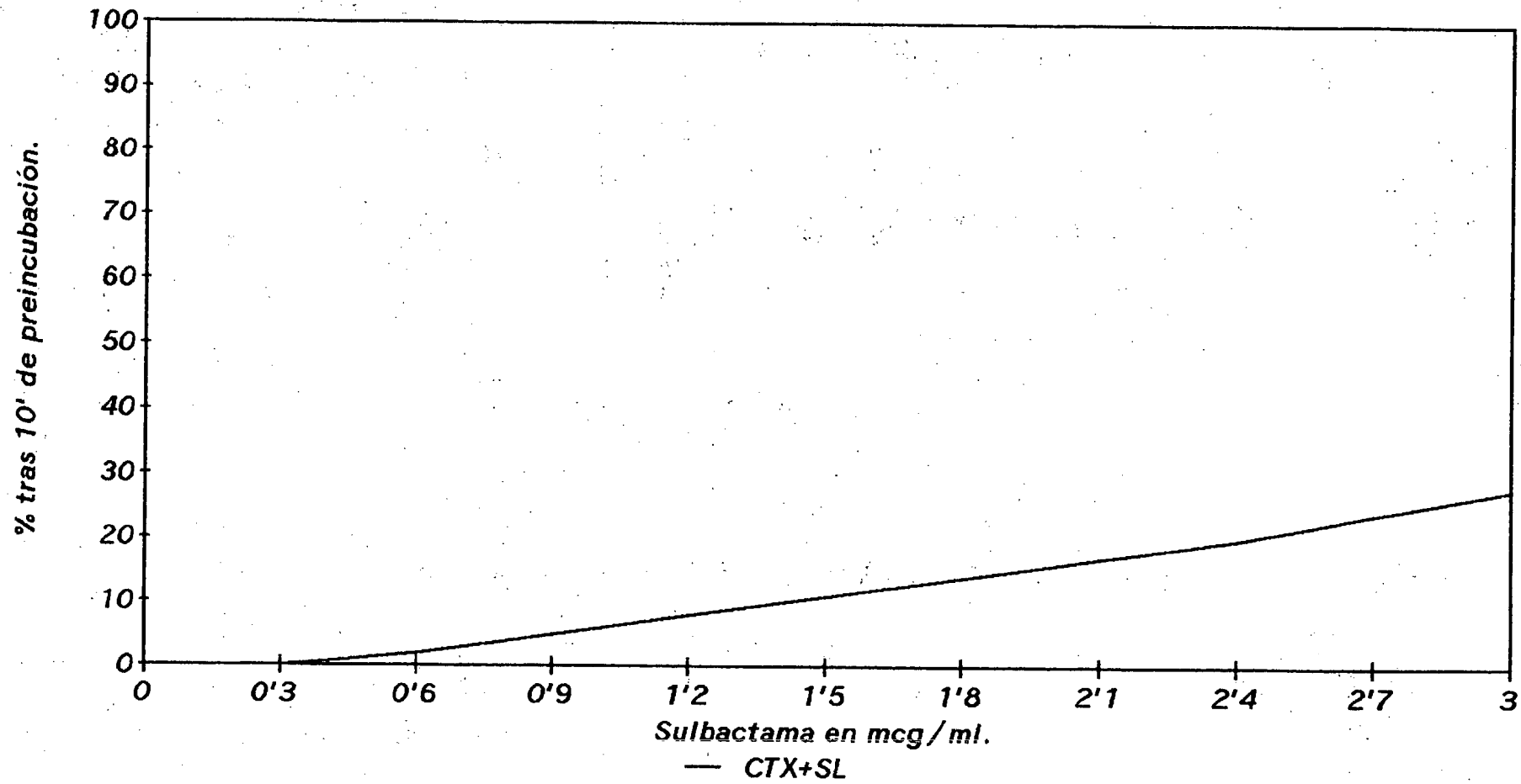


GRAFICO 46. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

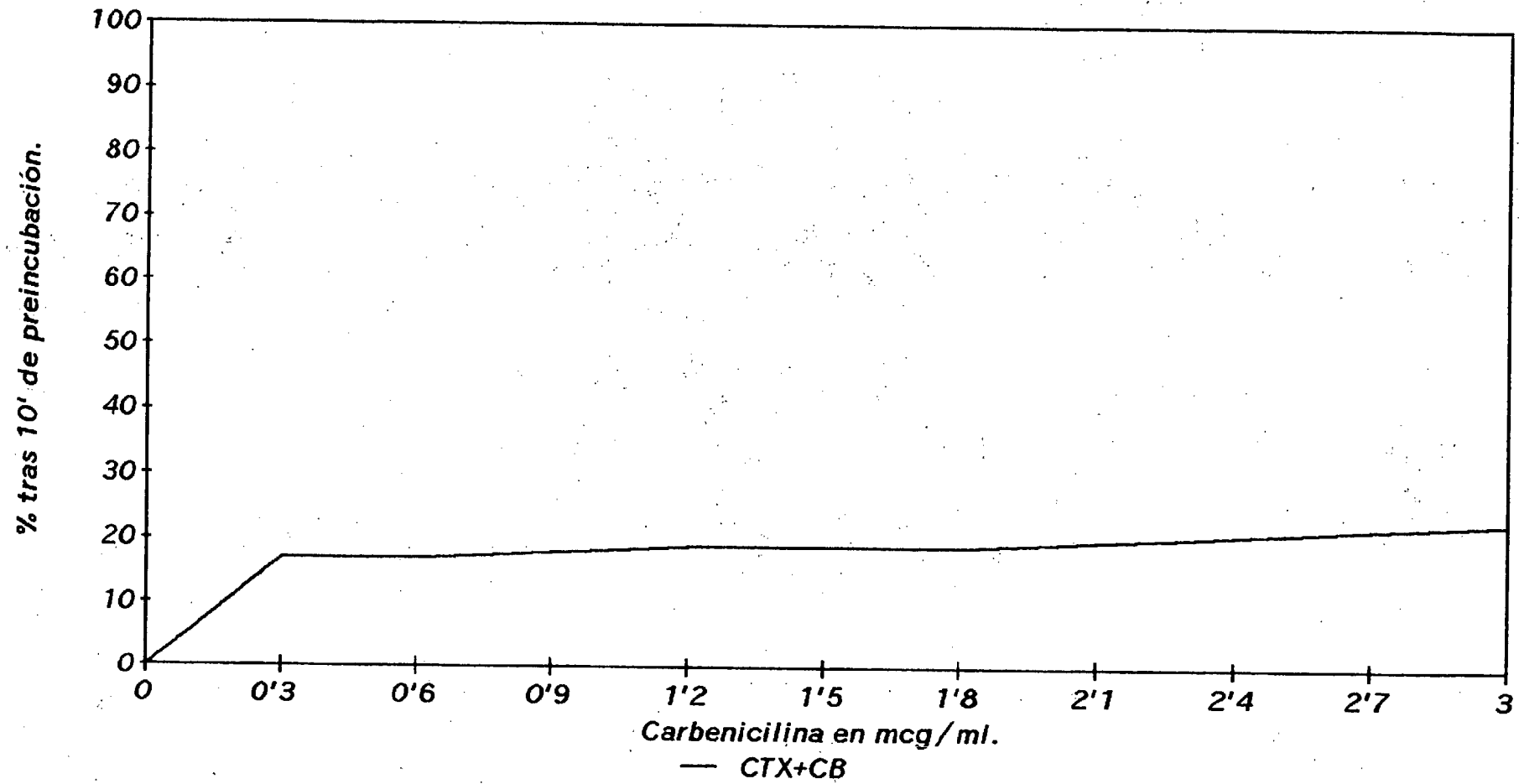


GRAFICO 47. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

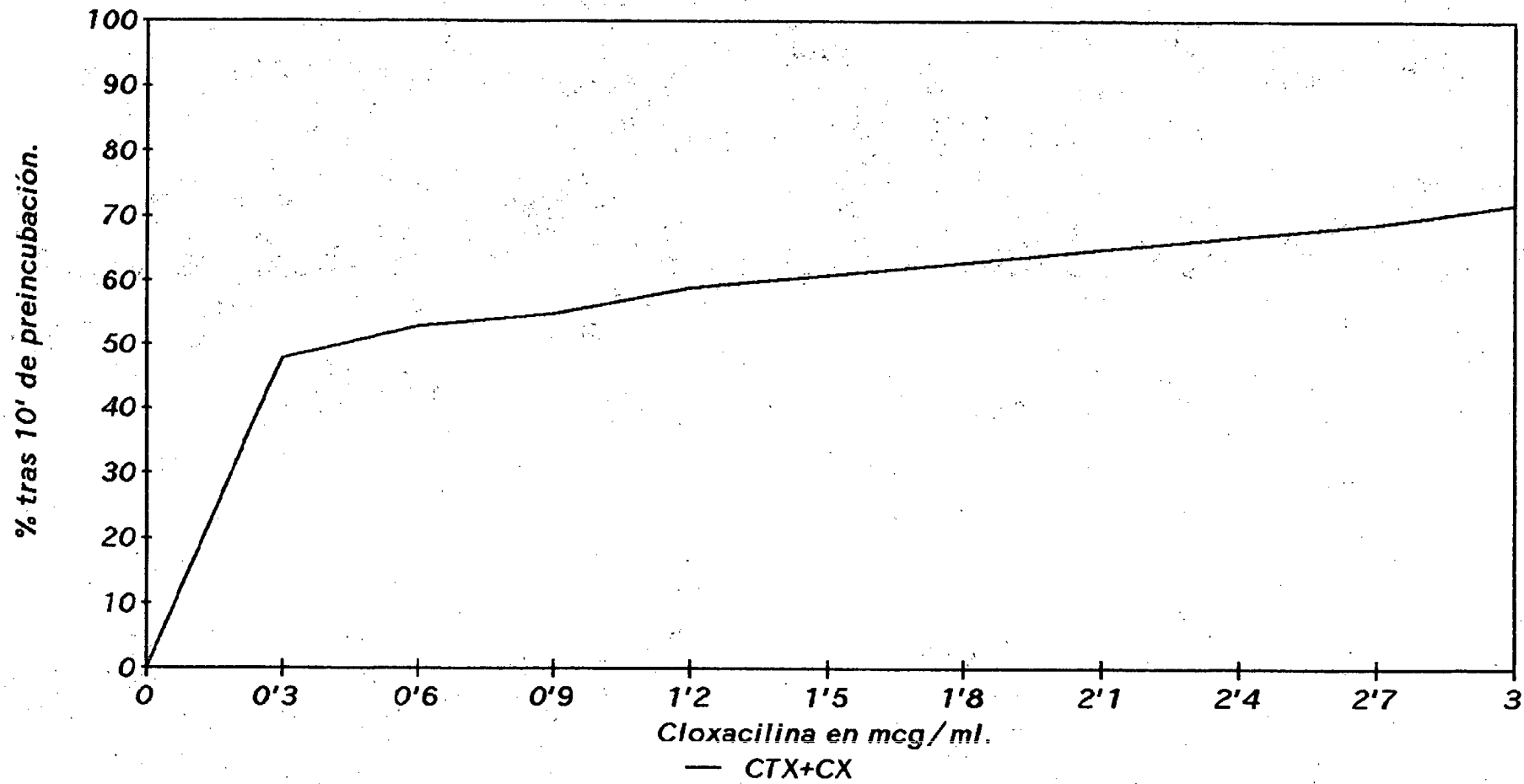


GRAFICO 48. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa Citrobacter freundii 1A.

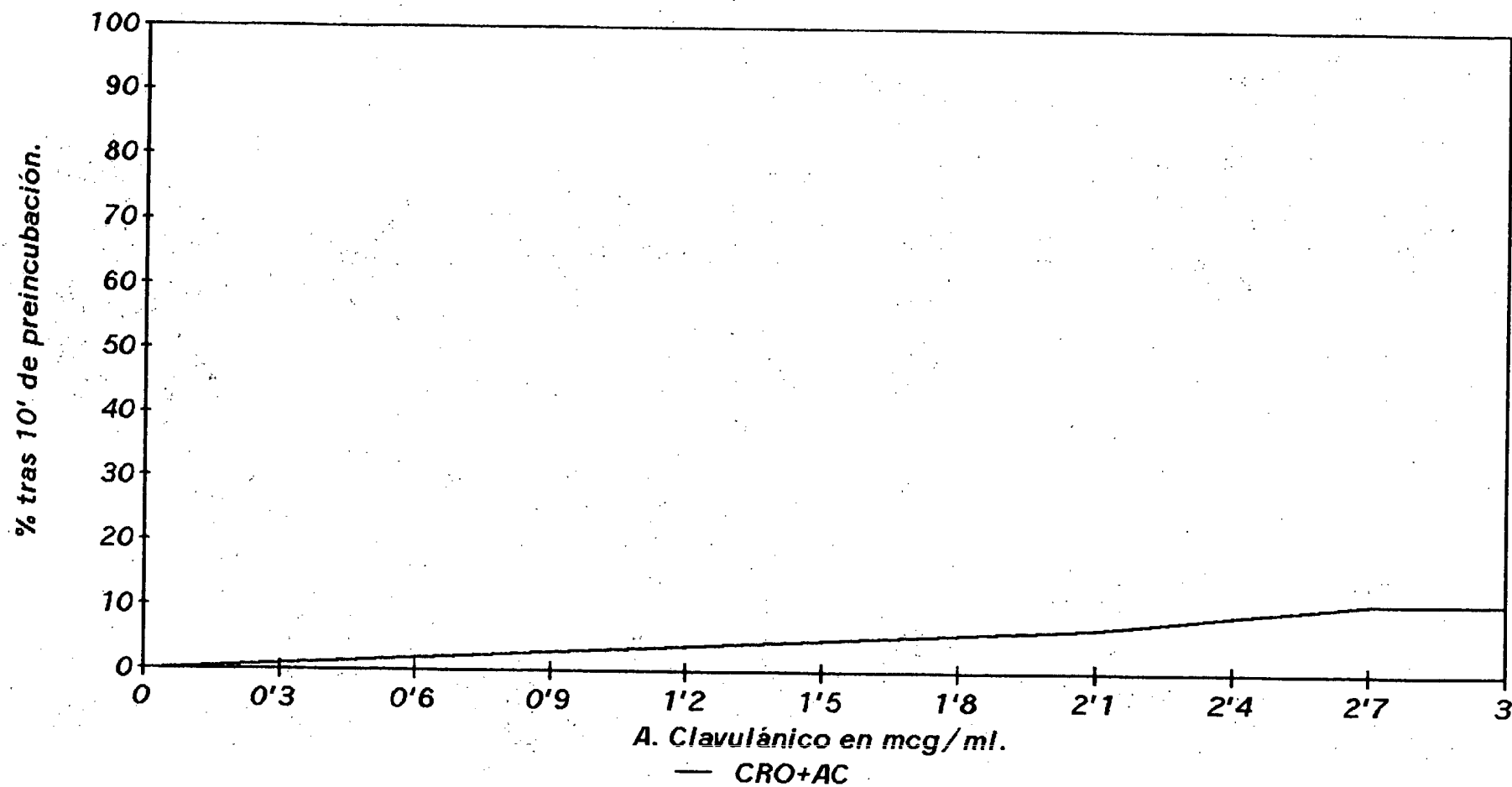


GRAFICO 49. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

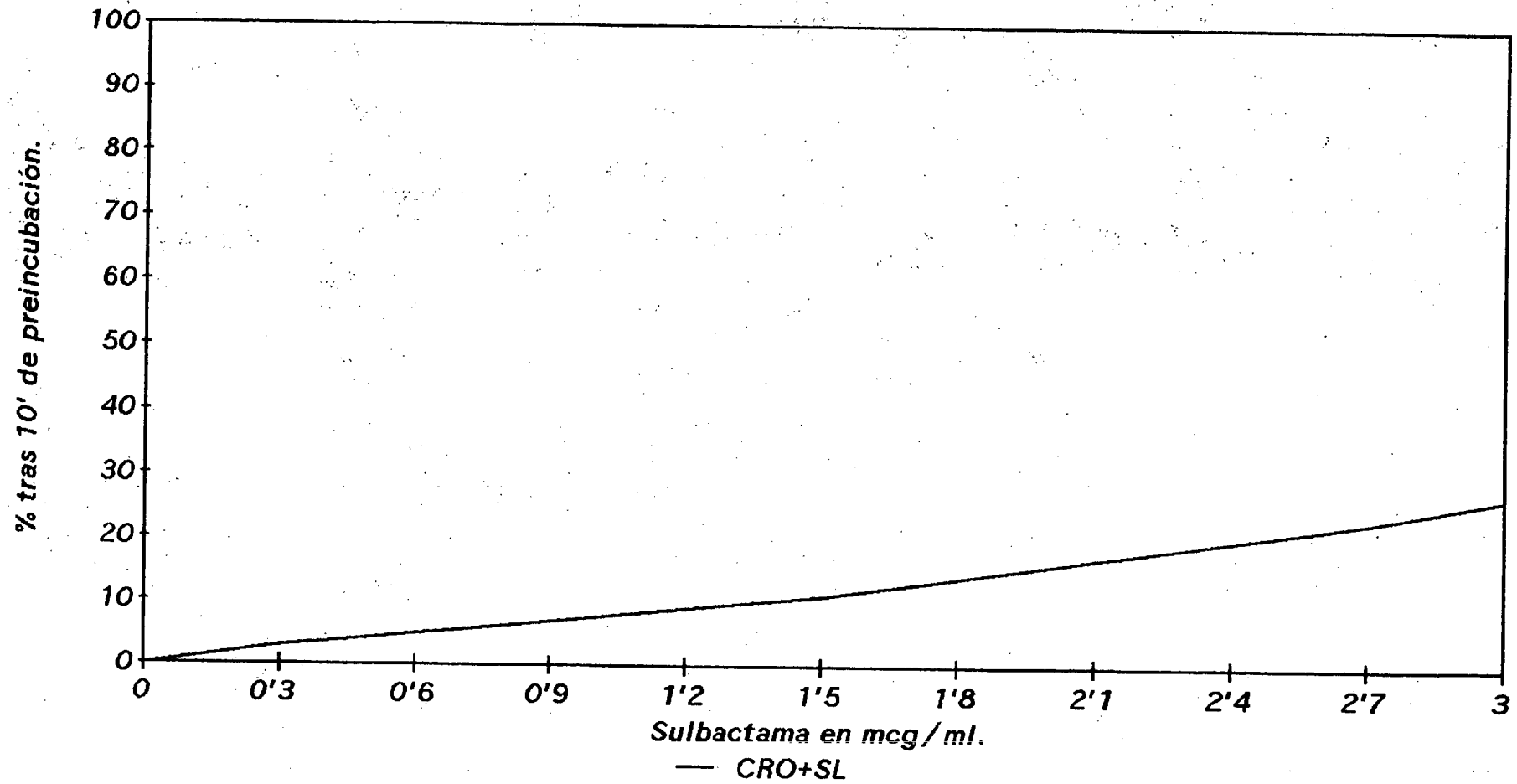


GRAFICO 50. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

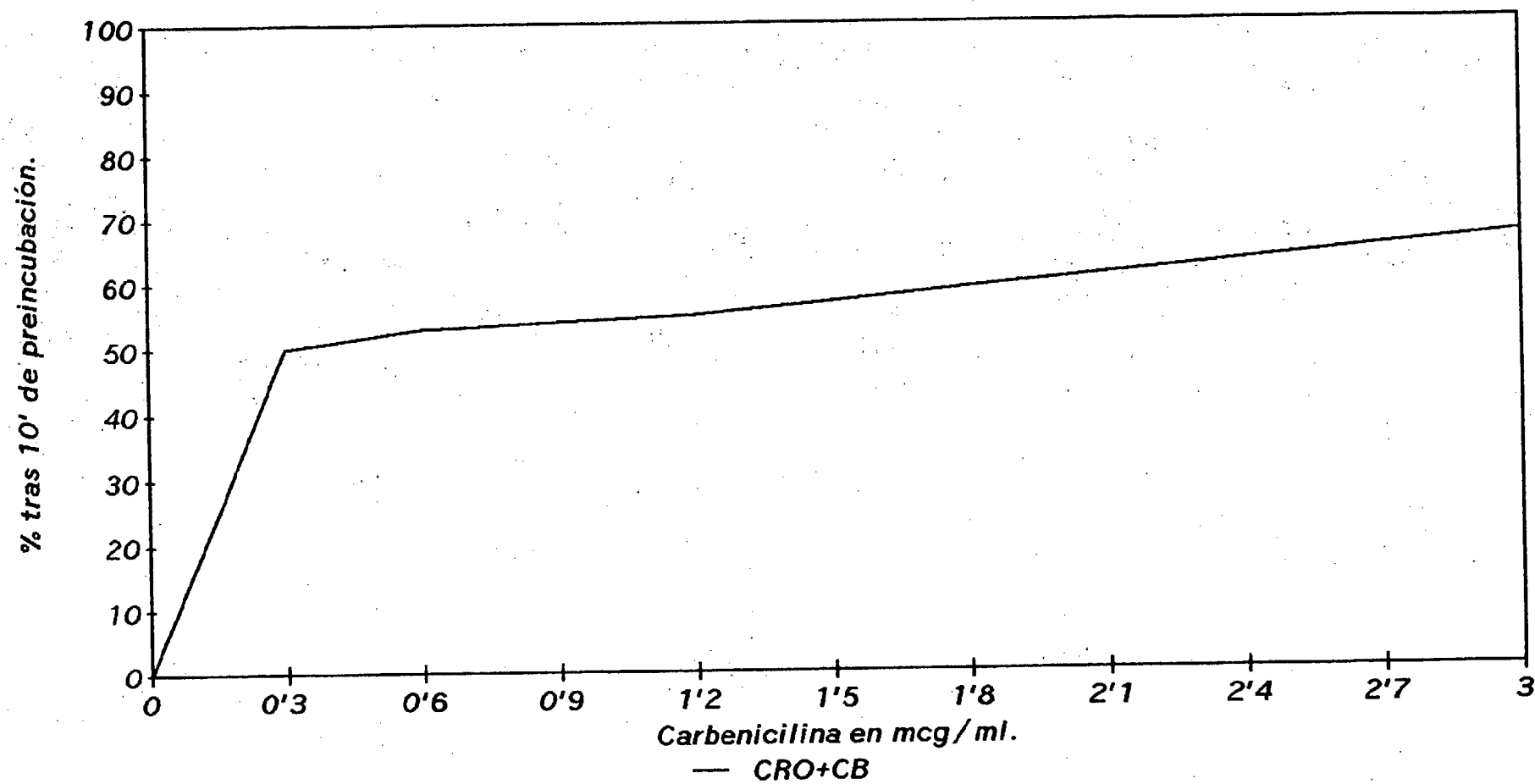


GRAFICO 51. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Citrobacter freundii* 1A.

