



Universitat de les
Illes Balears

**Estudi dels mecanismes de
resistència a antibiòtics a
*Klebsiella pneumoniae***

TESI DOCTORAL

Emma Padilla Esteba

Directors de Tesi:

Dr. Sebastián Albertí Serrano

Dra. Núria Borrell Solé

Àrea de Microbiologia. Departament de Biologia.

Universitat de les Illes Balears

Juny de 2010

Als meus pares

Al Ferran

Agraïments

M'agradaria en aquestes línies expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que han contribuït a que aquest treball d'investigació finalment el pogués presentar en forma de tesi.

Voldria de forma breu agraïr a les moltes persones que han ajudat al llarg d'aquests anys que pogués compaginar la feina a l'Hospital de Manacor (i al principi també a la clínica Juaneda i Son Llàtzer) amb la feina a la Universitat, sense elles m'hagués estat impossible començar i acabar aquest treball.

Primer de tot, i per ordre cronològic, agraïr a en José Luis Pérez, que em fes despertar els primers interessos cap a la Microbiologia quan estudiava tercer de medicina.

Agraïr a la Núria Borrell a introduir-me en aquest món de la investigació, apassionant i a la vegada dur; a en Peque (Antonio Doménech) i a en Javier que em van introduir en la investigació més bàsica a la Universitat i sobretot a en Sebastià per donar-me l'últim i gran impuls; ja que sense ell i la seva gran capacitat, no hagués pogut consolidar la feina feta.

Agraïr a totes/s les becàries, contractats i ex-residents/es amb els qui he compartit els horabaixes al laboratori de la Univeristat i també a la Unitat d'Investigació i servei de Microbiologia de Son Dureta, per totes les ajudes rebudes i per fer-m'hi sentir bé. També, agraïr a na M. Teresa de Francisco per la seva inestimable ajuda en els experiments amb animals.

Agraïr als companys de Manacor que sempre han estat a punt per donar-me un cop de mà, per congelar, descongelar soques i demés feinetes. Al meu "jefe" que tot i que encara no enten com i perquè he continuat fent investigació, mai ha posat cap entrebanc per ajudar-me a compaginar-ho.

Agraïr a aquells que han estat al meu costat tots aquests anys, per voler-me entendre i ajudar-me en tot el què han pogut i més. I finalment, agraïr sobretot al Ferran per la comprensió que han mostrat aquests últims mesos, i també a en Joel i a en Nil per utilitzar part del temps que em corresponia estar amb ells, per escriure.

A tots, gràcies.

Abreviatures utilitzades en aquest treball

BAL: Rentat broncoalveolar

BLEE: Beta-lactamasa d'espectre estès

MBL: Metalo-beta-lactamasa

CMI: Concentració mínima inhibidora

CLSI: Comitè Nacional de Normes de Laboratori Clínic d'Estats Units

DDST: Test de sinèrgia en doble disc

DL₅₀: Dosi letal 50

ADN: Àcid desoxiribonucleic

ELISA: Assaig per immunoabsorció lligat a enzims

MPOC: Malaltia pulmonar obstructiva crònica

LB: Luria Bertani

LPS: Lipopolisacàrid

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa

PFGE: Electroforesi en camp polsant

pI: punt isoelèctric

RNA: Àcid ribonucleic

RT-PCR: Reacció en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa

TSB: Caldo triptona i soja

UCI: Unitat de cures intensives

UFC: Unitat formadora de colònies

Totes les unitats de mesura estan expressades amb les sigles del Sistema Internacional.

Índex

Introducció	1
I.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> com a patogen	1
I. 1. 1 Característiques taxonòmiques	1
I. 1. 2 Factors de virulència	4
I. 1. 2. 1 Càpsula	4
I. 1. 2. 2 Lipopolisacàrid	5
I. 1. 2. 3 Fímbríes	7
I. 1. 2. 4 Sistemes de captura de ferro d'alta afinitat	8
I. 1. 3 Infeccions causades per <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
I. 1. 3. 1 Infeccions urinàries	10
I. 1. 3. 2 Infeccions respiratòries	10
I. 2 Mecanismes de resistència	11
I. 2. 1 Beta-lactamases	11
I. 2. 1. 1 Beta-lactamases tipus TEM i SHV	16
I. 2. 1. 2 Beta-lactamases tipus CTX-M	17
I. 2. 1. 3 Altres beta-lactamases	18
I. 2. 1. 4 Carbapenemases	18
I. 2. 1. 5 Beta-lactamases del tipus AmpC	19
I. 2. 2 Alteracions de la permeabilitat	20
I. 2. 2. 1 Porines	21
I. 2. 2. 2 Altres porus	23
I. 2. 2. 3 Pèrdua de porines i resistència antimicrobiana	24
I. 2. 3 Expulsió activa: bombes d'efluxió	25
I. 2. 3. 1 Família RND: el model del sistema d'efluxió AcrAB	28
I. 3 Models animals	32
I. 3. 1 Farmacocinètica	33
I. 3. 2 Model de pneumònia experimental	35
I. 3. 3 Paràmetres d'avaluació en els estudis d'eficàcia terapèutica al model animal	36
Objectius	41
Capítol 1: Detecció i caracterització d'aïllats clínics de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productors de beta-lactamasa d'espectre estès tipus CTX-M-15 a Bòsnia-Hercegovina.	
1. 1 Objectius	45
1. 2 Materials i mètodes	46
1. 3 Resultats	49
1. 4 Discussió	53
Capítol 2: Efecte de les beta-lactamases del tipus AmpC en l'eficàcia dels betalactàmics en un model de pneumònia en rata per <i>K.pneumoniae</i> .	
2. 1 Objectius	57
2. 2 Materials i mètodes	58
2. 3 Resultats	63

2.4 Discussió	69
Capítol 3: La bomba d'efluxió AcrAB de <i>K. pneumoniae</i> contribueix a la resistència als antimicrobians i a la virulència.	
3. 1 Objectius	75
3. 2 Materials i mètodes	76
3. 3 Resultats	80
3. 4 Discussió	87
Conclusions	91
Bibliografia	95
Annex: Articles publicats	115

INTRODUCCIÓ

I. 1 *Klebsiella pneumoniae* COM A PATOGEN

I. 1. 1 Característiques taxonòmiques

Klebsiella pneumoniae és l'espècie de major rellevància clínica dins el gènere bacterià *Klebsiella*, que pertany a la família dels enterobacteris. El gènere es va denominar així en honor a Edwin Klebs, microbiòleg alemany del segle XIX, que va observar per primera vegada el bacteri en mostres de secrecions bronquials de malalts que havien mort de pneumònia.

El gènere *Klebsiella* està constituït per bacils gramnegatius, d'una mida aproximada 0,3-1µm de diàmetre i 0,6-6 µm de llargada (Figura I. 1A). Normalment es troben aïllats, però en algunes ocasions els podem trobar en parelles o formant petites cadenes de poca longitud [1]. Estructuralment, en tractar-se de bacteris gramnegatius, presenten el citoplasma envoltat per una membrana citoplasmàtica o interna, el glicopèptid, l'espai periplasmàtic i una membrana externa. Algunes soques poden presentar fimbries o pilis, però no flagels, ja que són microorganismes immòbils. Es tracta de microorganismes no esporulats, que fermenten la glucosa amb producció d'àcid i gas. Són oxidasa negatius i catalasa positius, poc exigents pel que fa la seva nutrició ja que poden utilitzar diferents substàncies com a font de carboni i d'energia [2]. La temperatura òptima de creixement, igual que la resta d' enterobacteris, es troba entre 30-37°C. Moltes soques poden utilitzar el citrat i la glucosa com a única font de carboni, sintetitzen l'enzim lisina descarboxilasa però no l'enzim ornitina descarboxilasa i normalment són positius a la prova de Voges Proskauer [1-2].

Els membres del gènere *Klebsiella* es caracteritzen per ser capsulats. La seva càpsula està constituïda per un complex d'àcids polisacàridics formant una estructura molt gruixuda que és la responsable de l'aparença mucosa de les colònies quan creixen en un medi de cultiu sòlid ric en carbohidrats (Figura I. 1B).

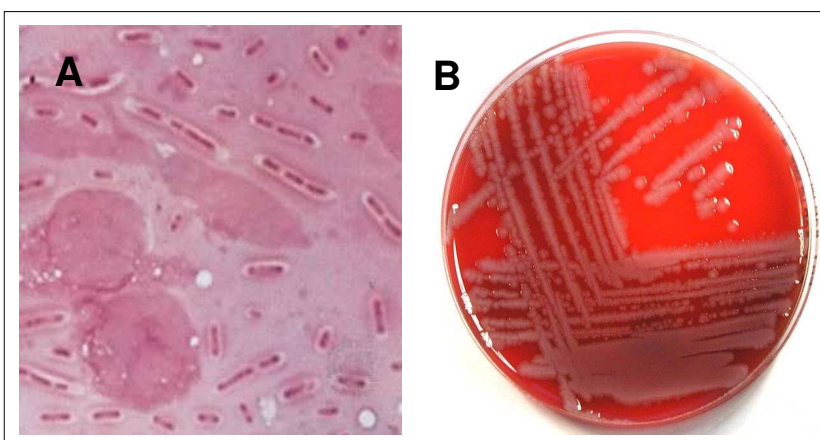


Figura I. 1 A) Imatge de *K. pneumoniae* per microscopia òptica després d'una tinció de Gram. B) Imatge de colònies de *K. pneumoniae* crescudes en agar amb sang.

Klebsiella spp. es troba a la natura en dos hàbitats diferents: al medi ambient, en aigües residuals i superficials, en sòls i sobre vegetals; i colonitzant les superfícies de les mucoses dels animals mamífers [1]. En aquest aspecte *Klebsiella* és molt semblant a *Enterobacter* spp. i *Citrobacter* spp., però diferent de *Shigella* spp. o *Escherichia coli* els quals són comuns en les mucoses del humans però és difícil trobar-los en el medi ambient. En humans, *Klebsiella* és present com a sapròfit a la nasofaringe, el tracte intestinal, el tracte urogenital i el tracte biliar [3]. Podem trobar uns percentatges de colonització totals de *Klebsiella* entre el 5 i el 38% en femta i entre l'1 i el 6% en nasofaringe. Aquests percentatges varien dràsticament quan ens centrem en l'ambient hospitalari on els índexs en femta poden arribar fins el 77% i a nasofaringe fins el 19%, incrementant-se proporcionalment al temps d'estada hospitalària i l'ús d'antibiòtics [1]. El tractament antimicrobià administrat prèviament al pacient està associat de manera significativa amb l'adquisició de *Klebsiella*. La importància de l'increment d'aquesta colonització s'il·lustra amb l'observació de que la taxa de casos d'infeccions nosocomials causades per *Klebsiella* a pacients portadors intestinals de la mateixa adquirida a l'hospital és quatre vegades superior a la observada als no portadors. A més, l'ús generalitzat de teràpia antibiòtica està associat amb l'aparició de soques multirresistents de *Klebsiella* a l'hospital.

Tal i com s'ha dit anteriorment, l'espècie més important en el camp mèdic és *Klebsiella pneumoniae*, de menor importància, *K. oxytoca* que també s'ha aïllat en mostres clíniques. Altres espècies com *K. terrigena* i *K. planticola*, anteriorment considerades com espècies ambientals, han demostrat tenir importància clínica en trobar-se com a causa de processos infecciosos en humans [1]. La majoria d'espècies de *Klebsiella* poden ser identificades sense massa problemes amb proves microbiològiques estàndards; *K. oxytoca* és molt semblant bioquímicament a *K. pneumoniae* excepte que és positiva a la prova de l'indol. *K. oxytoca* comparteix amb *K. pneumoniae* la tendència a produir càpsula. Les espècies del gènere *Klebsiella*, segons la classificació americana establerta per Ørskov el 1984, s'identifiquen i es diferencien entre elles pels resultats obtinguts de proves bioquímiques, les quals estan representades a la Taula I. 1 [1-2].

Taula I. 1 Identificació bioquímica de les diferents espècies del gènere *Klebsiella*

Característica	<i>K. pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. ornithionolytica</i>
	subsp	subsp	subsp				
	<i>pneumoniae</i>	<i>ozaeanae</i>	<i>rhinoscleromatis</i>				
Indol	-	-	-	+	-	V	+
Ornitina decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	+
Lisina decarboxilasa	+	V	-	+	+	+	+
Degradació pectat	-	-	-	+	-	-	-
Gas a partir de lactosa a 44.5°C	+	-	-	-	-	-	-
Creixement a 10°C	-	-	-	+	-	+	+
Formació d'àcid:							
D-Melezitosa	-	-	-	V	+	-	-
L-Sorbosa	V			+	+	+	
Test vermell metilè	-	+	+	-	+	V	+
Test Voges-Proskauer	+	-	-	+	+	+	+
Utilització de:							
m-Hidroxi-benzoat	-	-	-	+	+	-	-
Hidroxi-L-prolina	V			V	V	+	
Malonat	+	-	+	+	+	+	+

V (variable); + (el 90% o més de les soques són positives); - (el 90% o més de les soques són negatives)

I. 1. 2 Factors de virulència

I. 1. 2 Factors de virulència de *K. pneumoniae*

L'estudi dels mecanismes de patogenicitat que es desenvolupen durant les infeccions causades per *K. pneumoniae* ens ha permès identificar una sèrie de factors bacterians que determinen la capacitat del bacteri per causar la infecció. Aquests factors de virulència participen principalment en la superació dels mecanismes de defensa innats a l'hoste, tot i que també poden estar implicats en altres funcions crucials de diferents etapes del procés infecciós. A continuació es descriuen els factors de virulència millor estudiats a *K. pneumoniae*.

I. 1. 2. 1 Càpsula

La càpsula és l'estructura més externa de l'embolcall cel·lular i és el component que protegeix al microorganisme front a les condicions ambientals adverses. *K. pneumoniae* normalment desenvolupa una càpsula prominent composta de polisacàrids i pràcticament totes les soques de *K. pneumoniae* són capsulades. La càpsula és essencial per la virulència del bacteri ja que constitueix una barrera antifagocitària que protegeix al bacteri dels leucòcits polimorfonuclears i evita la seva opsonització i lisi, impeding la deposició del complement [4-6]. Estudis experimentals previs suggereixen que la càpsula podria ser un factor important per l'establiment de la pneumònia causada per *K. pneumoniae*, un cop demostrat que la immunització activa amb polisacàrid capsular purificat protegeix contra la pneumònia per *Klebsiella* induïda experimentalment [7]. A més, estudis més recents, utilitzen anticossos monoclonals contra el component capsular de *Klebsiella* per reduir la gravetat i el pas del bacteri a sang en les pneumònies [8]. Estudis publicats per Cortés *et al.* demostren que la càpsula permet al bacteri, *K. pneumoniae*, escapar-se dels sistema del complement (C3) i de la internalització per les cèl·lules epitelials, permetent l'establiment de la pneumònia i la disseminació de la infecció. Per tant, la càpsula contribueix en la capacitat de *K. pneumoniae* de produir pneumònia, bàsicament perquè la seva absència augmenta la sensibilitat a la deposició del complement i a l'acció dels macròfags alveolars.

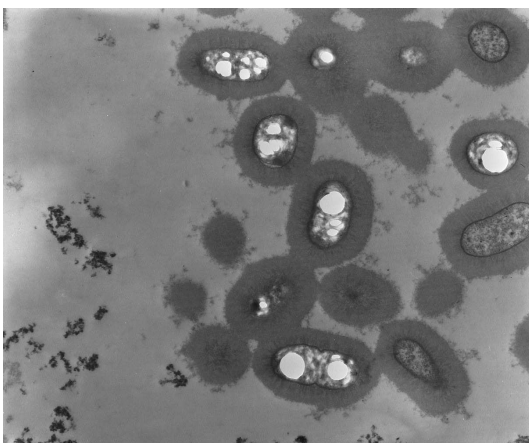


Figura I. 2. Fotografia en el microscopi electrònic on s'observa el material capsular envoltant *K. pneumoniae*. Obtinguda de la referència [1]

Generalment a mesura que augmenta l'espessor de la càpsula més alta és la virulència de la soca [9]. A *K. pneumoniae* s'han descrit fins a 82 serotips capsulars diferents, la variació dels quals és deguda a les diferències en la composició dels sucres que la constitueixen [7]. Segons alguns estudis epidemiològics, el 90% dels aïllaments són tipables; alguns serotips com K2, K21, K55, K7 i K33 [7, 10] són més freqüents que la resta, la freqüència dels quals és inferior al 0,5%. K21 és el serotip més freqüent aïllat a infeccions clíniques [1, 10] i la majoria d'estudis estan d'acord en què K2 és el serotip capsular més comú aïllat de pacients amb infeccions dels tracte urinari (bacteriúries asimptomàtiques, cistitis i pielonefritis) [11].