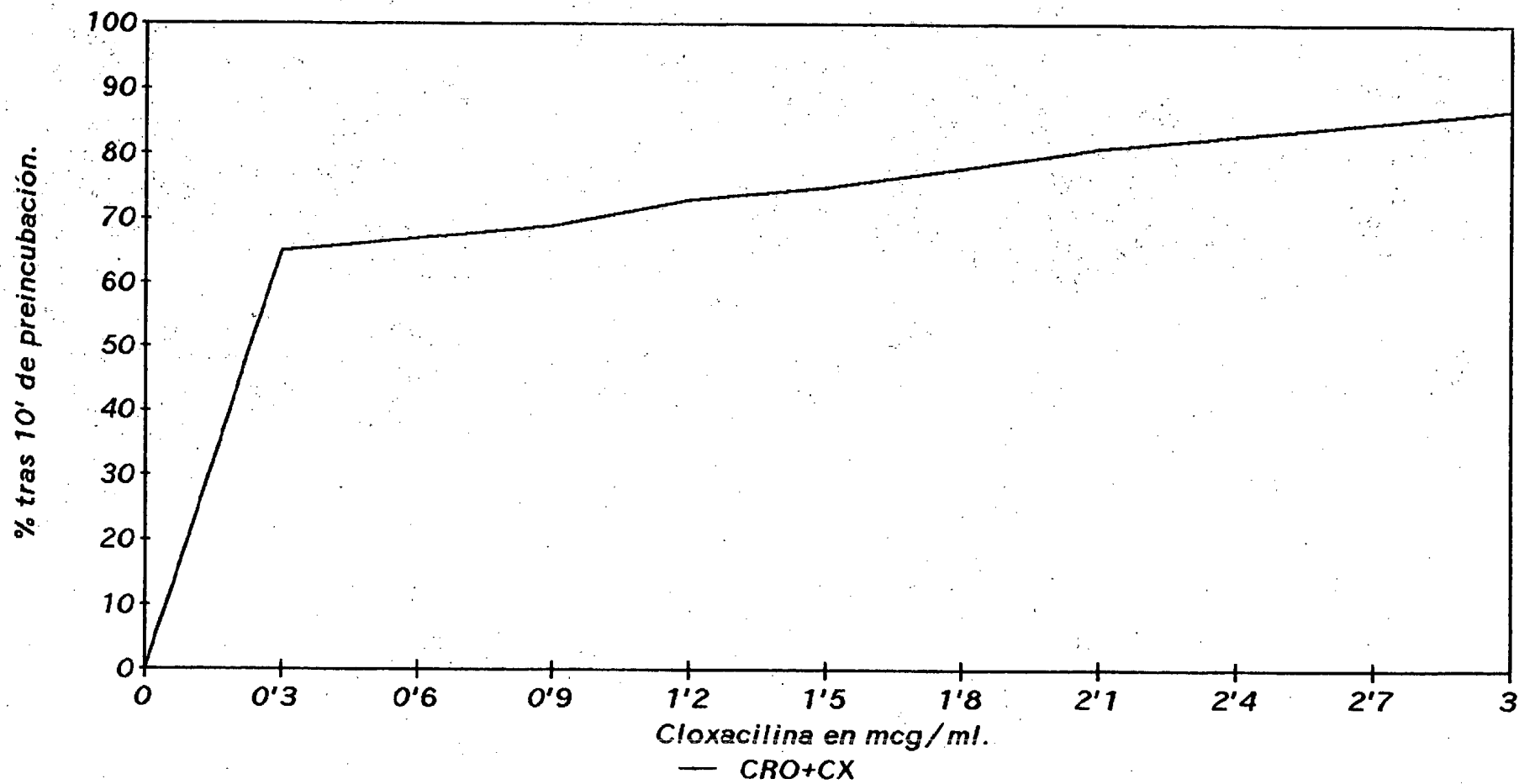


GRAFICO 52. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

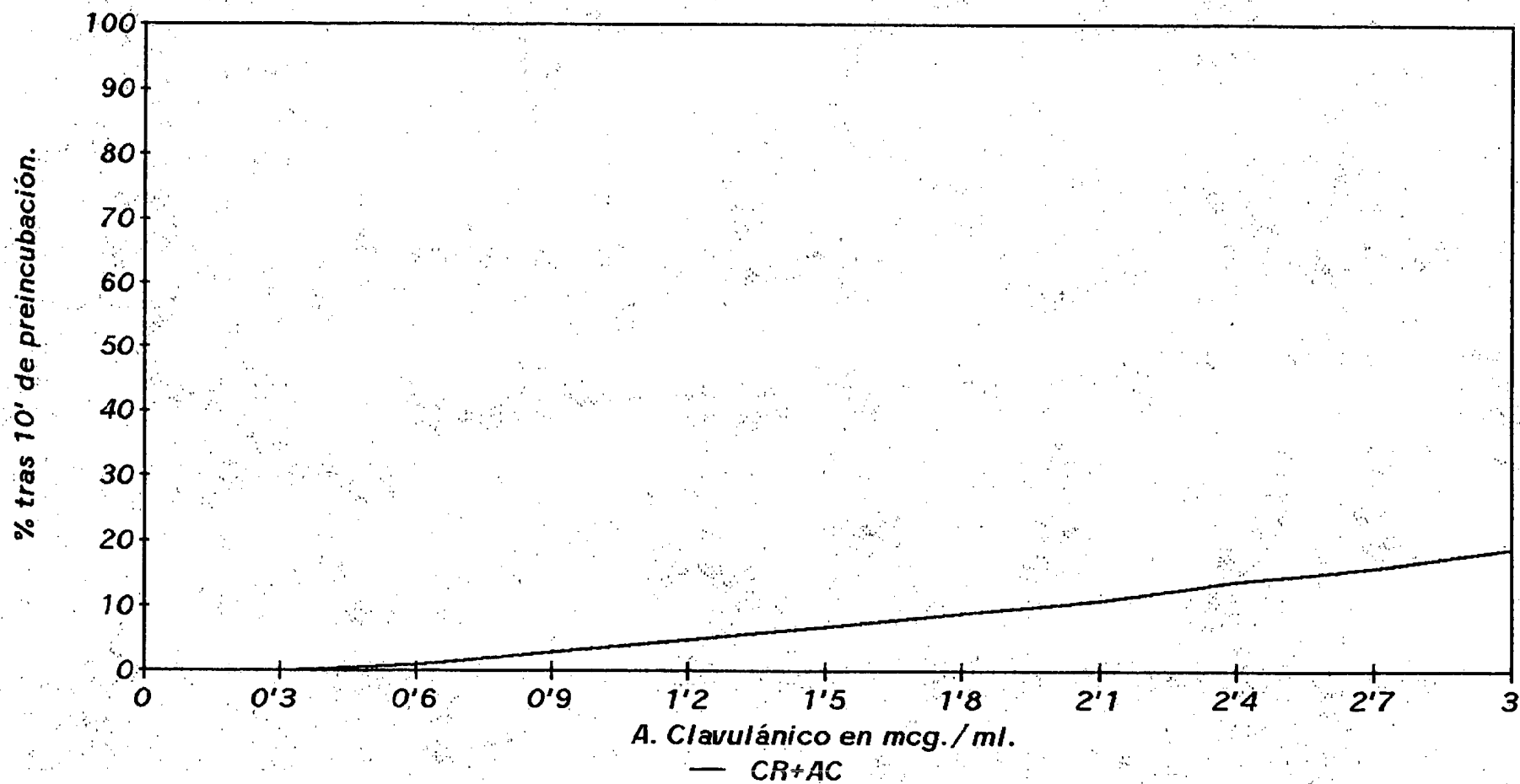


GRAFICO 53. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

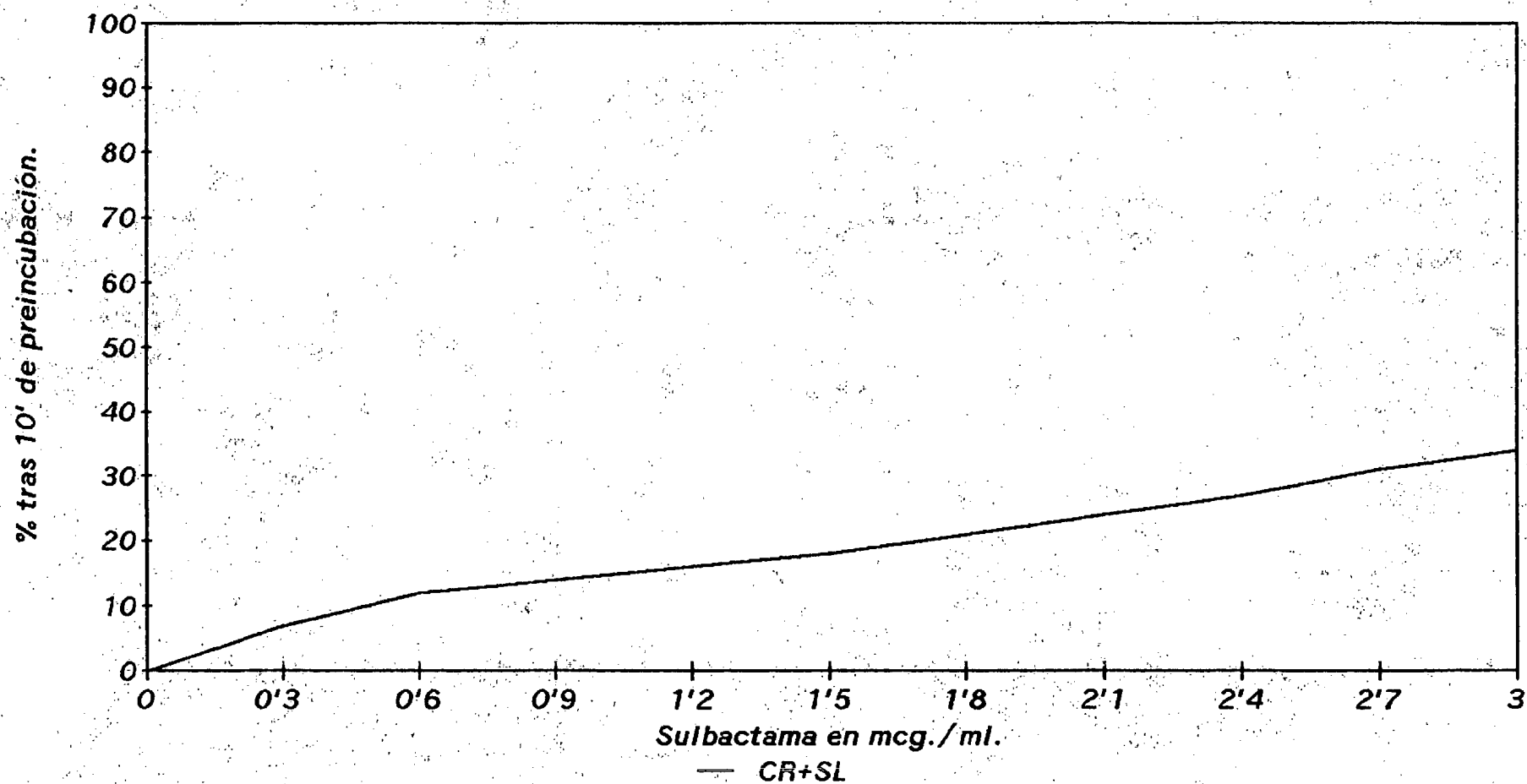


GRAFICO 54. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

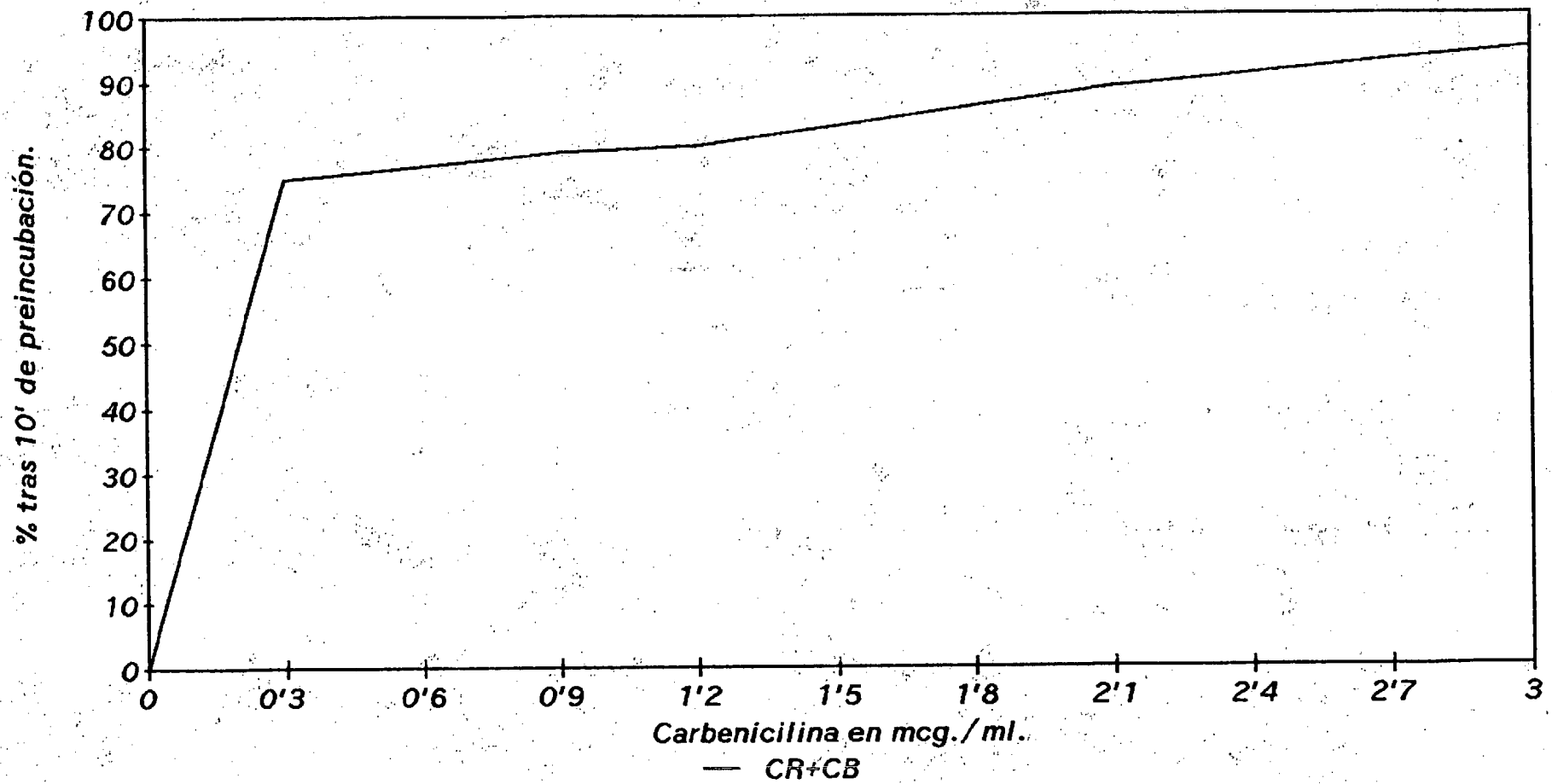


GRAFICO 55. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

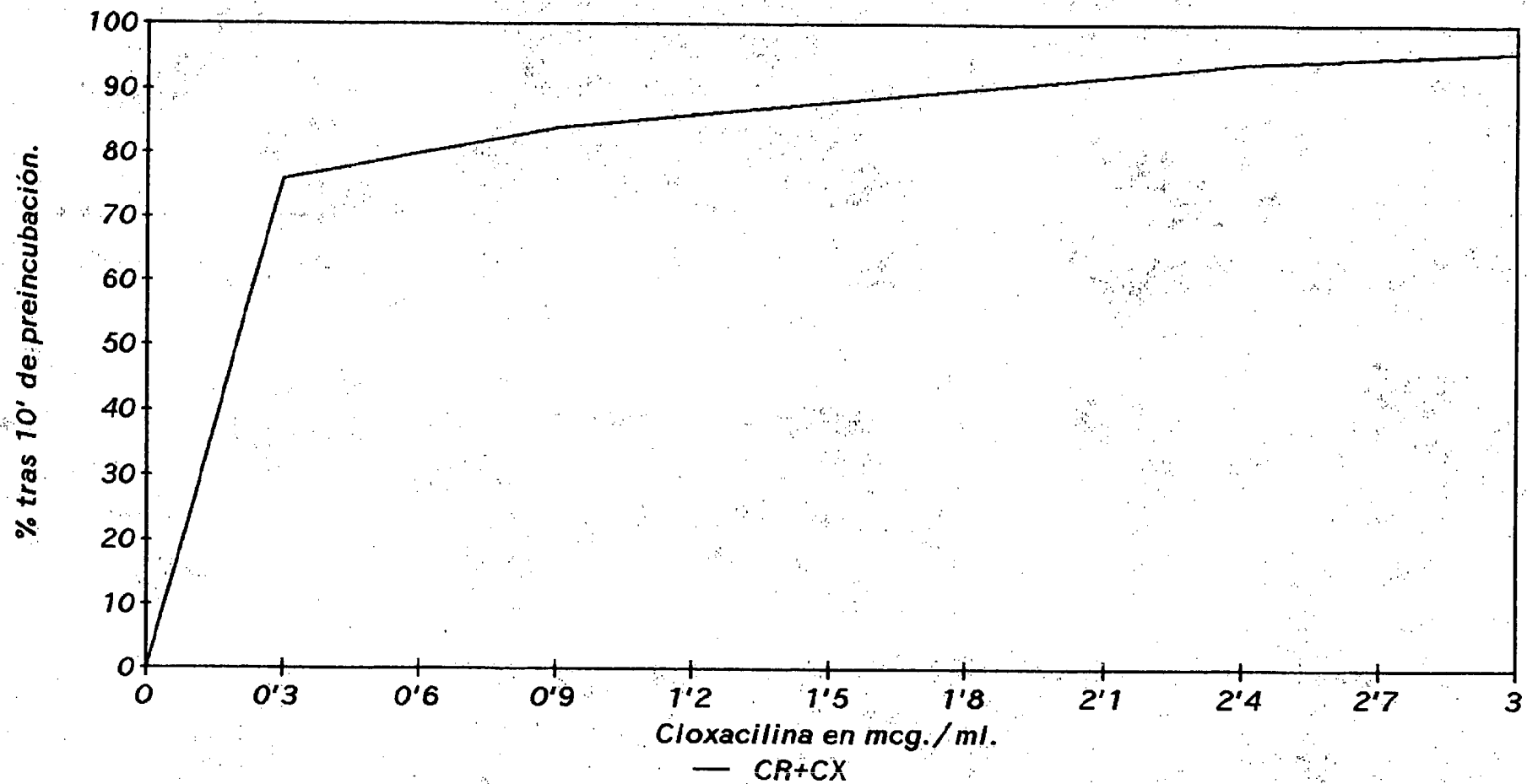


GRAFICO 56. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

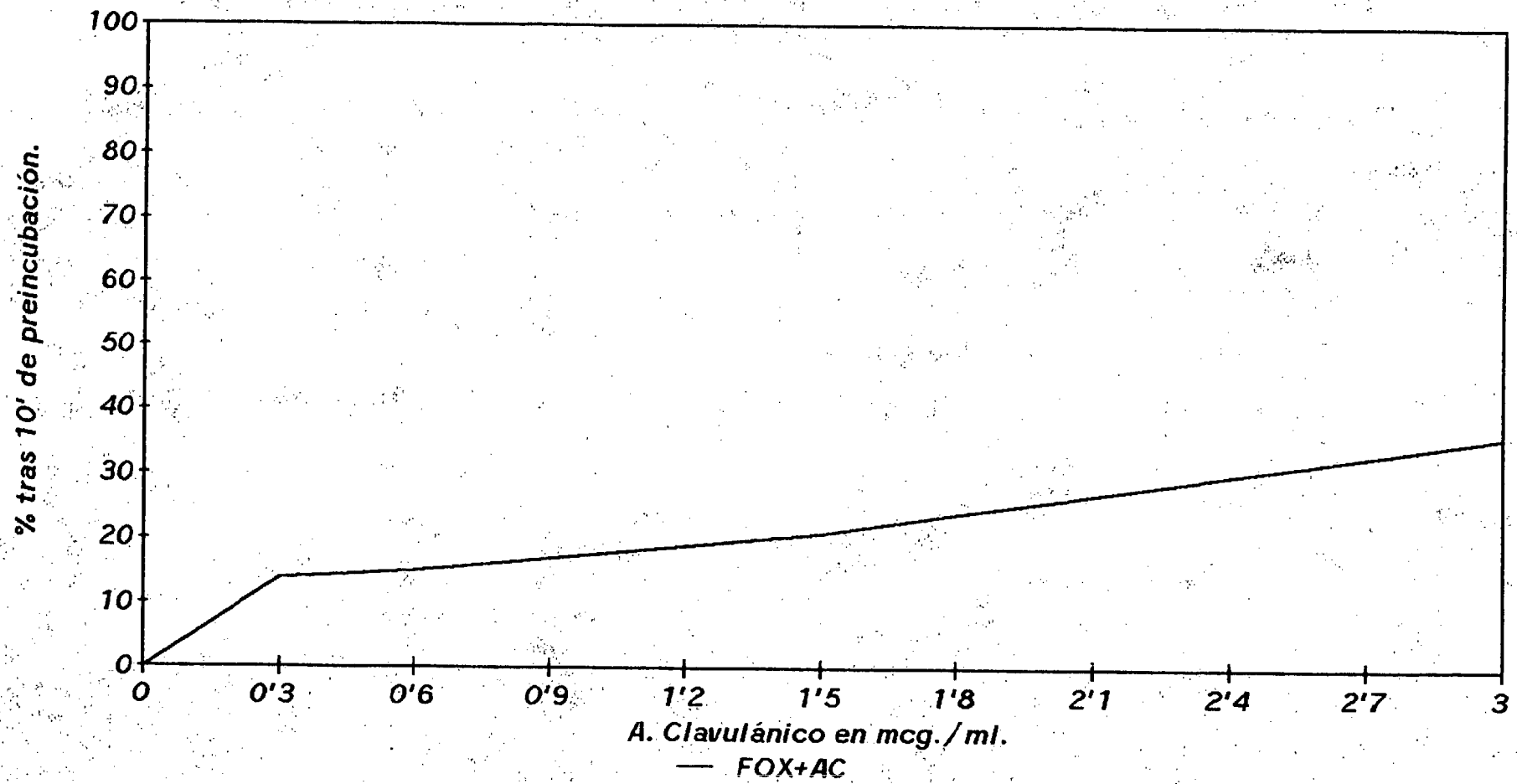


GRAFICO 57. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

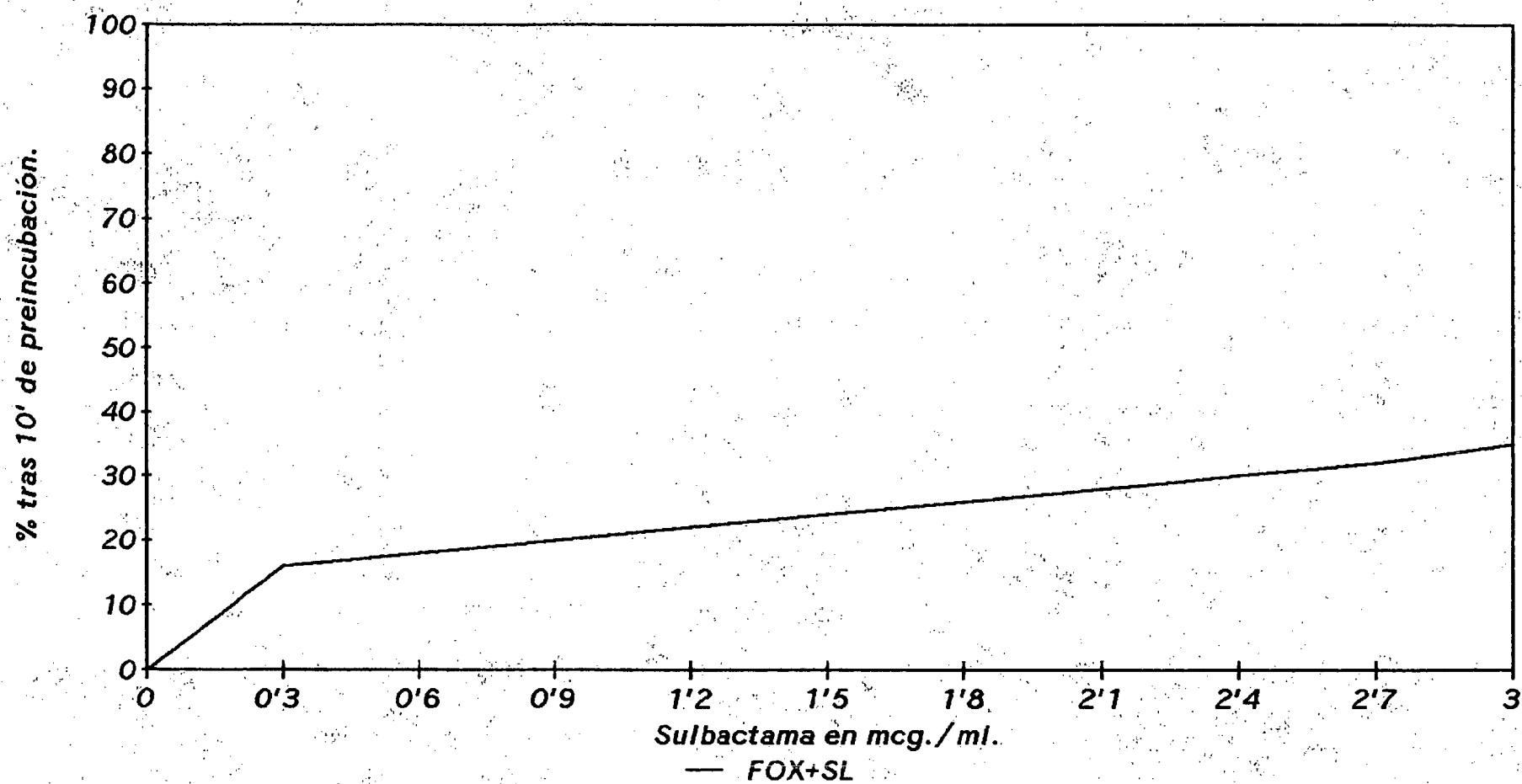


GRAFICO 58. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

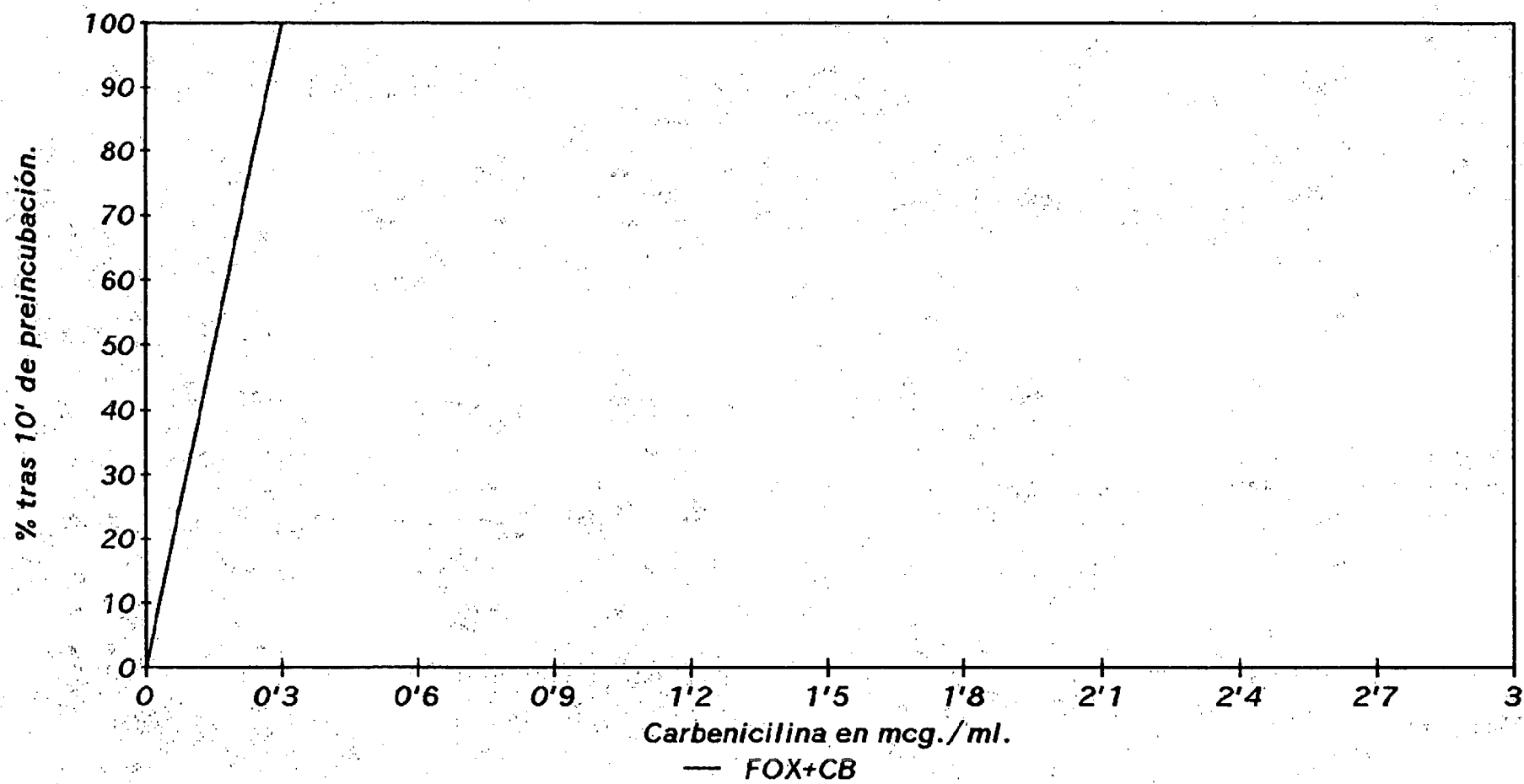


GRAFICO 59. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

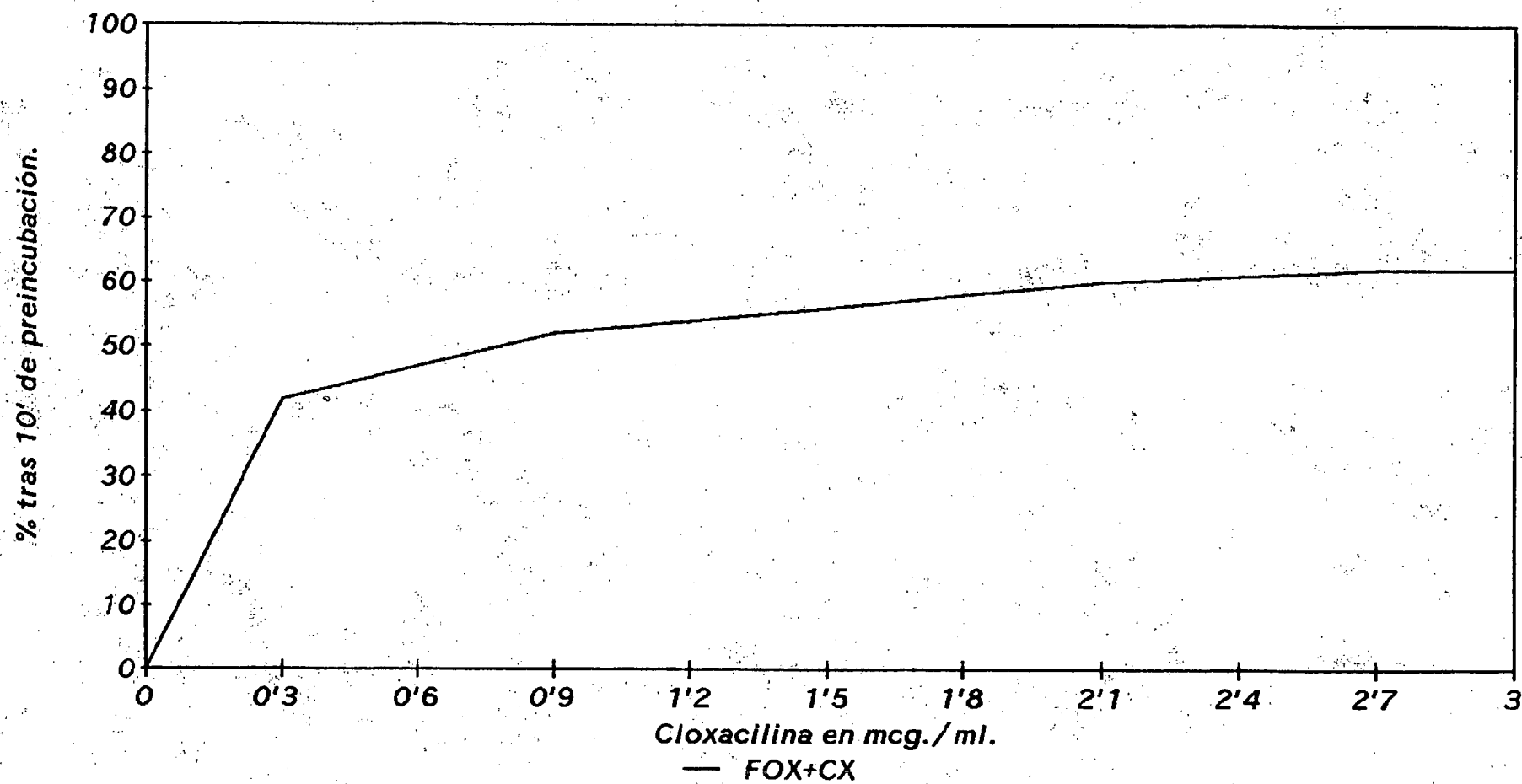


GRAFICO 60. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

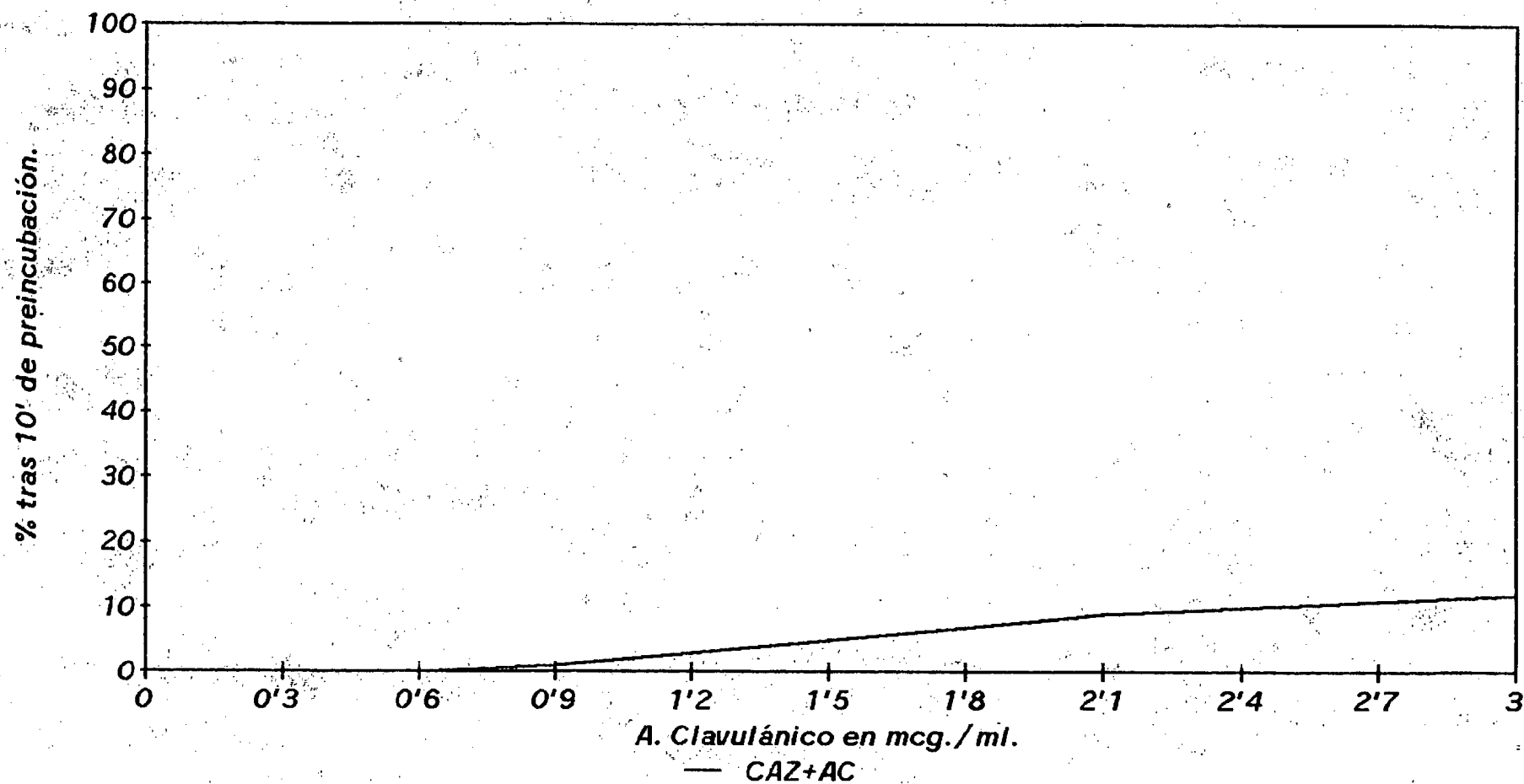


GRAFICO 61. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