El fet que es tracti de la capa més externa del bacteri i que quasi totes les soques de *Klebsiella* produeixin càpsula de manera constitutiva, justifica l'interès en l'elaboració de vacunes dirigides contra un o més serotips capsulars de *K. pneumoniae*. De fet, hi ha evidències experimentals de que els anticossos contra la càpsula protegeixen de les infeccions greus per *K. pneumoniae*. Tot i que el gran nombre de serotips capsulars suposa un desavantatge alhora d'elaborar una vacuna d'espectre suficientment ampli per garantir la seva eficàcia [12], alguna de les vacunes dirigides contra un o més serotips ja s'han provat en humans i s'han demostrat altament immunogèniques i no tòxiques.

I. 1. 2. 2 Lipopolisacàrid

El LPS és una molècula glicopídica ancorada a la cara externa de la membrana externa de la majoria dels bacteris gramnegatius. És un component estructural crucial als bacteris gramnegatius i està clarament implicat en la resistència de molts microorganismes front als mecanismes de defensa de l'hoste.

La seva contribució a la virulència és deguda, per un costat, a l'activitat endotòxica produïda per la part lipídica, el lípid A, que provoca l'activació dels macròfags, indueix la resposta i té un efecte pirogen. Per altra banda, la presència de les cadenes polisacàrides de l'antigen O faciliten el procés inicial d'adhesió i donen resistència al bacteri contra l'activitat bactericida del sèrum no immune. Aquest últim aspecte de l'antigen O és potser el més important [13]. Les cadenes laterals O del LPS que no queden cobertes i protegides per la càpsula, s'exposen al medi exterior i sobre elles s'hi diposita el component C3b del complement, però com que aquest principalment s'uneix a les cadenes laterals O més llargues, queda allunyat de la membrana bacteriana, i per tant, no es produeix la formació del complex d'atac a la membrana, implicant la formació del porus que provoca la mort del bacteri. Així doncs, les cadenes d'antigen O, representen una barrera física que impedeix la correcta actuació de la cascada de reaccions de les proteïnes del complement. En relació a la funció que exerceix l'antigen O en la patogènesi de la pneumònia, Clements *et al.* varen concloure que a *K. pneumoniae* l'antigen O es presenta a l'hoste amb una càrrega neutral; aquest emmascarament de les càrregues implicaria la disminució de les unions amb les partícules carregades facilitant l'establiment de la

pneumònia. Per exemple, la unió entre els pèptids antimicrobians i la superfície del bacteri quedaria alterada, igual que també s'afectaria la unió amb les defensines del pulmó [14].

Cada molècula de LPS està formada per tres regions diferents:

- Una regió interna denominada **lípid A** o endotoxina, composta per un disacàrid unit a varis àcids grassos. La seva principal activitat biològica és el manteniment de la integritat de la membrana externa bacteriana. De principal interès clínic és la seva funció com a endotoxina, essent responsable de molts dels efectes patofisiològics associats a les infeccions causades per bacteris gramnegatius.
- Una regió oligosacàrida central anomenada **nucli o core**. El nucli no participa de manera directa en la virulència del microorganisme, sinó que contribueix de manera indirecta a servir d'unió de l'antigen "O", autèntic factor de virulència. S'ha comprovat que les tres regions del LPS poden actuar com immunògens; el nucli presenta motius estructurals molt ben conservats, i per tant, es considera una diana adequada per la inducció d'anticossos de gran reactivitat creuada. En aquest sentit, s'han obtingut anticossos a través de la immunització de ratolins amb *K. pneumoniae*, que reconeixen de manera altament específica el nucli de l'espècie, amb independència del serotip del seu antigen "O". Aquests anticossos dirigits contra el nucli del LPS podrien ser utilitzats de tractament en pacients amb sèpsia causada per bacteris gramnegatius.
- Una regió polisacàrida anomenada cadena lateral O o **antigen "O"**. Està constituïda per la repetició d'una unitat bàsica, en alguns casos constituïda per un sol sucre o per dos o més. Aquestes diferències en la composició de sucres no només es troben entre les diferents espècies de bacteris gramnegatius, sinó també poden aparèixer entre soques d'una mateixa espècie bacteriana. La variabilitat d'aquesta estructura i les seves propietats immunogèniques han originat la descripció de fins a 9 serotips diferents a *K. pneumoniae* [12]. El serotip O1 és l'antigen O que més comunament s'ha trobat als aïllats clínics de *K. pneumoniae*. L'antigen O facilita el procés inicial d'adhesió i confereix resistència al bacteri contra l'activitat bactericida del sèrum [1]. Estudis realitzats amb models animals han comprovat el paper protector dels anticossos contra aquest serotip, i per tant, sembla que existeix una associació entre la presència d'aquest serotip a les soques de *K. pneumoniae* i la seva virulència.

Alguns serotips capsulars poden emascarar les estructures immunogèniques de la superfície bacteriana, inclòs l'antigen O del LPS, reduint d'aquesta manera l'eficàcia de les vacunes basades únicament en aquest antigen. Com alternativa, es proposa la incorporació dels

polisacàrids capsulars a la vacuna basada en els nou serotips O [12]. Les possibilitats terapèutiques d'una vacuna formulada així encara no han estat avaluades.

I. 1. 2. 3 Fímbríes

Durant el procés infecció resulta fonamental que el microorganisme sigui capaç d'establir-se i colonitzar les superfícies mucoses de l'organisme hoste. Hi ha diferents molècules d'adhesió que faciliten l'acostament i la unió del bacteri a receptors específics presents a les cèl·lules dels teixits infectats. A *K. pneumoniae*, igual que a d'altres enterobacteris, són les fímbríes, entre d'altres adhesines les que juguen aquest paper.

Les fímbríes són projeccions filamentoses no flagel·lars que surten de la superfície bacteriana. Estan constituïdes per subunitats proteiques globulars de pesos entre 15 i 26 kDa, tenen una longitud aproximada de 4 µm i s'han classificat en funció de la seva capacitat d'aglutinar els eritròcits de diferents animals. A *K. pneumoniae* predominen les fímbríes de tipus 1 i 3.

Les fímbríes de tipus 1 aglutinen els eritròcits de cobai. Aquestes fímbríes s'uneixen als receptors glicoproteics que estan presents a les cèl·lules de l'organisme hoste que contenen manòsids, a on l'activitat d'hemoaglutinació és inhibida per la manosa. Diferents estudis han permès concloure que l'adhesió mitjançada per les fímbríes de tipus 1 és un important factor de virulència en les infeccions del tracte urinari tant inferior com superior causades per *K. pneumoniae*, ja que permet la colonització de la bufeta urinària [15]. La capacitat d'unió de les fímbríes de tipus 1 a glicoproteïnes solubles presents a la saliva pot, a més, jugar un paper important en la colonització del tracte respiratori superior [16]. De totes maneres, encara que aquest tipus de fímbríes afavoreix l'establiment inicial del microorganisme a les superfícies mucoses, a les etapes posteriors del procés infecció resulta perjudicial pel bacteri per ser una estructura reconeguda pels sistemes de defensa de l'organisme hoste. Concretament les fímbríes del tipus 1 són reconegudes per receptors que contenen manosa, presents a la superfície dels leucòcits. La unió de l'adhesina a aquests receptors provoca la fagocitosis i mort del bacteri a l'interior dels leucòcits mitjançant un procés conegut com lectinofagocitosis. Per evitar aquest mecanisme de defensa el bacteri controla l'expressió de les fímbríes tipus 1 als teixits, amb capacitat de revertir al fenotip no fimbriat [17].

Les fímbríes de tipus 3 es varen descriure inicialment a *Klebsiella*, tot i que estudis posteriors han demostrat la seva presència a altres gèneres dels enterobacteris [18]. Està demostrat que les fímbríes de tipus 3 faciliten l'adhesió de *K. pneumoniae* a les membranes basals i superfícies basolaterals dels epitelis respiratori i renal, però se'n desconeix el seu paper patogènic [19].

Una altra fímbríes anomenada KPF-28 s'ha descrit recentment a algunes soques productores de beta-lactamases i s'ha relacionat amb la colonització de l'intestí en humans [20]

I. 1. 2. 4 Sistemes de captura de ferro d'alta afinitat

El creixement bacterià en els teixits infectats es veu limitat no només per l'acció dels mecanismes de defensa de l'hoste, sinó també per la disponibilitat de ferro a l'ambient. La major part del ferro es troba associat a proteïnes de l'organisme hoste, ja siguin intracel·lulars (mioglobina, ferritina, hemoglobina,...) com extracel·lulars (lactoferrina i transferrina). Per superar aquesta limitació de nutrició, molts bacteris secreten compostos quelants que reben el nom de sideròfors, són de baix pes molecular i presenten una elevada afinitat pel ferro.

A la família dels enterobacteris s'han descrit dos grups de sideròfors, essent l'enterobactina i l'aerobactina els membres més destacats. L'enterobactina és el principal sistema de captura de ferro dels enterobacteris. Té una elevada afinitat pel ferro que li permet competir de manera efectiva amb la transferrina, aconseguint segrestar així, el ferro extracel·lular. En el cas de l'aerobactina, la seva afinitat pel ferro és inferior i la font predominant de ferro la formen les pròpies cèl·lules de l'organisme hoste [21]. Altres característiques que permeten diferenciar a aquests dos sideròfors afecten tant a la seva distribució com a la seva participació en la virulència del bacteri. Així, mentre que l'enterobactina se sintetitza a quasi tots els aïllats clínics d'enterobacteris, incloent-hi *K. pneumoniae*, la síntesi de l'aerobactina varia entre els diferents gèneres d'enterobacteris, essent baixa a *Klebsiella*. Encara que, únicament en el cas de l'aerobactina s'ha pogut comprovar clarament la seva implicació en la virulència bacteriana. En un estudi de Nassif i Sansonetti [22] es demostra que la introducció del gen de l'aerobactina en una soca avirulenta de *K. pneumoniae*, que no produïa sideròfor, contribueix a l'augment de la virulència del mutant en un model de peritonitis en ratolí.

I. 1. 3 Infeccions causades per *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella està clàssicament considerada com un dels agents etiològics de pneumònia severa extrahospitalària, especialment en pacients alcohòlics. Tot i això, la gran majoria d'infeccions per *Klebsiella* es produeixen en un context hospitalari. Actualment, es troba entre els cinc bacteris gramnegatius patògens més freqüentment aïllat a les infeccions hospitalàries. Com a patògen oportunista, *Klebsiella* spp afecta sobretot als individus immunocompromesos que estan hospitalitzats i que pateixen malalties com la diabetis o MPOC. Als Estats Units, *Klebsiella* suposa entre el 3-7% de les infeccions nosocomials bacterianes, convertint-se en un dels 8 patògens infecciosos més importants als hospitals [23-24]

Taula I. 2 Infeccions adquirides a l'hospital causades per *Klebsiella*

Tipus d'infecció	% d'infeccions causades per <i>Klebsiella</i>	Rànquing de <i>Klebsiella</i> comparat amb altres patògens bacterians
Infecció urinària	6-17	5-7
Pneumònia	7-14	2-4
Sèpsia	4-15	3-8
Infecció de ferida	2-4	6-11
Infeccions a UCI	4-17	4-9
Sèpsia neonatal	3-20	2-8

Tal i com es detalla a la Taula I. 2, *K. pneumoniae* juntament amb *K. oxytoca*, aïllada en pacients hospitalitzats amb menor freqüència que *K. pneumoniae*, són causants principalment d'infeccions urinàries, pneumònia i sèpsia. Les espècies de *Klebsiella* es consideren entre els cinc agents que més freqüentment causen infeccions urinàries, de ferida i bacterièmies nosocomials i *Klebsiella* és el microorganisme aïllat en tercer lloc de freqüència com agent causal de pneumònies adquirides a l'hospital. Tot i que és menys prevalent que altres agents etiològics, *Klebsiella* causa infeccions amb important morbi-mortalitat. Així, per exemple, la pneumònia produïda per *Klebsiella pneumoniae* té un índex de mortalitat d'aproximadament el 50% tot i el tractament antibiòtic. La mortalitat assoleix índexs de fins el 100% en aquelles persones amb alcoholisme i bacterièmia, tot i l'ús de l'adequada teràpia antibiòtica.

El tractament amb antibiòtics administrat prèviament al pacient està associat de manera significativa amb l'adquisició de *Klebsiella* com a colonitzant, de fet, els percentatges s'incrementen proporcionalment al temps d'estança i l'ús d'antibiòtics [25]. La importància de l'increment d'aquesta colonització s'il·lustra amb l'observació de que la taxa de casos d'infeccions nosocomials causades per *Klebsiella* a pacients portadors intestinals de *Klebsiella* adquirida a l'hospital és quatre vegades superior a l'observada als no portadors. Les infeccions nosocomials degudes a *Klebsiella* són especialment problemàtiques a les unitats pediàtriques, sobretot a les unitats de cures intensives i nounats. *K. pneumoniae* està relacionada amb la sèpsia neonatal i la meningitis tant a infeccions neonatals precoces com tardanes [26]. Els brots causats per soques de *Klebsiella* multirresistent a les unitats de nounats, suposen un problema greu moltes vegades associat a una alta mortalitat.

Per tant, les infeccions adquirides a la comunitat causades per *Klebsiella*, afecten sobretot a persones de mitjana edat i majors amb problemes d'alcoholisme i són en forma de pneumònia. En el cas de les infeccions nosocomials afecten tant a adults com a nens, sobretot nens

prematur, pacients a les unitats de cures intensives de nounats i individus immunocompromesos hospitalitzats.

I. 1. 3. 1 Infeccions urinàries

El tracte urinari és la localització més freqüent d'infecció. *Klebsiella* causa entre el 6-17% de totes les infeccions del tracte urinari nosocomials i té una incidència encara més alta en pacients de risc, com pacients diabètics o amb bufeta neurògena [1]. La clínica de les infeccions del tracte urinari per *Klebsiella* és indistingible de la clínica de les infeccions causada per altres uropatògens comuns i inclou símptomes com la disúria, pol·laciúria, dolor lumbar i desconfort suprapúbic. La simptomatologia sistèmica com febre i mal estar general normalment ens indicaran pielonefritis o prostatitis. El tractament empíric habitual sol ser amoxicil·lina-àcid clavulànic i també cefalosporines. L'alternativa són les quinolones.

I. 1. 3. 2 Infeccions respiratòries

Les pneumònies adquirides a la comunitat produïdes per *Klebsiella* són infreqüents, però tot i així s'han de tenir presents sobretot en aquells malalts amb malalties de base debilitants com l'alcoholisme, diabetis o MPOC, amb les defenses de les vies respiratòries alterades i especialment en aquells que necessiten tractament hospitalari. Els microorganismes assoleixen els pulmons per l'aspiració d'aquells que estan colonitzant l'orofaringe. Aquesta pneumònia es caracteritza per un començament brusc i sovint una evolució i resolució fatal tot i el tractament antibiòtic instaurat a temps. Comença amb febre, mal estar general, tos productiva i abundant, dispnea i dolor al pit. Generalment s'afecten els lòbuls superiors dels pulmons i és freqüent la tendència a evolucionar cap a la formació d'abscessos, necrosi, adhesions pleurals, cavitació i empiema [27-28].

Quan la pneumònia és adquirida a l'hospital també es tracta d'una pneumònia lobar, necrotitzant i greu. Afectant sovint els lòbuls superiors i produint destrucció tissular com la descrita anteriorment [27]. El mecanisme més important de patogènesi és la microaspiració dels bacteris que colonitzen l'orofaringe. Quan la colonització orofaríngia està establerta, l'aspiració silent d'aquests bacteris potencialment virulents pot afectar les pròpies defenses del pulmó i derivar en pneumònia. En aquells pacients que han estat ventilats mecànicament, el tub endotraqueal juga un paper important en la patogènesi de la pneumònia; el mateix tub altera les defenses de les vies respiratòries altes i pot facilitar el pas de flora orofaríngia a les vies baixes. Els tractaments empírics habituals quan es sospita aquest tipus de pneumònies són les cefalosporines i els betalactàmics amb inhibidors de la beta-lactamasa (amoxicil·lina-àcid clavulànic o piperacil·lina-tazobactam). En casos d'al·lèrgia, les quinolones són bones

alternatives encara que, varis estudis alerten de l'augment de soques de *Klebsiella* resistents a aquests antimicrobians [29-31].

I. 2 MECANISMES DE RESISTÈNCIA

A més de ser un dels microorganismes més freqüentment associats a la infecció nosocomial, l'interès per *K. pneumoniae* ha augmentat recentment degut a l'aparició de soques resistents als antibiòtics habituals [25, 32-34]. *K. pneumoniae* és intrínsecament resistent a penicil·lina, ampicil·lina, amoxicil·lina, oxacil·lina, carbenicil·lina i ticarcil·lina degut a la producció intrínseca d'una beta-lactamasa SHV-1 cromosòmica. No es coneix bé si l'enzim SHV-1 (transportat per plasmidis en altres enterobacteris) es tracta d'una beta-lactamasa cromosòmica històrica de *K. pneumoniae*, o bé, si SHV-1 va convertir-se en prevalent des de la introducció de l'ampicil·lina. A més, *Klebsiella* pot adquirir plasmidis que contenen material genètic per produir altres beta-lactamases [35]. Entre aquests aïllaments resistents als antibiòtics destaquen especialment les soques productores de BLEE, que confereixen la resistència a la majoria de betalactàmics disponibles fins ara, les soques productores d'AmpC mitjançada per plasmidis, i també la resistència a aminoglicòsids a través d'enzims modificadors d'aquests. Un problema afegit és la facilitat amb què *K. pneumoniae* acumula altres mecanismes de resistència que actuen conjuntament amb aquests enzims, disminuint les opcions terapèutiques [36]. Per tant, *K. pneumoniae* a part de tenir un paper important com a bacil gramnegatiu causant d'infeccions nosocomials, també és una font important de transmissió de resistència antibiòtica [37].