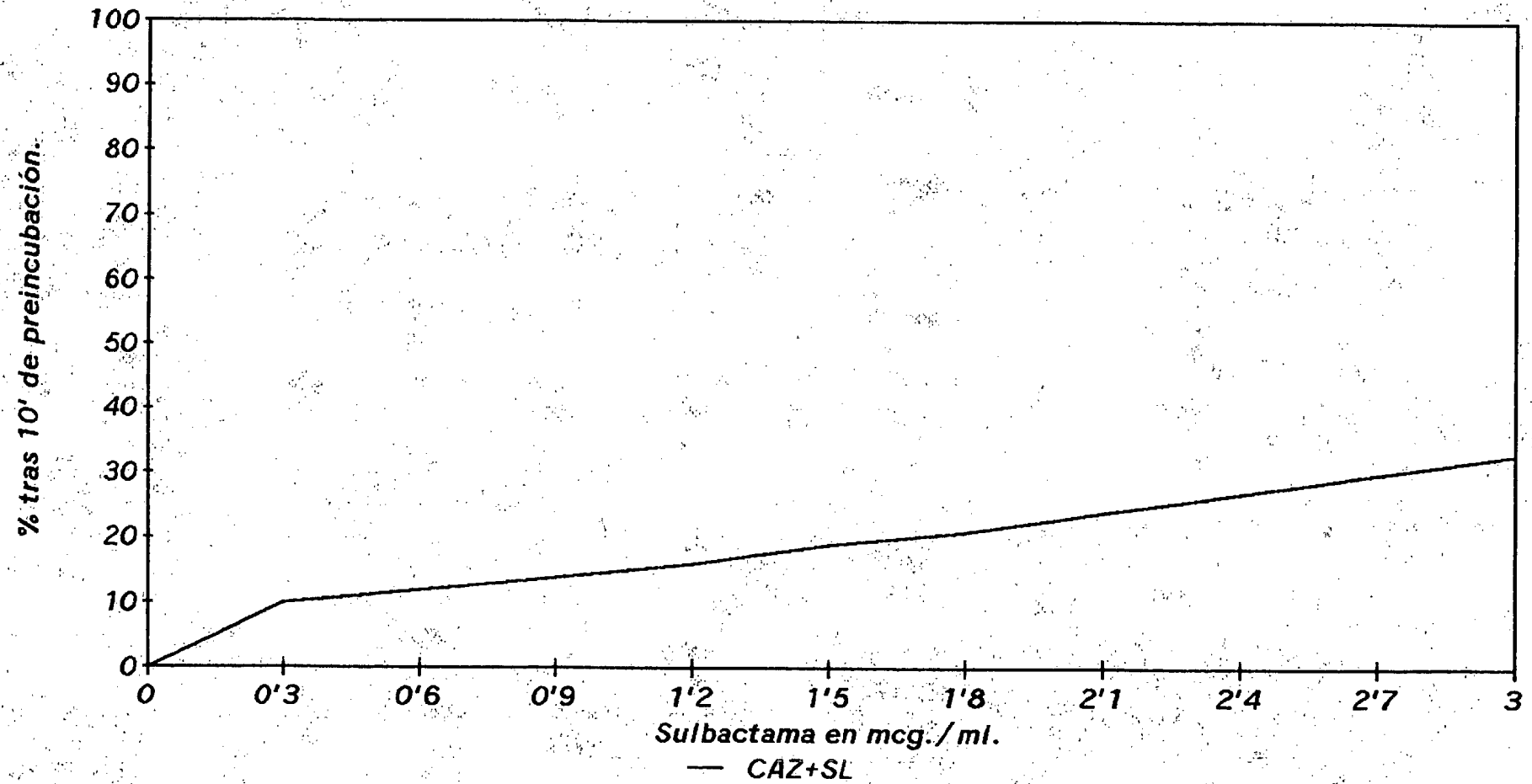


GRAFICO 62. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

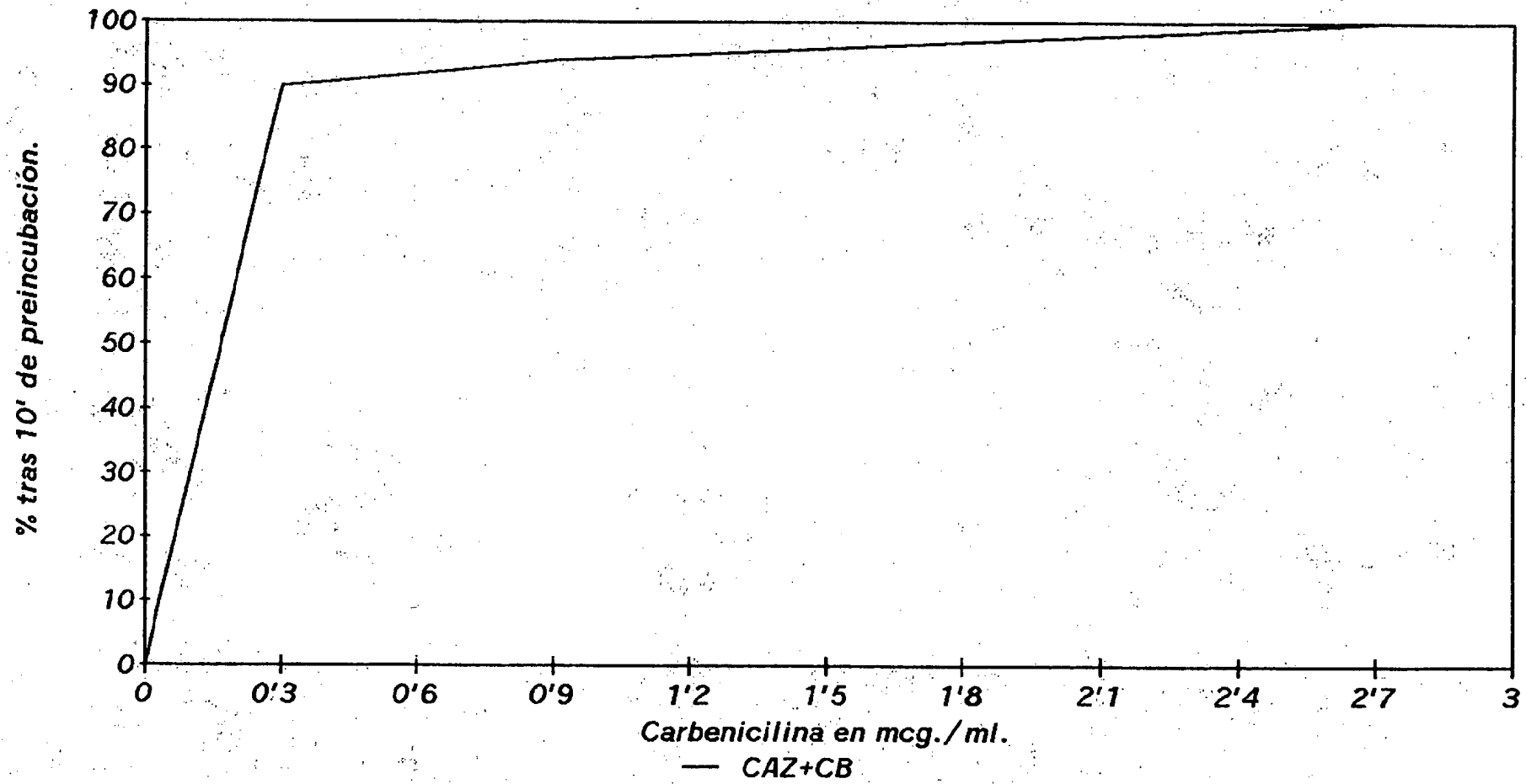


GRAFICO 63. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

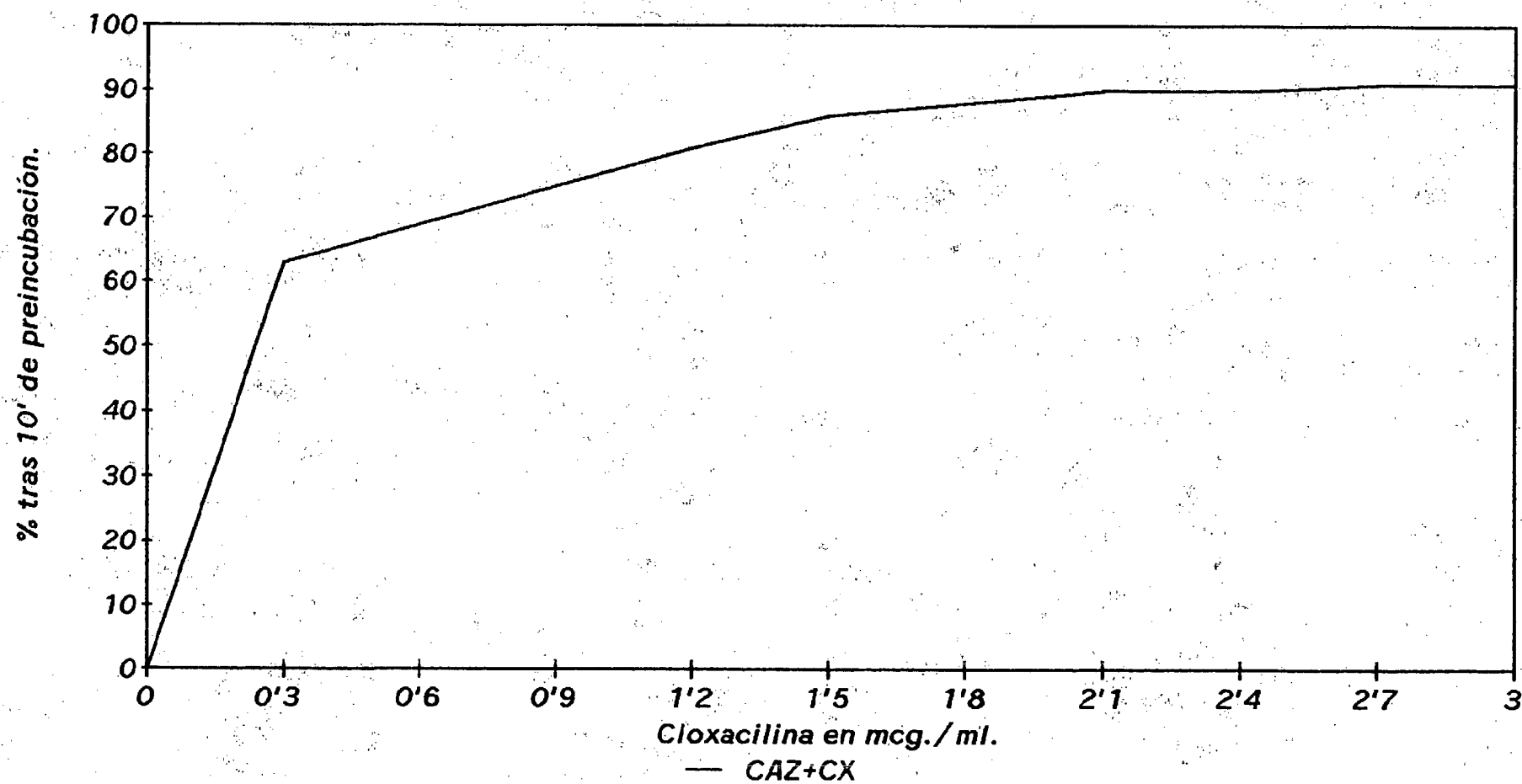


GRAFICO 64. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa Escherichia coli 2A.

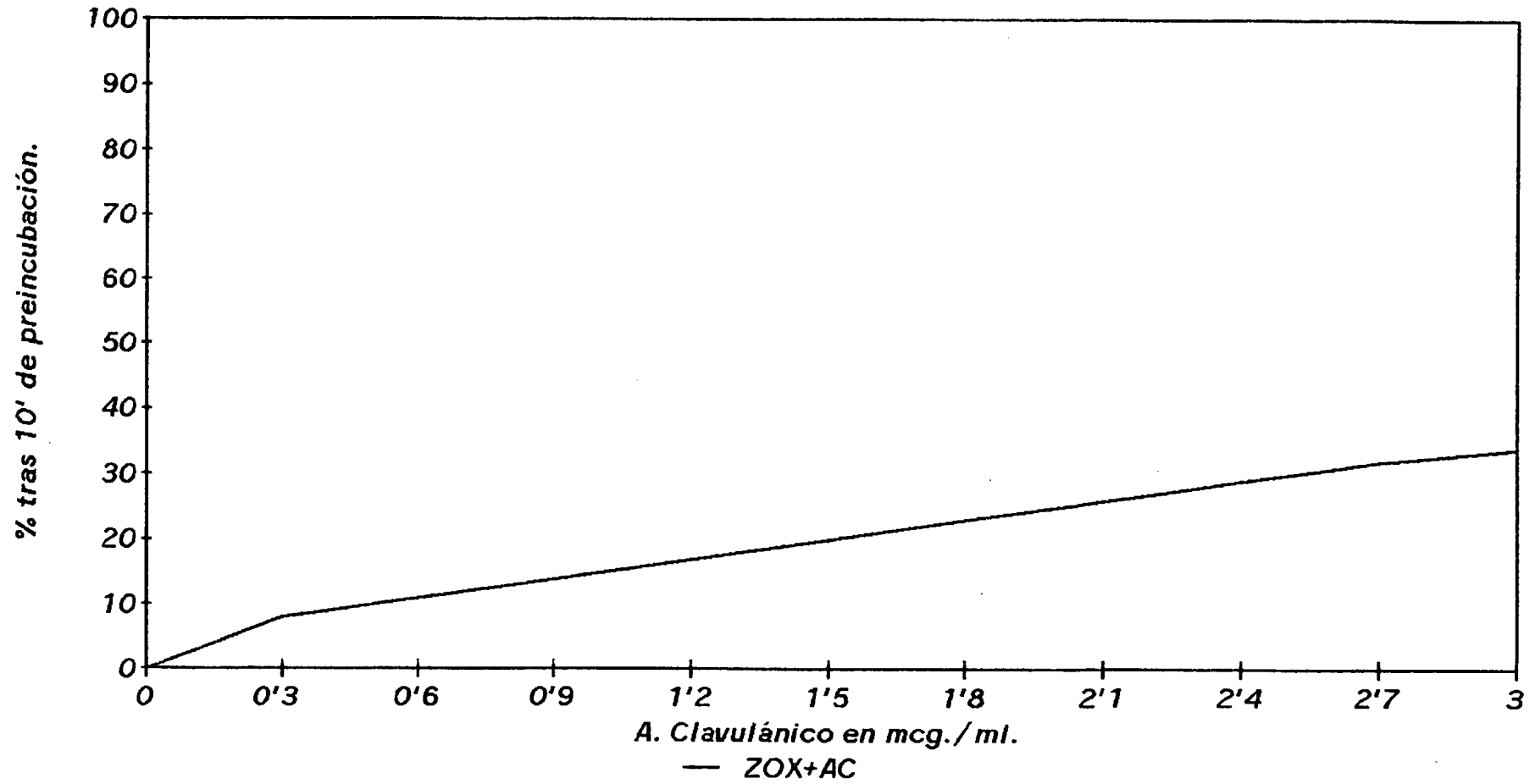


GRAFICO 65. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa Escherichia coli 2A.

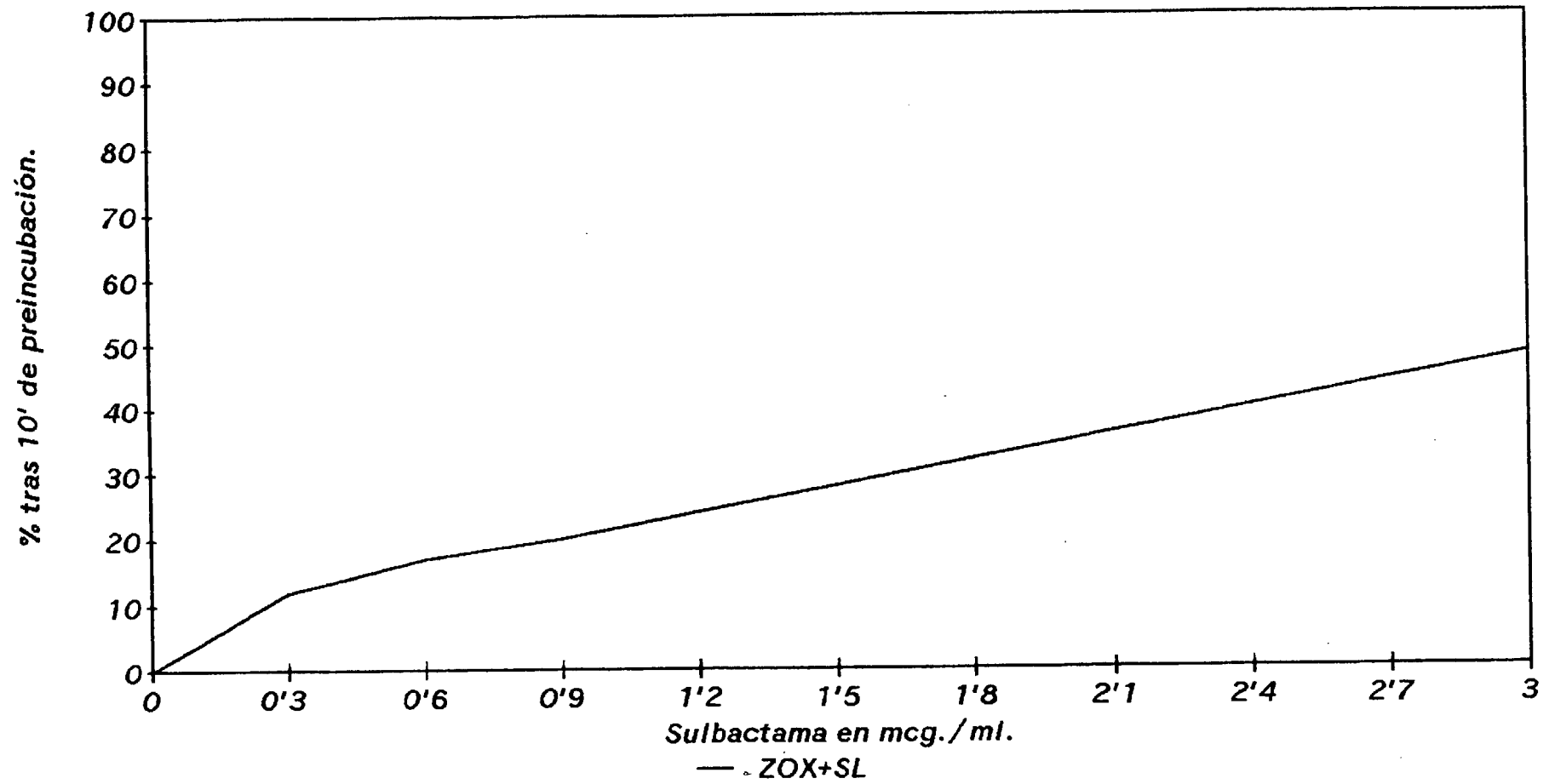


GRAFICO 66. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

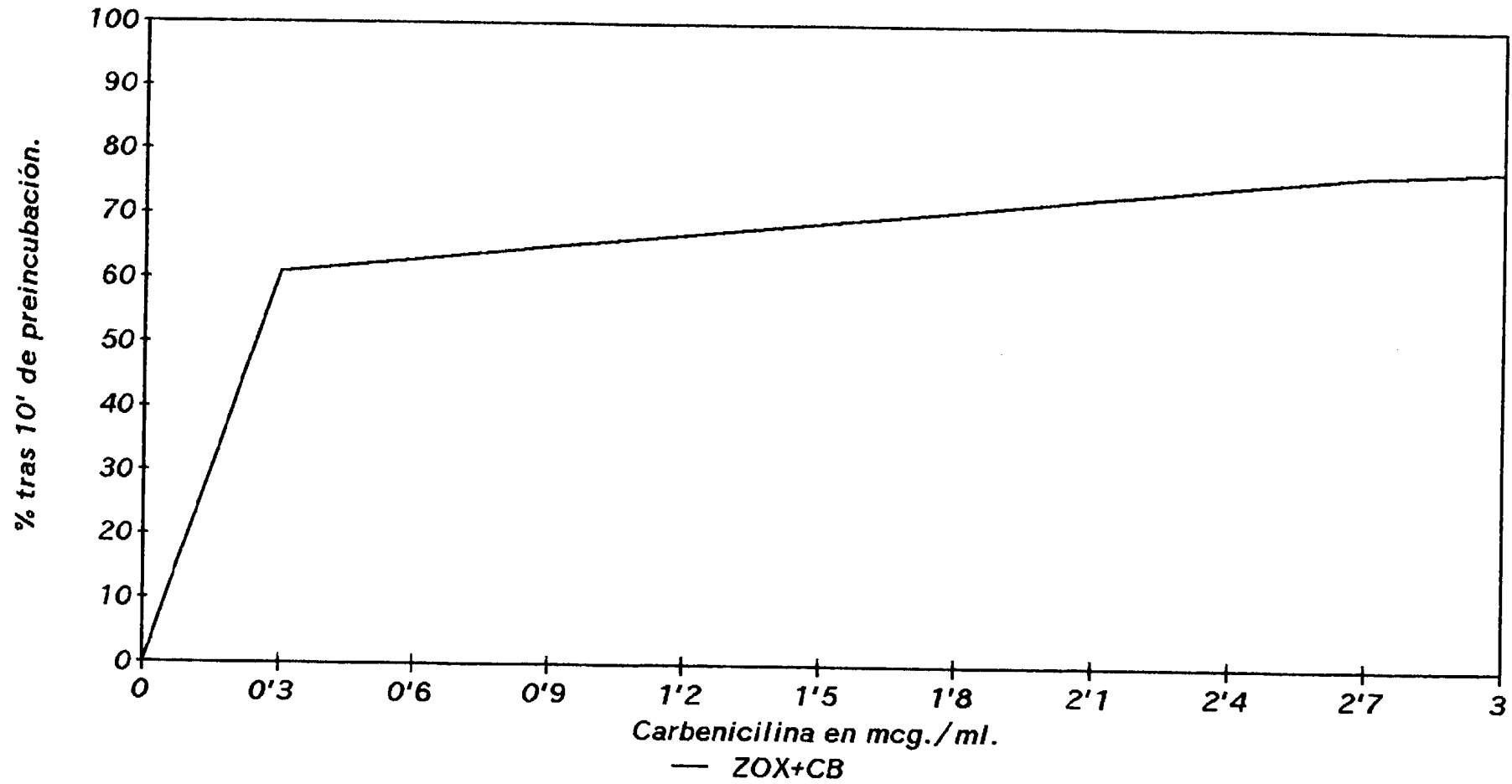


GRAFICO 67. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa Escherichia coli 2A.

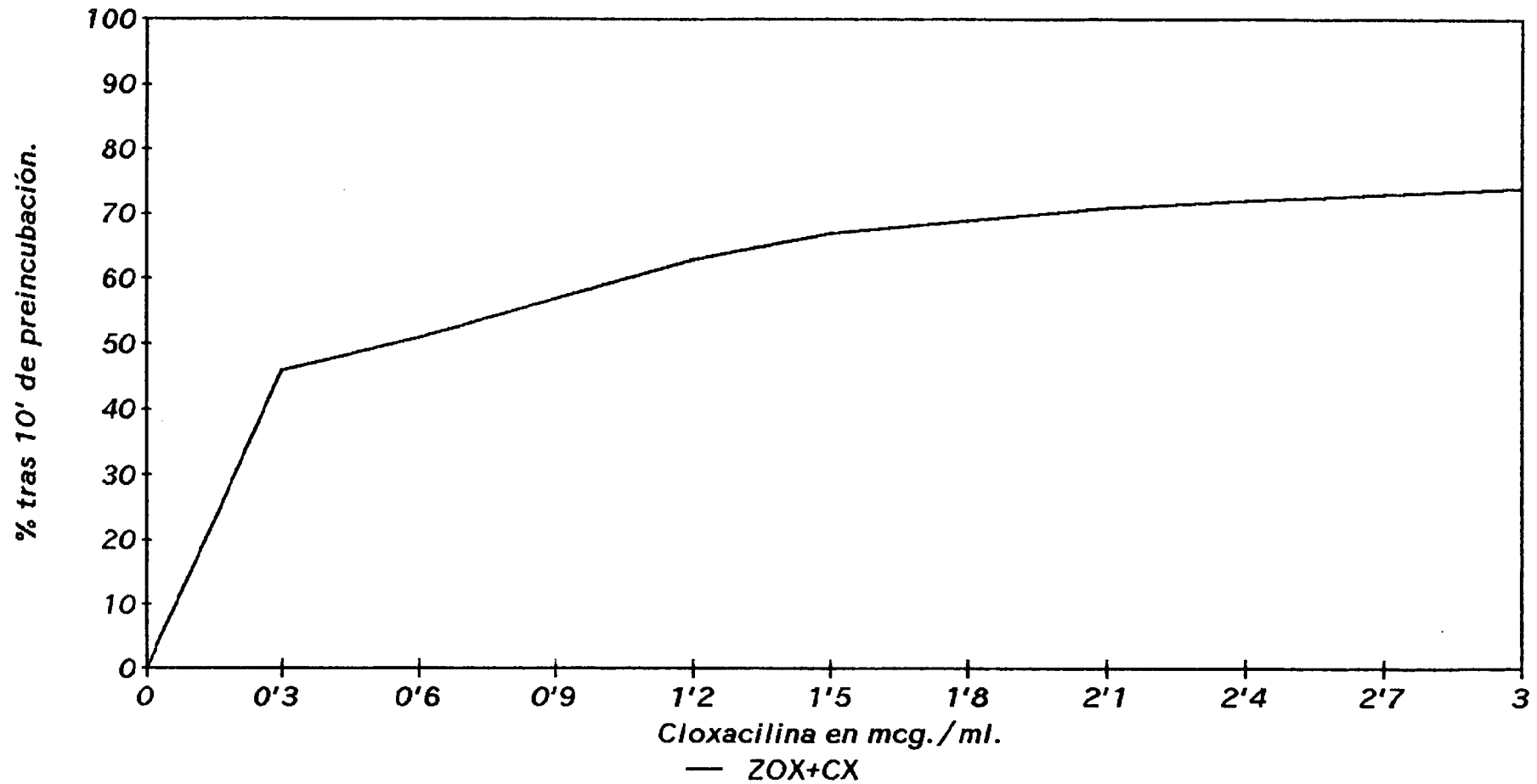


GRAFICO 68. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa Escherichia coli 2A.

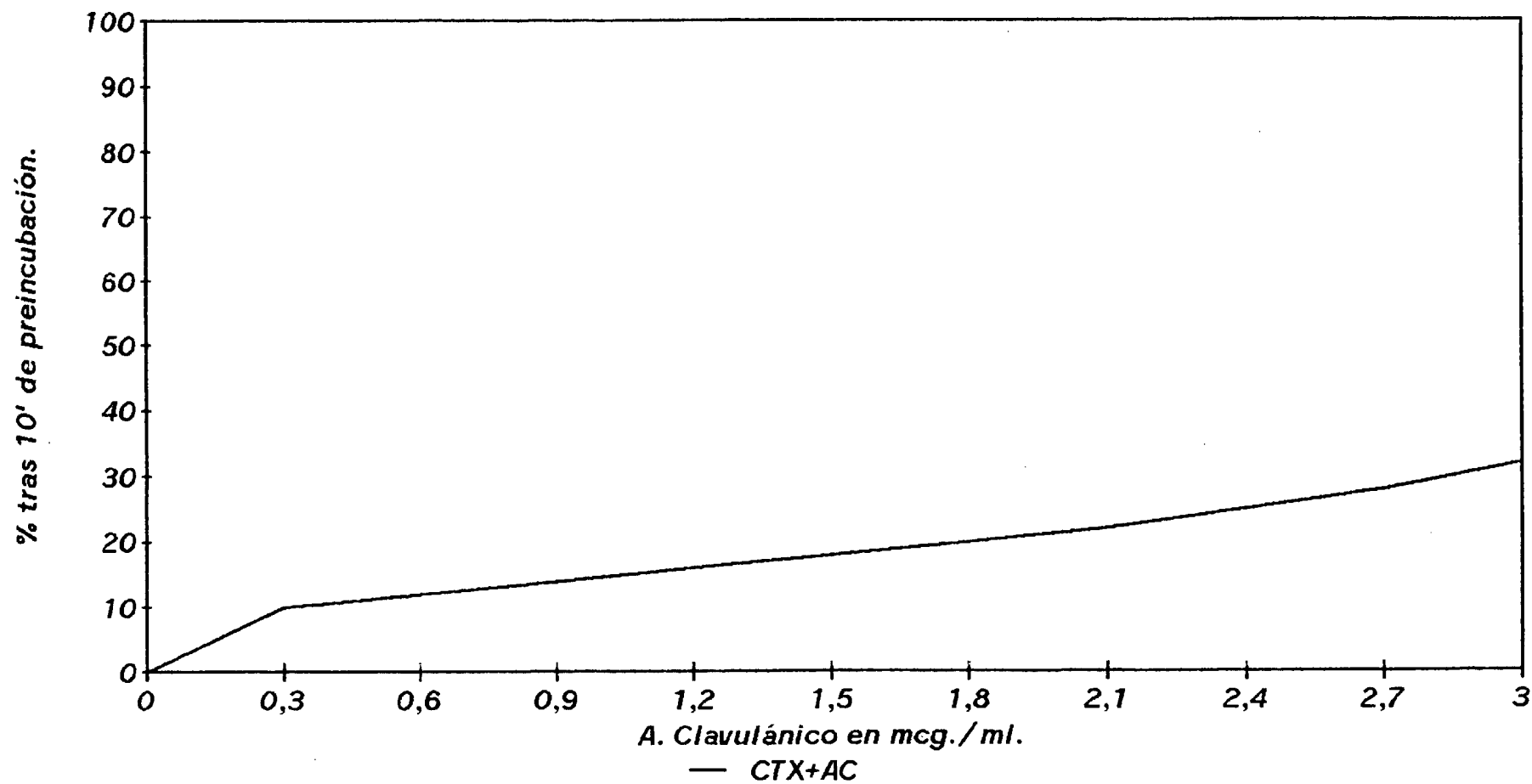


GRAFICO 69. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa Escherichia coli 2A.

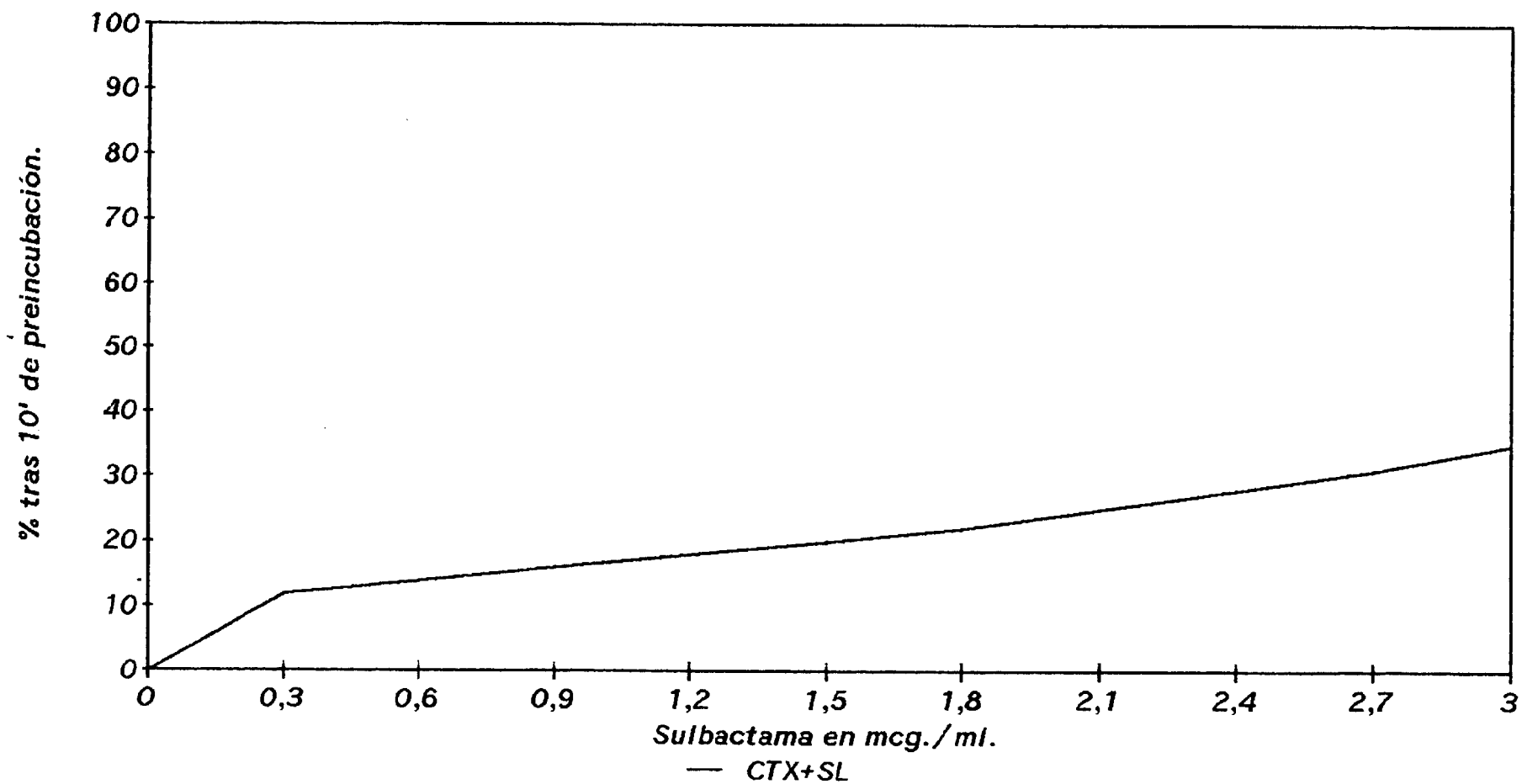


GRAFICO 70. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa Escherichia coli 2A.