Els principals mecanismes de resistència coneguts a *K. pneumoniae* estan basats en la presència de beta-lactamases i a canvis de la permeabilitat de la membrana que alteren la penetració i/o expulsió dels antibiòtics. Aquests tipus de mecanismes de resistència seran també els utilitzats a les soques objecte dels estudis exposats a continuació.

I. 2. 1 Beta-lactamases

Els betalactàmics continuen essent el grup d'antibiòtics més flexible, gràcies a la seva versatilitat i diversitat en termes de propietats químiques, espectre antibacterià i tipus d'administració. La gran amenaça dels betalactàmics és la diversificació i proliferació de les beta-lactamases. Les beta-lactamases són enzims produïts per alguns bacteris que inactiven els betalactàmics mitjançant l'acció damunt l'anell betalactàmic. Ja que penicil·lines, cefalosporines i carbapenems estan inclosos en molts protocols de tractament de la majoria de malalties infeccioses, la presència i les característiques d'aquests enzims juguen un paper important en la selecció del tractament adequat.

Existeixen dos esquemes de classificació de les beta-lactamases actualment en ús. La classificació molecular o sistema d'Ambler està basada en la seqüència d'aminoàcids i divideix les beta-lactamases en classe d'enzims A, C, i D, que utilitzen serina per la hidròlisi dels betalactàmics i classe B, que necessita d'ions divalents de zinc com a substrat per la hidròlisi. L'esquema de classificació funcional està basat en la classificació basada per Bush *et al.* el 1995 [38]. Aquesta classificació té en compte els substrats i els perfils inhibidors amb la intenció d'agrupar els enzims de manera que es puguin relacionar amb el seu fenotip de resistència en els aïllats clínics [39]. La Taula I. 3 representa una versió extensa de la classificació funcional proposada inicialment per Bush al 1989 i ampliada el 1995 [38]. Aquesta taula representa la classificació funcional i l'estructural, basada en informació de domini públic [39]. Així doncs, les beta-lactamases es classifiquen en:

Grup 1 Cefalosporinases: pertanyen a la classe molecular C i estan codificades en els cromosomes de molts enterobacteris i altres organismes. Són més actives a les cefalosporines que a la penicil·lina i normalment són resistents a la inhibició per l'àcid clavulànic. Són actives front cefamicines com la cefoxitina i tenen alta afinitat per l'aztreonam. A molts organismes l'expressió d'aquestes, també anomenades AmpC, és baixa però induïble quan s'exposa a determinats betalactàmics: amoxicil·lina, ampicil·lina, imipenem i àcid clavulànic. En aquest grup també es troben enzims mitjançats per plasmidis com FOX, CMY, ACT, DHA i MIR. Hi ha un nou subgrup del grup 1, 1e, amb enzims que tenen major activitat front ceftazidima i altres oximiino-betalactàmics, com a resultat de substitucions, insercions o delecions d'aminoàcids. S'han anomenat AmpC d'espectre estès.

Grup 2 Beta-lactamases serina: inclou les classes moleculars A i D, representa el grup més gran de beta-lactamases, degut a l'augment d'identificacions de BLEE en els darrers 20 anys. Es divideix en varis subgrups:

- 2a: penicil·linases: grup petit que inclou beta-lactamases d'espectre relativament limitat i que predominen en els grampositius. La majoria d'aquests enzims són cromosòmics, tot i que algunes penicil·linases dels estafilococs es troben en plasmidis.
- 2b: beta-lactamases que hidrolitzen penicil·lines i cefalosporines d'espectre estret o petit; són inhibides per l'àcid clavulànic i el tazobactam. Inclou enzims com TEM-1, TEM-2 i SHV-1, que són les beta-lactamases mitjançades per plasmidis que més comunament s'identificaven als anys 1970s i principis dels 1980s.
- 2be: BLEE. El primer subgrup 2be va derivar de substitucions d'aminoàcids a les clàssiques TEM-1, TEM-2 i SHV-1, augmentat el seu espectre d'hidròlisi. Ràpidament han proliferat els enzims tipus CTX-M, no relacionats amb els anteriors. Finalment, BLEEs menys comuns, tampoc relacionades amb TEM, SHV o CTX-M inclouen: BEL-1, BES-1, SFO-1; TLA-1, TLA-2 i membres de les famílies PER i VEB.

- 2br: beta-lactamases d'ampli espectre que s'han fet resistents a l'àcid clavulànic.
- 2ber: inclou enzims del tipus TEM, que combinen espectre estès amb una resistència relativa a l'àcid clavulànic; també s'han anomenat CMT: complex mutant de TEM, que inclouen TEM-50.
- 2c: penicil·linases que es caracteritzen funcionalment per hidrolitzar carbenicil·lina o ticarcil·lina.
- 2ce: inclou una beta-lactamasa carbenicil·linasa d'espectre estès recentment descrita: RTG-4 (CARB-10) que té activitat front cefepime i cefpiroma.
- 2d: beta-lactamases amb capacitat d'hidròlisi a la cloxacil·lina o oxacil·lina. Són coneguts com enzims tipus OXA.
- 2de: són enzims que hidrolitzen cloxacil·lina o oxacil·lina amb un espectre estès que inclou oxiimino-betalactàmics però no carbapenems. La majoria d'aquests enzims deriven d'OXA-10, com OXA-11 i OXA-15.
- 2df: beta-lactamases tipus OXA amb activitat hidrolítica front els carbapenems. Sobretot apareixen en aïllats d'*Acinetobacter baumannii*, i normalment produït per gens que estan localitzats al cromosoma.
- 2e: Cefalosporinases que inclouen l'habilitat d'hidrolitzar cefalosporines d'espectre estès i són inhibides per l'àcid clavulànic o tazobactam.
- 2f: Carbapenemases, de classe molecular A. Inclou tipus IMI, GES i KPC; aquestes últimes recentment relacionades amb brots epidèmics per gramnegatius multiresistents

Grup 3: Metallo-beta-lactamases (MBL): formen un únic grup de beta-lactamases tant estructuralment com funcionalment, sovint es produeixen en combinació amb altres beta-lactamases. Es diferencien de les altres pel seu requeriment en ions zenc. Funcionalment, es diferenciaven al principi per la seva capacitat d'hidrolitzar carbapenems, però ara existeixen algunes beta-lactamases serina amb aquesta habilitat. Les MBL es caracteritzen per tenir poca afinitat o capacitat hidrolítica pels monobactams i no són inhibides per l'àcid clavulànic o tazobactam; però si són inhibides per quelants d'ions metall com l'EDTA. Segons la seva estructura també s'han subdividit en classes:

- 3a: MBL que inclouen les principals famílies codificades en plasmidis: IMP, i VIM sovint es troben en bacteris no fermentadors però també en enterobacteris
- 3b: grup petit de MBL que preferentment hidrolitzen carbapenems més que penicil·lines i cefalosporines.

S'han identificat més de 350 beta-lactamases diferents, quasi un terç d'elles són capaces d'hidrolitzar les oxiimino-cefalosporines (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, cefuroxima) i l'aztreonam. Aquestes, anomenades BLEE, es defineixen per consens com "beta-lactamases generalment adquirides i no inherents a una espècie que, o bé confereixen

resistència a les oximiino-cefalosporines però no carbapenems, o bé presenten un augment de l'habilitat per fer-ho, quan ho comparem amb altres membres de la família relacionats genèticament" [40].

La prevalença de BLEE és alta arreu i és degut a varis factors: ús incontrolat d'antibiòtics d'ampli espectre, la identificació limitada dels bacteris productors de BLEE per part dels laboratoris de microbiologia clínica i la probabilitat de transmissió entre pacients, degut a la massificació i als errors alhora de prendre mesures de contacte i en els procediments de rentat de mans. Inicialment, les BLEE, es trobaven sobretot afectant pacients ubicats a unitats de cures intensives amb infeccions causades per *K. pneumoniae* i *Enterobacter cloacae*, actualment les BLEE sobretot es troben en aïllats d'*E. coli* de pacients que viuen en residències o en centres socio-sanitaris amb infeccions adquirides a la comunitat. La prevalença de BLEEs a Europa és més alta que al EEUU però inferior que Àsia i Sud-Amèrica. Mentre que a Europa la prevalença de BLEE a *K. pneumoniae* ha augmentat del 9% al 13,6%, a EEUU els aïllats de *K. pneumoniae* productora de BLEE han disminuït de 7,2% a 4,4% [41]. Les dades espanyoles mostren un augment important de portadors fecals que han passat a ser de <1% al 1991 al 12% al 2003 a pacients hospitalitzats, i en pacients comunitaris la prevalença ha passat de ser de <1% al 1991 a 5% al 2003 [41].

En el cas de les BLEEs descobertes a *K. pneumoniae* ha crescut en els últims anys de forma exponencial com pot revisar-se amb detall a <http://www.lahey.org/studies>.

Els carbapenems, el moxalactam i les cefamicines (cefexitina, cefotetan) s'escapen de l'acció hidrolítica de les BLEE. Aquest fet junt a que els microorganismes que produeixen BLEE sovint també porten gens que codifiquen resistència a altres classes d'antibiòtics, incloent quinolones, aminoglicòsids i tetraciclins ha fet que les opcions terapèutiques siguin limitades i que els carbapenems siguin considerats el tractament més efectiu per les infeccions greus causades per organismes productors de BLEE.

En resum, la gran majoria de beta-lactamases que trobem en la pràctica clínica pertanyen a les famílies de TEM, SHV i CTX-M, i és la seva propagació, i sobretot la de la BLEE tipus CTX-M, la que és motiu de preocupació a nivell de salut pública.

Taula I. 3. Classificació de les beta-lactamases. Basada en la referència [39].

Grup Bush-Jacoby (2009)	Sistema de Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Classes moleculars. Sistema d'Ambler	Substrats	Inhibides per		Característiques principals i enzims representatius
				CA o TZB ^a	EDTA	
1	1	C	Cefalosporines	NO	NO	Major hidròlisi a cefalosporines que penicil·lina. Hidrolitza cefamícin. AmpC d' <i>E.coli</i> , P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cefalosporines	NO	NO	Hidròlisi augmentada a ceftazidima i altres oximiino-betalactàmics. GC-1, CMY-37
2a	2a	A	Penicil·lines	SI	NO	Major hidròlisi penicil·lines que cefalosporines. PC1
2b	2b	A	Penicil·lines i primeres cefalosporines	SI	NO	Ampli espectre: TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporines espectre estès i monobactam	SI	NO	Espectre estès: TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicil·lines	NO	NO	Resistència a l'àcid clavulànic, tazobactam i sulbactam. TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporines espectre estès i monobactam	NO	NO	Espectre estès i resistència a l'àcid clavulànic, tazobactam i sulbactam. TEM-50
2c	2c	A	Carbenicil·lina	SI	NO	Hidròlisi carbenicil·lina. PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicil·lina, cefepime	SI	NO	Hidròlisi carbenicil·lina, cefepime i ceftiroma. RTG-4
2d	2d	D	Cloxacil·lina	variable	NO	Hidròlisi cloxacil·lina o oxacil·lina. OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporines espectre estès	variable	NO	Hidròlisi cloxacil·lina o oxacil·lina i oximiino-betalactàmics. OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	variable	NO	Hidròlisi cloxacil·lina o oxacil·lina i carbapenems. OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporines espectre estès	SI	NO	Hidròlisi cefalosporines, inhibides per àcid clavulànic però no aztreonam. CepA
2f	2f	A	Carbapenems	variable	NO	Hidròlisi carbapenems, oximiino-betalactàmics, cefamícin. KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B	Carbapenems	NO	SI	Hidròlisi ampli espectre carbapenems però no monobactams. VIM-1, IMP-1, CcrA, IND-1
3b	3	B	Carbapenems	NO	SI	Hidròlisi carbapenems CphA, Sfh-1

^aCA: àcid clavulànic; TZB, tazobactam ^bNI: no incloses

I. 2. 1. 1 Beta-lactamases tipus TEM i SHV

L'origen de les beta-lactamases tipus TEM encara és incert. SHV-1 deriva de la beta-lactamasa cromosòmica de classe A de *Klebsiella pneumoniae*. No cal dir que, l'ús massiu d'oxiimino-cefalosporines, que encara són tractaments d'elecció per pneumònies, infeccions intraabdominals, i infeccions urinàries a la majoria d'hospitals d'arreu del món, ha suposat una gran pressió per la selecció de resistències. Al 1982, Kliebe *et al* [42], varen descriure una soca de *K. pneumoniae* provinent d'Alemanya amb una beta-lactamasa del tipus SHV-2, mutant de SHV-1 i que era capaç d'hidrolitzar oxiimino-cefalosporines. Sorprenentment, no varen registrar-se més mutants fins al cap de 5 anys, que Sirot *et al* varen descriure varies soques de diferents espècies d'enterobacteris que presentaven una cefalosporinasa derivada de TEM-1, mutant de tres aminoàcids i que es va anomenar TEM-3 [43].

Actualment, les variants de TEM i SHV catalogades han crescut fins a 175 i més de 120, respectivament, (veure <http://www.lahey.org/studies>) la majoria d'elles amb activitat front les oxiimino-cefalosporines. Les primeres variants de TEM i SHV, identificades els anys 1970s i 1980s es caracteritzen per la hidròlisi de cefalosporines de primera i segona generació i són inhibides per l'àcid clavulànic i tazobactam; inclouen els enzims TEM-1, TEM-2 i SHV-1 i formen part del subgrup 2b de la classificació de Bush i Jacoby. També trobem beta-lactamses del tipus TEM i SHV dins el grup 2br, com TEM-30, TEM-31, TEM-163, SHV-10 i SHV-72, que tenen el mateix espectre d'activitat front els betalàctàmics però són resistents a l'àcid clavulànic i tazobactam.

Dins el grup 2be trobem altres enzims derivats de TEM i SHV amb grau de resistència a les cefalosporines de 3a o 4a generació i aztreonam variable depenent del tipus d'enzim i de l'aïllament (<1a 256 mg/dL) i són inhibits per l'àcid clavulànic i el tazobactam; hi ha enzims amb major nivell de resistència a la ceftazidima que a la cefotaxima (com TEM-5, TEM-24, SHV-4, SHV-5).

Per afegir més complexitat, el subgrup 2ber inclou beta-lactamases tipus TEM, que són resistents als inhibidors de beta-lactamases i presenten resistència d'espectre estès, com TEM-50 i TEM-158 i que tenen un conjunt de mutacions descrit prèviament a TEM-12 (activitat BLEE) i a TEM-39 (activitat de TEMs resistents als inhibidors)[44].

A *K. pneumoniae* els tipus TEM més estesos són TEM-3 i TEM-4 aïllats sobretot a UCIs. També podem trobar soques amb TEM-1 i hiperproducció d'aquesta, donant lloc a un fenotip caracteritzat per resistència a l'àcid clavulànic i cefalosporines de 1a generació. A la família SHV, un dels enzims més prevalent a *K. pneumoniae* és SHV-12 [41]. També podem trobar soques de *Klebsiella* amb expressió d'alt nivell de SHV-1 (present de forma natural en el

cromosoma de la majoria de soques clíniques de *K. pneumoniae*), que pot arribar afectar cefalosporines de 2a generació i inclús ceftazidima.

I. 2. 1. 2 Beta lactamases tipus CTX-M

Els enzims de tipus CTX-M han protagonitzat una ràpida i forta expansió mundial des de finals dels anys 90, reemplaçant en gran mesura a les BLEEs de tipus SHV i TEM. Són un grup d'enzims de classe A molecular i funcionalment estan classificades totes dins el subgrup 2be. S'han reconegut a pràcticament tot el món [45]. Les primeres soques productores de BLEE tipus CTX-M es varen publicar a finals dels 1980 a Japó, Europa i Argentina [46]. Durant els últims 15 anys, aquest tipus de BLEE ha protagonitzat una propagació ràpida i global, i a segons quins llocs les BLEEs tipus CTX-M són més nombroses que les clàssiques del tipus TEM i SHV. Dels últims estudis de vigilància se n'extreu que s'han publicat soques de *K. pneumoniae* i *E. coli* productores de BLEE tipus CTX-M a Sud-Amèrica, Àsia i Europa, mentre que s'observa poca incidència a Canadà [47]. A Espanya, l'índex de producció d'enzims tipus CTX-M és del 12,5% a aïllats productors de BLEE de *K. pneumoniae*, amb predomini del grup 9 (CTX-M-9 i CTX-M-14) i grup 1 (CTX-M10) [48] (Figura I. 3). Es coneixen almenys 80 tipus de beta-lactamases CTX-M i es divideixen en 5 grups segons la seqüència d'aminoàcids: CTX-M-1, -M-2, M-8, M-9, M-25. Cadascun d'aquests grups està relacionat amb beta-lactamases cromosòmiques de diferents espècies de *Kluyvera* que podrien haver-se mobilitzat per transposició. La propagació horitzontal dels gens bla_{CTX-M} entre les soques d'una mateixa o diferent espècie d'enterobacteris és en gran mesura produïda per plasmidis, que sovint transporten altres mecanismes de resistència addicional [46], per això, en aquestes soques se sol observar coresistència a quinolones i aminoglicòsids. El nom de CTX ve donat per la seva activitat hidrolítica front cefotaxima i molta menor afectació de ceftazidima. Tot i que, noves beta-lactamases CTX-M derivades d'altres per mutacions puntuals augmenten l'activitat front ceftazidima [46]; per exemple CTX-M-15,-16,-27 i -32 es diferencien de CTX-M-3,-9,-14 i -1, respectivament, únicament per la substitució Asp240Gly, però són molt més actives front ceftazidima. El clúster CTX-M-9 és el més prevalent a Espanya [48].

Encara que els carbapenems es mantenen estables als enzims de tipus CTX-M, ja s'han publicat casos d'aparició de resistència a carbapenems durant el tractament amb aquests en soques de *K. pneumoniae* productora de CTX-M-15 i CTX-M-1 degut a la pèrdua de porines [49-50].

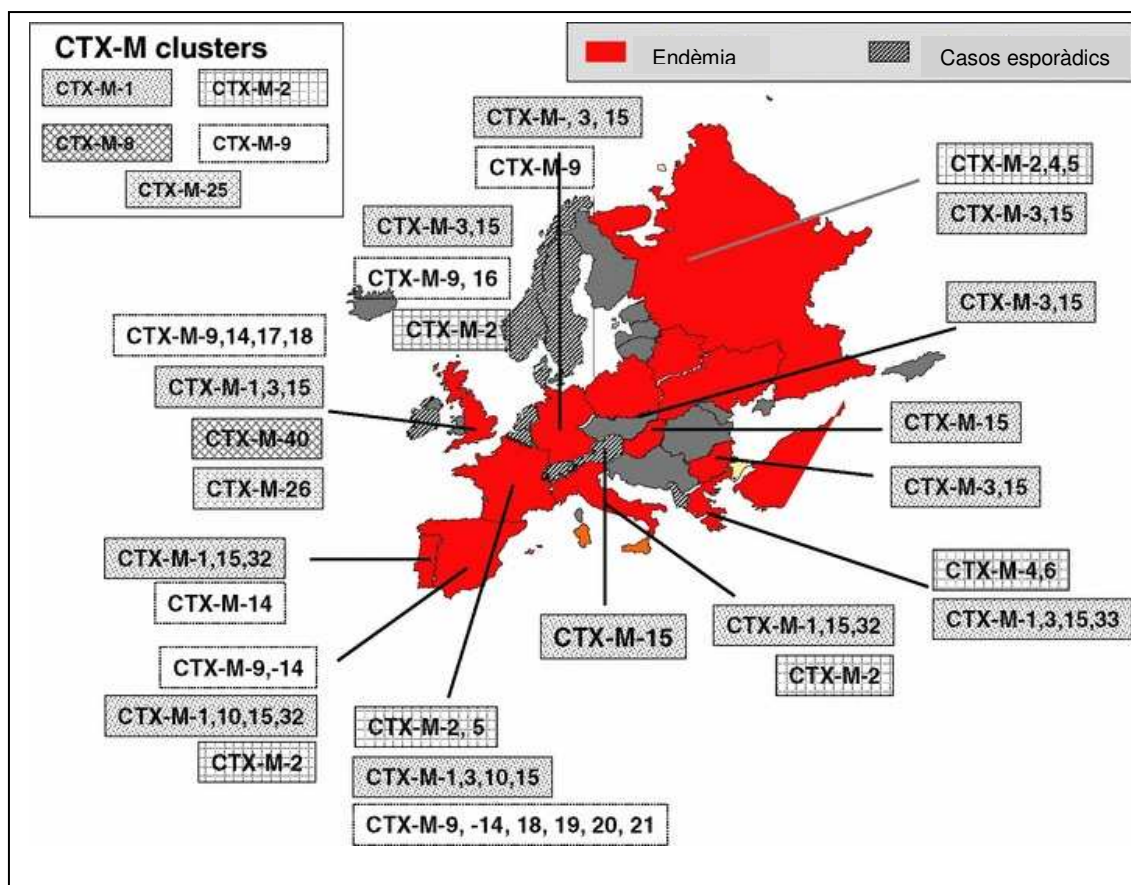


Figura I. 3 Distribució de les BLEEs tipus CTX-M a Europa. Mapa adaptat de la referència [41].

I. 2. 1. 3 Altres beta-lactamases

Altres grups de beta-lactamases adquirides amb perfils hidrolítics similars als de TEM i SHV i que també pertanyen a la classe molecular A han anat apareixent, però amb diferent evolució. Entre elles destaquen les famílies PER, VEB, GES, TLA [44, 51]. Totes elles mitjançades per plasmidis, inhibides per l'àcid clavulànic i capaces d'hidrolitzar una o més oximiinocefalosporines i per tant incloses dins el grup 2be.

I. 2. 1. 4 Carbapenemases

Són enzims que hidrolitzen tots els betalactàmics, inclosos els carbapenems. Els trobem dins les classes A molecular i dins els grups 2f i 2e de la classificació funcional, que es caracteritzen per ser sensibles a l'acció dels inhibidors com l'àcid clavulànic; les carbapenemases d'aquesta classe descrites a *K. pneumoniae* són KPC-1 i KPC-3. També trobem aquest tipus d'enzims dins la classe B i grups 3a i 3b, on es denominen metalo-beta-lactamases per la necessitat d'ions de zinc en el seu centre actiu per poder exercir la seva activitat hidrolítica. Són inhibides per substàncies quelants d'ions com l'EDTA i l'àcid mercaptopropiònic, entre d'altres, i a més

tenen la característica de no presentar activitat front a aztreonam; a *K. pneumoniae* s'han descrit del tipus VIM i IMP. Per últim, les carbapenemeses de classe D i grup 2df, es caracteritzen per ser capaces d'hidrolitzar la cloxacil·lina i a la qual pertanyen els enzims tipus OXA, també s'han descrit a soques de *Klebsiella*, entre d'altres [44].

I. 2. 1. 5 Beta-lactamases del tipus AmpC

Aquest tipus de beta-lactamases són el resultat de la integració en plasmidis dels gens *ampC*, que varen migrar del cromosoma d'espècies naturalment productores d'AmpC (*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp. i *Pseudomonas* spp.) i que actualment s'han difós a enterobacteris com *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis*, etc. Les beta-lactamases plasmídiques del tipus AmpC, també anomenades cefamicinases plasmídiques, són enzims de tipus serina, de la classe molecular C i incloses dins el grup 1 de la classificació funcional de Bush. No s'inhibeixen per l'àcid clavulànic i sí per la cloxacil·lina i l'aztreonam i el fenotip de resistència es caracteritza per afectar a cefalosporines de 2a i 3a generació a més de les combinacions amb inhibidors de beta-lactamases i amino-, carboxi-, i ureidopenicil·lines [52-53]. Característicament, són resistents a les cefamicines (cefexitina i cefotetan); aquest fet, juntament a la resistència a la inhibició per clavulànic, se sol utilitzar per diferenciar entre enzims tipus AmpC i BLEEs. Tot i que la resistència a cefexitina també pot ser deguda a d'altres mecanismes com la pèrdua de porines. Els carbapenems i les cefalosporines de 4a generació com cefepime i cefpiroma es mantenen actives front aquestes soques. Des de finals dels 80, quan es va descriure la primera beta-lactamasa AmpC plasmídica, s'han descrit nombrosos enzims d'aquest tipus al llarg de tot el món en diferents enterobacteris. En els últims anys estan tenint una incidència creixent, implicant-se en nombrosos brots nosocomials i amb importants índexs de fracàs terapèutic i mortalitat; encara que, la seva importància real segurament està infraestimada degut a la dificultat de detecció [32, 54-57]. Els plasmidis on s'han localitzat els gens *ampC* solen ser conjugatius i sovint transporten altres determinants de resistència que afecten quinolones, aminoglicòsids, tetraciclins, sulfonamides, cloramfenicol i també altres beta-lactamases. La seva importància com a problema no està tenint la mateixa consideració que les BLEEs, això implica un retràs en les mesures de control epidemiològic, podent afavorir la seva extensió en els últims anys. La majoria de laboratoris clínics inclouen en la seva rutina diària la detecció de soques productores de BLEEs, però no la detecció de beta-lactamases AmpC mitjançades per plasmidis. De fet, no es disposen recomanacions oficials per part dels comitès d'estandardització d'antibiogrames [58]. Existeixen varis tests fenotípics per detectar la presència d'AmpC. Entre els més utilitzats i senzills de realitzar trobem el test de doble-disc amb un disc de 500µg de cloxacil·lina (inhibidor betalactàmic) col·locat entre discs de cefotaxima i ceftazidima; i entre els quals s'ha d'observar sinèrgia. També, l'àcid borònic s'ha reconegut com a inhibidor de les beta-lactamases tipus AmpC. Per això s'han d'utilitzar discs de 300µg d'àcid borònic col·locats entre discs de cefotaxima i ceftazidima i entre els quals

s'ha d'observar sinèrgia, com en el cas anterior [58]. Els tests fenotípics no permeten diferenciar entre les diferents famílies d'enzims tipus AmpC mitjançats per plasmidis, és per això que el mètode de detecció estàndard d'or de beta-lactamases AmpC és la PCR.

I. 2. 2 Alteracions de la permeabilitat

Els embolcalls dels bacteris gramnegatius estan formats per tres capes ben diferenciades (Figura I. 4). La capa interna, corresponent a la membrana citoplasmàtica, la qual regula el pas de metabòlits tan d'entrada com de sortida del citoplasma; una capa prima de peptidoglicà que dóna rigidesa mecànica a la cèl·lula i que es troba a tots els bacteris menys en els micoplasmes; i la capa més exterior, la membrana externa, que és una barrera addicional formada de lípids, polisacàrids i proteïnes pròpia dels bacteris gramnegatius. La membrana externa conté una quantitat relativament alta d'àcids grassos saturats i fosfatidiletanolamina i té una permeabilitat reduïda als agents hidrofòbics. Als bacteris gramnegatius que viuen en el tracte intestinal dels animals, la membrana externa s'ha desenvolupat com una barrera molt eficient que protegeix les cèl·lules de l'acció de les sals biliars i de la degradació per part dels enzims digestius. A més, aquesta estructura actua com una barrera impermeable a molts antibiòtics grans i lipofílics com els macròlids, novobiocina, clindamicina, entre altres. Aquesta reduïda permeabilitat prevé de l'entrada de components tòxics ajudant al bacteri a sobreviure en ambients adversos [59]. Tot i aquesta relativa impermeabilitat la membrana externa conté diverses proteïnes que permeten l'entrada de components hidrofílics (nutrients) a la cèl·lula i la sortida de productes de rebuig. La membrana externa conté lipoproteïnes i proteïnes integrades, aquestes últimes formen una estructura transmembrana en forma de porus hidrofílics. Els porus no-específics es coneixen amb el nom de porines.

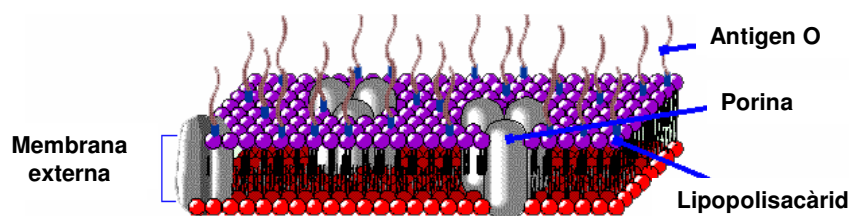


Figura I. 4 Representació esquemàtica de la membrana externa de *K. pneumoniae*.

1. 2. 2. 1 Porines

Les primeres porines identificades foren OmpF i OmpC (ambdues trimètriques) a *E. coli*, però anys més tard la identificació de les porines s'ha estès a moltes espècies de gramnegatius [59]. A *K. pneumoniae* també s'han descrit dues porines principals, OmpK35 (homòloga de OmpF) [60-61] i OmpK36 (homòloga de OmpC) [62]. A *Enterobacter* spp. s'han caracteritzat amb detall Omp35 i Omp36.

Si bé s'ha avançat en diversos camps, com per exemple en l'anàlisi de tipus funcional, el progrés més important en l'estudi de les porines ha estat indiscutiblement l'aclariment de la seva estructura tridimensional a través de difracció electrònica i cristal·lografia de rajos X [63-66]. Aquests estudis han demostrat que, tal i com s'havia predit en estudis anteriors, els monòmers de les porines travessen la membrana lipídica com un barril format per 16 fulles β , i que per això també rep el nom de barril β (Figura 1. 5). Aquestes fulles β estan clarament inclinades (entre 30 i 60°) respecte l'eix del barril, el què suposa un increment del diàmetre del porus [67-68]. La longitud d'aquestes fulles β varia entre 7 residus (fulla 5) i 16 (fulla 1) a la porina OmpF d'*E. coli*. El contacte entre monòmers s'estabilitza mitjançant interaccions hidrofòbiques i polars, i l'ansa extracel·lular 2 tendeix a encorbar-se sobre la paret del barril de la subunitat veïna, jugant un paper important en l'estabilitat de l'estructura. La superfície externa del barril està ocupada per cadenes lipofíliques. Curiosament molts residus aromàtics es localitzen a les interfases interna i externa entre la bicapa i el medi aquós [63, 69]. Un fenomen semblant passa a l'estructura de les proteïnes integrals de la membrana interna [70]. Just abans de conèixer-se l'estructura de les porines PhoE i OmpF es va veure que, de forma invariable, les seqüències de les porines mostraven un residu de fenilalanina en el seu extrem C-terminal. Aquest aspecte s'ha confirmat pràcticament a totes les proteïnes formadores de canals de la membrana externa, tot i que en comptades ocasions aquest residu C-terminal és un triptòfan. Aquest residu C-terminal es localitza a la interfase entre la membrana externa i el periplasma d'OmpF i PhoE [63], que podria explicar la seva conservació.

Les fulles transmembrana estan connectades per girs periplasmàtics curts, però les anses extracel·lulars que les connecten amb l'exterior són generalment llargues. Com s'ha dit anteriorment, l'ansa 2 s'aplega per facilitar la connexió amb el monòmer veí. L'ansa 3, que connecta les fulles 5 i 6, és especialment llarga (33 residus a OmpF) i s'aplega per introduir-se a l'interior del barril, limitant d'aquesta manera el diàmetre d'aquest.

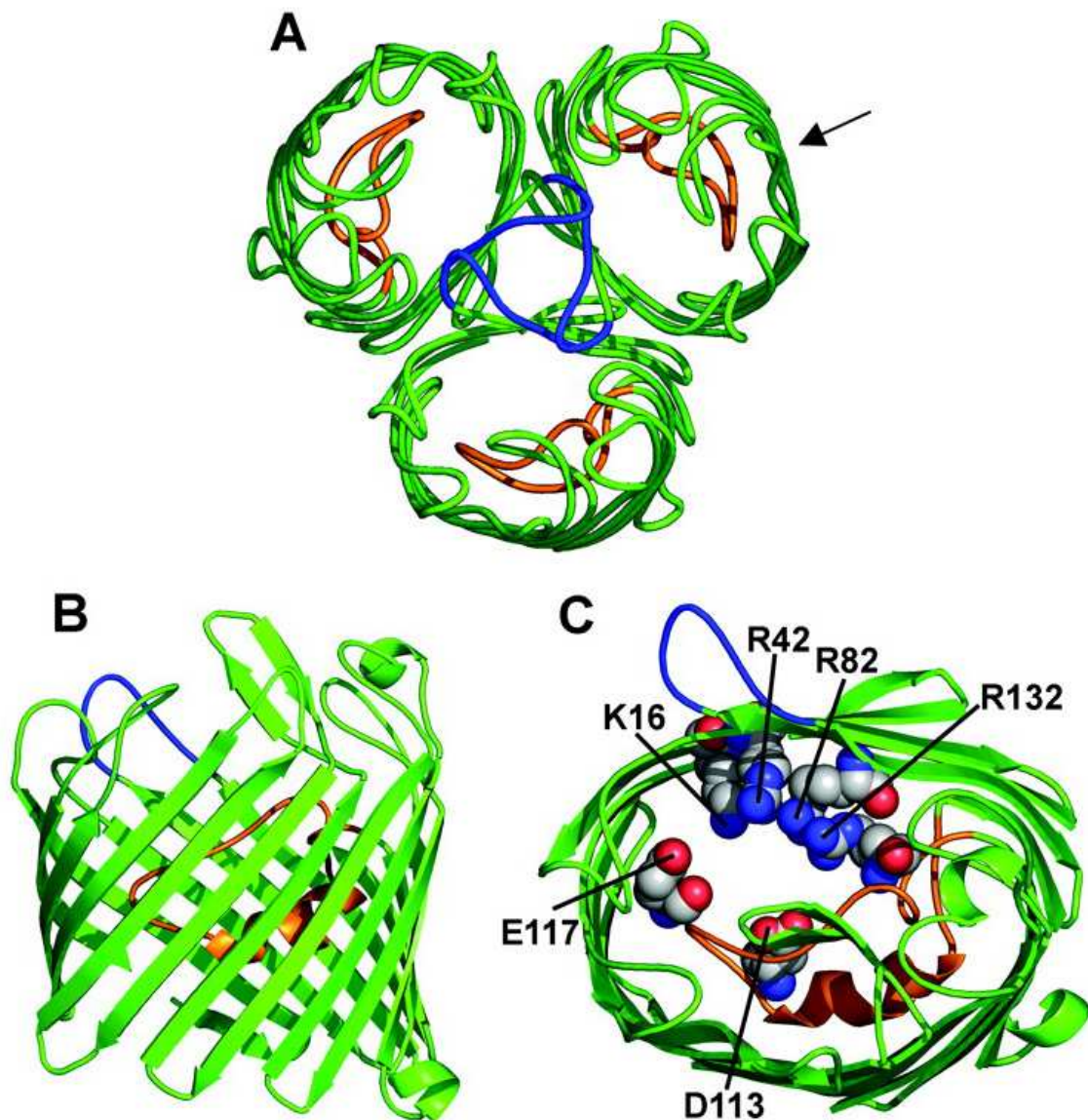


Figura 1.5 Estructura de la porina OmpF d'*E. coli* (A). Vista del trímer des de l'exterior de la cèl·lula perpendicular respecte al pla de la membrana. L'ansa 2 de cada monòmer en blau juga un paper important en la interacció amb el monòmer veí. L'ansa 3 de cada monòmer indicada amb taronja estrena el porus. (B) Vista lateral de la unitat monomèrica des del costat indicat amb la fletxa en el panell A. Les anses 2 i 3 estan d'igual color que en el panell A. (C) Vista del mateix monòmer des de l'exterior cel·lular mostrant la regió del porus. Aquesta regió està formada per Glu117 i Asp113 de l'ansa 3 i per 4 residus bàsics ubicats a la paret oposada del barril: Lys16, Arg82 i Arg132.