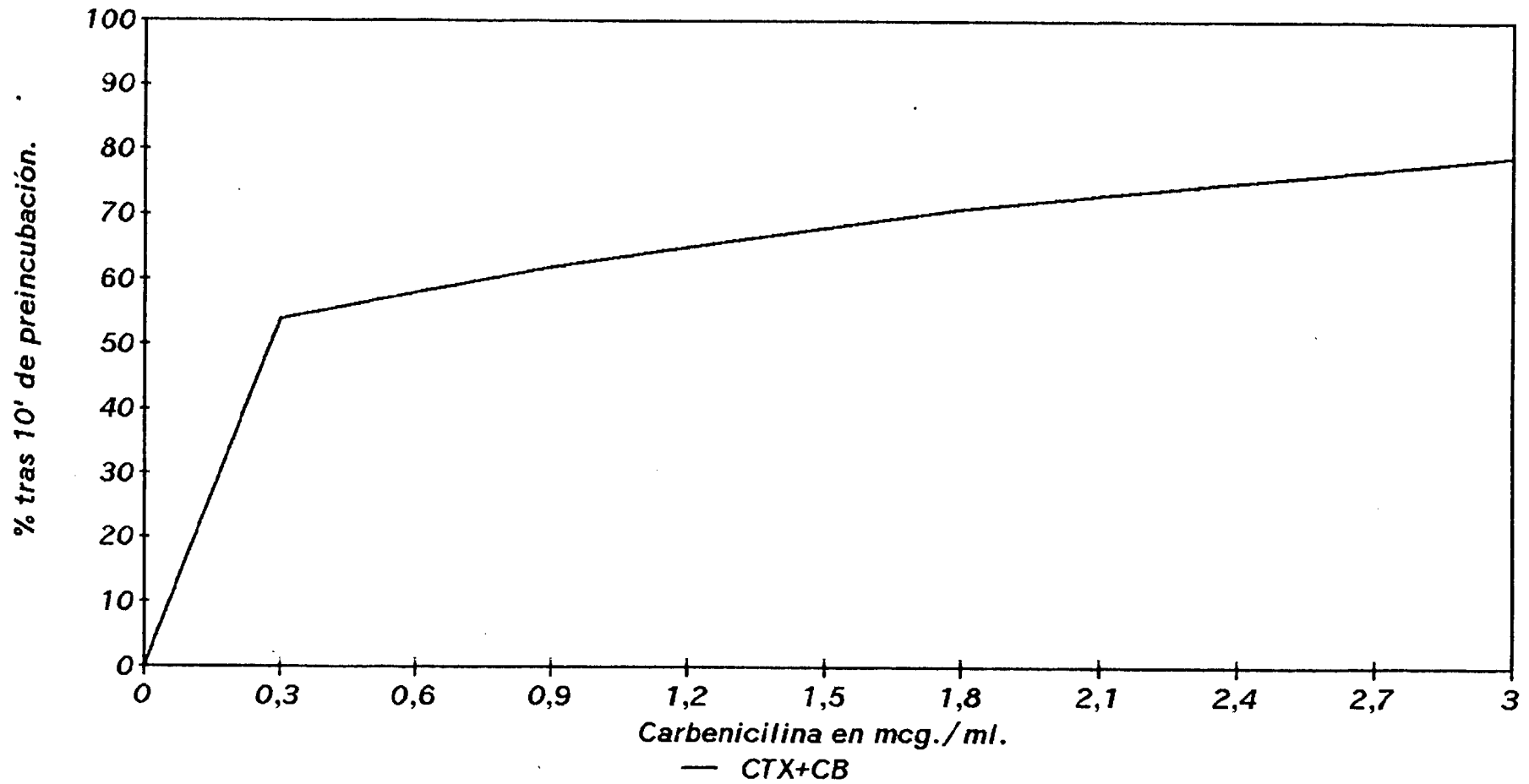


GRAFICO 71. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa Escherichia coli 2A.

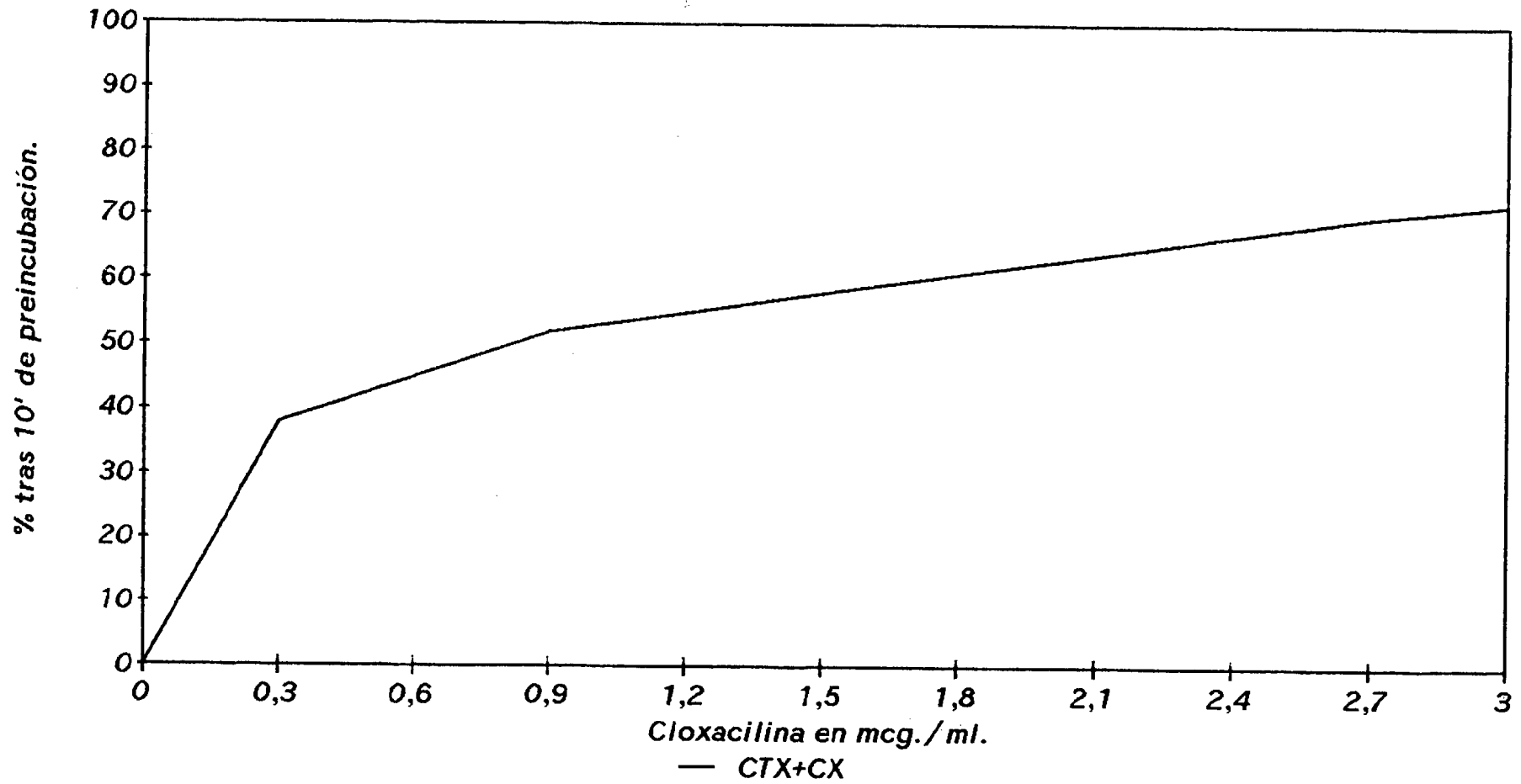


GRAFICO 72. PORCENTAJES DE INHIBICION.
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

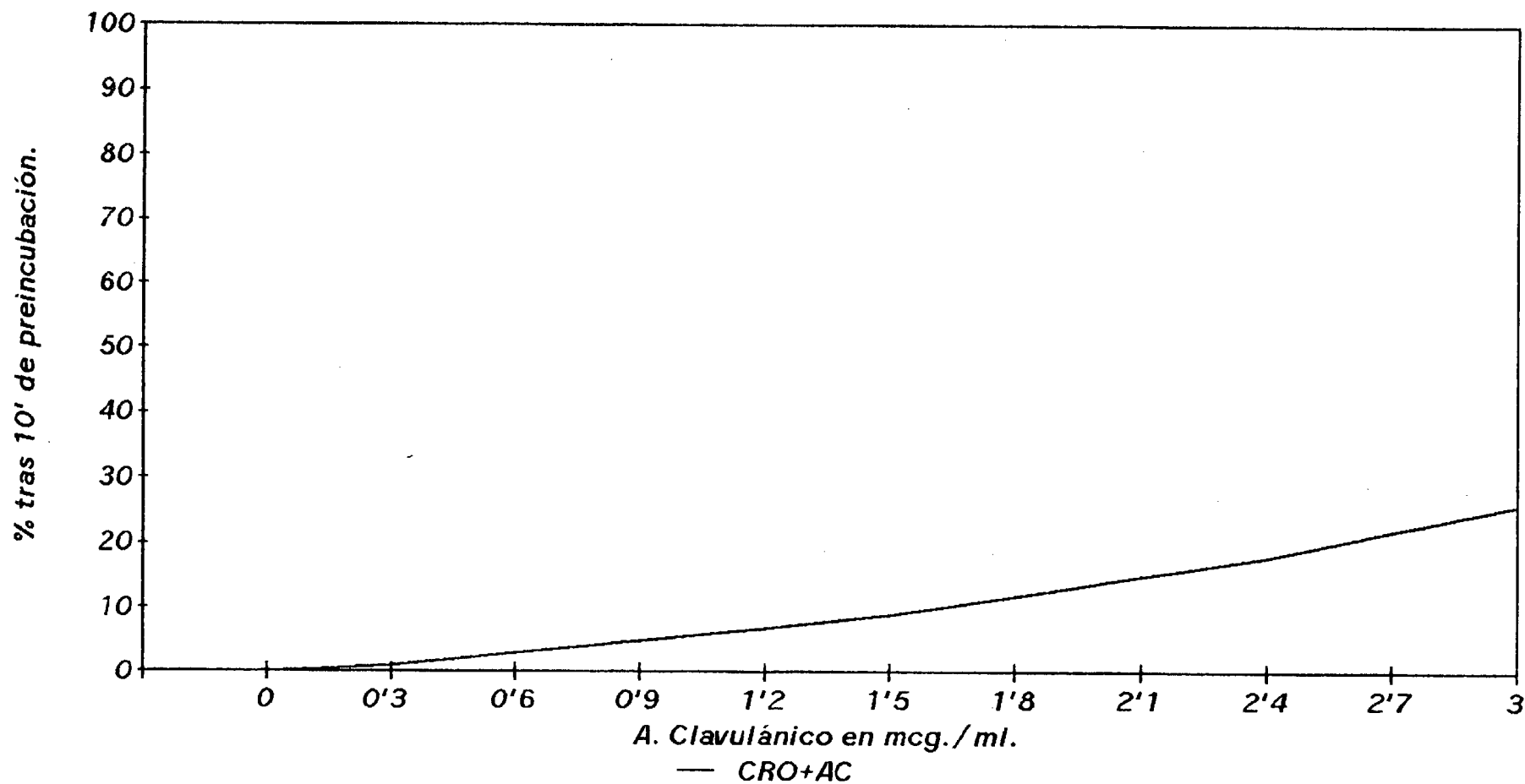


GRAFICO 73. PORCENTAJES DE INHIBICION.
En la cepa *Escherichia coli* 2A.

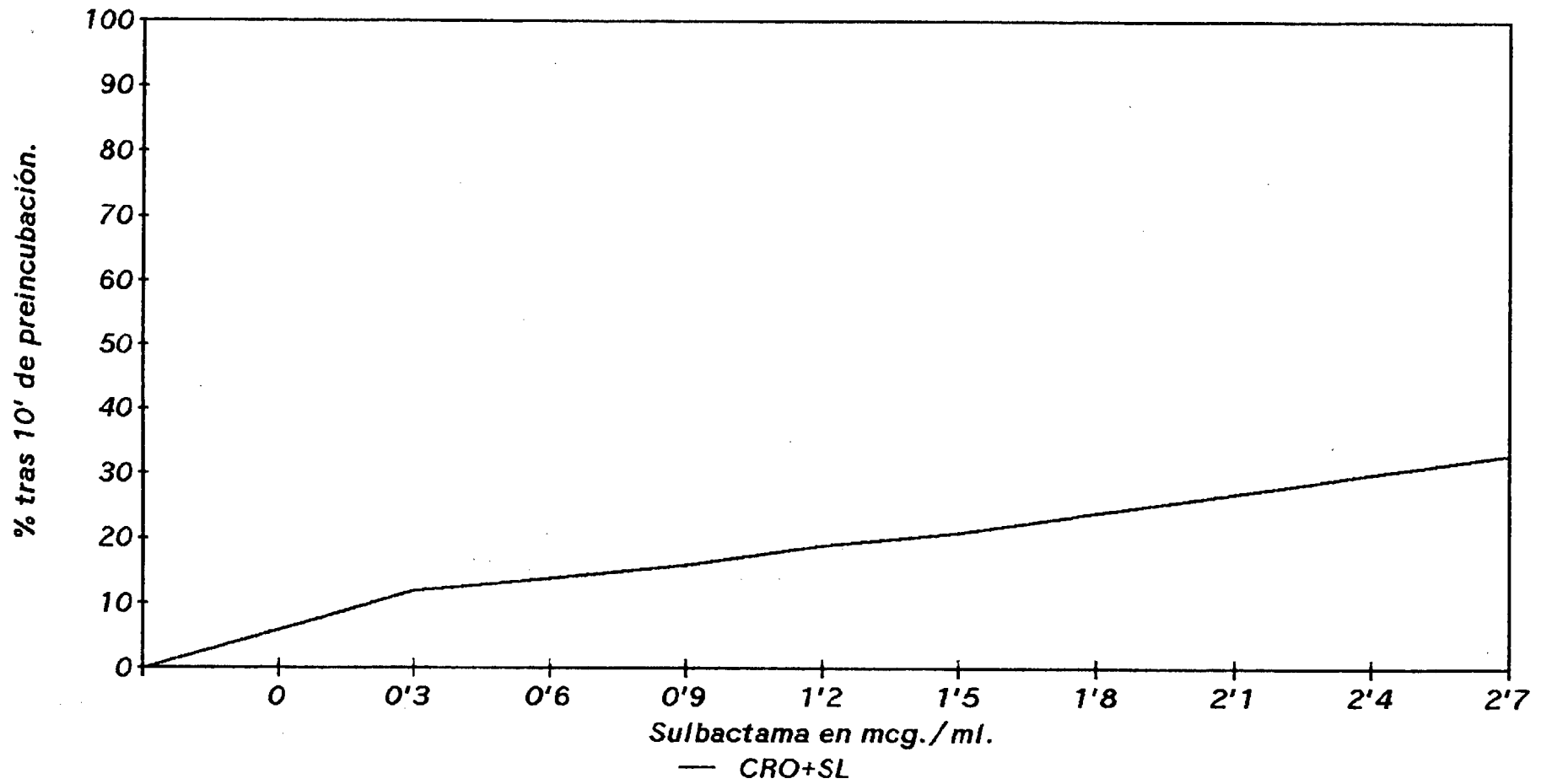


GRAFICO 74. PORCENTAJES DE INHIBICION.
En la cepa Escherichia coli 2A.

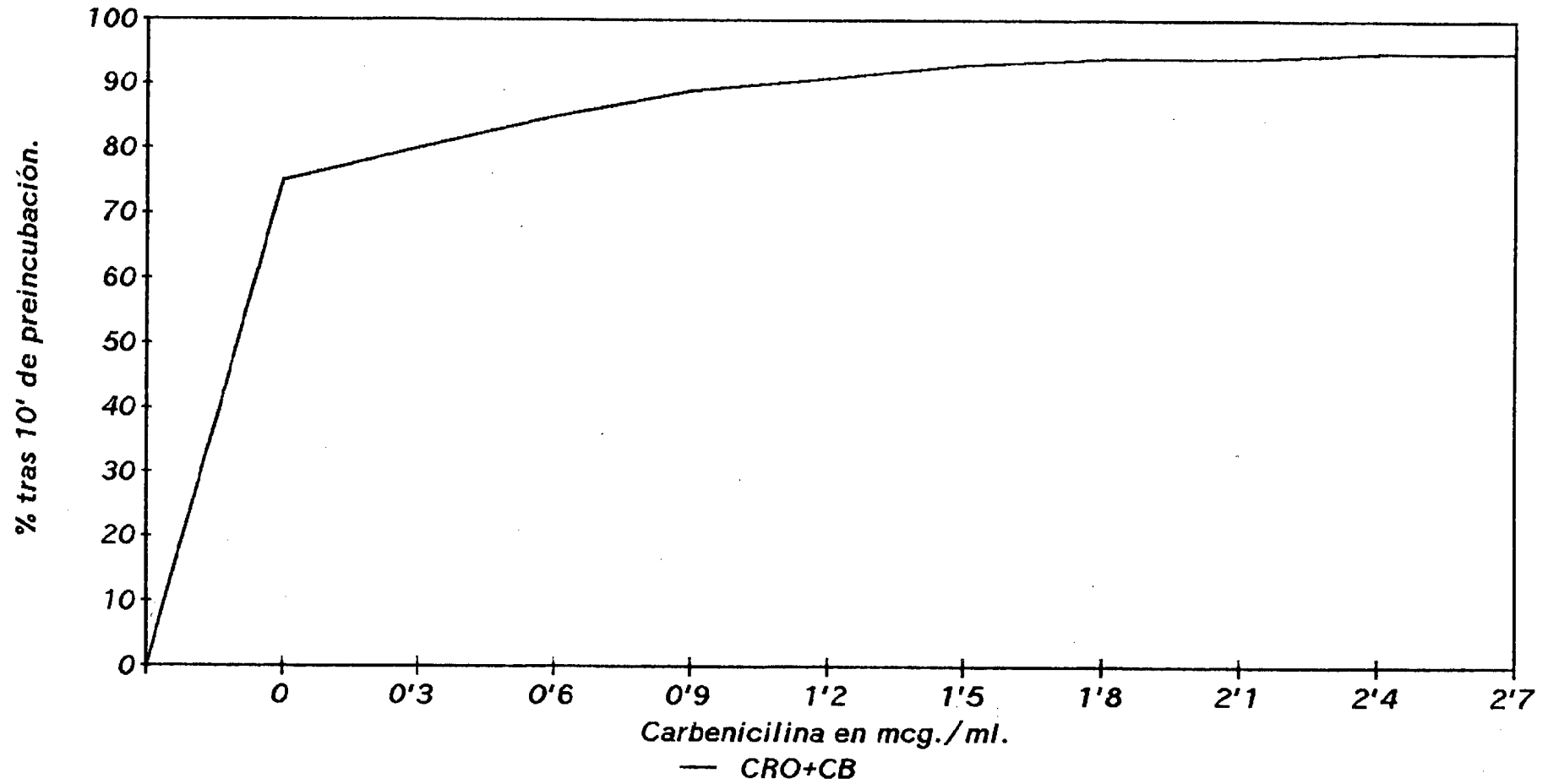


GRAFICO 75. PORCENTAJES DE INHIBICION.
En la cepa Escherichia coli 2A.

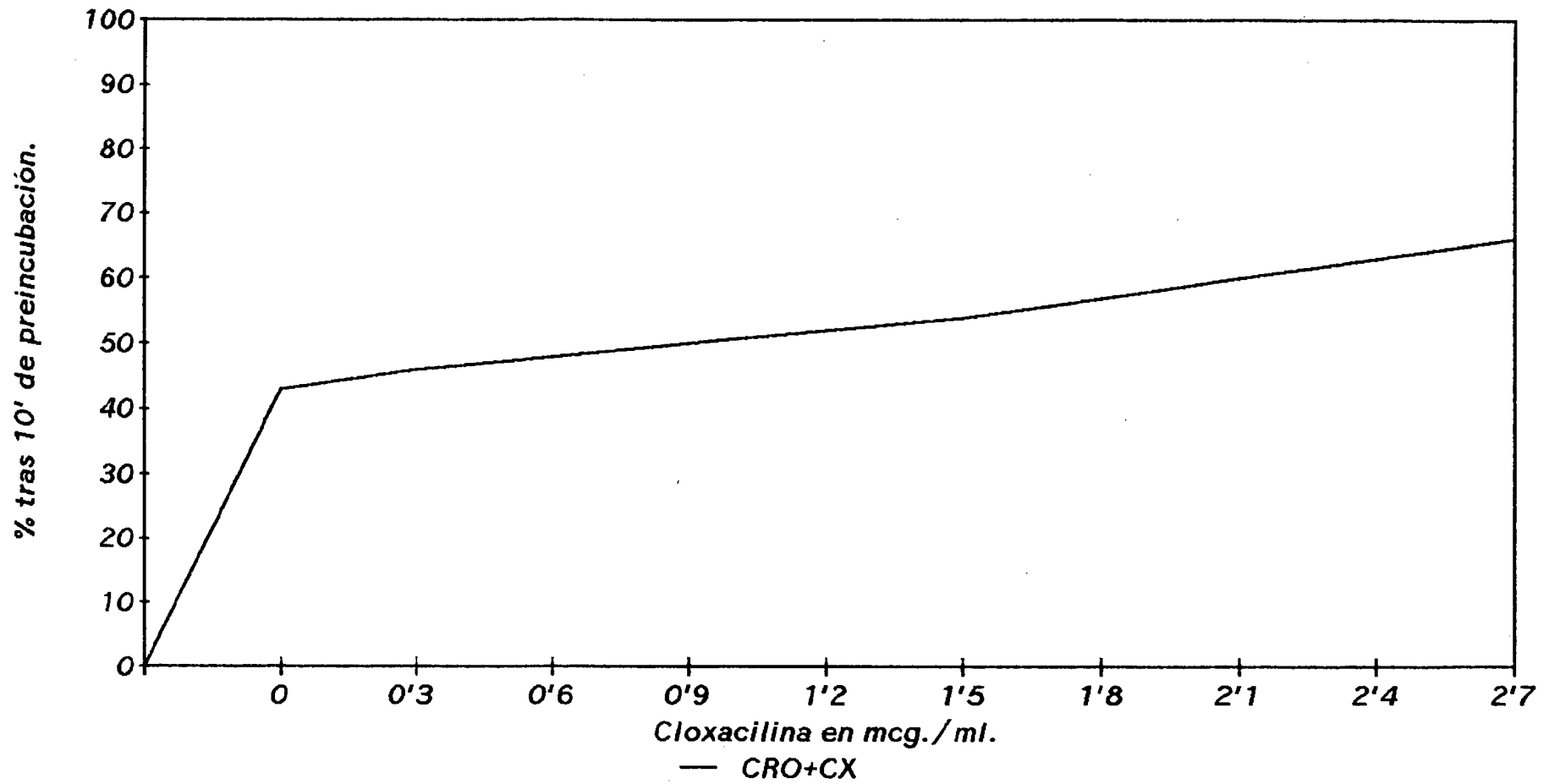


GRAFICO 76. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

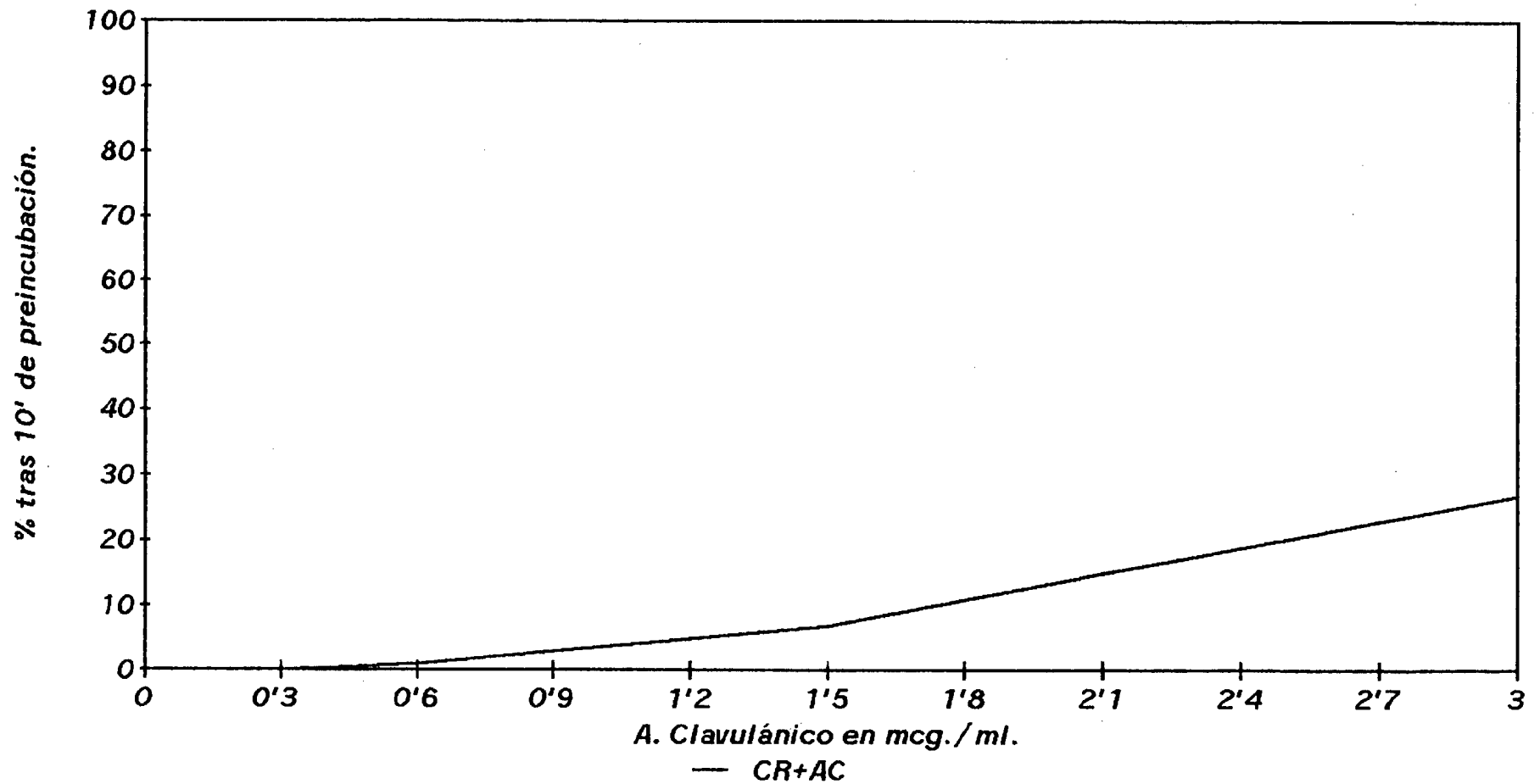


GRAFICO 77. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

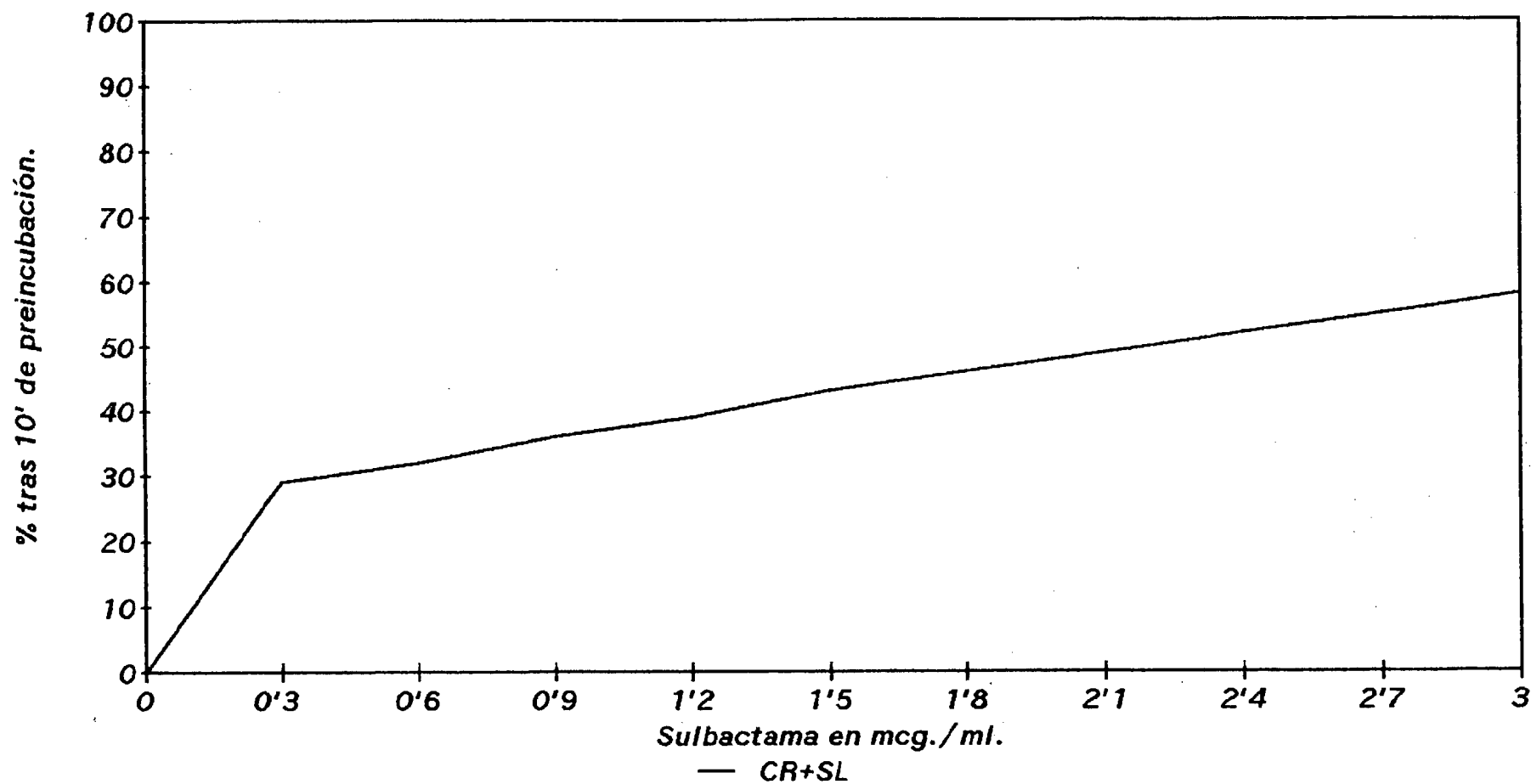


GRAFICO 78. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A*

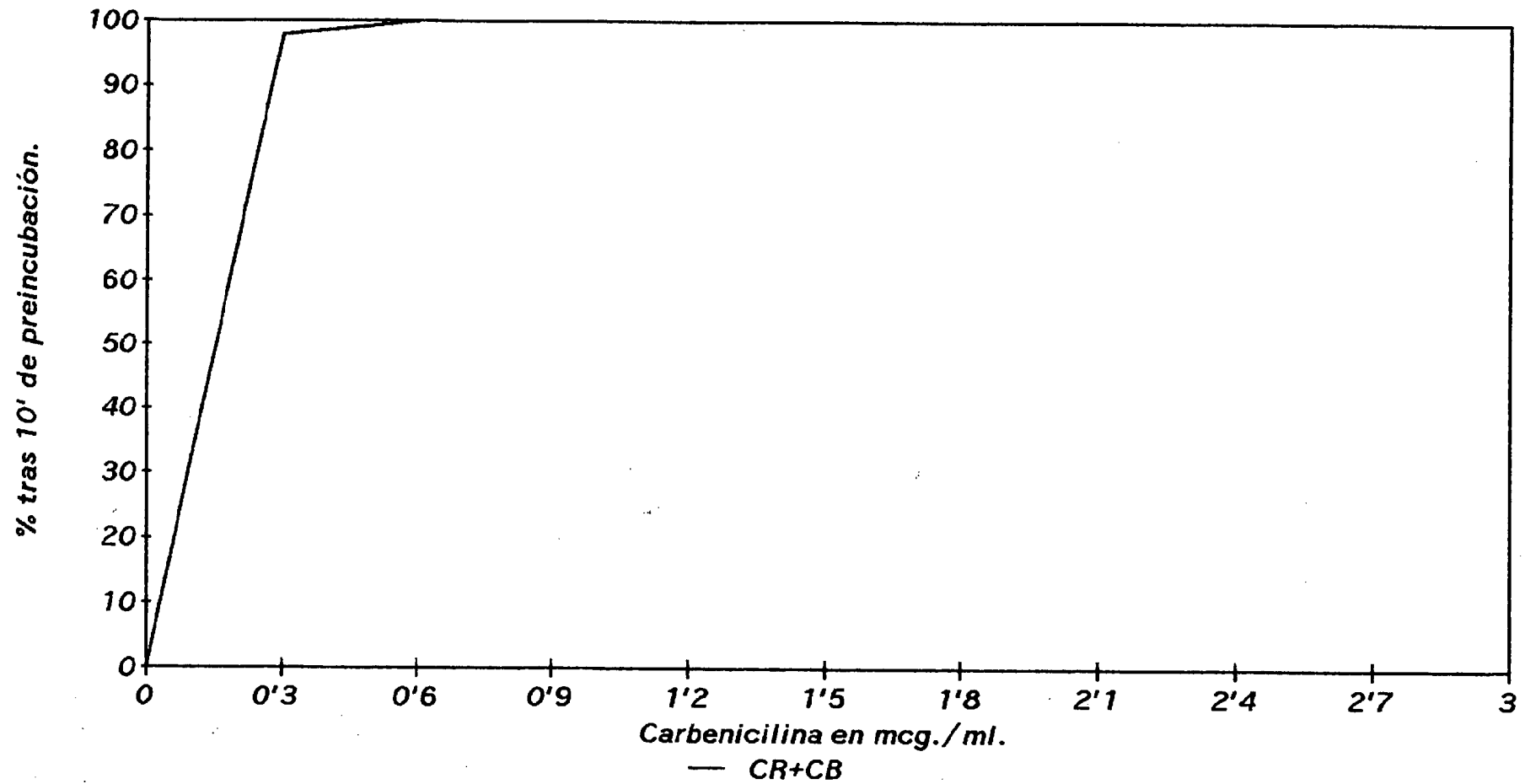


GRAFICO 79. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Morganella morganii* 3A