La naturalesa dels residus alineats a la paret del canal proporciona una explicació raonable de les característiques de la difusió a través de les porines. Per exemple, OmpF i PhoE prefereixen cations i anions, respectivament, tot i tenir un 72% d'homologia a la seqüència de la

proteïna madura. Aquesta diferència en la preferència de càrregues és deguda principalment a la substitució del residu Gly131 en el porus d'OmpF per una Lys125, amb càrrega positiva, a PhoE [63, 71-72].

El porus d'OmpC sembla que podria ser lleugerament menor que el d'OmpF segons les taxes de difusió de molècules orgàniques [73]. Tot i que encara no es coneix l'estructura cristal·logràfica d'OmpC d'*E. coli*, el nostre grup va descriure l'estructura de la seva homòloga a *K. pneumoniae*, OmpK36 [64]. Sorprenentment, tant la constricció de la regió del porus com la ubicació dels residus carregats són pràcticament idèntiques, el que dificulta en gran mesura l'explicació d'aquestes lleugeres diferències en la difusió. Una possibilitat és que el fet de que la majoria dels residus carregats d'OmpC estiguin dirigits cap a la llum del porus redueixi el radi funcional per la difusió dels soluts [74].

I. 2. 2. 2 Altres porus

E. coli també expressa la proteïna OmpA, homòloga de la porina principal de *Pseudomonas aeruginosa* OprF [59]. Proteïnes semblants a OmpA també s'han descrit a *K. pneumoniae*, OmpK34. Aquesta proteïna monomèrica permet la penetració de soluts, però amb una eficiència molt més baixa, unes 100 vegades menor que les porines no específiques trimètriques [59]. A més de les proteïnes principals també trobem altres porines de menor importància com OmpK37 a *K. pneumoniae* i OmpN a *E. coli*. No s'expressen a la membrana externa de soques que creixen sota condicions estàndard de laboratori, indicant que existeix una forta regulació dels seus gens [75]. La seqüència d'aminoàcids revela que la porina OmpK37 de *K. pneumoniae* és altament homòloga a les porines OmpS2 de *Salmonella typhi* i OmpN d'*E. coli*. L'expressió d'OmpK37 podria estar estimulada sota condicions (com la pressió antibiòtica) en què les seves característiques estructurals (el seu porus més petit) podria suposar un avantatge damunt les porines clàssiques; per això sobretot, es troba en aquelles soques deficientes en OmpK36 i OmpK35, com a resultat de la selecció en la resistència a betalactàmics [75].

K. pneumoniae també produeix porus específics, que catalitzen la difusió espontània de nutrients concrets. LamB permet l'entrada de derivats de maltosa, i actua de receptor del bacteriòfag lambda. PhoE catalitza l'entrada de fosfat, s'expressa únicament en condicions de carència de fosfats, encara que sobretot és un canal amb preferència pels anions. Ambdós tenen una estructura general semblant a les porines no específiques, però els residus que revesteixen l'interior del porus són suficientment diferents per donar-los una funcionalitat específica. En el cas de LamB, cada subunitat del trímer és un barril tipus β format per 18 fulls β transmembrana, a diferència de 16 de les porines clàssiques [76]. La funció fisiològica de

LamB a *E. coli* és facilitar l'entrada d'una àmplia varietat de carbohidrats quan estan presents en baixes concentracions en l'ambient [77].

L'estructura de PhoE té una homologia del 72% amb OmpF, tal i com ja s'ha comentat anteriorment.

I. 2. 2. 3 Pèrdua de porines i resistència antimicrobiana

La pèrdua de porines s'ha relacionat amb un increment de la resistència a agents antimicrobians hidrofílics; els estudis sobre aquesta àrea s'han focalitzat en els betalactàmics i les fluoroquinolones. Les soques de *K. pneumoniae* productores de BLEE solen expressar només una de les dues porines. Sovint només expressen OmpK36 més freqüentment que les soques no productores de BLEE, que normalment expressen les dues porines: OmpK36 i OmpK35 [78-79]. La pèrdua aïllada d'OmpK35 o d'OmpK36 a soques sense cap mecanisme de resistència només augmenta de forma mínima la resistència basal, però quan existeixen altres mecanismes juntament a la pèrdua de les porines, aquest exerceix un efecte multiplicador sobre la resistència. El nivell de resistència és màxima quan es perden alhora OmpK36 i OmpK35, que al mateix temps pot afavorir la selecció addicional d'altres mecanismes de resistència.

Els mecanismes de control de la pèrdua de porines a *K. pneumoniae* estan encara poc entesos. Però, està descrit que la pèrdua de la porina OmpK36 tant a soques clíniques com en el laboratori es produeix per la interrupció directa del gen *ompk36* ja sigui per la inserció de seqüències i menys freqüentment, per mutacions puntuals o delecions. La pèrdua de la porina OmpK35 podria estar controlada per mecanismes similars als descrits per OmpK36 [80]. La pèrdua de porines deguda a les insercions de seqüències en els gens de les porines és un mecanisme que apareix *in vivo* en aquells pacients que estan amb tractament antibiòtic; aquests canvis en el gen de la porina podrien ajudar a les cèl·lules a adaptar-se als canvis del medi i augmentar la seva capacitat de supervivència [80].

El tractament d'infeccions causades per *K. pneumoniae* productora de BLEE és difícil no només degut a la seva resistència a les cefalosporines d'espectre estès sinó també per la resistència a d'altres agents antimicrobians codificats en el mateix o diferent plasmidi. Les cefamicines o els carbapenems serien dels betalactàmics les opcions més raonables, ja que les beta-lactamases no hidrolitzen la cefoxitina ni els carbapenems. S'ha observat però, que els tractaments amb cefoxitina poden seleccionar mutants de *Klebsiella* deficients en les dues porines principals [79]. A *K. pneumoniae* un bon marcador de la doble pèrdua és la resistència a la cefoxitina; tot i que la resistència a cefoxitina no és un marcador específic de la pèrdua de porines, ja que també s'observa a soques que produeixen una beta-lactamasa plasmídica tipus

AmpC. En el cas de la producció d'AmpC a part d'afectar-se la cefoxitina també s'alteren les CMI's de cefotetan (una altra cefamicina), cosa que no passa amb la pèrdua de porines [79].

Els carbapenems, com ja s'ha comentat anteriorment, són actius també front soques productores de BLEE, inclús en aquelles soques que han perdut les porines principals. Però, s'han descrit soques clíniques de *K. pneumoniae* resistents als carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem). S'ha descrit resistència a imipenem i meropenem en una soca de *K. pneumoniae* productora de SHV-2 i deficient en OmpK35 i amb expressió reduïda d'OmpK36 [81]. També, Mena *et al.* varen descriure un brot nosocomial causat per *K. pneumoniae* productora de BLEE tipus CTX-M-1, en què durant el tractament amb carbapenems dos pacients varen desenvolupar resistència a aquests degut a la pèrdua de l'expressió de les dues porines principals [50]. La resistència a carbapenems també s'ha observat quan una soca deficient en les dues porines principals també expressa beta-lactamases del tipus AmpC o carbapenemases dels grups A o D [82-83]. De fet, els valors de CMI's més alts pels carbapenems es troben en aquelles soques de *K. pneumoniae* deficientes en les dues porines amb beta-lactamases del grup 1 tipus AmpC com ACT-1, DHA-1 i FOX-1 i per carbapenemases grup 2f: KPC-1. En moltes d'aquestes soques la pèrdua de sensibilitat és més marcada per ertapenem que per imipenem i meropenem [52, 84-85].

Les soques de *K. pneumoniae* productores de BLEE i deficientes en les dues porines principals presenten més freqüentment una bomba d'efluxió, podria ser que el mecanisme d'efluxió funcionés més bé en aquelles soques deficientes en porines. En aquests casos també observaríem resistència a quinolones [86].

La importància que tenen altres porus específics sobre la resistència antibiòtica a *K. pneumoniae* està menys estudiada. No està clara si la funció de l'expressió de LambB podria facilitar la penetració de components hidrofílics i si la seva pèrdua suposaria un augment de la resistència. És possible que l'expressió de PhoE sigui responsable de la sensibilitat a carbapenems en aquelles soques amb deficiència de les porines principals; i que la disminució de la regulació de *phoE* estaria implicada en la resistència als carbapenems [83, 87].

I. 2. 3 Expulsió activa: bombes d'efluxió

Efluxió és el bombeig d'un solut fora de la cèl·lula. Els gens i proteïnes de les bombes d'efluxió estan presents tant en els bacteris sensibles com en els resistents als antibiòtics. Alguns dels sistemes poden estar induïts pels seus substrats i per això una soca aparentment sensible pot sobreproduir un bomba i convertir-se en resistent. La resistència als antibiòtics en un mutant de bomba és deguda a un dels dos mecanismes següents: per la sobreexpressió de la proteïna de

la bomba d'efluxió, o bé perquè s'hagin produït substitucions en els aminoàcids de les proteïnes que facin la bomba més eficient a l'exportació. Les bombes d'efluxió poden ser específiques d'un substrat o poden transportar un ventall ampli de components estructuralment diferents (incloent antibiòtics de diferents classes); algunes bombes poden estar associades a resistència a múltiples antibiòtics. La resistència en aquest context no vol dir necessàriament resistència a aquells antibiòtics que utilitzaríem per tractar una infecció per determinades espècies o resistència clínicament assolida per determinades concentracions d'aquests antibiòtics, i per tant, la rellevància clínica de la resistència produïda per les bombes d'efluxió és espècie, droga i infecció dependent.

Fa temps que es coneix que la funció fisiològica natural de les bombes d'efluxió multidroga als bacteris és la d'exportar substàncies nocives fora del bacteri permetent la supervivència d'aquest en ambients hostils. Les bombes d'efluxió s'avancen a l'era dels antibiòtics, i per tant la seva funció natural és poc probable que estigui relacionada amb l'ús d'antibiòtics. L'ambient natural en què es troben els patògens intestinals és ric en sals biliars i àcids grassos, això suggereix que una de les funcions fisiològiques dels sistemes d'efluxió actius sigui la de secreció de metabòlits intracel·lulars i la de protegir contra la varietat de substàncies que hi ha en aquest ambient. S'ha demostrat que mutants d'*E. coli*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, i *Campylobacter jejuni* que han perdut components de la bomba AcrAB-TolC són molt sensibles a la bilis i les sals biliars i que mutants que sobreexpressen components d'aquesta bomba són resistents a altes concentracions de bilis i sals biliars [88-95]. Per tant, s'ha suggerit que la funció primària de les bombes AcrAB-TolC d'*E. coli* i CmeABC de *C. jejuni* és la de permetre la supervivència dels bacteris intestinals en presència de bilis [91, 93].

Durant els últims 10 anys hi ha hagut publicacions esporàdiques implicant components de les bombes d'efluxió en la patogenicitat de l'organisme i/o la seva supervivència en el nínxol ecològic. Al 2002 Hirakata *et al.* [96] van concloure que el sistema d'efluxió MexAB-OrpM de *Pseudomonas aeruginosa* exportava determinants de virulència que contribuïen a la virulència d'aquest organisme. Jerse *et al.* [97] varen publicar que un sistema d'efluxió funcional MtrCDE a *Neisseria gonorrhoeae* augmentava la supervivència en un model d'infecció del tracte genital en ratolins femella. Aquests autors varen suggerir que això era degut a la capacitat de sobreviure en presència de substàncies mucoses. Més recentment, 2 grups per separat han demostrat que el sistema AcrAB-TolC de *S. enterica* serovar *Typhimurium* és important en la colonització dels pollets [98-99]. També s'ha demostrat en estudis de cultius tissulars que components de les bombes d'efluxió del tipus RND són importants per la invasió, adherència, i/o colonització de la cèl·lula hoste. En el mutant de *P. aeruginosa* PAO1 es va observar una disminució en la invasió cel·lular quan s'inactivava *mexB* [96]. Buckley *et al.* [99] també varen publicar que un mutant de *S. enterica* serovar *Typhimurium* amb absència de *tolC* tenia poca adherència tant a les cèl·lules humanes embrionàries d'intestí com als macròfags de ratolí

(RAW 264.7) i va ser incapaç d'envair els macròfags. El mutant *acrB* s'adheria però no envaïa els macròfags. En resum, totes aquestes dades suggereixen que el sistema de bomba d'efluxió juga un paper important en mitjançar l'adherència i el segrest del bacteri en les cèl·lules hoste, així com també és important en la supervivència de substàncies nocives en l'ambient local. Varis factors de virulència extracel·lulars, que són regulats per quòrum-sensing, fan de substrat en el sistema d'efluxió MexAB-OprM de *P. aeruginosa* [100-101]. S'ha suggerit que la disminució de la virulència de les soques de *P. aeruginosa* que sobreexpressen bombes d'efluxió podria ser degut a un augment dels senyals quòrum-sensing, d'aquesta manera es reduiria l'expressió de determinants de virulència regulats per molècules quòrum-sensing. Recentment, s'ha relacionat la sobreexpressió dels sistemes MexCD-OrpJ i MexEF-OrpN amb la reducció de l'expressió de gens que codifiquen components de secreció tipus III a *P. aeruginosa* [102].