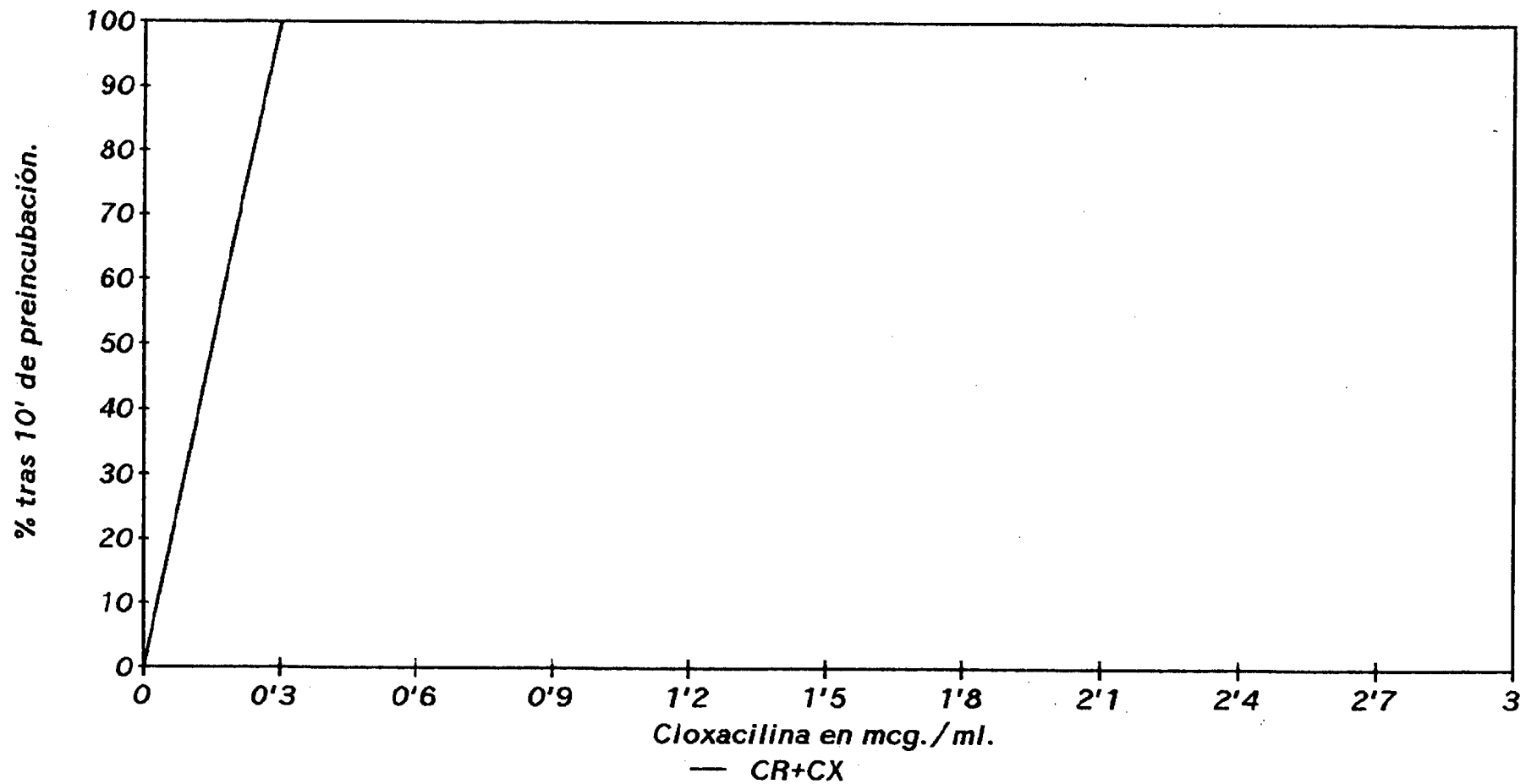


GRAFICO 80. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

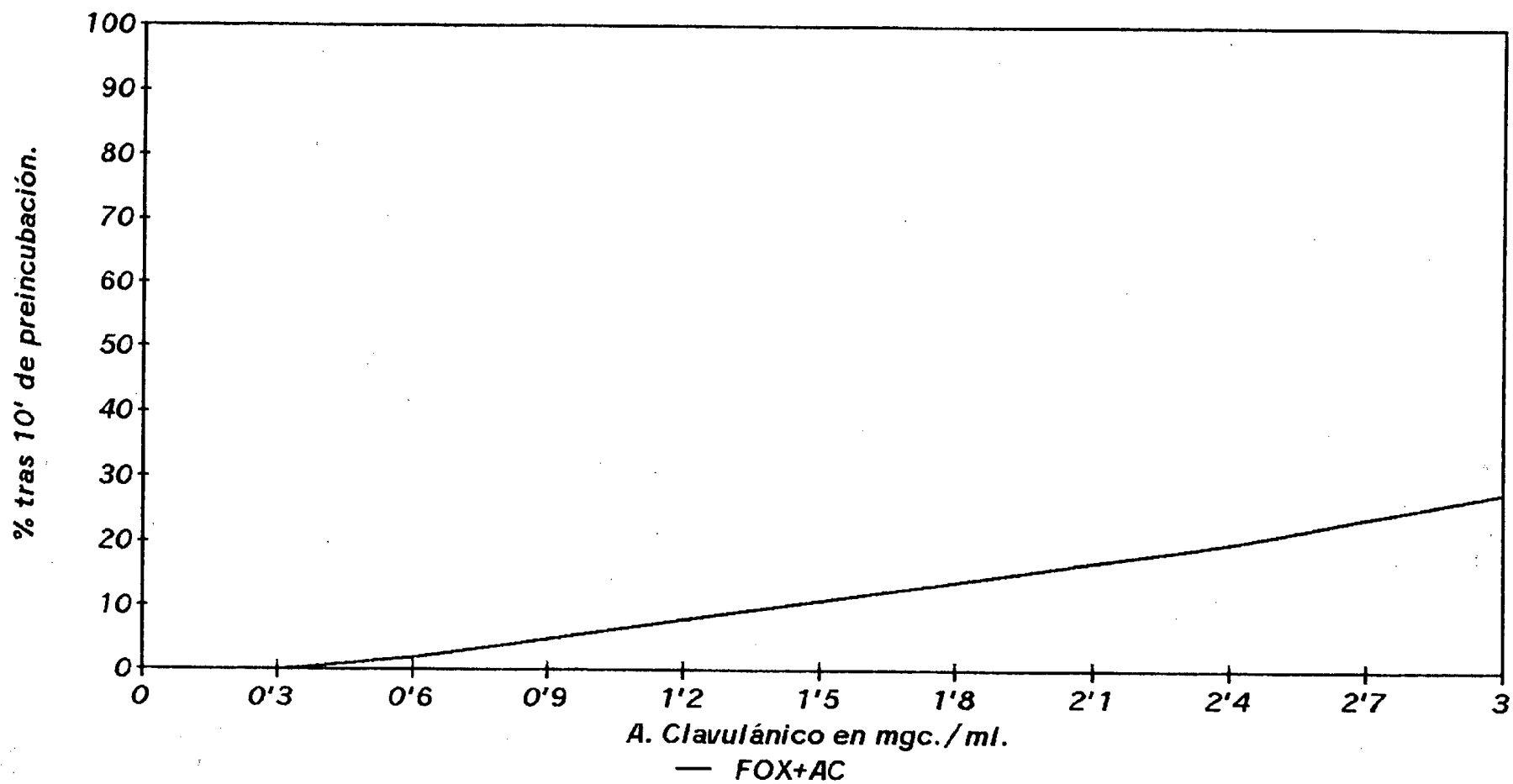


GRAFICO 81. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

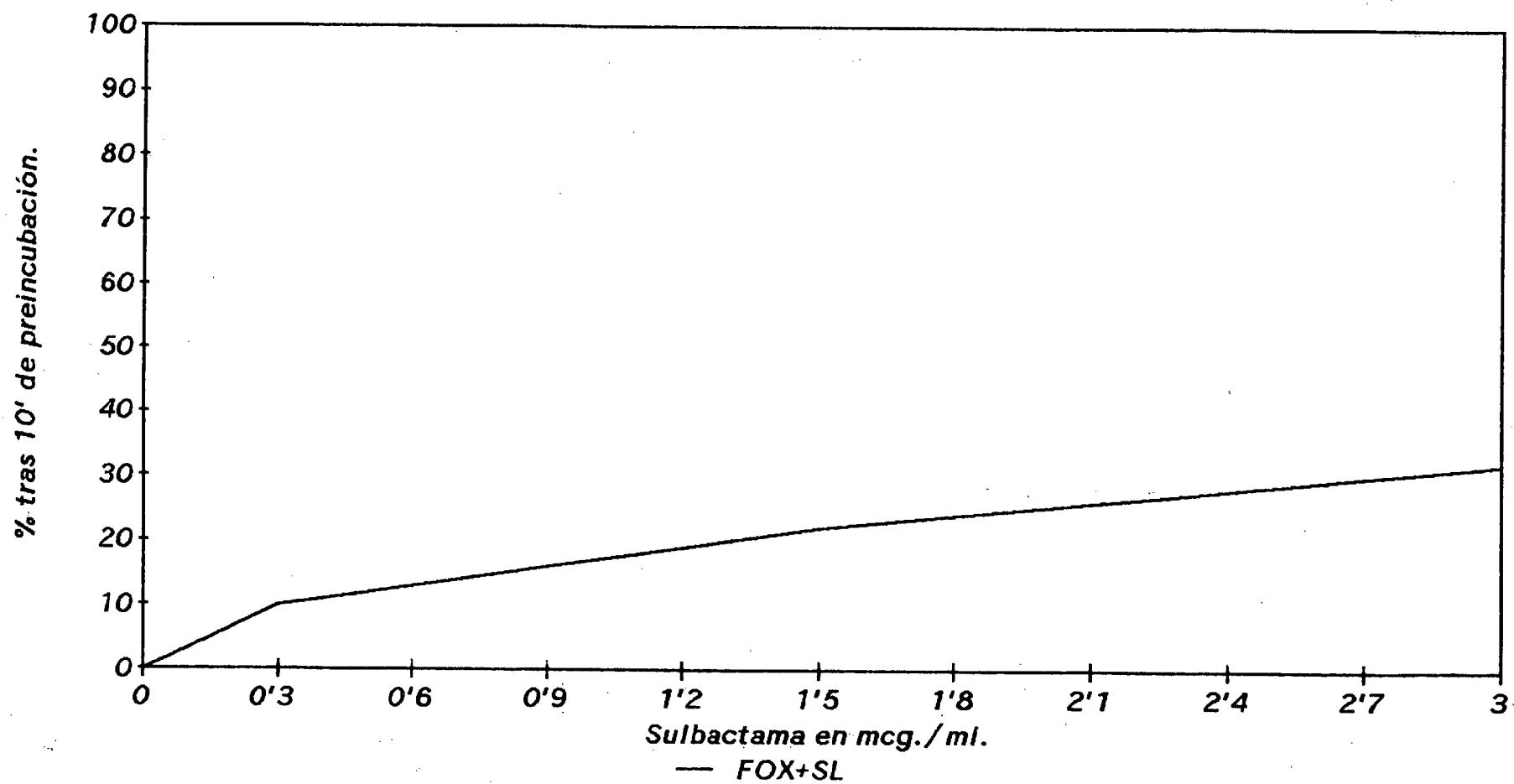


GRAFICO 82. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

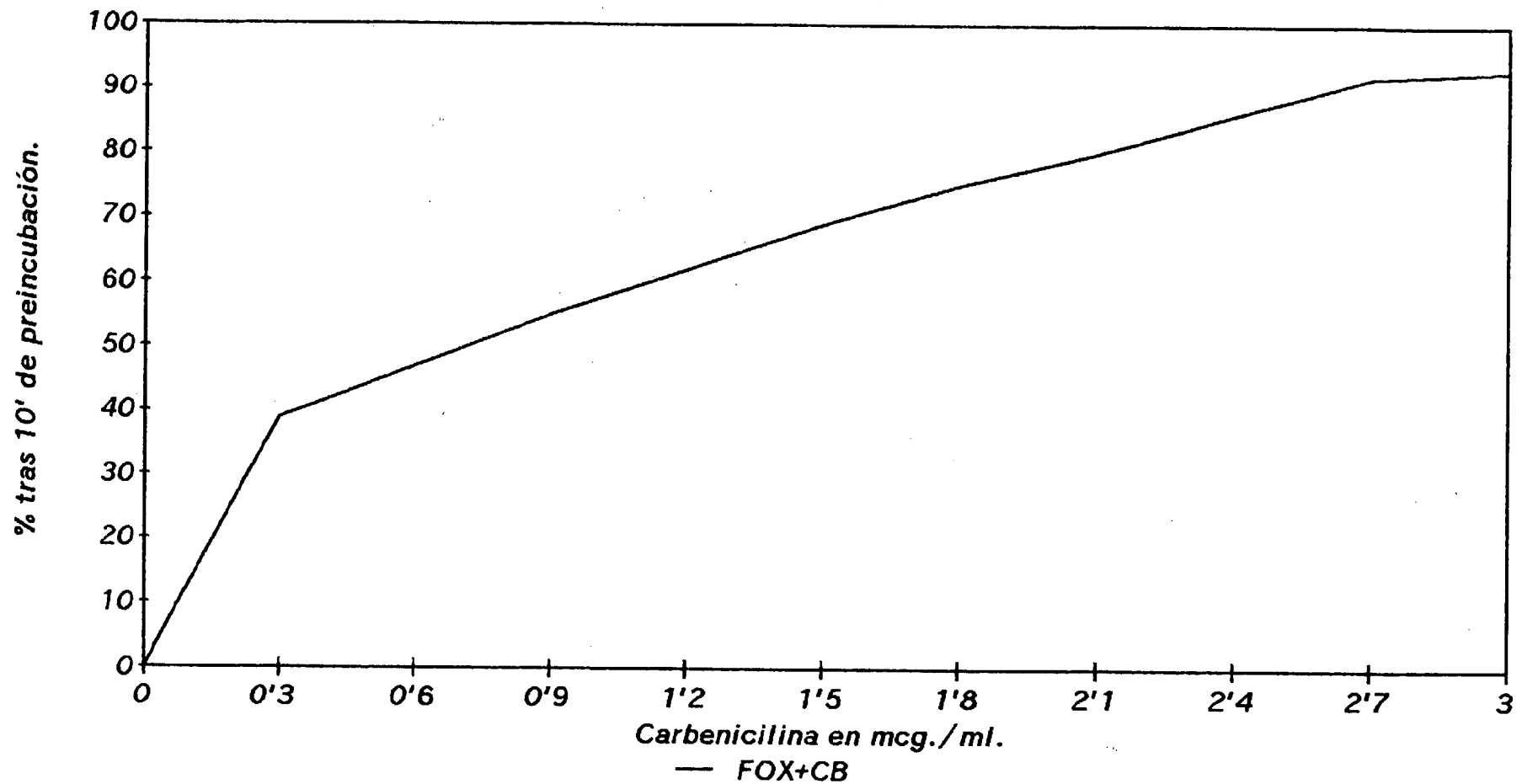


GRAFICO 83. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

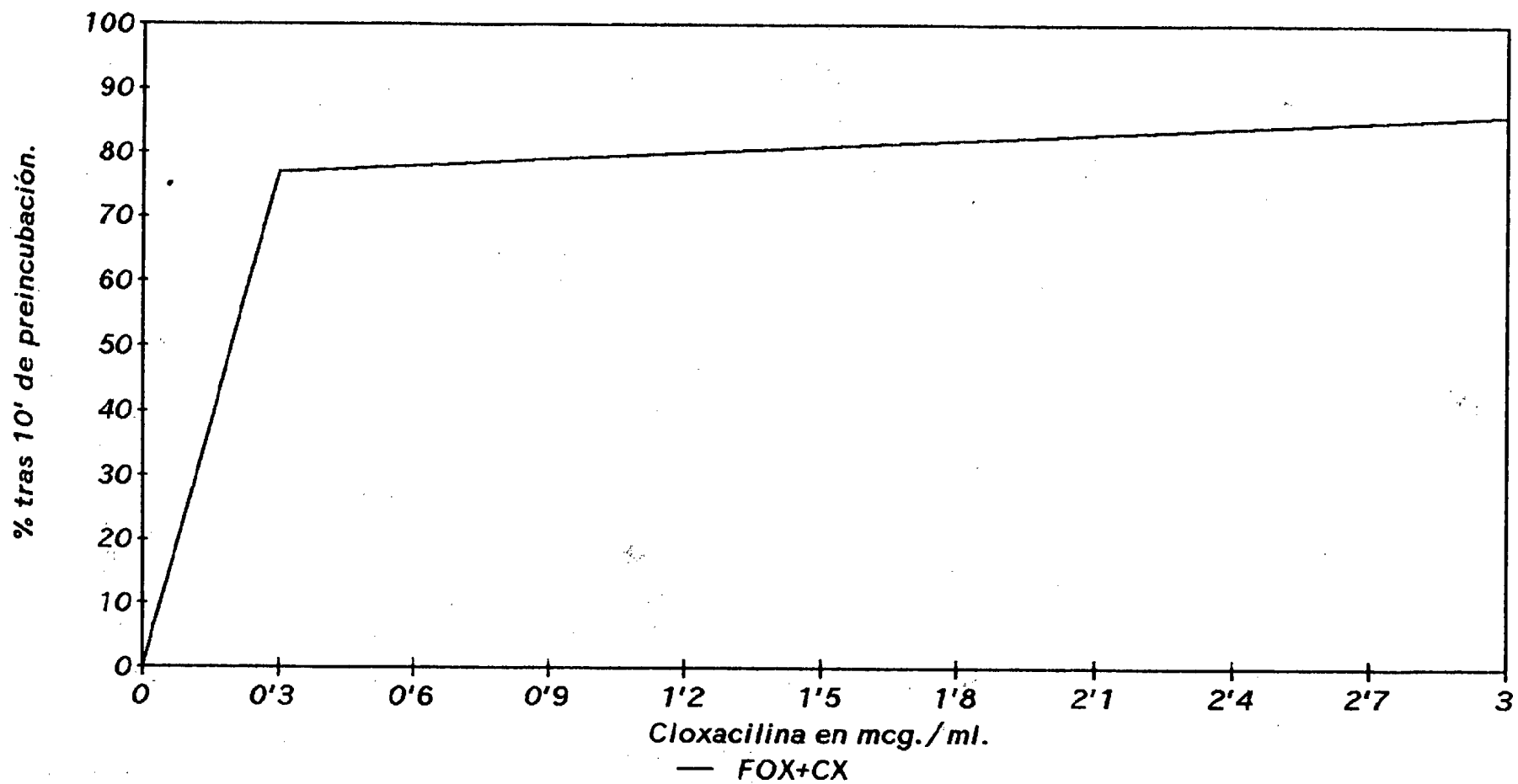


GRAFICO 84. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Morganella morganii* 3A.

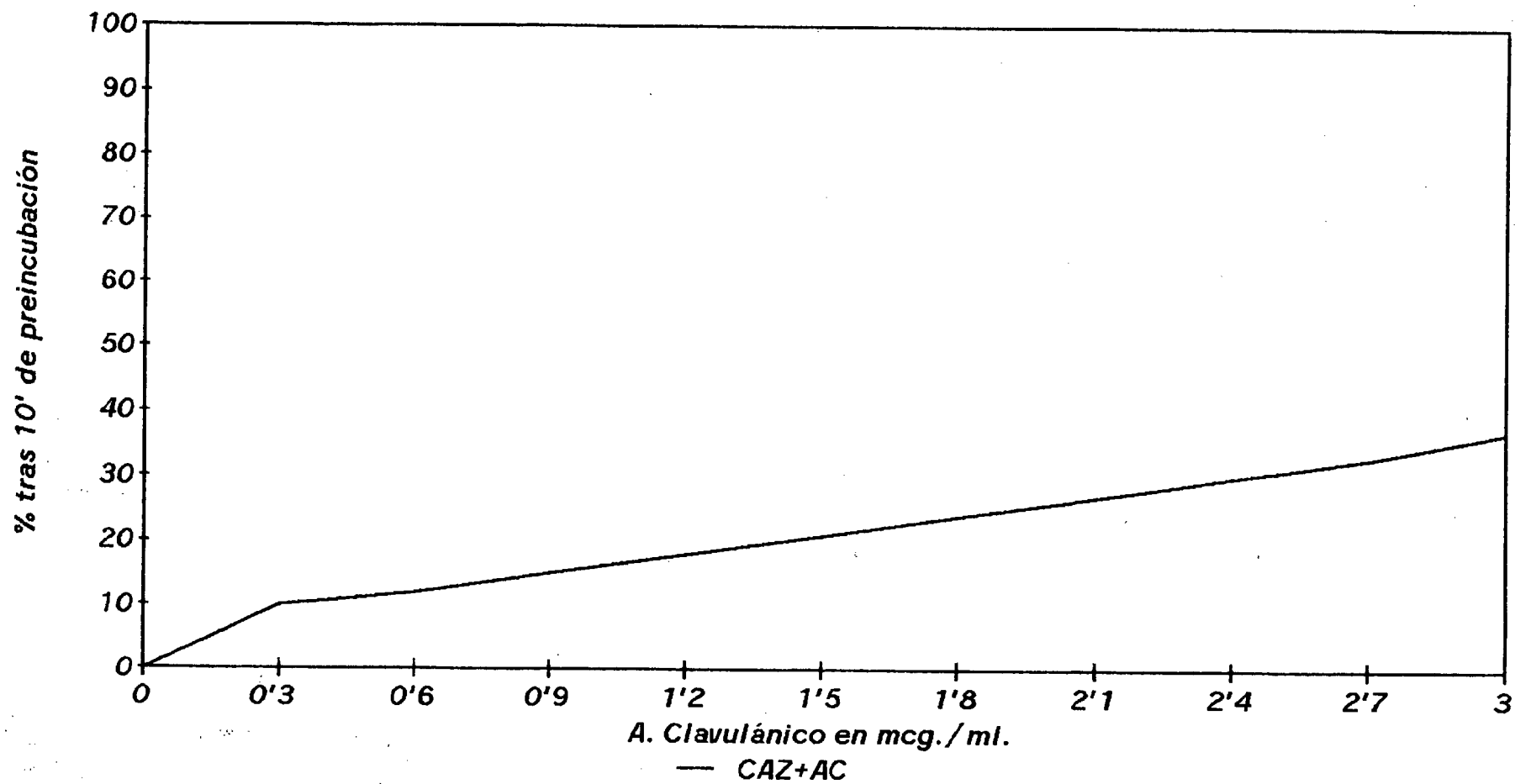


GRAFICO 85. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

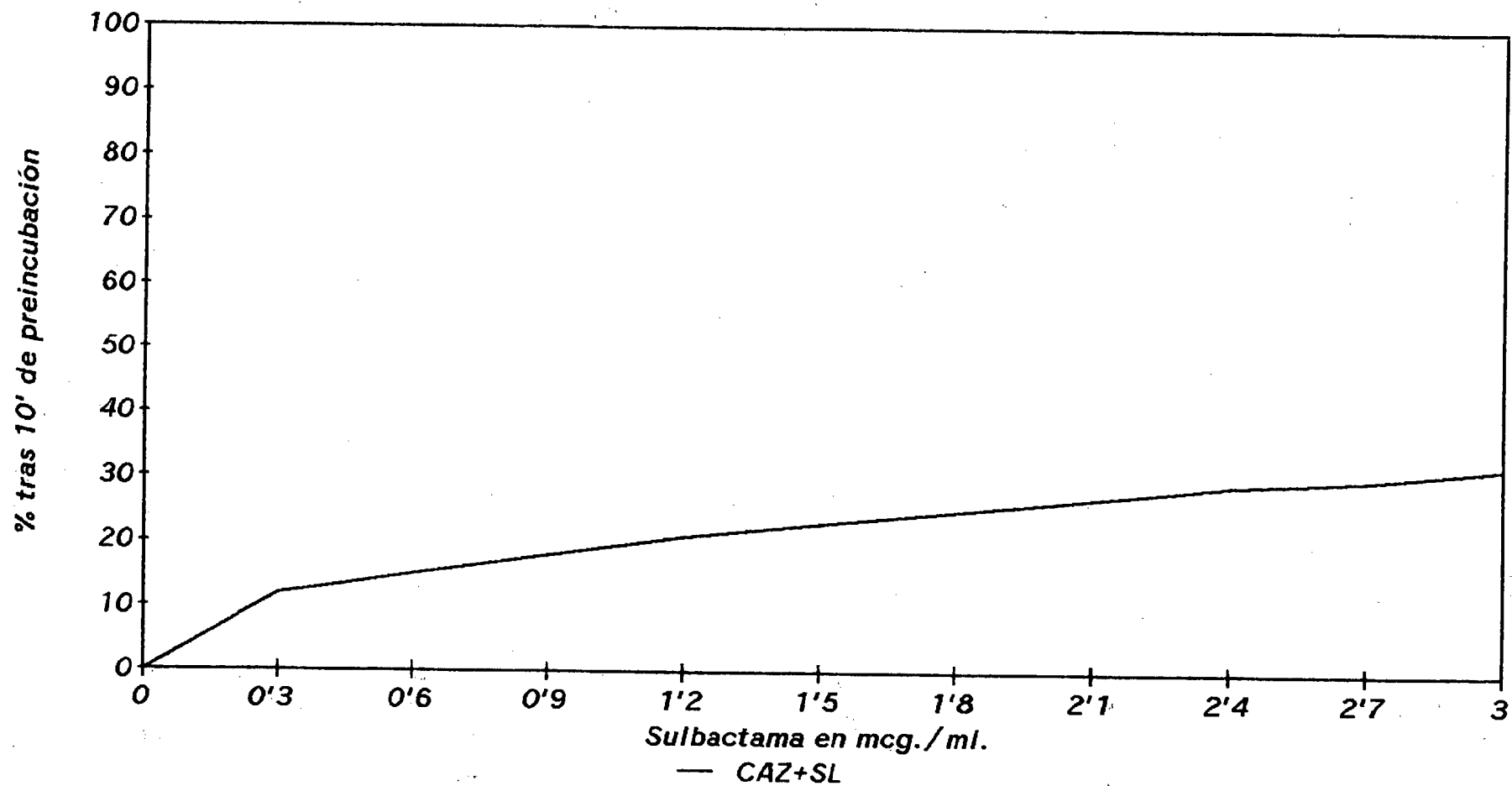


GRAFICO 86. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

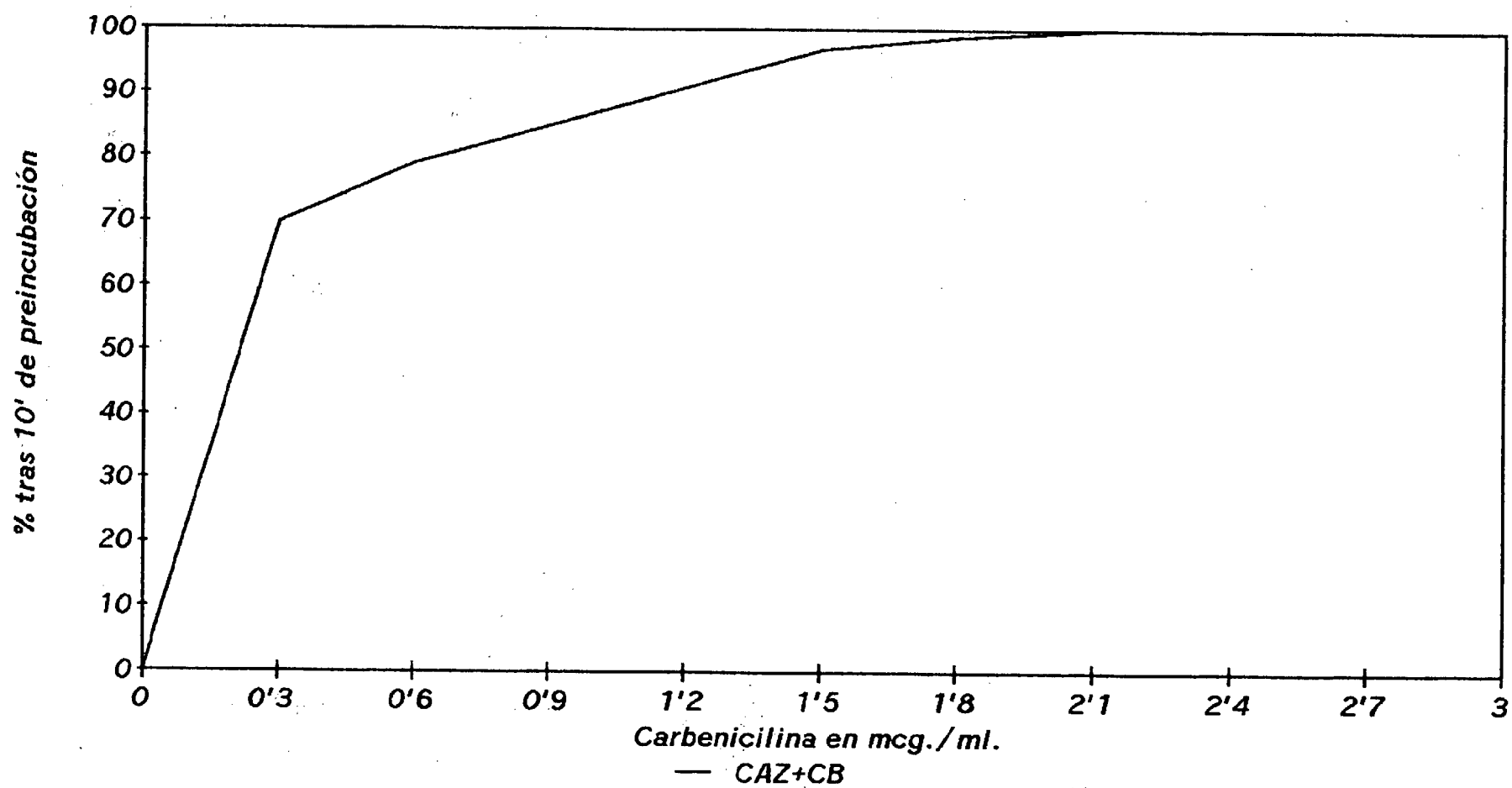


GRAFICO 87. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

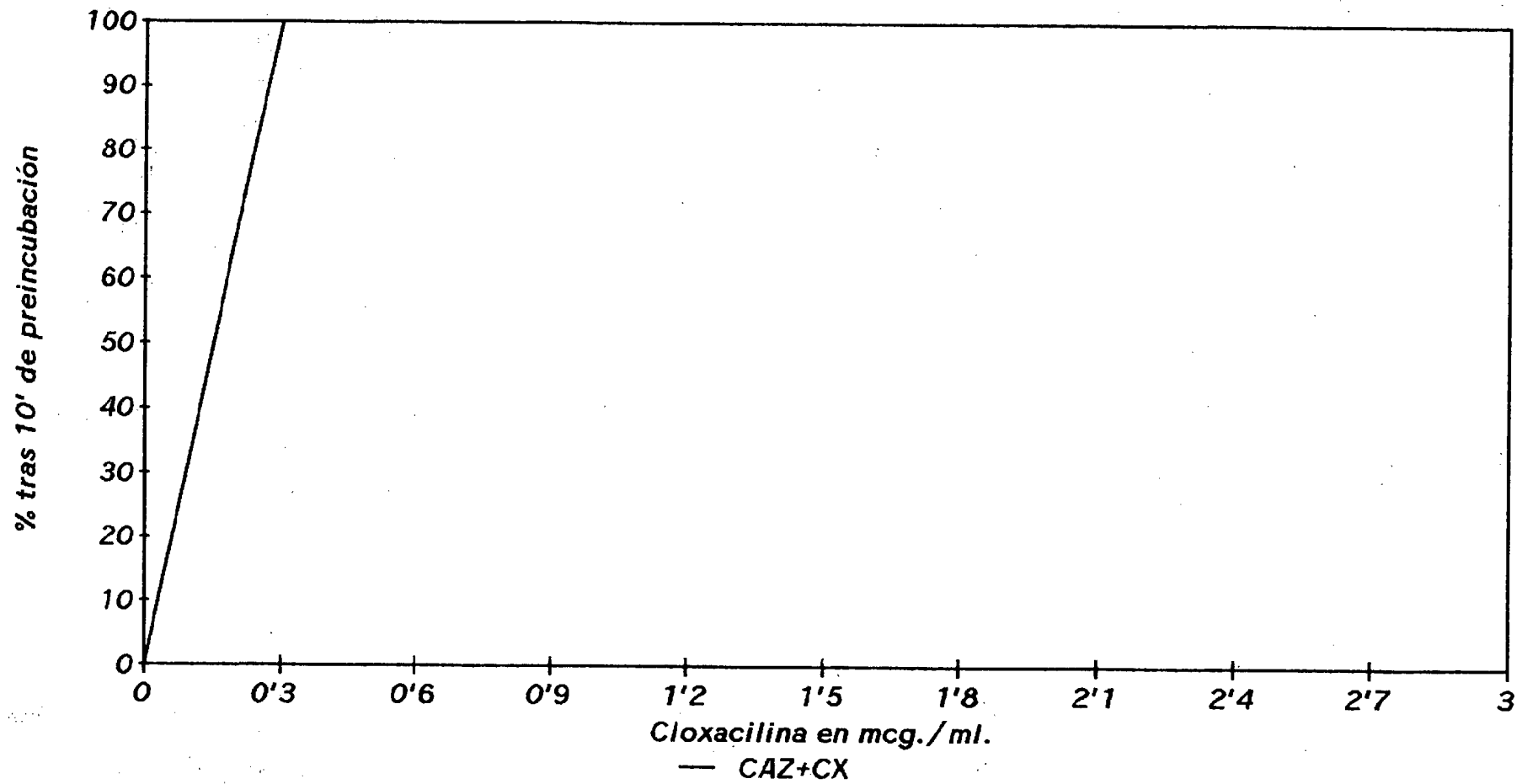


GRAFICO 88. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

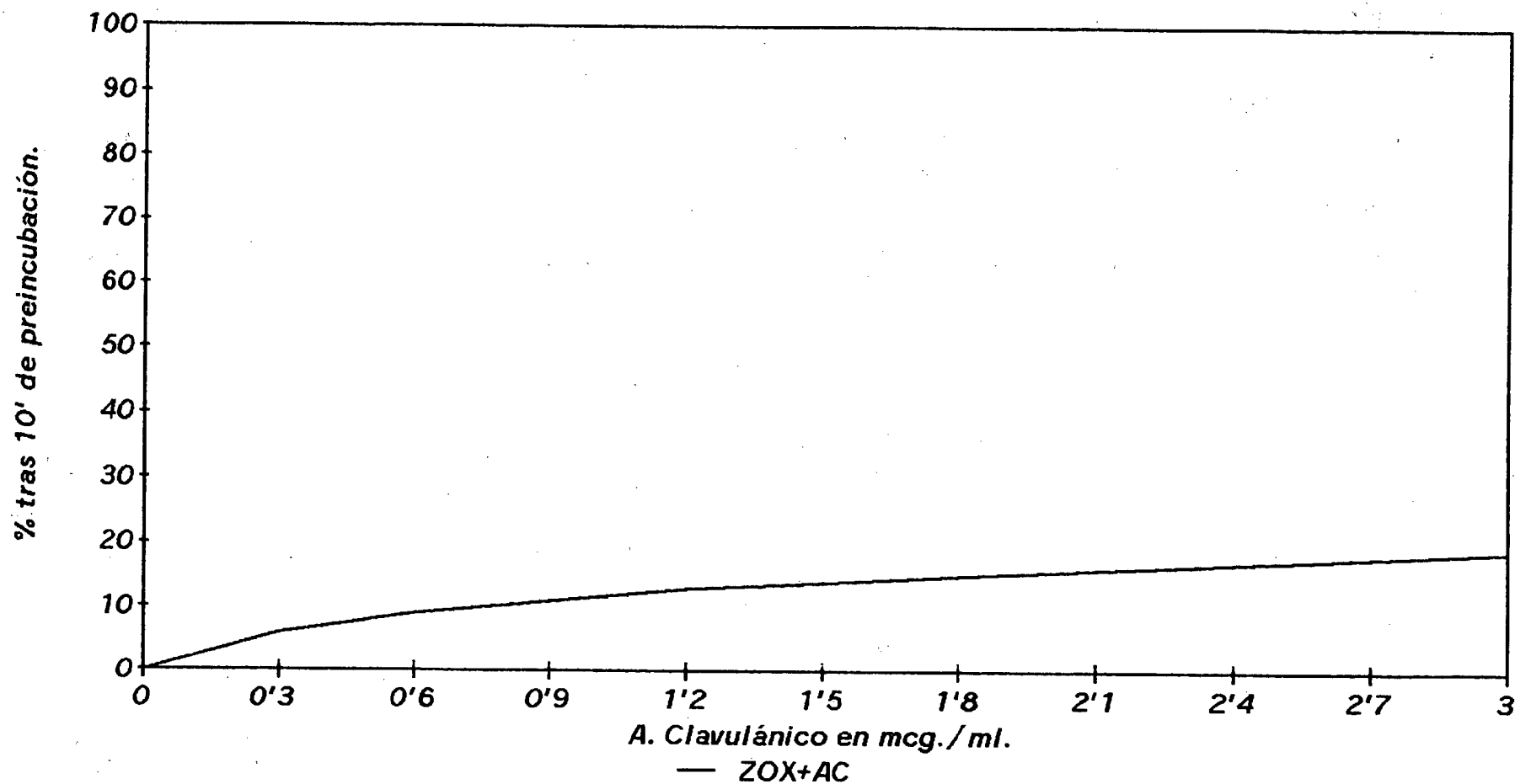


GRAFICO 89. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Morganella morganii* 3A.

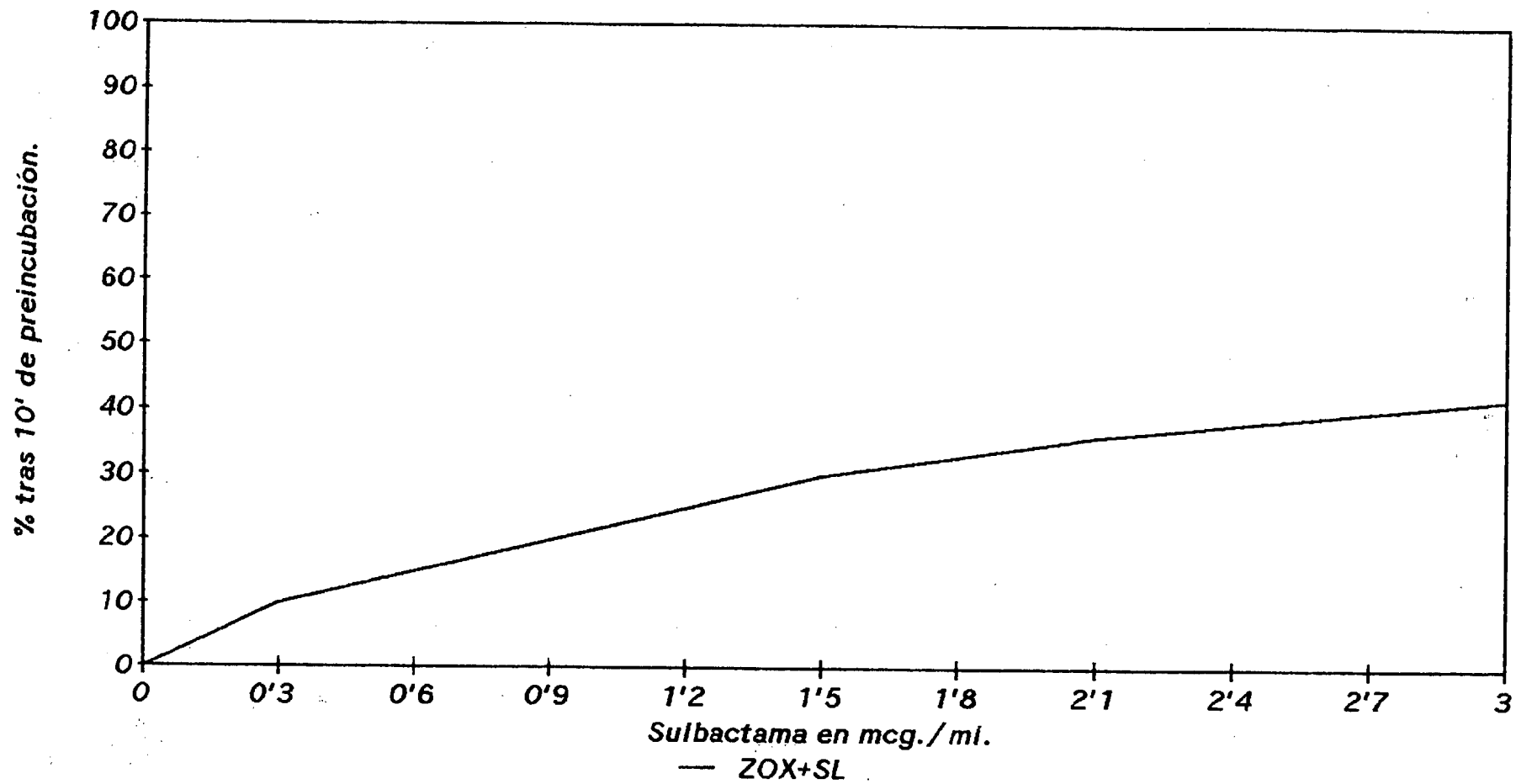


GRAFICO 90. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

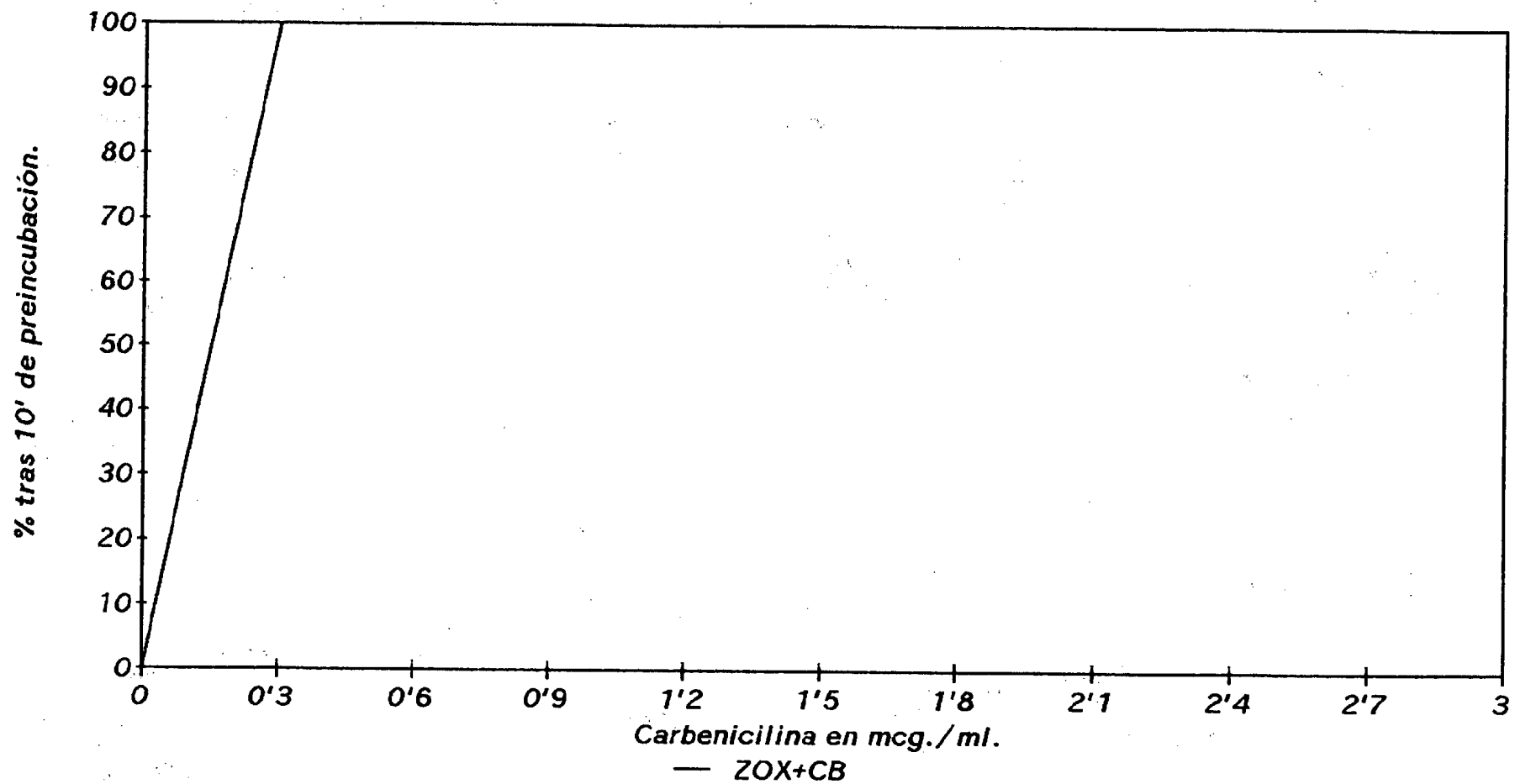


GRAFICO 91. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

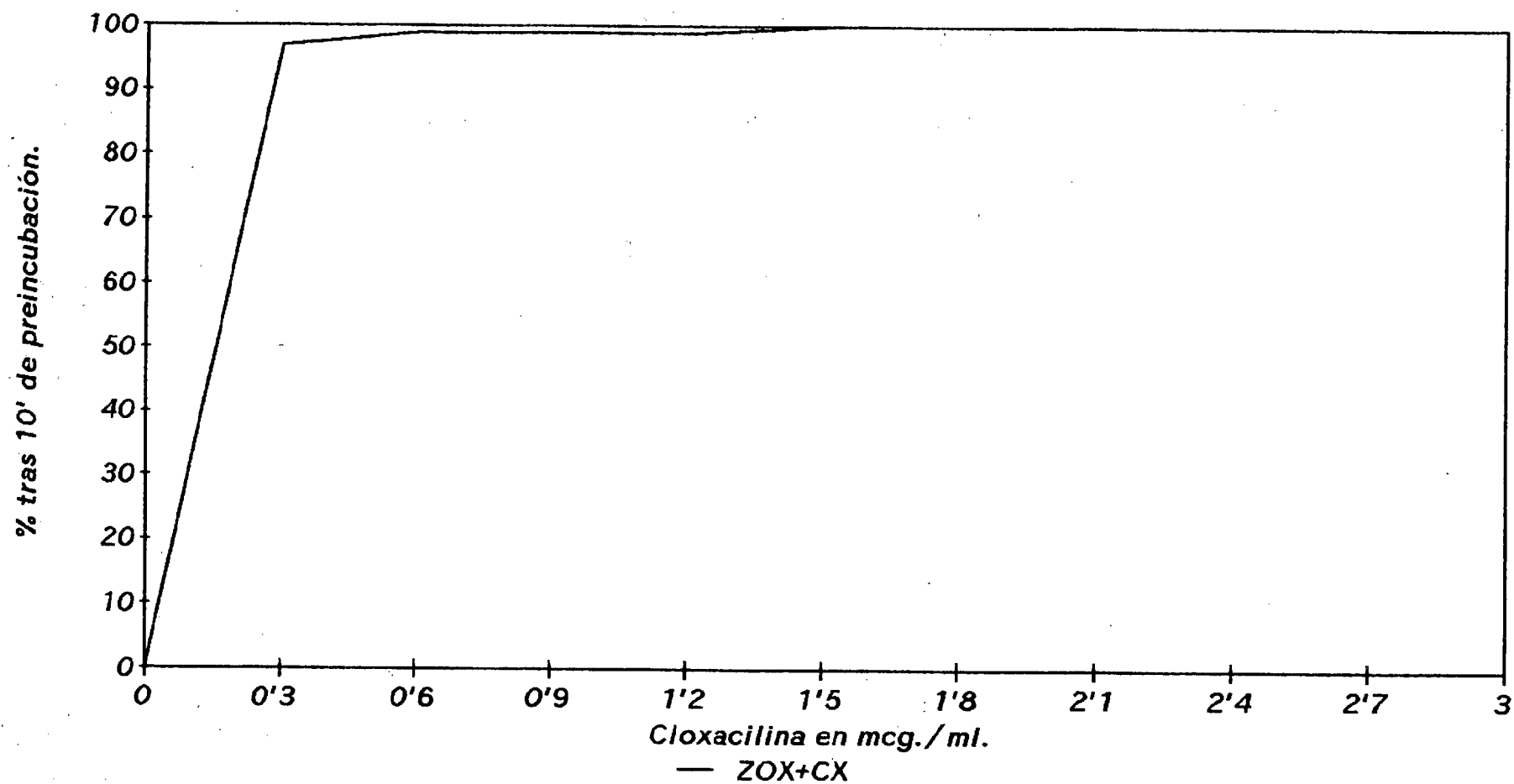


GRAFICO 92. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Morganella morganii* 3A.

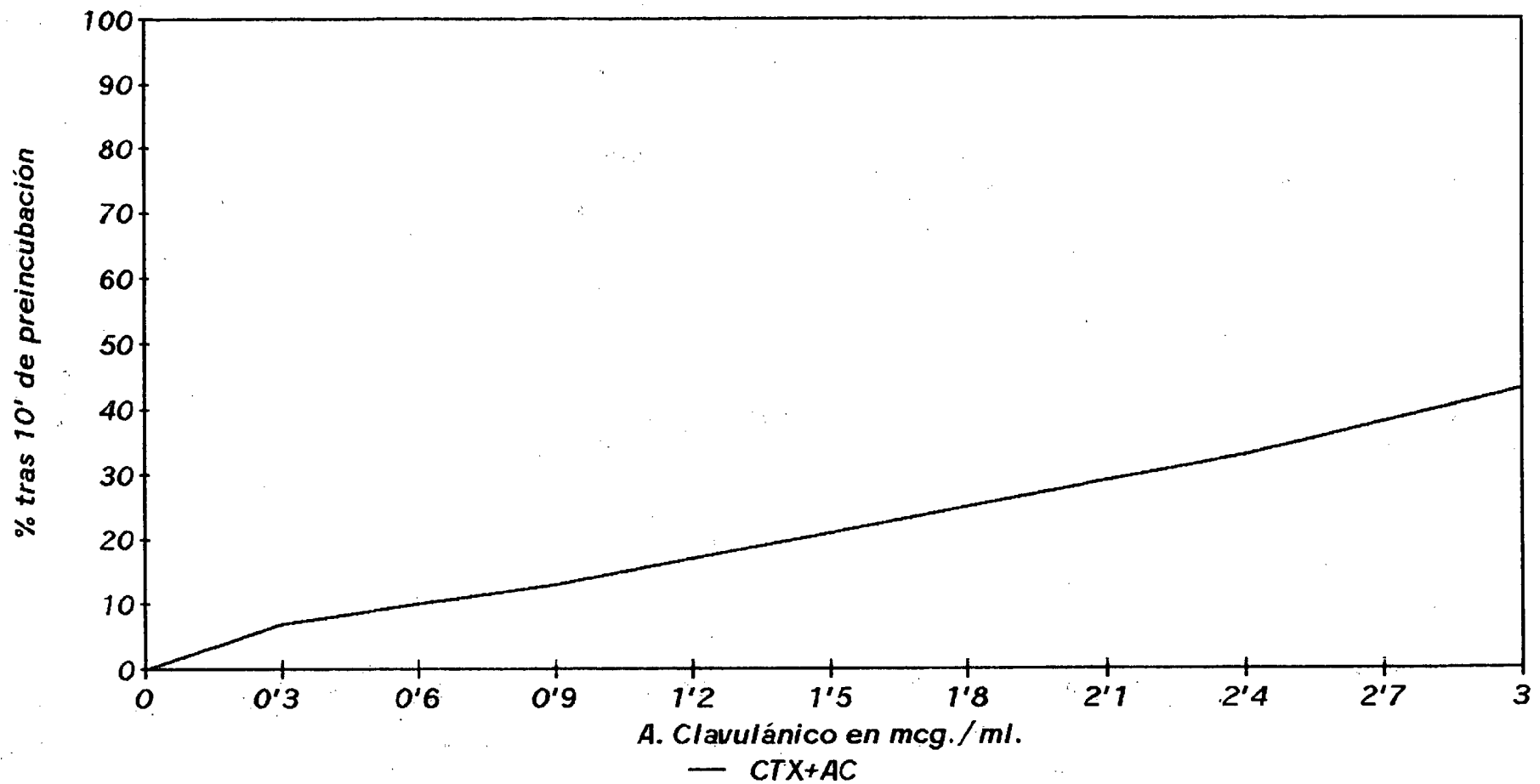


GRAFICO 93. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Morganella morganii* 3A.

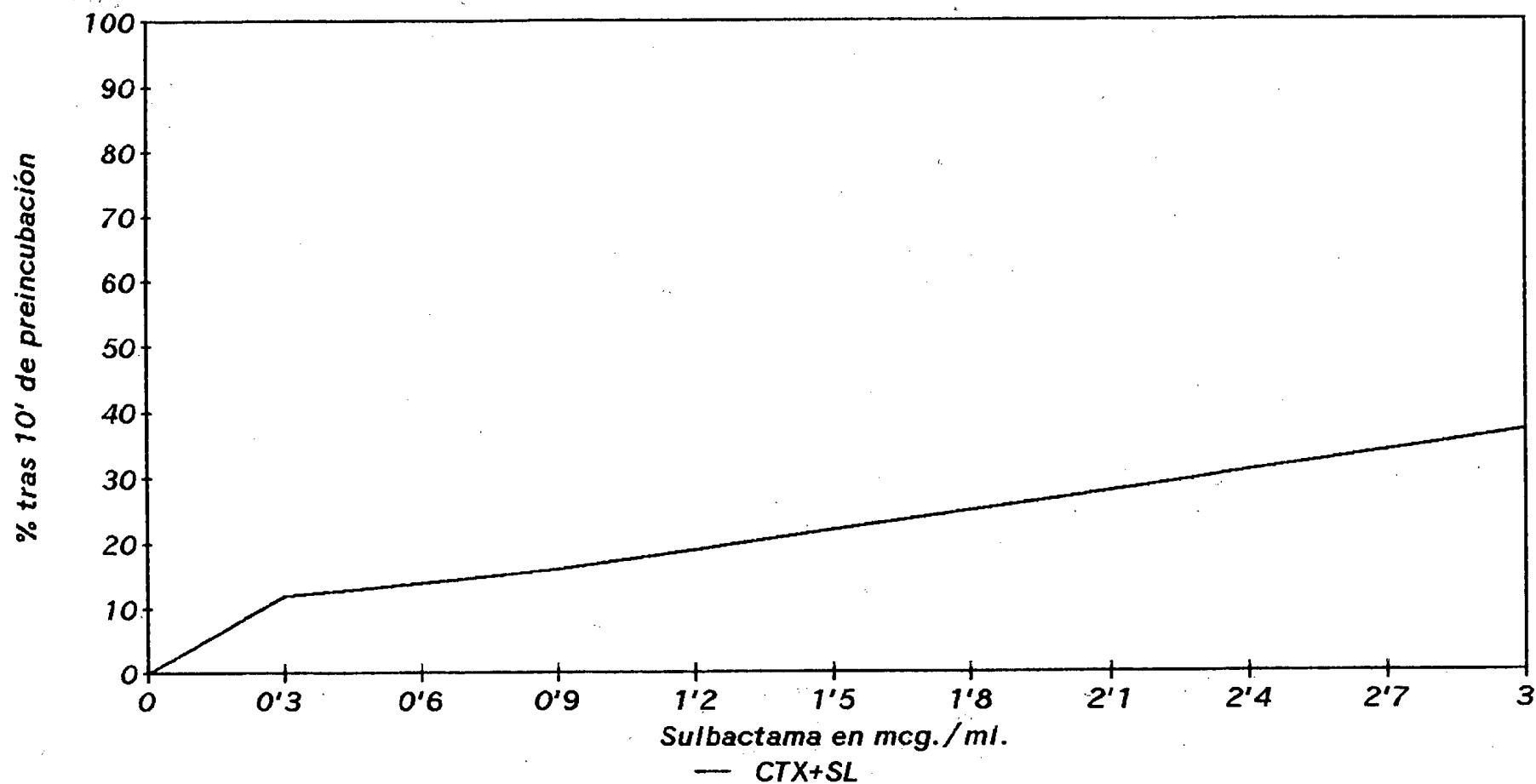


GRAFICO 94. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

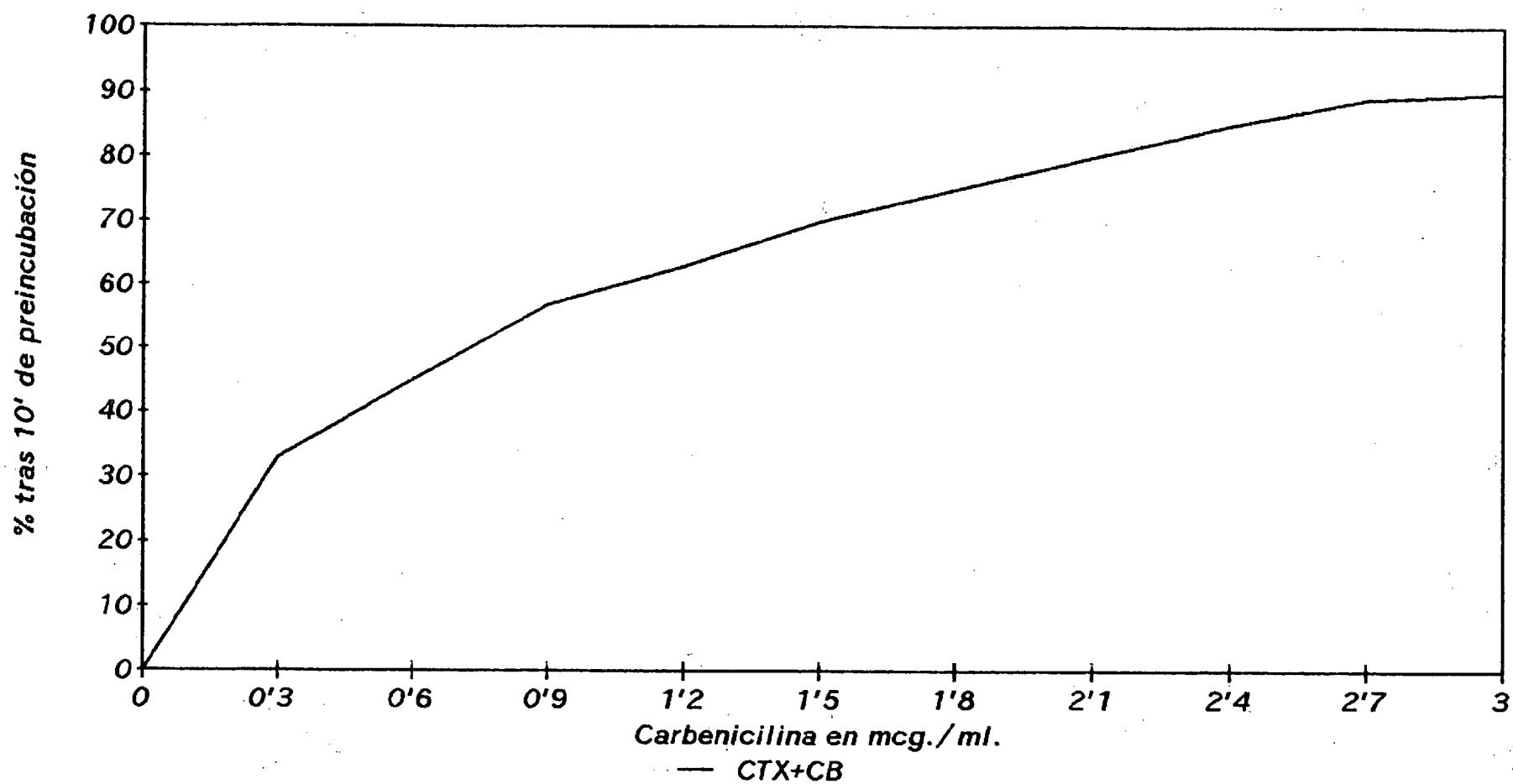


GRAFICO 95. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Morganella morganii* 3A.