Els gens que codifiquen les bombes d'efluxió es poden trobar en el cromosoma o bé en elements transmissibles com són els plasmidis. La genòmica ens ha demostrat que hi ha molts gens que codifiquen bombes d'efluxió de tots els tipus, com les que produeixen resistència a múltiples antibiòtics [103]. Hi ha també evidències de que la mida del genoma queda reflexada en el nombre de gens presents a la bomba, com més llarg és el genoma més nombre de gens de bomba [104-105]. Sovint, un sol organisme pot tenir múltiples bombes d'efluxió multidroga. Hi ha 5 famílies diferents de bombes d'efluxió (Figura I. 6); fins ara les famílies importants de bombes d'efluxió bacterianes codificades cromosòmicament són:

- RND: "*Resistance Nodulation Division*"
- MFS: "*Major Facilitator Superfamily*"
- SMR: "*Staphylococcal Multiresistance*"
- MATE: "*Multidrug and Toxic Compound Extursion*"
- ABC: "*ATP Binding Cassette*"

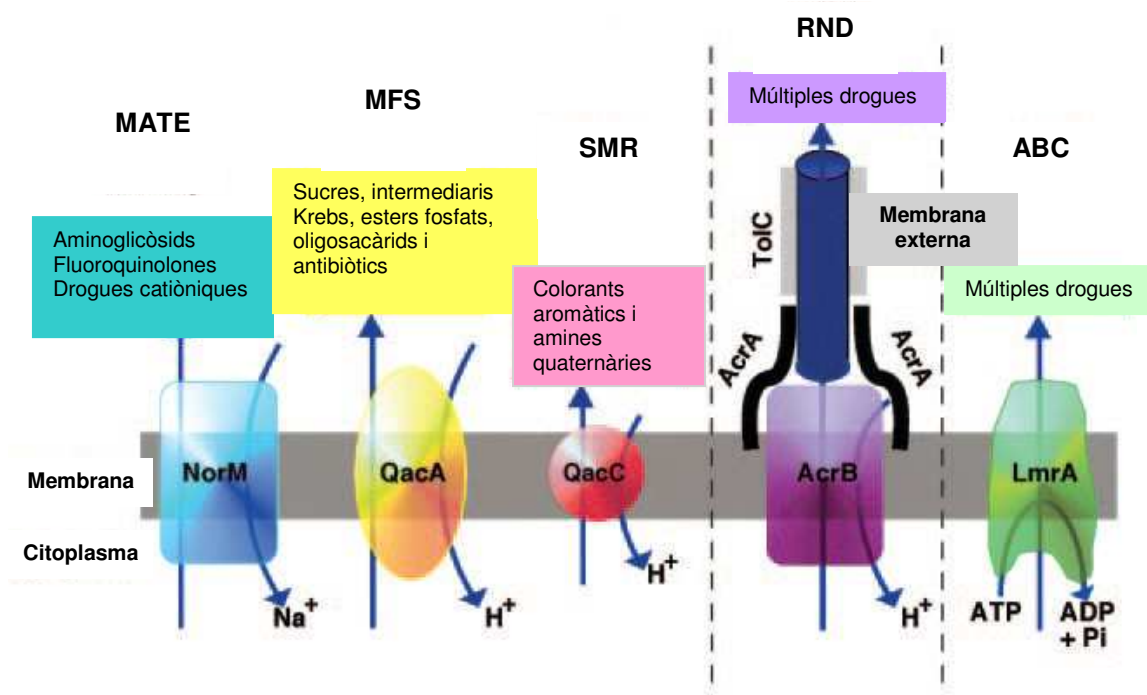


Figura I. 6 Comparació de les estructures de les cinc famílies de bombes d'efluxió

I. 2. 3 .1 Família RND: El model del sistema d'efluxió AcrAB

Genètica

Estructuralment, els sistemes d'efluxió de la família RND estan compostos per tres parts. Així per exemple, la bomba AcrAB, és el sistema d'efluxió del tipus RND més estudiat; a *E. coli* i a d'altres bacteris de gramnegatius com *K. pneumoniae* té tres components: una proteïna transportadora (efluxió) a la membrana interna (per exemple, AcrB), una proteïna periplasmàtica (per exemple, AcrA), i una proteïna canal a la membrana externa (per exemple, TolC) [106-107] o proteïna de membrana externa o factor de membrana externa. El component AcrB captura els seus substrats de la bicapa lipídica de la membrana interna o del citoplasma [108] i els transporta cap al medi exterior a través de TolC [109]. La cooperació entre AcrB i TolC està mitjançada per la proteïna periplasmàtica AcrA. Les comparacions genòmiques han donat a conèixer una homologia de fins el 70% entre els gens de les bombes i de fins >80% entre les seqüències d'aminoàcids de les proteïnes de les bombes de la família RND, intra espècie i entre diferents espècies bacterianes, per exemple *E. coli* *acrB/AcrB*, *P. aeruginosa* *mexB/MexB*, *C. jejuni* *cmeB/CmeB*, i *N. gonorrhoeae* *mtrD/MtrD*. Les organitzacions dels gens que codifiquen aquests sistemes d'efluxió de tres parts són també similars entre les diferents espècies. Típicament, els gens estan organitzats com a operons: el gen regulador està localitzat al costat del gen que codifica la proteïna periplasmàtica, que alhora està localitzat

contigu al gen de la proteïna de la bomba d'efluxió, que està localitzada al costat de la proteïna de membrana externa. La proteïna de fusió de membrana i la proteïna de bomba normalment es cotranscriuen. Per alguns sistemes i/o espècies, la proteïna de membrana externa no està col·locada amb els altres gens, per exemple, *acrAB* i *tolC* d'*E.coli* [92] i *mexXY* i *oprM* de *P. aeruginosa* [110]. Les bombes RND transporten protons a la inversa, utilitzant el gradient de protons a través de la membrana, intercanviant un H^+ per una molècula d'antibiòtic [111].

Estructura

Vàries publicacions han descrit les estructures cristal·logràfiques dels components de les bombes d'efluxió multidroga, de tres parts, de la família RND dels bacteris gramnegatius, incloent AcrB i TolC d'*E.coli* i MexA, MexB i OprM de *P. aeruginosa* [112-116] (Figura I. 7). L'estructura cristal·logràfica de TolC es va resoldre a una resolució de 3,5-Å [115]. La unitat funcional d'aquesta proteïna està formada de tres unitats idèntiques de polipèptid amb un canal llarg que travessa tant la membrana externa com l'espai periplasmàtic. Un grup d'hèlixs en espiral que al final del túnel es desfan per tal d'obrir el canal. L'estructura cristal·logràfica d'AcrB es va obtenir a una resolució de 3,5-Å [116]. La unitat funcional d'AcrB està formada també per tres unitats idèntiques de polipèptid, amb dotze hèlixs que travessen la membrana i un llarg domini periplasmàtic. L'estructura continua com un "pentinat" que s'obre en forma d'embut facilitant el contacte amb TolC. Hi ha tres hèlixs que formen un porus cap a l'embut, amb una cavitat central localitzada a dalt de tot de l'estructura. La cavitat té tres "vestíbuls" a cada costat del pentinat que van a parar al periplasma. A la regió de la transmembrana, cada protòmer té 12 hèlixs transmembrana. L'estructura suggereix que els substrats es transporten des del citoplasma via la regió transmembrana i del periplasma via els vestíbuls. Finalment, els substrats són transportats de forma activa a través del porus cap a TolC.

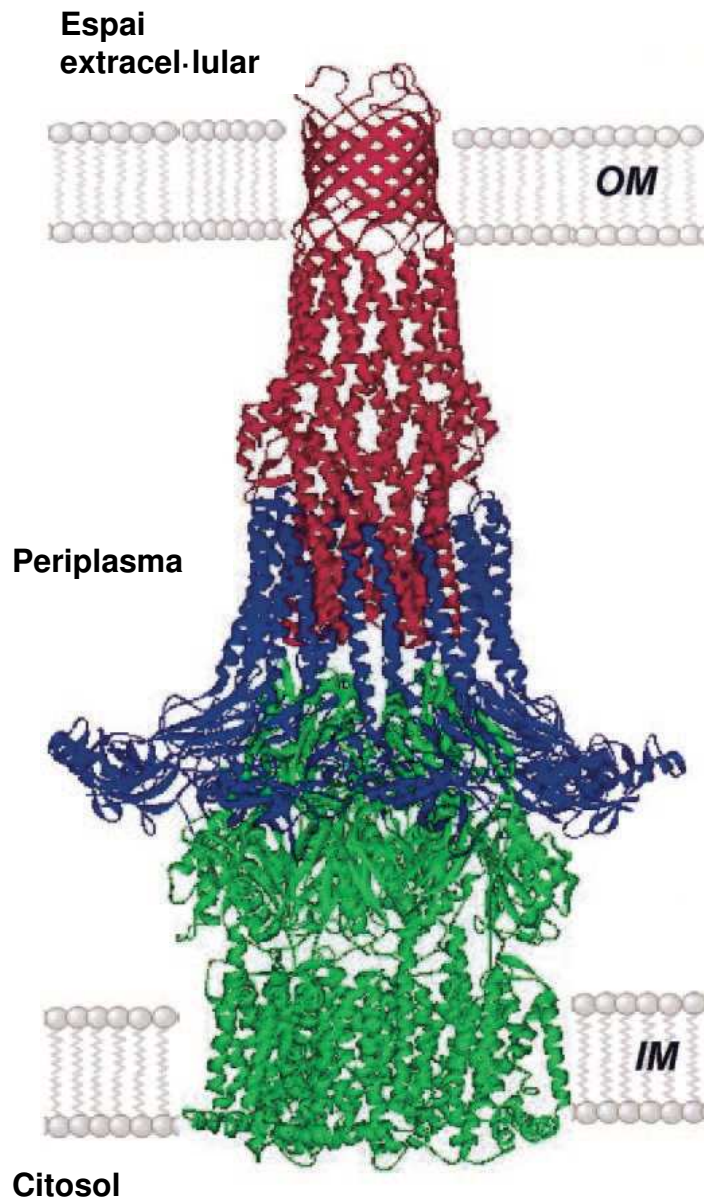


Figura I. 7 Model de bomba d'efluxió de tres parts. Aquest possible model d'una bomba d'efluxió basada en el model de TolC (vermell) formant una zona d'interacció mínima amb les 6 agulles de monyo de l'apex d'AcrB (verd). Un anell de nou molècules de MexA (blau) està donant forma per crear una funda al voltant d'AcrB i del barril beta de TolC (MexA és un homòleg molt proper d'AcrA, el company natural d'AcrB/TolC). IM: membrana interna; OM, membrana externa. Figura reproduïda de la referència [109].

Substrats

Les bombes d'efluxió multidroga contribueixen a la resistència antibiòtica en els bacteris de diverses maneres: (i) resistència inherent en els bacteris gramnegatius a una classe sencera d'agents antimicrobians, (ii) resistència inherent en algunes classes de bacteris gramnegatius a

agents antimicrobians específics, i (iii) resistència a bacteris clínicament rellevants que sobreexpressen una bomba d'efluxió. A *E. coli*, el perfil de substrats de la bomba AcrAB/TolC inclou cloramfenicol, betalactàmics lipofílics, fluoroquinolones, tetraciclina, rifampicina, novobiocina, àcid fusídic, àcid nalidíxic, bromur d'etidi, acriflavina, sals biliars, àcid grassos de cadena curta, dodecil sulfat sòdic, TritonX-100, i triclosan [59, 117-120].

AcrA i AcrB de *S. enterica* serovar *Typhimurium* són molt similars a AcrA (94%) i AcrB (97%), respectivament, d'*E. coli* [121]. S'han construït mutants de *S. enterica* serovar *Typhimurium* que els faltaven varis gens de les bombes d'efluxió [99, 121-123]. Aquests mutants deficients en AcrB varen resultar ser molt més sensibles a quinolones, tetraciclina, cloramfenicol, sals biliars, dodecil sulfat sòdic, Triton X-100, acriflavina, bromur d'etidi, bromur de cetiltrimetilamoni, i triclosan. La sobreexpressió d'AcrB també s'ha associat amb resistència a múltiples antibiòtics tant a aïllats clínics d'humans com a veterinària i a mutants de laboratori de *S. enterica* serovar *Typhimurium* [122, 124-125].

Regulació

Els mecanismes que donen lloc a un augment de l'efluxió en aïllats clínics es poden dividir en quatre grups: (i) mutacions en el gen repressor local, (ii) mutacions en el gen regulador global, (iii) mutacions en la regió promotora del gen transportador, i (iv) inserció d'elements en el gen transportador. Només tres d'ells actuen en la regulació d'AcrAB.

La majoria dels gens de les bombes d'efluxió multidroga de la família RND estan codificats per operons que estan sota el control del gen repressor local; per exemple, a *E. coli*, AcrA i AcrB es cotranscriuen sota el control d'*acrR* [126]. El mateix passa per altres gens *acr* d'altres espècies. Mutacions als gens *acrR* i *acrS* [127] donen lloc a un augment de la sobreexpressió de les bombes d'efluxió corresponents. Aquestes mutacions s'han trobat a gens *acrR* d'aïllats clínics d'*E. coli*, *S. enterica* serovar *Typhimurium*, *Haemophilus influenzae*, i *Enterobacter aerogenes*. [118, 128-130].

A *E. coli* l'expressió d'AcrAB està controlada tant per *acrR*; l'operó de MarRAB, incloent MarA (un activador transcripcional) com per l'operó SoxRS [131-134]. Tant a *E. coli* com a altres enterobacteris hi ha porines presents a la membrana externa [59]; l'expressió de les proteïnes de les porines està també sota el control de MarA i SoxS; quan els activadors transcripcionals estan sobreexpressats, es produeix *micF* que fa disminuir l'expressió d'OmpF a la membrana externa i per tant, redueix l'afluència d'alguns agents antimicrobians [126]. Aquests activadors també interactuen amb *acrAB* fent que augmenti la producció d'AcrAB i augmentant l'efluxió [126]. Altres espècies de la família dels enterobacteris tenen bombes d'efluxió homòlogues a AcrAB/TolC i la seva expressió es considera que també està regulada igual que a *E. coli*. De totes maneres, hi ha evidències de que el regulador global podria no ser sempre MarR o SoxR i

ser RamA. La sobreexpressió d'aquesta proteïna estaria associada amb la resistència a múltiples antibiòtics a *S. enterica* serovar *Typhimurium*, *E. aerogenes*, i *K. pneumoniae* [135-138].

S'ha identificat la presència de seqüències d'inserció en direcció 5' a gens que codifiquen components estructurals de les bombes d'efluxió o insercions en el gen del repressor local en soques clíniques que sobreexpressen bombes d'efluxió multidroga. Alguns d'aquests elements d'inserció tenen seqüències promotores que poden augmentar l'expressió del gen d'efluxió. El primer element d'inserció es va trobar insertat a *acrR* en un aïllat clínic d'*E. coli* [130].

I. 3 MODELS ANIMALS

Pels resultats que es disposen fins al moment, la importància de les infeccions ocasionades pel tipus de soques de *K. pneumoniae* resistents radica en la seva repercussió a la pràctica clínica degut a que es limiten molt les opcions terapèutiques. A més, l'aparició d'aquestes soques resistents suposa un augment del fracàs dels tractaments, augmentant l'estància hospitalària i el bloqueig de llits per nous pacients.

En aquest sentit, són pocs els estudis clínics que avaluen els possibles tractaments d'infeccions per *K. pneumoniae* productores de BLEEs [25, 33, 50, 139-141] i menys encara quan es tracta d'una beta-lactamasa del tipus AmpC plasmídica [142-143] on la majoria dels autors estarien d'acord que els antibiòtics del grup dels carbapenems serien els que mostrarien major eficàcia *in vitro* però sense que això s'hagi corroborat *in vivo*. Les dades de pacients tractats amb cefalosporines de 4^a generació (cefepime o cefpiroma) són més escasses [142, 144-145].

Com a primera aproximació per demostrar la utilitat d'aquests antibiòtics *in vivo*, els models experimentals amb animals són una eina útil per realitzar els estudis d'eficàcia terapèutica. Poden ser dissenyats per assemblar-se al màxim a la infecció que es produeix en humans, presentant en aquest cas una sèrie d'avantatges pràctics i científics sobre els estudis clínics, que els fan altament recomanables per la investigació de noves pautes terapèutiques. Variables com l'estadi de la malaltia, la gravetat de les complicacions, l'heterogenicitat de la població i la farmacocinètica, que són difícils de poder controlar en estudis clínics, poden mantenir-se de manera constant i invariable en estudis del model animal.

El model animal es crea per la investigació de la causa, la naturalesa i el tractament de les malalties humanes i animals. Per conèixer quin és el millor model animal a utilitzar s'ha de considerar quina serà la extrapolació dels resultats que aquest model generarà [146].

Els objectius del models de patologia infecciosa són:

- Eina per millorar el coneixement de la fisiopatologia de les malalties infeccioses
- Prevenció i tractament amb antimicrobians
 - Avaluació de noves molècules antiinfeccioses
 - Avaluació de noves estratègies terapèutiques front microorganismes multiresistents.
 - Investigació sobre noves vacunes

Aquests models animals han de ser models discriminadors, ideals per reproduir la infecció de la forma més similar. Han de tenir una tècnica d'infecció simple, amb una semblança important al procés que ocorre a l'ésser humà en gravetat, curs i duració de la malaltia. Han de ser previsibles, reproduïbles i analitzables i finalment, han de ser capaços de mesurar i reproduir el tractament antimicrobià.

S'han utilitzat diversos models d'infeccions a animals que han ajudat a entendre la fisiopatologia de varies infeccions, bons exemples en són els models de pneumònia, tuberculosi, infeccions per fongs, endocarditis, osteomielitis, infeccions sistèmiques a neutropènics, de SIDA, en l'estudi de vacunes i nous antirretrovirals i infeccions per anaerobis entre d'altres [146-147].

L'ús d'antimicrobians en els animals d'experimentació suposa un nexa d'unió entre els resultats *in vitro* i els resultats clínics. Aquest tipus d'experiments ens ajuden a identificar problemes potencials de toxicitat, permetent conèixer les propietats farmacocinètiques dels antimicrobians, les possibles vies d'administració, dosis letals i també són útils per suggerir indicacions pels futurs estudis clínics.

I. 3. 1 Farmacocinètica

Un punt crític en aquest tipus d'experiments és la farmacocinètica dels antibiòtics, que influeix en la resposta *in vivo* dels antimicrobians, i que per tant, s'han de tenir en compte les variacions farmacocinètiques inter-espècie. En aquest sentit, hi ha dos grans grups de treballs d'eficàcia terapèutica: aquells que utilitzen una farmacocinètica no humanitzada i que consisteixen en donar dosis molt elevades per aconseguir temps de vida mitja semblants als règims humans, però que s'aparten dels règims de dosificació humana; i aquells estudis que segueixen una farmacocinètica humanitzada amb dosis semblants a les humanes. Els fàrmacs poden ser administrats als animals a dosis que facin assolir les concentracions sèriques similars a les humanes, però de forma invariable, són eliminats més ràpidament als animals que als humans. Això pot corregir-se assolint el model de farmacocinètica humanitzada, que pot aconseguir-se

mitjançant diferents tècniques com són la dosificació repetida fraccionada [148], la disminució de l'eliminació del fàrmac mitjançant l'alteració de la seva eliminació biliar o renal, o la infusió contínua de l'antibiòtic [148-149].