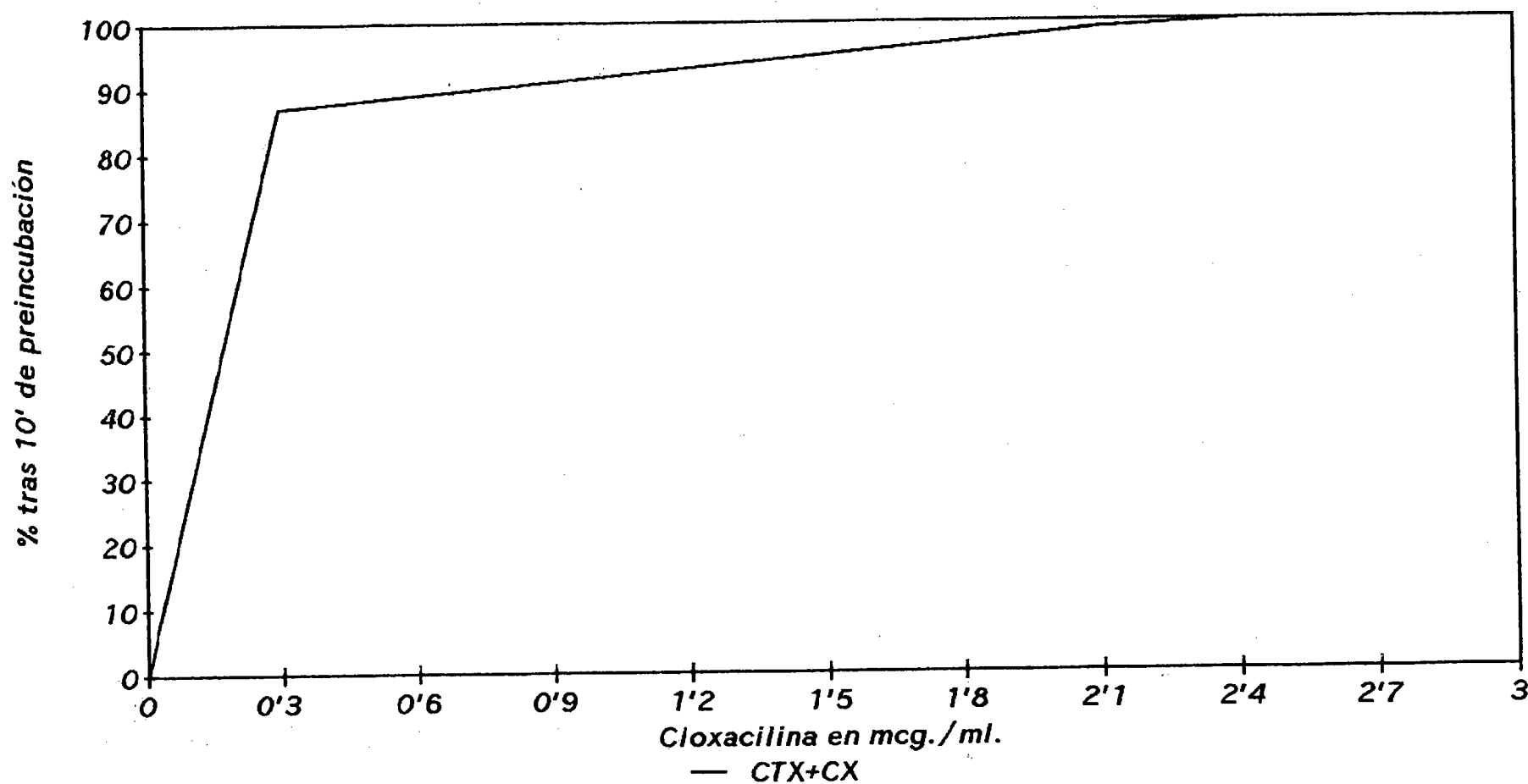


GRAFICO 96. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

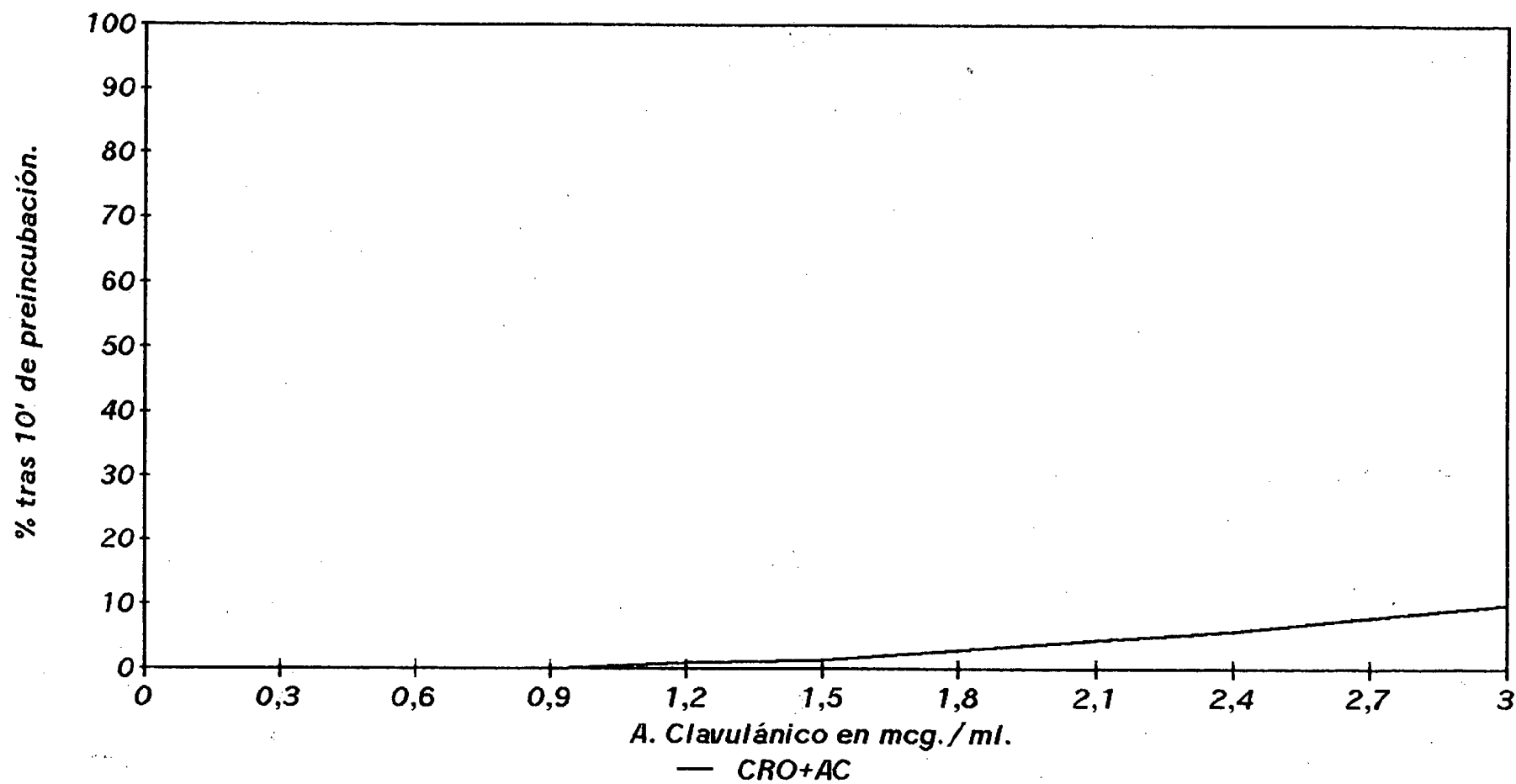


GRAFICO 97. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Morganella morganii* 3A.

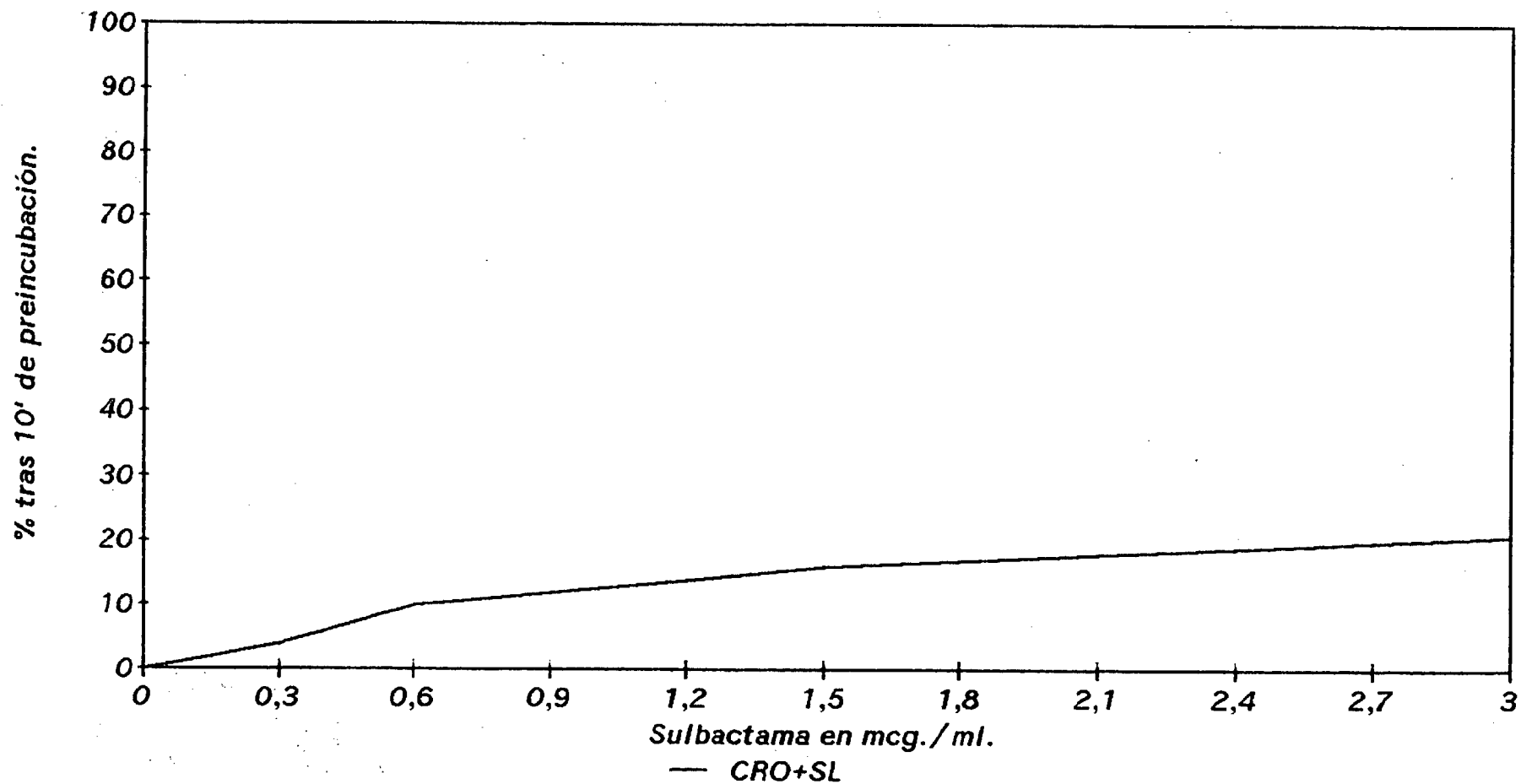


GRAFICO 98. PORCENTAJES DE INHIBICION
*En la cepa *Morganella morganii* 3A.*

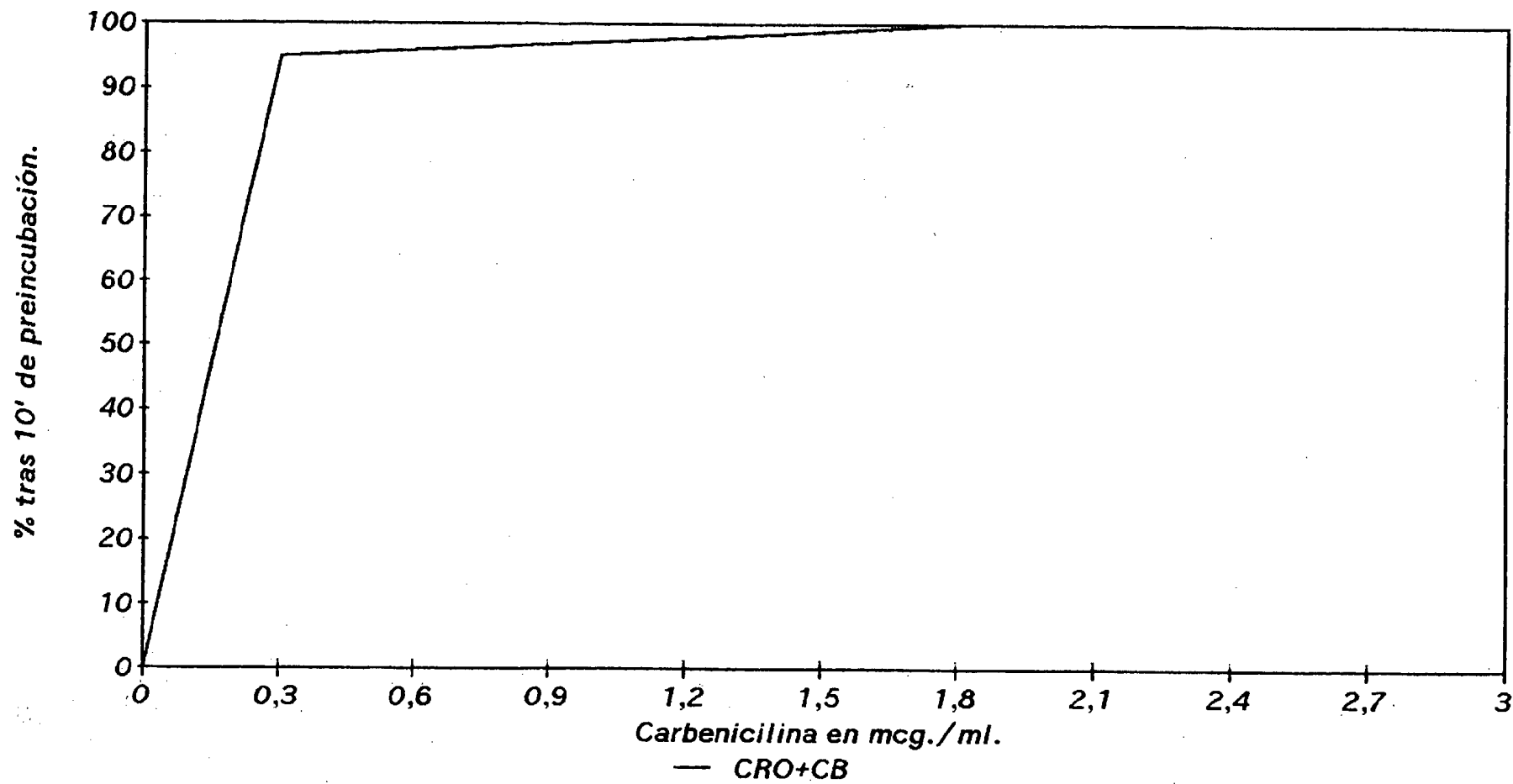
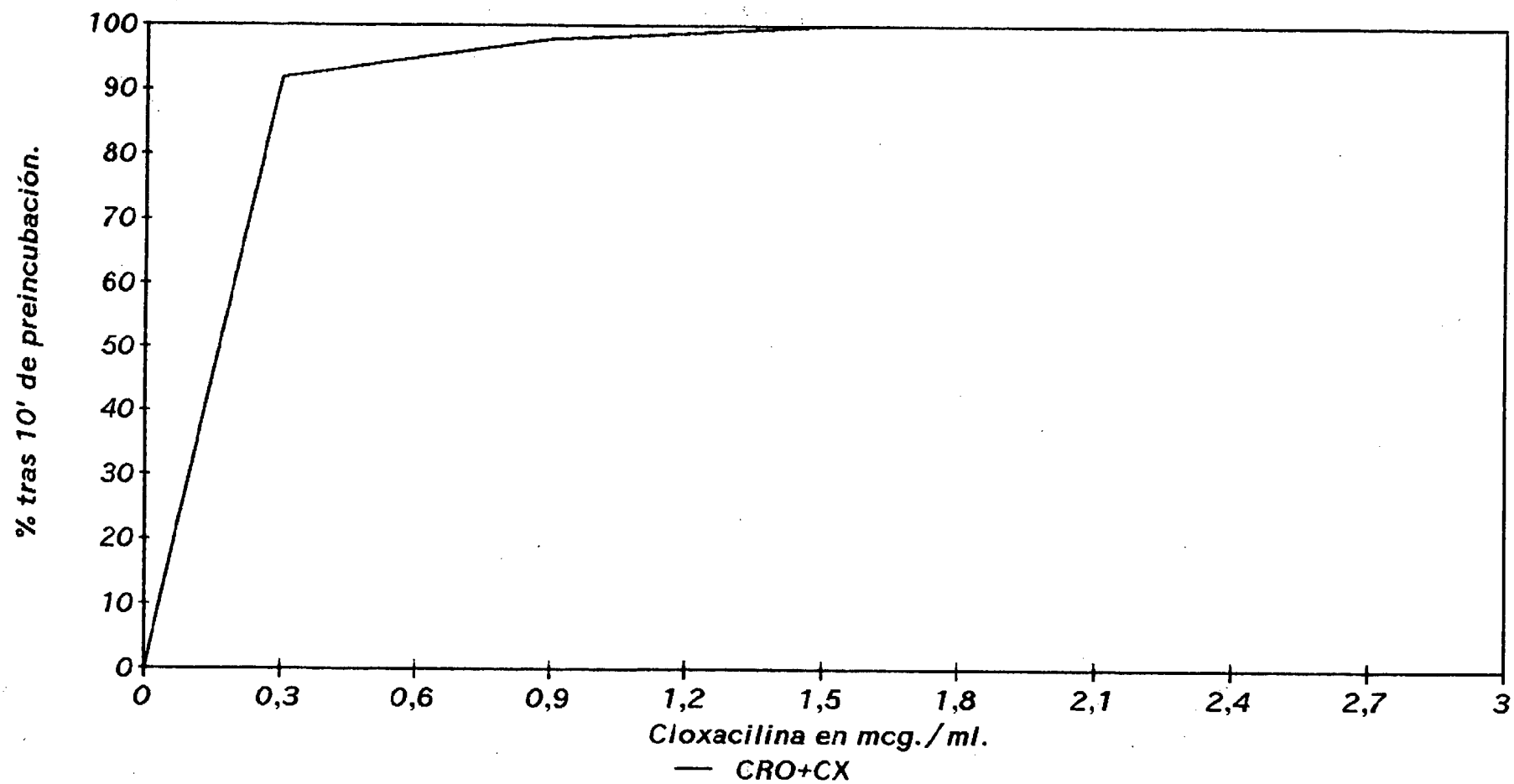


GRAFICO 99. PORCENTAJES DE INHIBICION
En la cepa *Morganella morganii* 3A.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1- Se han conseguido aislar de muestras hospitalarias, cepas resistentes a cefalosporinas de amplio espectro por cefalosporinasas en los géneros *Citrobacter* y *Morganella*, que presentan una síntesis constitutiva de ellas. En el género *Escherichia* se ha aislado una cepa con multirresistencia a cefalosporinas de amplio espectro y penicilinas, productora de cefalosporinasas.

2- Aislamos cepas productoras de cefalosporinasas a bajo nivel e inducibles in vitro como lo son *Citrobacter freundii* 1B y *Morganella morganii* 3B.

3- En *E. coli* 2B la resistencia a las cefalosporinas no fue inducible y presentó una penicilinasa tipo TEM como causante de su resistencia a Cefalotina, Ampicilina y otras Penicilinas. Codificada plasmidicamente y cotransferida (en el proceso de Conjugación y en el de Transformación) con la resistencia a la Tobramicina, Cloramfenicol, Estreptomycin y Netilmicina.

4- En el proceso de curación fue más efectiva la Naranja de Acrídina, tal que tras la curación con ella la cepa *E. coli* 2B perdió las mismas resistencias que transfirió. No obteniéndose curación con el Bromuro de etidio.

5- Es posible la aparición in vivo a nivel hospitalario de cepas de enterobacterias patógenas oportunistas que

10- Existe una estrecha relación genética entre inducción y desrepresión puesto que fue posible seleccionar subpoblaciones mutantes desreprimidas in vitro en el seno de una población bacteriana productora de cefalosporinasas inducibles a bajo nivel, con sólo someterla al efecto de concentraciones subinhibitorias de inductores fuertes.

En concreto, a partir de *C. freundii* 1B se obtuvo con la exposición a Cefoxitina la selección de una subpoblación mutante desreprimida. Igualmente ésto podría ocurrir in vivo. No se pudieron seleccionar mutantes desreprimidos con Imipenem.

11- En el mutante de la especie *Citrobacter freundii* 1B', obtenido in vitro, el papel más importante en la resistencia lo tuvieron las cefalosporinasas, al igual que en la cepa 1A de origen hospitalario.

12- Los p.I. nos mostraron el carácter básico de las Cefalosporinasas. La mutación no supuso una alteración en las características moleculares del enzima respecto a su p.I., ya que la mutante obtenida in vitro presentó sólo una beta-lactamasa y con el mismo p.I. que la población inicial sensible.

13- En la valoración del p.I. fueron igual de efectivos el Isoelectroenfoque en Gel de Poliacrilamida por el método de Vecoli y cols. (1983) como el Isoelectroenfoque por Phastsystem, aunque el rendimiento de éste último fue mayor.

14- Respecto al origen, la penicilinasas estudiada en *E. coli* 2B por los resultados de la conjugación y curación y el perfil plasmídico, está codificada en un plásmido de 52 Megadaltons.

presenten resistencia de origen cromosómico a cefalosporinas de 3a generación. La causa de este fenómeno generalmente se encuentra en el frecuente uso hospitalario de estas cefalosporinas.

6- Por su parte, las cepas mutantes desreprimidas aisladas, *C. freundii* 1A y *M. morgani* 3A, así como las que presentaron resistencias inducibles a las cefalosporinas, se mostraron muy sensibles a los Aminoglucósidos, Cloramfenicol y Sulfonamidas, y también a las nuevas quinolonas (Fleroxacina y Ciprofloxacina). Ello podría tener su utilidad desde un punto de vista terapéutico.

7- Frente a los antibióticos que actúan como inductores fuertes, las cepas mutantes desreprimidas fueron resistentes a la Cefoxitina, pero muy sensibles al Imipenem, a pesar de que frente a las cepas con cefalosporinasas inducibles el Imipenem se comportó como un inductor más eficaz que la Cefoxitina.

8- Constatamos además, que la alta resistencia a Cefoxitina en las cepas *C. freundii* 1B y *M. morgani* 3B se correspondió con una respuesta notable a los inductores en lo que a la variación de sus valores de CMI frente a Cefalosporinas se refiere.

9- En las cepas productoras de cefalosporinasas fue característica constante su resistencia a la Ampicilina y a la asociación Amoxicilina/Ácido Clavulánico. No así en la única cepa estudiada productora de penicilinasas.

Mientras que en las otras cepas cuyas resistencias a cefalosporinas fueron cromosómicas, y cuando presentaban plásmidos éstos eran de peso molecular inferior a 50 Mg.

15- En el aislamiento de plásmidos fueron igual de efectivos el procedimiento de Boirnboim y Doly y el de Kado y Liu. Aunque el rendimiento fue algo superior en este último.

16- Frente a cefalosporinasas Aztreonam y Cloxacilina fueron los antibióticos de mayor efecto inhibidor.

17- En la caracterización de las beta-lactamasas fue útil como diferenciador de las cefalosporinasas el ensayo del ATM como inhibidor. Hasta el momento se han usado para ello A.C. y CX. fundamentalmente.

18- Es infrecuente encontrar aislamientos multirresistentes a cefalosporinas de amplio espectro en *E. coli*, fenómeno muy poco descrito en la bibliografía. En esta especie no es inducible la presencia de cefalosporinasas. En nuestro caso el resto de los aislamientos de *E. coli* fueron sensibles a las cefalosporinas de 2ª y 3ª generación.

19- A pesar de esa escasa frecuencia, se ha aislado una cepa de *E. coli* multirresistente en la que sólo se identificaron cefalosporinasas (*E. coli* 2A), y en la que la disminución de la permeabilidad y el fenómeno de trapping producido por el exceso de enzima, así como por la afinidad de éstas por las cefalosporinas, constituyen parte secundaria en la causa de esta multirresistencia.

20- Respecto al mutante desreprimido de *Citrobacter freundii* de procedencia hospitalaria, las beta-lactamasas comparten su papel en la causa de sus resistencias con la disminución de la permeabilidad de la membrana externa, aunque el papel preponderante lo tengan las cefalosporinasas.

21- La resistencia en *E. coli* a cefalosporinas de amplio espectro de forma espontánea puede ocurrir a nivel hospitalario y tener su origen fundamentalmente en las cefalosporinasas.

22- En esta cepa multirresistente a cefalosporinas de amplio espectro, *E. coli* 2A, también fue muy sensible a aminoglucósidos y a las nuevas quinolonas (CPX y FRX). Lo que tiene su valor terapéutico.

23- El resto de las cepas aisladas en los géneros *Citrobacter* y *Morganella* fueron sensibles a las cefalosporinas de 3ª generación, con valores de CMI 90 inferiores a 2 y 1 µgr./ml.

BIBLIOGRAFIA

76. KORKFMANN G., SANDERS C.C. (1989). ampG is essential for high-level expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1946-1951.
77. KRON M.A., SHLAES D.M., CURRIE-MC.CUMBER C., MEDEIROS A.A. (1987). Molecular epidemiology of OHIO-1 beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 2007-2009.
78. KRON M., SHLAES D.M., MEDEIROS A., KRON M.A., CURRIE-MC.CUMBER C., PAPA E., VARTIAN C. (1986). Novel plasmid-mediated beta-lactamase in members of the family *Enterobacteriaceae* from Ohio. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 220-224.
79. KROPP H., GERCKENS L., SUNDELOF J., KAHAR F. (1985). Antibacterial activity of Imipenem : the first thienamycin antibiotic. *Rev. Infect. Dis.* 7 (suppl.3): 5389-5410.
80. KUCK N.A., JACOBUS N.V., PETERSEN P.J., WEISS W.J., TESTA R.T. (1989). Comparative in vitro and in vivo activities of Piperacillin combined with the beta-lactamase inhibitors Tazobactam, Clavulanic Acid and Sulbactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1964-1969.
81. LABIA R. (1989). Constitutive and Inducible Beta-lactamases. *Medicine et Maladies Infectieuses* 19 (Febrero): 9-12.

82. LABIA R., MORAND A., GIRONIE M. (1986). Stability of Imipenem to beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 (suppl. E): 1-8.
83. LI J.-T., MOOSDEEN F., WILLIAMS J.D. (1982). The effect of inhibitors of beta-lactamase extracts and on intact cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 9: 287-296.
84. LINDBERG F., LINDQUIST S., NORMARK S. (1988). Genetic Basis of induction and overproduction of chromosomal Class I beta-lactamase in nonfastidious Gram-negative bacilli. *Rev. Infect. Dis.* 10: 782-785.
85. LINDBERG F., NORMARK S. (1986). Contribution of chromosomal beta-lactamases to beta-lactam resistance in enterobacteria. *Rev. Infect. Dis.* 8 (suppl. 3): 292-304.
86. LINDBERG F., NORMARK S. (1987). Common mechanism of ampC Beta-lactamase induction in enterobacteria: Regulation of the cloned *Enterobacter cloacae* P99. *J. Bacteriol.* 169: 758-769.
87. LIVERMORE D.M. (1985). Do beta-lactamases "trap" cephalosporins?. *J. Antimicrob. Chemother.* 15: 511-514.

88. LIVERMORE D.M. (1988). Permeation of beta-lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 10: 691-698.

89. LIVERMORE D.M. (1988). Significado clínico de la inducción y de la desrepresión estable de las beta-lactamasas en los Bacilos Gram-negativos. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 3 (suppl.1): 611-619.

90. LIVERMORE D.M. (1989). Inducer activity of β -lactam antibiotics: Description and Consequencies, mechanisms of resistance in *Ps. aeruginosa*. *Medicine et Maladies Infecteuses*. 19 (Febrero): 44-50.

91. LIVERMORE D. M., JONES C.S. (1986). Characterization of NPS-1, a novel plasmid-mediated beta-lactamase from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 99-103.

92. MALOUIN F., BRYAN L.E. (1986). Modification of Penicillin-Binding Proteins as Mechanisms of Beta-lactam Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 1-5.

93. MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1982). Analysis of recombinant DNA probes. En: *Molecular Clonig: A Laboratory Manual*. Maniatis T. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory (Nueva York). pp.: 363-401.

94. MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1982). Gel Electrophoresis. En: Molecular Clonig: A Laboratory Manual. Maniatis T. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory (Nueva York). pp.: 150-172.

95. MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1982). Introduction of plasmid and *Bacterophago Lambda* DNA into *Escherichia coli*. Maniatis T. (eds.). Molecular Cloning. A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory (Nueva York). pp.: 247-268.

96. MARCHOU B., BELLIDO F., CHARNAS R., LUCAIN C., PECHERE J. (1987). Contribution of beta-lactamase hydrolysis and outer membrane permeability to Ceftriaxone resistance in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1589-1595.

97. MARRE R., ALEKSIC S. (1990). Beta-lactamase types and Beta-lactam resistance of *Escherichia coli* strain with chromosomally mediated Ampicillin resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1: 44-46.

98. MATTHEW M., HARRIS A.M., MARSHALL M.J., ROSS G.W. (1975). The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J. Gen. Microbiol.* 88: 169-178.