Alguns autors han optat per augmentar la concentració de l'antibiòtic en sèrum mitjançant la disminució de la secreció tubular de l'antibiòtic aconseguit amb l'administració conjunta de l'antibiòtic a estudiar i probenecid [150-151]. El probenecid és un agent oral uricosúric que s'utilitza habitualment pel tractament de la hiperuricèmia associada a la gota crònica o secundària altres causes. El probenecid es pot utilitzar també com a adjuvant a la teràpia antibiòtica (per exemple amb penicil·lines, cefalosporines o carbapenems). Quan són necessàries altes concentracions d'antibiòtic en teixit, el probenecid es pot administrar juntament amb l'antibiòtic per disminuir la secreció tubular renal d'aquest, aconseguint augmentar i prolongar les concentracions de l'antibiòtic en sèrum. Una interacció semblant passa quan s'administra el probenecid amb ciprofloxacina, salicilats, ganciclovir, cilastatina o metotrexat, amb el risc d'arribar a nivells tòxics d'aquests agents. El probenecid, inhibidor del transport d'anions, augmenta la vida mitja d'imipenem i meropenem en un 30% o més, degut a la inhibició de la secreció tubular d'aquests antibiòtics, que s'eliminen quasi exclusivament pel ronyó mitjançant la filtració glomerular i la secreció [152]. D'altres, administrant a l'animal nitrat d'uranil subcutani previ a l'inici del tractament antibiòtic, aconseguint un dany renal adequat per augmentar així la vida mitja de l'antibiòtic [145, 153-154]. Finalment, altres grups han aconseguit la farmacocinètica humanitzada administrant cisplatí als seus animals d'experimentació durant 3 dies [155-157], abans de causar la infecció, per produir l'adequat dany renal. El cisplatí (*Cis-diamminedichloroplatinum*) és una sal inorgànica de platí que s'utilitza com a quimioteràpic en el tractament del càncer i es caracteritza per produir toxicitat renal, reconeguda tant a animals d'experimentació com a pacients tractats amb el fàrmac. Una dosi d'aproximadament 8 mg/kg de cisplatí causa alteracions morfològiques que afecten el tub proximal, distal i tubs col·lectors, donant lloc a una disfunció renal crònica.

En el cas d'utilitzar la dosi repetida fraccionada cal conèixer els paràmetres farmacocinètics a l'animal que ens permetin adequar l'interval de dosificació que es correspongui a quatre vegades la vida mitja del fàrmac. En el cas concret de l'avaluació del meropenem en un model de ratolí o rata, s'ha de tenir en compte, que aquest antimicrobià és fàcilment hidrolitzat per una dehidropeptidasa renal que no està present a humans però sí en aquest tipus d'animals [158-159], i que per tant la seva administració ha d'anar sempre associada a la cilastatina.

Aquells que utilitzen la infusió contínua, solen utilitzar animals grans com per exemple el conill. L'animal pot estar anestesiats o bé conscient. Els fluxes d'infusió han d'estar dins els límits fisiològics per l'espècie animal que s'empra. S'utilitza sobretot per tractar infeccions greus amb betalactàmics.

I. 3. 2 Model de pneumònia experimental

S'han desenvolupat al llarg dels anys diferents models de pneumònia, entre aquests destaquen els utilitzats per infeccions causades per *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *Legionella pneumophila*, *Acinetobacter baumannii*, etc [148-149, 153, 160-163].

Els efectes dels tractaments experimentals en els models animals poden ajudar a la interpretació de l'eficàcia dels diferents fàrmacs. Els resultats obtinguts d'aquests models animals poden ajudar als dissenys de futurs protocols clínics.

Els objectius dels models de pneumònia experimental són:

- Facilitar el coneixement de la patogènia de la malaltia, dels fenòmens inflamatoris causants de la lesió pulmonar i dels mecanismes de la insuficiència respiratòria i hipoxèmia.
- Conèixer aspectes de les infeccions relacionades amb la fibrosi quística i la MPOC.
- Conèixer l'eficàcia dels diferents antimicrobians a pneumònies causades per diferents microorganismes.
- Conèixer les característiques farmacodinàmiques relacionades amb l'eficàcia del tractament.

Entre els estudis experimentals d'eficàcia terapèutica aplicats a *K. pneumoniae* destaquen els models de pneumònia en rates i ratolins immunocompetents, mitjançant incisió i inoculació directa intratraqueal de l'inòcul bacterià en el cas de les rates i mitjançant cànula intratraqueal en els ratolins [153-154, 163-164] (Taula I. 4). Altres autors han utilitzat la intubació de bronqui per aconseguir una pneumònia unilateral [165-166]. L'inòcul inclou tant soques sensibles de *K. pneumoniae*, com resistents per producció de BLEEs i del tipus AmpC. S'han comparat les utilitats de piperacil·lina i piperacil·lina-tazobactam en uns estudis, i d'aminoglicòsids i cefepime associats o no en altres [155, 160].

Mimoz *et al.* [145, 153-154] van descriure un model d'eficàcia terapèutica en rates amb pneumònia per *E. cloacae* sensible i resistent a ceftazidima. Si bé aplicat a una altre microorganisme de la família dels enterobacteris, aquests estudis assagen l'eficàcia de cefalosporines de 3^a generació, cefalosporines de 4^a generació (cefepime) i carbapenems (imipenem i meropenem) o la seva combinació amb aminoglicòsids, en un model de pneumònia en rata mitjançant farmacocinètica humanitzada.

Més recentment, Pichardo *et al.* [142-143] han utilitzat un model de pneumònia per *K. pneumoniae* productora de beta-lactamasa del tipus AmpC i amb alteració de les porines per avaluar l'eficàcia terapèutica d'imipenem i cefepime. Utilitzen un model de pneumònia

experimental en ratolí immunocompetent descrit prèviament, en el qual es canula la tràquea per la seva inoculació (Taula I. 4).

I. 3. 3 Paràmetres d'avaluació en els estudis d'eficàcia terapèutica al model animal: mortalitat, recomptes pulmonars, aparició de mutants.

Per tal d'avaluar i comparar l'eficàcia del tractament en aquests tipus d'estudis es defineixen uns paràmetres essencials, que són la mortalitat acumulada en els grups control i grups de tractament i els recomptes de colònies obtingudes dels homogeneïtzats pulmonars un cop acabat l'experiment i després de 8 hores de la última dosi d'antibiòtic. El recompte pulmonar s'expressa en \log_{10} de les UFC obtingudes per gram de pulmó; és una mesura que s'utilitza de forma estandarditzada que facilita la comparació entre els diferents grups terapèutics estudiats [148, 154, 160, 167].

A més, degut a la pressió antibiòtica a que està subjecte la soca en el teixit pulmonar de l'animal es podria pensar en l'aparició de resistències durant el tractament de la pneumònia amb antibiòtics. L'aparició de resistències als betalactàmics durant el tractament s'examina sembrant l'homogeneïtzat del pulmó afectat en plaques que continguin medi de cultiu adequat amb una concentració d'antibiòtics quatre vegades la concentració mínima inhibidora de les soques corresponents als antibiòtics utilitzats. Es considera que han aparegut mutants de les soques quan es visualitza creixement de les soques en les plaques amb antibiòtic [153, 160]. Un dels inconvenients per la detecció de l'aparició de mutants durant el tractament seria que la densitat de bacteris que es troben en els pulmons dels animals tractats no fos suficientment important com per poder detectar aquestes subpoblacions, ja que aquests mutants està descrit que apareguin en 1 de 10^5 - 10^9 a les soques salvatges de *K. pneumoniae* que contenen beta-lactamases del tipus AmpC [82].

Taula 1. 4 Taula resum de diferents models de pneumònia experimental.

GRUP	ANIMAL UTILITZAT	MICROORGANISME	TIPUS DE PNEUMÒNIA	FARMACOCINÈTICA
			INOCULACIÓ	
Fournier <i>et al.</i>	Ratolí	<i>K. pneumoniae</i>	Cànula intratraqueal	No humanitzada: dosi única elevada
Mimoz <i>et al.</i>	Rata	<i>Enterobacter cloacae</i>	Inoculació directa intratraqueal per cirurgia	Insuficiència renal amb nitrat uranil
Szabó <i>et al.</i>	Ratolí	<i>K. pneumoniae</i>	Cànula intratraqueal	Insuficiència renal amb cisplati
Pichardo <i>et al.</i>	Ratolí	<i>K. pneumoniae</i>	Cànula intratraqueal	Dosis fraccionades
Schiffelers <i>et al.</i>	Rata	<i>K. pneumoniae</i>	Intubació de bronqui pneumònia unilateral	Immunosupressió amb ciclofosfamida
Bakker-Woundenberg <i>et al.</i>	Rata	<i>K. pneumoniae</i>	Intubació de bronqui pneumònia unilateral	Immunosupressió amb ciclofosfamida
Gavaldà <i>et al.</i>	Rata	<i>S. pneumoniae</i>	Traqueotomia. Catèter fins a bronquis	Dosis fraccionades
Ponte <i>et al.</i>	Conill de rata	<i>S. pneumoniae</i>	Inoculació intratraqueal	No humanitzada: dosis elevades
Piroth <i>et al.</i>	Conill	<i>S. pneumoniae</i>	Catèter endobronquial	Infusió contínua

OBJECTIUS

Objectius

Klebsiella pneumoniae és un patògen de gran importància a nivell nosocomial, del qual en coneixem diversos mecanismes de resistència als antimicrobians.

A més de ser un dels microorganismes més freqüentment associat a la infecció nosocomial, el seu interès ha augmentat recentment per la detecció de soques de *K. pneumoniae* multirresistents. Els principals mecanismes de resistència coneguts estan basats en l'expressió de beta-lactamases i en canvis de la permeabilitat que alteren la penetració dels antibiòtics i/o la seva expulsió: porines i bombes d'efluxió. Aquesta tesi pretén estudiar els principals mecanismes de resistència a *K. pneumoniae*, des de diferents punts de partida; els objectius han estat:

- Detectar i caracteritzar diversos aïllats clínics de *K. pneumoniae* productors de beta-lactamasa d'espectre estès tipus CTX-M-15 a Bòsnia-Hercegovina.
- Avaluar l'efecte de les porines i les beta-lactamases del tipus AmpC en l'eficàcia dels betalactàmics en un model de pneumònia en rata per *K. pneumoniae*.
- Estudiar quina és la contribució de la bomba d'efluxió AcrAB de *K. pneumoniae* en la resistència als antimicrobians i a la virulència.

CAPÍTOL 1

**Detecció i caracterització d'aïllats
clínic de *Klebsiella pneumoniae*
productors de beta-lactamasa
d'espectre estès tipus CTX-M-15 a
Bòsnia-Hercegovina**

1. 1 OBJECTIUS

Fins ara, a Bòsnia-Hercegovina només s'havia descrit la presència de beta-lactamases del tipus SHV-5 a 14 soques de *K. pneumoniae* aïllades a la comunitat, sense que se'n coneguessin dades de soques de cap espècie productores de beta-lactamases del tipus CTX-M, la més habitual a altres països d'Europa [168]. Degut a l'escassetat de dades sobre BLEE provinents d'aquest país, el principal objectiu d'aquest estudi va ser caracteritzar a nivell molecular els aïllats de *K. pneumoniae* productors de BLEE a l'hospital de referència de la capital del país.

Aquest objectiu general es va dividir amb els següents objectius concrets:

- Analitzar la sensibilitat antibiòtica de les soques de *K. pneumoniae* productores de BLEE aïllades a l'hospital de referència de la capital de Bòsnia-Hercegovina.
- Determinar el tipus de BLEE de cadascuna de les soques aïllades.
- Caracteritzar molecular i epidemiològicament les soques aïllades.
- Investigar els mecanismes de transmissió de la resistència a les soques resistents.
- Analitzar l'expressió de les porines d'aquelles soques de *K. pneumoniae* amb valors de CMI de cefoxitina >64.

1. 2 MATERIALS I MÈTODES

Soques clíniques i determinació de la sensibilitat antibiòtica

Els aïllats que es varen incloure a l'estudi corresponen a soques aïllades de pacients adults (només un aïllament per pacient) que varen estar ingressats en el centre hospitalari de referència de Sarajevo (Bòsnia-Hercegovina), amb una capacitat de 1762 llits, durant el període inclòs entre febrer i novembre de 2007 i que es varen infectar per *K. pneumoniae* productora de BLEE.

La identificació bacteriana i els exàmens de sensibilitat es varen realitzar inicialment amb el sistema semi-automatitzat Vitek2 (bioMérieux). Addicionalment, la determinació de les CMI's d'alguns antibiòtics es va realitzar per microdilució o bé utilitzant les tires d'Ettest (AB Biodisk), seguint les instruccions i recomanacions del fabricant.

Per la detecció de la producció de BLEE es va utilitzar el DDST, utilitzant discs d'amoxicil·lina-clavulànic, cefotaxima, ceftazidima, cefepime i aztreonam situats a 20 i/o 30 mm de distància entre ells, seguint les recomanacions del CLSI [169]. Per la detecció fenotípica de la presència de beta-lactamasa del tipus AmpC vàrem utilitzar discs d'àcid borònic i cloxacil·lina com inhibidors d'AmpC [170].

Tipatge molecular de les soques

La relació clonal entre les diferents soques es va estudiar mitjançant l'anàlisi del seu ADN cromosòmic per electroforesi en camp polsant. Es van preparar blocs d'agarosa contenint l'ADN cromosòmic de cada soca tal i com es va descriure prèviament [171]. Aquests blocs es van digerir amb l'enzim *Xba*I i es van introduir dins els pouets d'un gel d'agarosa Megabase a l'1% (Bio-Rad). La separació dels fragments d'ADN es va fer utilitzant l'aparell CHEF-DRIII (Bio-Rad). Les condicions que vam utilitzar van ser: 6 V/cm² durant 20 h a 14°C, amb un pols inicial i final de 2 s i 35 s, respectivament. Els gels es van tenyir amb bromur d'etidi i es van fotografiar. Els resultats es van interpretar segons els criteris de Tenover *et al.* [172]. La comparació dels perfils de les soques i la realització de dendrogrames es va fer mitjançant un anàlisi jeràrquic de conglomerats amb el mètode no ponderat de grup, utilitzant vincles de terme mitjà i el coeficient de Dice per mesurar la distància, i amb l'ús del software PAST-Paleontological Statistics v.1.29.

Estudi i caracterització de les beta-lactamases i els seus gens

Per determinar els punts isoelèctrics de les beta-lactamases es van aplicar els sobrenedants dels extractes cel·lulars obtinguts per sonicació, en gels Phast (Pharmacia AB) amb un gradient de pH entre 3 i 9 i utilitzant el sistema Phast (Pharmacia AB). Com a controls es van incloure diverses beta-lactamases amb punts isoelèctrics coneguts (TEM-1, TEM-2, TEM-4, TEM-3, SHV-1, CTX-M-10 i CTX-M-1). El gel es va tenyir amb nitrocefina 500 µg/ml (Oxoid) per tal d'identificar les bandes corresponents a les beta-lactamases.

Per identificar les beta-lactamases es van amplificar els gens que codifiquen les beta-lactamases del tipus TEM, SHV i CTX-M amb la tècnica de la PCR i els encebadors i condicions descrites prèviament [50, 173]. Les dues cadenes de cada producte de la PCR es van seqüenciar utilitzant el kit BigDye (PE-Applied Biosystems) i el seqüenciador ABI Prism 3100 ADN (PE-Applied Biosystems).

Experiments de conjugació i anàlisi de plasmidis

Els experiments de conjugació es van dur a terme mitjançant el mètode d'unió en filtre entre els aïllats de *K. pneumoniae* productora de BLEE corresponents als diferents tipus de clons i un mutant d'*E. coli* HB101 resistent a rifampicina com a receptor en una proporció 1:1. Els transconjugants es van seleccionar en plaques de Luria Bertani (LB) amb agar complementades amb 100 mg/L de rifampicina i 2 mg/L de cefotaxima. Es va confirmar la presència de les beta-lactamases en els transconjugants amb la realització del DDST, amplificació per PCR, seqüenciació del gen de la BLEE corresponent i determinació de les CMI's pel mètode d'Etest als antibiòtics betalactàmics i no betalactàmics (per determinar les co-transferències amb les BLEE). Per l'anàlisi dels plasmidis, es va obtenir l'ADN plasmídic dels transconjugants utilitzant el kit Qiagen plasmid Midi (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. Els plasmidis es van digerir amb *EcoRI* o *BamHI* i els fragments de restricció obtinguts es van separar per electroforesi en un gel d'agarosa a l'1%.