99. MEDEIROS A. (1984). Beta-lactamases. *Br. Med. Bull.* 40: 18-27.

100. MEDEIROS A.A., HARE R., PAPA E., ADAM C., MILLER G.H. (1985). Gram-negative bacilli resistant to third-generation cephalosporins: beta-lactamase characterization and susceptibility to Sch 34343. *J. Antimicrob. Chemother.* 15 (suppl. C): 119-132.
101. MEDIAVILLA A. (1986). Antibióticos beta-lactámicos. En: Bases de la terapéutica, 15. Salvá P. (eds.). IDEPSA (Madrid). pp.: 419-427. (García de la Fuente A., Tratado de Medicina Interna; vol 1).
102. MEYERS J.A., SANCHEZ D., ELWELL L.P., FALKOW S. (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127: 1529-1537.
103. MISRA R., BENSON A. (1988). Isolation and Characterization of ompC porins mutants with altered pore properties. *J. Bacteriol.* 170: 528-533.
104. MOELLERING R. Jr., ELIOPOULUS G., SENTOCHNICK D. (1989). The carbapenems: New broad spectrum beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 24 (suppl.A): 1-7.
105. MORITZ V.A., CARSON P.B. (1986). Cefoxitin sensitivity as a marker for inducible beta-lactamases. *J. Med. Microbiol.* 21: 203-207.

106. MURAKAMI K., DOI M., YOSHIDA T. (1986). 7 α -formylamino substituent confers beta-lactamase-inactivating potency on 1-oxacefalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 447-452.
107. MURAYAMA S.Y., YAMAMOTO T., SUZUKI I., SAWAI T. (1986). Mutation of *Escherichia coli* capable of expressing gene(s) for beta-lactamase production of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 707-709.
108. MURRAY R. (1984). Kingdom *Procaryotae*. En: Bergey's Manual Systematic Bacteriology. Krieg R. (eds.). Williams & Wilkins (Baltimore). pp.: 35-36.
109. MURRAY P. (1985). In vitro selection of beta-lactam resistance by exposure to second, third, and fourth generation cephalosporins. *Chemotherapia* 4: 78-82.
110. NAKAGAWA S., SANADA M., MATSUDA K., HAZUMI N., TANAKA N. (1987). Biological activity of BO-1236, a new antipseudomonal cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1100-1105.
111. NEU H.C. (1985). Contribution of beta-lactamases to bacterial resistance and mechanisms to inhibit beta-lactamases. *Am. J. Med.* 79: 2-12.

112. NEU H. (1989). Definitions and Classification of Beta-lactamases. *Medecine et Maladies Infectieuses*. 19 (Febrero): 5-7.

113. NEU H.C., CHIN N.-X., LABTHAVIKUL P. (1986). In vitro Activity and Beta-lactamases stability of two oral cephalosporins, Cefetrame (Ro 19-5247) and Cefetamet (Ro 15-8074). *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 423-428.

114. NEU H.C., CHIN N.-X., NEU N. (1987). In vitro Activity and Beta-lactamase stability of a new Penem, CGP 31608. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 558-569.

115. NEU H.C., CHIN N.-X. (1987). In vitro beta-lactamase stability of a new monobactam, BO-1165. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 505-511.

116. NEU H.C., NIU W-W., CHIN N.-X. (1989). Prevención del progreso de las resistencias en bacterias productoras de beta-lactamasas. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2: 133-142.

117. NEU H., SAHA G., CHIN N.-X. (1989). In vitro Activity of ME1228, a new parenteral cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1260-1267.

118. NICOLAS M.-H., HONORE N., JARLIER V., PHILIPPON A., COLE S. (1987). Molecular genetic analysis of cephalosporinase production and its role in beta-lactam resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 295-299.
119. NICOLAS M.-H., JARLIER V., HONORE N., PHILIPPON A., COLE S. (1989). Molecular characterization of the gene encoding SHV-3 beta-lactamase responsible for transferable Cefotaxime resistance in a clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 2096-2100.
120. NICOLLE L.E. (1988). Prior Antimicrobial Therapy and resistance of *Enterobacter*, *Citrobacter*, and *Serratia* to third generation cephalosporins. *J. Hosp. Infect.* 2: 321- 327.
121. NIKAIDO H. (1989). Outer Membrane Barrier as a Mechanism of Antimicrobial Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1831-1836.
122. NIKAIDO H., VAARA M. (1985). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability. *Microbial. Rev.* 49: 1-32.
123. NORMARK S. (1989). Mechanisms of beta-lactamase induction in Enterobacteria. *Medicine et Maladies Infectieuses* 19 (Febrero): 13-15.

124. NORMARK S., LINDQUIST S., LINDBERG F. (1986). Chromosomal beta-lactam resistance in enterobacteria. *Scand. J. Infect. Dis.* 49 (suppl.): 38-45.
125. NOVICK R.P. (1987). Plasmid Incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51: 381-395.
126. O'CALLAGHAN C. (1979). Description and classification of newer cephalosporins and their relations with dealt composites. *J. Antimicrob. Chemother.* 5: 635-671.
127. O'CALLAGHAN C.H., MORRIS A., KIRBY S.M., SHINGLER A. (1972). Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1: 283-288.
128. OKONOGI K., SUGIURA A., KUNO M., HIGASHIDE E., KONDO M., IMADA A. (1985). Effect of beta-lactamase induction of susceptibility to cephalosporins in *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* 16: 31-42.
129. OLIVA B., BENNETT P.M., CHOPRA I. (1989). Penicillin-Binding Protein 2 is Required for Induction of the *Citrobacter freundii* Class I Chromosomal Beta-lactamase in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1116-1117.

130. ORSKOV F. (1984). Genus *Escherichia*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg R. (eds.). vol. 1. Williams & Wilkins (Baltimore). pp.: 420-459.
131. ORSKOV F. (1984). Genus *Citrobacter*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacterology. Krieg R. (eds.). vol. 1. Williams & Wilkins (Baltimore). pp.: 1458-1461.
132. ORTIZ J. (1981). Fisiología de las Beta-lactamasas. En: Conferencia Internacional sobre Beta-lactamasas. Rollinson G. (eds.). Beecham S.A. (Madrid). pp.: 19-78.
133. OUELLETTE M., ROY P. (1986). Analysis by using DNA probes of the OXA-1 beta-lactamase gene and its transposon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 46-51.
134. PARR T.R. Jr., BRYAN L.E. (1984). Nonenzymatic Resistance to beta-lactam Antibiotics and Resistance to other Cell Wall Synthesis Inhibitors. En: Antimicrobial Drugs Resistance. Bryan L. (eds.). Academic Press (Londres). pp.: 81-111.
135. PAUL G.C., GERBAUD G., BURE A., PHILIPPON A.M., PANGON B., COURVALIN P. (1989). TEM-4, a new plasmid-mediated beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1958-1963.

136. PENNER J. (1984). Genus XIII. *Morganella*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg R. (eds.). vol. 1. Williams & Wilkins (Baltimore). pp.: 497-498.

137. PETIT A., SIROT D.L., CHANAL M., SIROT J., LABIA R., GERBAUD G., CLUZEL R. (1988). Novel Plasmid-Mediated beta-lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to Ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 626-630.

138. PHELPS D.J., CARLTON D.D., FARRELL C.A., KESSLER R.E. (1986). Affinity of Cephalosporins for beta-lactamases as a factor antibacterial efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 845-848.

139. PHILIPPON A. (1989). In vitro antagonism: Laboratory test and consequences. *Medicine et Maladies Infectieuses.* 19 (Febrero): 39-43.

140. PHILIPPON A.M., LABIA R., JACOBY G. (1989). Extended-Spectrum Beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1131-1136.

141. PHILIPPON A.M., PAUL G.C., JACOBY G.A. (1986). New plasmid-mediated oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 17: 415-422.

142. PHILIPPON A., PAUL G., NEVOT P. (1986). Mécanisme de résistance enzymatique aux beta-lactamines. *Presse Med.* 15: 2290-2296.

143. PHILIPPON A., PAUL G., NEVOT P. (1988). Mécanisme de résistance enzymatique aux beta-lactamines. Enzymatic resistance to beta-lactamins. *J. Pharm. Clin.* 7(1): 5-24.

144. PHILLIPS I. (1989). Differences between induction, mutation and selection of derepressed mutants. *Medicine et Maladies Infectieuses* 19 (Febrero): 51- 52.

145. PUMAROLA A. (1987). Enterobacterias: Caracteres generales. En: Microbiología y Parasitología Clínica. Pumarola A. (eds.). Salvat (Barcelona). pp.: 414-430.

146. PUMAROLA A. (1987). *Shigella y Escherichia (E. coli)* productores de diarrea). En: Microbiología y Parasitología Clínica. Pumarola A. (eds.). Salvat (Barcelona). pp.: 431-440.

147. PUMAROLA A. (1987). Enterobacterias oportunistas. En: Microbiología y Parasitología Médica. Pumarola A. (eds.). Salvat (Barcelona). pp.: 441-448.

148. QUINN J.P., MIYASHIRO D., SAHM D., FLAMM R., BUSH K. (1989). Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to Ceftazidime and Aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1451-1456.
149. RANHAND J.M. (1982). A simple method for the cualitative demonstration of large and small plasmid deoxyrribonucleic acid in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Ann. Biochem.* 122: 426-432.
150. REID A.J., AMYES S.G. (1986). Plasmid Penicillin resistance in *Vibrio cholerae* : Identification of new beta-lactamase SAR-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 245-247.
151. REYNOLDS P.E. (1984). Resistance of the antibiotic target site. *Br. Med. Bull.* 40: 3-10.
152. ROCHELLE P.A., FRY J.C., DAY M.J., BALE M.J. (1985). An accuratte method for estimating sizes of small and large plasmids and DNA fragments by gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 132: 53-59.
153. ROLLISON G.N. (1989). Beta-lactamase induction and resistance to beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 23: 1-5.

154. ROMAN M.C., AROCA J.G., VACAS DIAZ C., MARTINEZ P. (1989). Estudio de la actividad " in vitro" de dos monobactamos. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 4: 90-92.
155. ROY C., TERUEL D., REIG R., HERMIDA M., TIRADO M., RAFOLS M. (1990). Piperacilina asociada a tazobactam frente a cepas de *Escherichia coli* productoras de beta-lactamasas plasmídicas. *Rev. Esp. Quimioterap.* 3: 54-59.
156. SANDERS C.C. (1987). Chromosomal Cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer beta-lactam antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 573-593.
157. SANDERS C.C. (1989). Beta-lactamase stability and in vitro activity of oral cephalosporins against strains possessing well-characterized mechanisms of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1313-1317.
158. SANDERS C., GATES M.L., SANDERS W.E. Jr. (1988). Heterogenicity of Class I beta-lactamase expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1893-1895.

159. SANDERS C.C., SANDERS W.E. Jr., THOMSON K.S., IACONIS J. (1989). Meropenem: activity against resistant Gram-negative bacteria and interactions with beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 24 (suppl. A): 187-186.
160. SANDERS C.C., SANDERS W.E. Jr. (1985). Microbial resistance to newer beta-lactam antibiotic: clinical and laboratory implications. *J. Infect. Dis.* 151: 399-406.
161. SANDERS C.C., SANDERS W.E. (1987). Clinical importance of inducible beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6: 435-437.
162. SANDERS W.E., SANDERS C.C. (1988). Inducible Beta-lactamases: clinic and epidemiological implications for the use of the newer cephalosporins. *Rev. Infect. Dis.* 10: 830-838.
163. SANED (eds.). (1987). Beta-lactamases. *Rev. Esp. Microbiol. Clin.* 3 (suppl.1): 11-15.
164. SATABE S., HIRAOKA M., MITSUBASHI S. (1989). Interaction of Cefpiroma and cephalosporinase from *Citrobacter freundii* GN7391. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 398-399.

165. SEGURA C., ROY C. (1986). Las beta-lactamasas como factores de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos. En: Enfermedades Infecciosas, I. Salvá P. (eds.). IDEPSA (Madrid). pp.: 2993-3002. (García de la Fuente A., Tratado de Medicina Interna, vol. 3).

166. SENTOCHNICK D.E., ELIOPOULUS G.M., FERRARO M.J., MOELLERING R. Jr. (1989). Comparative in vitro activity of SM7338, a new carbapenem antimicrobial agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1232-1236.

167. SHANNON K., KING A., PHILLIPS I. (1985). Sch 34343: In vitro antibacterial activity and susceptibility to beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 15 (suppl. C): 15-23.

168. SHANNON K., KING A., PHILLIPS I. (1986). Beta-lactamases with high activity against Imipenem and SCH 34343 from *Aeromonas hydrophila*. *J. Antimicrob. Chemother.* 17: 45-50.

169. SHAOKAT S., OUELLETTE M., SIROT D., JOLY B., CLUZEL R. (1987). Spread of SHV-1 Beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from fecal samples in Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 943-945.

170. SHEEHAN J.C. (1981). Beta-lactam Antibiotics-Historical Perspective. En: Beta-lactam Antibiotics. Mode of action, New Developments and Future Prospects. Salton M., Shockman G. (eds.). Academic Press Inc. (Nueva York). pp.: 5-12.
171. SHLAES D., LITTLE J. (1988). Cefoxitin-Aztreonam Antagonism: lack of correlation with induction of beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 21: 673-674.
172. STRATTON C.W., WEEKS L.S., TAUSK F. (1987). Beta-lactamase induction and aminoglycoside susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 19: 21-25.
173. SYKES R.B., MATTHEW M. (1979). Detection, Assay and Immunology of beta-lactamases. En: Beta-lactamasas. Hamilton-Miller J., Smith J. (eds.). Academic Press Inc. (Londres). pp.: 17-50.
174. THEN R.L., ANGEHRN P. (1986). Multiply resistant mutants of *Enterobacter cloacae* selected by beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 684-688.
175. THOMAS M.G., LANG S.D. (1986). Antimicrobial Spectrum of Ro 15-8074/001, a New Oral Cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 945-947.

176. TRIAS J., DUFRESNE J., LEVESQUE R.C., NIKAIDO H. (1989). Decreased outer membrane permeability in Imipenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1201-1206.

177. VAN LANDUYT H.W., LAMBERT A., BOALAERT J., GORDTS B. (1986). In vitro activity of BRL 36650, a new penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 362-366.

178. VECOLI C., PREVOST F., VERVERIS J., MEDEIROS A., O'LEARY G. Jr. (1983). Comparison of polyacrylamide and agarosa gel thin-layer Isoelectric Focusing for the characterization of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 186-189.

179. VU M., NIKAIDO H. (1985). Hydrolysis of beta-lactam in mechanism of resistance in *Enterobacter cloacae* strains with constitutive beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 393-398.

180. VUYE A., VERSCHRAEGEN G., CLAEYS G. (1989). Plasmid-Mediated Beta-lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* resistant to Ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 757-761.

181. WARD A., RICHARDS D. (1985). Cost-Effective Antimicrobial Therapy. *Drugs* 30: 382-426.
182. WASHINGTON J. II. (1985). Susceptibility Tests: Agar Dilution. En: Manual of Clinical Microbiology. Ballows A., Hausler W., Shadomy H. (eds.). Lennette (Washington, D.C.). pp.: 967-971.
183. WATANABE N., KATSU K., MORIYAMA M., KITO K. (1988). In vitro evaluation of E1040, a new cephalosporin with potent antipseudomonal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 693-701.
184. WERNER R.G., APPEL K.R., ERNE A.M. (1985). Beta-lactamases from *Bacteroides fragilis* active against Oximino-cephalosporins. *Drug. Res.* 35: 348-350.
185. WIEDEMAN B. (1986). Genetic and Biochemical basis of resistance of *Enterobacteriaceae* to beta-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 (suppl. B): 31-38.
186. WIEDEMAN B., ZÜHLSDORF M. (1989). Antibacterial properties of Meropenem towards clinical isolates, beta-lactamase producers and laboratory mutants. *J. Antimicrob. Chemother.* 24 (suppl. A): 197-205.

187. WILLETTTS N., WILKINS B. (1984). Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbial. Rev.* 48: 24-41.
188. WILLIAMS R.J., YANG Y.J., LIVERMORE D. (1986). Mechanisms by which imipenem may overcome resistance in Gram-negative bacilli. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 (suppl. E): 9-13.
189. WILLSHAW G.A., SMITH H.R., ANDERSON E.S. (1979). Application of agarose gel electrophoresis to the characterization of Plasmid DNA in drug-resistant Enterobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 114: 15-25.
190. WISE R., ANDREWS J.M., PIDDOCK L.J. (1987). In vitro activity of CPF 31608, a new penem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 267-273.
191. YANG Y., LIVERMORE D.M. (1988). Activity of themocillin and other penicillins against inducible beta-lactamases and derepressed mutant enterobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 22: 299-306.
192. YANG Y., LIVERMORE D.M. (1989). Interactions of Meropenem with Class I chromosomal beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 24 (suppl. A): 207-217.

BIBLIOGRAFIA

1. ACAR J.F., GUTMANN L., KITZIS M.D. (1988). Beta-lactamases in clinical isolates. Spectrum implications of Sulbactam/Ampicillin. *Drugs* 35 (suppl. 7): 12-16.
2. AGGELER R., THEN R., GHOSH R. (1987). Reduced expression of outer-membrane proteins in beta-lactam-resistant mutants of *Enterobacter cloacae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3383-3392.
3. ALLAN D.J., ELIOPOULUS G.M., REISZNER E., MOELLERING R.C. (1987). In vitro Activities of ICI 194008 and ICI 193428, two new cephem antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1997-2001.
4. APPELBAUM P.C., JACOBS M.R., BUICK M.K., FLANAGAN M.M., GYMER G.M. (1985). Evaluation of the Micro-ID, the API 20E and the Rapid 20E for Same-Day Identification of *Enterobacteriaceae*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 4: 498-501.
5. ARAKAWA Y., OHTA M., KIDO N., MORI M., ITO H., KOMATSU T., FUJII Y., KATO N. (1989). Chromosomal Beta-lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new Class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 63-70.

6. ARTHUR M., BRISSON A., CARLIER C. (1985). Techniques d'étude du support génétique de la résistance aux antibiotiques. En: L'Antibiogramme. Courvalin P., Goldstein F., Philippon A., Sirot J. (eds.). MPC-VIDEOM (Paris). pp.: 253-343.
7. ASHBY J., KIRPATRICK B., PIDDOCK L.J., WISE R. (1987). The effect of imipenem on strains of *Enterobacteriaceae* expressing Richmond & Sykes Class I beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 20: 15-22.
8. ASPIOTIS A., CULLMANN W., DICK W., STIEGLITZ M. (1986). Inducible beta-lactamases are principally responsible for the naturally occurring resistance towards beta-lactam antibiotics in *Proteus vulgaris*. *Chemother.* 32: 236-246.
9. AUCKENTHALER R., BISMUTH R., COURVALIN P. (1985). L'Antibiogramme. En: L'Antibiogramme. Courvalin P., Goldstein F., Philippon A., Sirot J. (eds.). MPC-VIDEOM (Paris). pp.: 11-163.
10. AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE D., SEIDMAN J.G., SMITH J., STRUHL K. (1990). Analysis of Proteins. En: Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K. (eds.). Wiley J. & Sons (Nueva York). pp.: 1-3.

11. BARRY A.L., THORNSBERRY C. (1985). Susceptibility Test: Diffusion Test Procedures. En: Manual of Clinical Microbiology. Ballows A., Hausler W., Shadomy H. (eds.). Lennette (Washington, D.C.). pp.: 978-987.
12. BAUERNFEIND A., HOERL G. (1987). Novel R-factor borne beta-lactamase of *Escherichia coli* conferring resistance to cephalosporins. *Infect* 15: 257-259.
13. BELLO H., NORAMBUENA R., MONDACA M., MONTOYA R., ZEMELMAN R. (1987). Inactivation of some third-generation cephalosporins by beta-lactamases of non-fermentative Gram-negative bacteria isolated from freshwater of remote environment. *Lett. Appl. Microbiol* 5: 123-126.
14. BINGEN E. (1987). Mecanismo de acción de los beta-lactámicos. Roussel Ibérica (Madrid). pp.: 47-68.
15. BOISSINOT M., HUOT A., MERCIER J., LEVESQUE R. (1989). Development of gene probes and evolutionary relationships of the PSE-4 bla gene to plasmid-mediated beta-lactamases of Gram-negative bacteria. *Mol. Cell. Probes* 3: 179-188.

16. BOISSINOT M., MERCIER J., LEVESQUE R. (1987). Development of natural and synthetic DNA probes for OXA-2 and TEM-1 Beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 728-734.
17. BRENNER D.J. (1984). Family I. *Enterobacteriaceae*. En: Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Krieg R. (eds.). Williams & Wilkins (Baltimore). pp.: 408-420.
18. BROWN A.G. (1988). Progresos en el descubrimiento de nuevos inhibidores de beta-lactamasas y beta-lactámicos naturales. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 3 (supl.1): 107-118.
19. BUSH K. (1988). Beta-lactamases Inhibitors from Laboratory to Clinic. *Clín. Microbiol. Rev.* 1: 109-123.
20. BUSH K. (1989). Classification of beta-lactamases: Groups 1, 2a, 2b and 2b'. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 264-270.
21. BUSH K. (1989). Classification of beta-lactamases: Groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 271-276.
22. BUSH K. (1989). Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 33: 259-263.

23. BUSH K., SYKES R. (1984). Interaction of Beta-lactam Antibiotics with beta-lactamases as Cause for Resistance. En: Antimicrobial Drugs Resistance. Bryan L.E. (eds.). Academic Press (Londres). pp.: 1-31.

24. BUSH K., SYKES R. (1986). Methodology for the study of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 6-10.

25. BUSH K., TANAKA S.K., BONNER D.P., SYKES R.D. (1985). Resistance caused by decreased penetration of beta-lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 555-560.

26. CHANAL C.M., SIROT D.L., LABIA R., PETIT A., MORAND A., SIROT J., CLUZEL R.A. (1988). Comparative study of a novel plasmid-mediated beta-lactamase, CAZ-2, and the CTX-1 and CAZ-1 enzymes conferring resistance to broad spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1660-1665.

27. CHANAL C.M., SIROT D.L., PETIT A., LABIA R., MORAND A., SIROT J., CLUZEL R. (1989). Multiplicity of TEM-derived beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the same hospital and relationships between the responsible plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1915-1920.

28. COLE S.T., HONORE N., NICOLAS M.H. (1989). Regulation of inducible cephalosporinases in *Enterobacter*. Induction and Mutation, other hypotheses. *Medicine et Maladies Infectieuses* 19 (Febrero): 16-19.

29. COOKSEY R.C., CLARK N.C., THORNSBERRY C. (1985). A gene probe for TEM type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 154-156.

30. COURVALIN P., GOLDSTEIN F., PHILIPPON A., SIROT J. (1985). Fiches techniques d'etude pratique des Antibiotiques. En: L'Antibiogramme. Courvalin P., Goldstein F., Philippon A., Sirot J. (eds.). MPC-VIDEOM (Paris). pp.: 165-250.

31. COUTURIER M., BEX F., BERGQUIST P.L., WERNER K.M. (1988). Identification and Classification of Bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* 52: 375-395.

32. CULLMANN W., DICK W. (1985). Evidence for nonspecific induction of beta-lactamase in overproducing variants of *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 4: 34-40.

88. LIVERMORE D.M. (1988). Permeation of beta-lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 10: 691-698.
89. LIVERMORE D.M. (1988). Significado clínico de la inducción y de la desrepresión estable de las beta-lactamasas en los Bacilos Gram-negativos. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 3 (suppl.1): 611-619.
90. LIVERMORE D.M. (1989). Inducer activity of β -lactam antibiotics: Description and Consequencies, Mechanisms of resistance in *Ps. aeruginosa*. *Medicine et Maladies Infecteuses.* 19 (Febrero): 44-50.
91. LIVERMORE D. M., JONES C.S. (1986). Characterization of NPS-1, a novel plasmid-mediated beta-lactamase from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 99-103.
92. MALOUIN F., BRYAN L.E. (1986). Modification of Penicillin-Binding Proteins as Mechanisms of Beta-lactam Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 1-5.
93. MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1982). Analysis of recombinant DNA probes. En: Molecular Clonig: A Laboratory Manual. Maniatis T. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory (Nueva York). pp.: 363-401.

38. DAMASO D., MORENO-LOPEZ M., DAZA R. (1984). Betalactaminas II. Cefalosporánidos. Nuevas Beta-lactaminas. En: Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos de uso clínico. Dámaso, Moreno-López, Daza (eds.). Laboratorios Beecham S.A. (Madrid). pp.: 169-222.

39. DAMASO D., MORENO-LOPEZ M., DAZA R. (1984). Interacciones antibióticas. Asociaciones. En: Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos de uso clínico. Dámaso, Moreno-López, Daza. (eds.). Laboratorios Beecham S.A. (Madrid). pp.: 493-515.

40. DRABU Y.J., BLAKEMORE P.H., COX D.M, MC.LAREN A. (1988). Plasmid-mediated Resistance to Ceftazidime. *J. Antimicrob. Chemother.* 23: 287-290.

41. DWORZACK D.L., PUGSLEY M.P., SANDERS C.C., HOROWITZ E.A. (1987). Emergence of resistance in Gram-negative bacteria during therapy with expanded-spectrum cephalosporins. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 16: 456-459.

42. ESCAMILLA J. (1976) Susceptibility of *Haemophilus influenzae* to Ampicillin as determined by use of a modified, one-minute beta-lactamase test. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9: 196-198.

43. ESPOSITO S., GALANTE S., BARBA D., PENNUCCI D., LIMAURO D. (1985). Comparative activity of Ceftizoxima and four other cephalosporins against Gram-negative bacteria and their sensitivity to beta-lactamases. *Microbiol* 8: 197-204.

44. FASS R.J., HELSEL V.L. (1986). In vitro activity of Ro 19-5247 and Ro 15-8074, a new oral cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 429-434.

45. FASS R.J., HELSEL V. (1988). In vitro activity of U-76,252 (CS-807), a new oral cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1082-1085.

46. FISHER J. (1984). Beta-lactams Resistant to Hydrolysis by beta-lactamases. En: *Antimicrobial Drugs Resistance*. Bryan L.E. (eds.). Academic Press (Londres). pp.: 33-79.

47. FOLLATH F., COSTA E., THOMMEN A., FREI R., BURDESKA A., MEYER J. (1987). Clinical consequences of development of resistance to third generation cephalosporins. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6: 446-450.

48. FORST S., DELGADO J., RAMAKRISHNAM G., INOUE M. (1988). Regulation of ompC y ompF expression in *Escherichia coli* with lack of gene envZ. *J. Bacteriol* 170: 5080-5085.

49. FOZ A. (1986). Tendencias en Taxonomía bacteriana. En: Bases de la terapéutica 15. Salvá P. (ed.). IDEPSA (Madrid). pp.: 419-415. (García de la Fuente A., Tratado de Medicina Interna; vol 3).
50. FU K.P., MC.CLOUD S., GREGORY F.J., HUNG P.P. (1985). Inhibitory activity of Cefpiramide on beta-lactamase. *Chemother.* 31: 200-203.
51. FUCHS P.C., JONES R.N., BARRY A. (1987). Effect of beta-lactamase inhibitors on the antimicrobial activity of cefoperazone, Cefotaxime, and Ceftizoxime against aerobic and anaerobic beta-lactamase producing bacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 61-65.
52. FUJIMOTO T., OTANI T., NAKAJIMA R., UNE T., OSADA Y. (1986). In vitro activity of DQ-2556, a new cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 611-613.
53. FUNG-TOMC J., DOUGHERTY T.J., DEORIO F.J., SIMICH-JACOBSON V., KESSLER R.E. (1989). Activity of Cefepime against Ceftazidime and Cefotaxime resistant Gram-negative bacteria and its relationship to beta-lactamase levels. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 498-502.

54. GARCIA J.A. (1989). Cefalosporinas de 3ª generación. ¿Han de quedar relegadas al hospital?. *Rev. Esp. Quimioterap.* 2: 115-118.
55. GARCIA-RODRIGUEZ J. (1987). Antimicrobianos. En: Microbiología y Parasitología Médica. Pumarola A. (eds.). Salvat (Barcelona). pp.: 120-152 .
56. GATES M.L., SANDERS C.C., GOERING R.V., SANDERS W.E. Jr. (1986). Evidence of multiple forms of type I chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 453-457.
57. GATUS B.J., BELL S.M., JIMENEZ A.S. (1989). A comparison of Aztreonam and Imipenem induction of Clase I beta-lactamase in *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 841-849.
58. GOOTZ T.D. (1990). Discovery and Development of new antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 13-31.
59. GOOTZ T., RETSEMA J., GIRARD A., HAMANAKA E., ANDERSON M., SOKOLOWSKI S. (1989). In vitro Activity of CP-65,207, a new penem antimicrobial agent, in comparison with those of other agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1160-1166.

60. GUTMANN L., KITZIS M.-D., YAMABE S., ACAR J.F. (1986). Comparative evaluation of a new beta-lactamase inhibitor, YTR 830, combined with different beta-lactam antibiotics against bacteria harboring known beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 955-957.
61. HANCOCK R. (1987). Role of Porins in outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* 169: 929-933.
62. HECHLER U., VAN DEN WEGHE M., MARTIN H.S., FRERE J.-M. (1989). Overproduced Beta-lactamase and the outer-membrane barrier as resistance factors in *Serratia marcescens* highly resistant to beta-lactamase-stable beta-lactam antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1275-1290.
63. HOY J.F., ROLSTON K.V.I., HSI HO D., ALVAREZ M., THIROLF P. (1986). In vitro Activity of BRL 36650, a new semisynthetic Penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 972-976.
64. HUOVINEN S. (1988). Rapid Isoelectric Focusing of plasmid-mediated beta-lactamases with Pharmacia Phastsystem. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1730-1732.

65. HUOVINEN S., HUOVINEN P., TORNIAINEN K., JACOBY G.A. (1988). Evaluation of plasmid-encoded beta-lactamase resistance in *Escherichia coli* blood culture isolates. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* 7: 651-655.
66. INOUE E., MITSUHASHI S. (1989). Interaction of E1040 with Cephalosporinase from *Citrobacter freundii* GN7391. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 2157-2159.
67. JACOBY G.A., SUTTON L. (1985). Beta-lactamases and Beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 703-705.
68. JACOBS M.R., ARONOFF S.C., JOHENNING S., SHLAES D.M., YAMABE S. (1986). Comparative activities of the beta-lactamase inhibitors YTR 830, Clavulanate, and Sulbactam combined with ampicillin and broad-spectrum penicillins against defined beta-lactamase-producing aerobic Gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 980-985.
69. JARLIER V., NICOLAS M.-H., FOURNIER G., PHILIPPON A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns. *Rev. Infect. Dis.* 4: 867-878.

70. JONES R.N. (1988). In vitro evaluation of Aminopenicillin/Beta-lactamase inhibitor combinations. *Drugs* 35 (suppl. 7): 17-26.
71. JONES R.N., BARRY A.L. (1988). Susceptibility of stably derepressed beta-lactamase producing strains to Imipenem and four Quinolones. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 82-83.
72. KADO C.I., LIU S.T. (1985). Rapid Procedure for detection and isolation of Large and Small Plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.
73. KITZIS M.D., BILLOT-KLEIN D., GOLDSTEIN F.W., WILLIAMSON R., TRAN VAN NHIEU G., CARLET J. (1988). 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.* 32: 9-14.
74. KNAPP C.C., SIERRA-MADERO J., WASHINGTON J.A. (1988). Antibacterial activities of Cefpodoxime, Cefixime, and Ceftriaxone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1896-1898.
75. KOBAYASHI S., ARAI S., HAYASHI S., FUJIMOTO K. (1986). Beta-lactamase stability of Cefpirome (HR-810), a new cephalosporin with a broad antimicrobial spectrum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 713-718.