Anàlisi de les proteïnes de membrana externa

Les cèl·lules bacterianes es van lisar per sonicació i les membranes cel·lulars es van recuperar per ultracentrifugació. Per obtenir les proteïnes de membrana externa es va realitzar un tractament de les membranes cel·lulars amb sarcosinat lauril de sodi (Sigma) i es varen precipitar per ultracentrifugació [174]. Les proteïnes de membrana externa es varen separar per electroforesi en gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat-sòdic realitzat amb 11% acrilamida-0,35% bisacrilamida-0,1% dodecil sulfat-sòdic (Sigma) i utilitzant el tampó de Laemmli i la tinció de blau Coomassie. La identificació de les porines es va realitzar per la tècnica de la

transferència Western amb els tampons i les condicions descrites anteriorment per Hernández-Allés *et al.* [174]. Per això es varen transferir els gels d'acrilamida a filtres Immobilon-P (Millipore), els filtres es van bloquejar amb albúmina sèrica bovina a l'1% en tampó fosfat salí (PBS). Després de 3 rentats amb PBS, els filtres s'incubaren seqüencialment amb sèrum anti-OmpK36 diluït 1:100 i amb immunoglobulina G anti-conill marcada amb fosfatasa alcalina obtinguda a partir de cabra. Finalment els filtres es varen revelar amb Nitro Blue Tetrazolium i 5-Bromo-4-Cloro-Indolilfosfat (NBT i BCIP, Sigma).

1. 3 RESULTATS

A l'any 2007 la prevalença de microorganismes productors de BLEE a l'hospital de referència de Sarajevo va ser de 19,6%; essent *K. pneumoniae* l'espècie més prevalent de microorganismes productors de BLEE en aquell centre (88,8%). De fet, el 68,8% de les soques de *K. pneumoniae* aïllades eren productores de BLEE.

Tots els aïllats de *K. pneumoniae* productors de BLEE obtinguts dels diferents pacients adults admesos a l'hospital de Sarajevo entre febrer i novembre de 2007 es varen guardar i posteriorment es van analitzar i caracteritzar molecularment per PFGE. Tot eren soques hospitalàries, no es van incloure duplicats i es va escollir a l'atzar un aïllat de cada pacient. Els perfils representatius d'aquests aïllats (n=57) estan representats a la Figura 1. 1. Es van identificar 4 clons designats amb les lletres: A, B, C i D. Els clons més prevalents varen ser l'A i el B amb 35 i 17 aïllats, respectivament. En conjunt, aquests dos clons van representar un 91,2% del total d'aïllats.

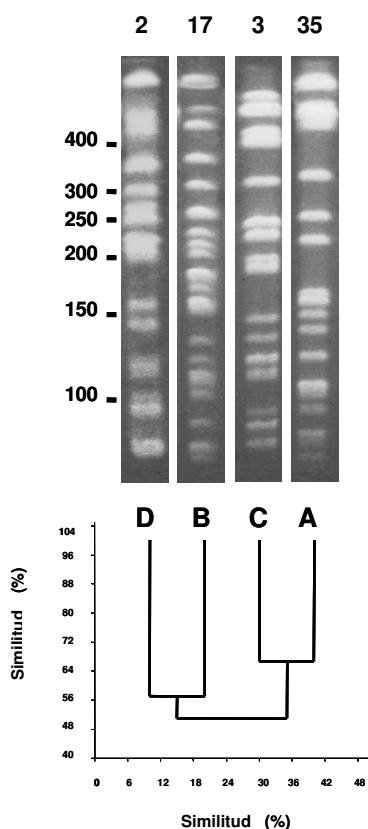


Figura 1. 1 Dendrograma realitzat a partir de les bandes dels clons representatius de les soques de *K. pneumoniae* productora de BLEE obtinguts per PFGE després de la digestió de l'ADN cromosòmic amb *Xba*I. Les lletres en majúscula que hi ha sota cada carrer es refereixen als clons obtinguts per electroforesi en camp polsant, i els números de damunt cada carrer representen el nombre d'aïllats de cada clon. Els marcadors de pes molecular (en kilobases) estan indicats a l'esquerra.

El primer aïllat clonal productor de BLEE es va registrar el febrer i pertany al clon B. Les soques d'ambdós clons majoritaris (A i B) es van anar aïllant al llarg de tot l'any, assolint màxims a l'agost i febrer, respectivament. Les soques es van aïllar de mostres d'orina (30 en el clon A i 8

del B), de sang (4 del clon A i 5 del B), de frotis de ferida (1 clon A i 1 del B) i també, es van aïllar 3 soques del clon B provinents de mostres respiratòries. Tant les soques del clon A com del B es varen aïllar a diferents unitats de l'hospital, fins a 7 unitats diferents.

Tots els aïllats d'adults presentaren el mateix patró de multiresistència mostrant, a part de la resistència a penicil·lines i cefalosporines pròpia de la BLEE, resistència creuada a quinolones, gentamicina, tobramicina i cotrimoxazol. Tots varen ser sensibles a l'imipenem.

Per tal d'identificar els tipus de BLEE es va amplificar l'ADN present en els aïllats de *K. pneumoniae* utilitzant els encebadors específics descrits prèviament [50, 173]. Els productes de la PCR es varen seqüenciar i varen confirmar la presència de TEM-1, SHV-1 i CTX-M-15 en tots els aïllats independentment del tipus de clon que representaven. Aquests resultats també es varen comprovar mitjançant la determinació dels punts isoelèctrics de dos representants de cada clon; en aquestes soques varen aparèixer tres bandes de beta-lactamasa amb punts isoelèctrics de 5,4, 7,6 i 8,6 corresponents a TEM-1, SHV-1 i CTX-M-15, respectivament.

També vàrem investigar la possibilitat de que el fenotip de resistència que mostraven tots els aïllats fos degut a la transferència d'un únic plasmidi que codificava les beta-lactamases. La localització de les beta-lactamases en un plasmidi es va demostrar a través d'experiments de conjugació. L'ADN plasmídic de dues soques de cada clon elegides a l'atzar es va transferir a *E. coli*. Els transconjugants obtinguts, crescuts en plaques de LB complementades amb cefotaxima 2 mg/L, es varen comprovar pel DDST, amplificació de la PCR i seqüenciació amb els encebadors corresponents.

Les CMI's de les soques d'*E. coli* transconjugants es mostren a la Taula 1. 1. Es pot observar que a part del patró de resistència típic de la BLEE també mostraven resistència a gentamicina i tobramicina, suggerint que la resistència a aminoglicòsids es transmetia en el mateix plasmidi. L'anàlisi de la PCR i la seqüenciació dels plasmidis transconjugats varen mostrar que el gen de TEM-1 es transmetia amb el gen de CTX-M-15 a tots els aïllats, independentment del tipus de clon.

L'anàlisi de l'ADN plasmídic va mostrar que els transconjugants que provenien d'aïllats clínics que pertanyien al mateix clon contenien el mateix plasmidi. Tot i que, els plasmidis eren diferents entre tranconjugants que provenien d'aïllats de diferent clon. Es va fer una aproximació de la mida dels plasmidis utilitzant els enzims de restricció *EcoRI* i *BamHI*; la mida oscil·lava entre 50 i 100 kilobases per a tots els clons.

Taula 1. 1 CMI's de diferents antibiòtics dels aïllats de *K. pneumoniae* productors de BLEE i dels transconjugants d'*E.coli* contenint els plasmidis que codifiquen BLEE.

Antibiòtic	CMI (µg/ml) per:											
	Aïllats de <i>K. pneumoniae</i> dels diferents clons ^a				<i>E. coli</i> HB101				Transconjugants d' <i>E.coli</i> /HB101 contenint el plasmidi dels diferents clons			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Amoxicil·lina-clavulànic	8->32	16->32	16->32	>32	<2			4	4	8	4	4
Piperacil·lina + tazobactam	32->128	<4-64	<4-64	<4-64	<4			<4	<4	<4	<4	<4
Cefoxitina	<4-128	<4-8	<4-16	<4	<4			<4	<4	<4	<4	<4
Ceftazidima	16->64	>64	16-64	16->64	<1			16	4	4	4	4
Cefotaxima	>64	>64	>64	>64	<1			>64	>64	>64	>64	>64
Cefepime	2->64	8->64	>64	<1-32	<1			<1	<1	<1	<1	<1
Imipenem	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25			0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Ciprofloxacino	>4	>4	>4	>4	<0,25			<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25
Gentamicina	>16	8->16	>16	>16	<1			>16	8	8	8	8
Tobramicina	8->16	>16	>16	>16	<1			8	8	8	8	>16

^aInterval de CMI's dels aïllats productors de BLEE, cadascun recollit de diferents pacients.

Tres aïllats inclosos dins el clon A varen ser resistents a la cefoxitina, amb un valor de CMI >128 mg/L. Per investigar si la resistència a cefoxitina era deguda a alteracions en la permeabilitat de la membrana externa, es varen analitzar les proteïnes de membrana externa d'aquestes soques resistents i es varen comparar amb les d'una soca sensible del mateix grup (Figura 1. 2. A). A l'aïllament sensible, l'anàlisi per gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat-sòdic de les proteïnes va detectar l'expressió de les dues proteïnes majoritàries d'aproximadament 33-kDa i 36-kDa en l'interval de 31-45-kDa i que corresponen a OmpA i OmpK36, respectivament. De la mateixa manera, en un aïllament resistent es va detectar l'expressió de les mateixes proteïnes però als altres aïllaments resistents es va observar una reducció o absència completa de l'expressió de la proteïna de 36 kDa, OmpK36. És important destacar que els dos aïllaments amb alteracions a l'expressió de OmpK36 varen ser també resistents a ertapenem.

L'anàlisi de les proteïnes de membrana externa amb la tècnica de Western blot utilitzant anticossos específics contra la porina OmpK36 va confirmar que la proteïna de 36-kDa s'expressava en l'aïllat sensible a cefoxitina i als dos aïllats resistents, es va comprovar l'absència o l'expressió reduïda de la porina OmpK36 (Figura 1. 2. B).

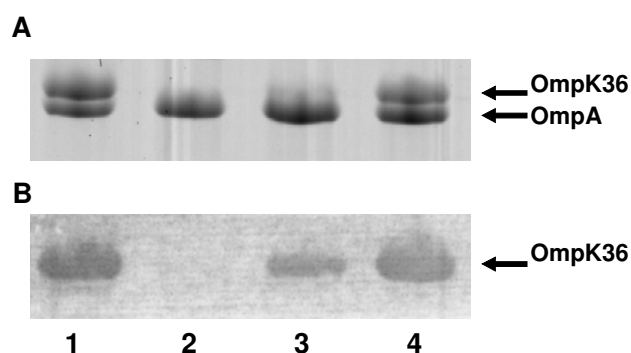


Figura 1. 2 Anàlisi en gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat-sòdic (A) i Western blot amb sèrum anti-*ompK36* (B) de les proteïnes de la membrana externa de *K. pneumoniae* sensible a cefoxitina (carrer 1), i de les respectives mutants seleccionades *in vivo* (carrers 2, 3 i 4). Les bandes que corresponen a OmpK36 i OmpA estan indicades amb fletxes a la dreta dels panells. Només es mostren les parts rellevants del gel i Western blot.

1. 4 DISCUSSIÓ

La disseminació de *K. pneumoniae* productora de BLEE en el marc hospitalari és una amenaça important amb conseqüències a nivell terapèutic i epidemiològic, sobretot quan afecta a unitats on es tracten pacients crítics. Actualment, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-14 i CTX-M-15 són els tipus de CTX-M més estesos en els països europeus. Ara bé, les dades de què disposem fins ara sobre l'epidemiologia de les BLEE a Bòsnia-Hercegovina són escasses.

En aquest treball documentem per primera vegada la presència d'aïllats de *K. pneumoniae* productors de CTX-M-15 en un dels hospitals més importants del país. La majoria dels aïllats productors de CTX-M-15 pertanyien a dos clons predominants, indicant que, almenys en part, la disseminació de CTX-M-15 pels diferents serveis de l'hospital va ser deguda a la propagació d'aquests clons. No obstant, també demostrem que a ambdós clons els gens de CTX-M-15 es trobaven codificats en plasmidis llargs i transferibles, que podrien haver contribuït en la situació endèmica que presenta l'hospital.

A més, TEM-1 i els gens de resistència a aminoglicòsids es van transferir juntament amb els de CTX-M-15. Aquest fet ha estat descrit prèviament en diverses ocasions; la caracterització molecular dels plasmidis que codifiquen CTX-M-15 de soques d'*E. coli* implicades en brots epidèmics a diferents països ha demostrat que aquests plasmidis contenen altres gens de resistència antibiòtica, com ara *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1}, *tetA*, *aac(6')-Ib-cr*, i *aac(3)-II* ([175-177]).

Degut a que normalment no es produeix hidròlisi de la cefoxitina per la BLEE, la cefoxitina pot ser una alternativa terapèutica pel tractament de les infeccions greus adquirides a l'hospital causades per *K. pneumoniae* multiresistent, productora de BLEE com les que es descriuen en aquest treball, tot i que actualment, no es pot garantir la sensibilitat a aquest antibiòtic en aquest tipus de soques. De fet, el nombre de treballs on es descriu el desenvolupament de resistència a la cefoxitina en soques productores de BLEE deguda a la selecció de mutants amb una reducció de la permeabilitat a aquests antibiòtics esta augmentant [87]. Treballs anteriors han mostrat que l'expressió de les dues porines majors, OmpK35 i OmpK36, juguen un paper important en la sensibilitat a la cefoxitina i que mutants que no expressen o tenen una expressió reduïda d'aquestes dues proteïnes de membrana mostren una sensibilitat disminuïda a aquest antibiòtic. A l'estudi documentem i caracteritzem per primera vegada l'aparició de resistència *in vivo* a la cefoxitina en aïllats de *K. pneumoniae* productors de CTX-M-15 degut a la selecció de mutacions encapçalades per la pèrdua d'expressió de porines. Com passa freqüentment als aïllats clínics de *K. pneumoniae* productora de BLEE [174], les soques estudiades en aquest treball no expressaven OmpK35, afavorint el desenvolupament de resistència a la cefoxitina degut a la inactivació d'OmpK36. En concret, de les soques de *K.*

pneumoniae productora de CTX-M-15 varen ser 3 de les 36 que pertanyien al clon A (8,3%) que varen desenvolupar resistència a la cefoxitina a les mostres clíniques. Dues d'elles eren deficientes en l'expressió d'OmpK36, però l'altra no mostrava cap alteració en l'expressió d'aquesta porina suggerint que un altre mecanisme de resistència havia estat involucrat en aquest fenotip de resistència. El test fenotípic amb discs d'àcid borònic i cloxacil·lina va descartar la presència de beta-lactamases del tipus AmpC (no es mostren les dades), això ens va fer pensar en la possibilitat de que la resistència a la cefoxitina fos deguda a mutacions en l'estructura del porus de la porina [178] o bé a l'expressió d'una bomba d'efluxió [179].

En resum, en aquest primer capítol s'ha descrit, per primera vegada a Bòsnia-Hercegovina, l'aparició d'aïllaments de *K. pneumoniae* productors de la beta-lactamasa de tipus CTX-M15 i s'han caracteritzat els mecanismes responsables de la resistència a cefoxitina a dos d'aquests aïllats clínics.

CAPÍTOL 2

Efecte de les porines i les beta-lactamases del tipus AmpC en l'eficàcia dels betalactàmics en un model de pneumònia en rata per *K. pneumoniae*

2. 1 OBJECTIUS

Pels resultats de que es disposen fins al moment, la importància de les infeccions causades per soques de *K. pneumoniae* multirresistents radica en la limitació terapèutica durant la pràctica clínica. En el cas de les soques productores de beta-lactamases del tipus AmpC amb alteracions de les porines les opcions quedarien limitades, segons resultats *in vitro*, a cefalosporines de 4^a generació i carbapenems, però es requereixen d'estudis experimentals *in vivo* que corroborin aquests resultats. Són pocs els estudis que avaluen en humans el tractament de les infeccions per *K. pneumoniae* productores de BLEE [25, 50, 139] i menys quan es tracta d'AmpC plasmídica [142-143], tot i que la majoria semblen suggerir que els carbapenems serien els antimicrobians que mostren sensibilitat *in vitro* i s'associen a una menor mortalitat. Són encara més escasses les dades de pacients tractats amb cefepime o cefpiroma.

L'objectiu general d'aquest capítol de la tesi ha estat avaluar l'eficàcia antibiòtica de cefepime, imipenem i meropenem en un model d'infecció *in vivo* per *K. pneumoniae* resistent.

Aquest objectiu general s'ha dividit amb els següents objectius concrets:

- Construir mutants isogènics de *K. pneumoniae* amb mecanismes de resistència concurrents: expressió de beta-lactamasa tipus AmpC i alteracions a l'expressió de les porines.
- Caracteritzar les soques a estudiar, determinant la CMI de cefepime, imipenem i meropenem de les soques de *K. pneumoniae* que expressen beta-lactamases tipus AmpC amb/sense alteracions a l'expressió de les porines.
- Determinar les constants farmacocinètiques pels antimicrobians cefepime, imipenem i meropenem administrats als animals d'experimentació per tal de definir la farmacocinètica humanitzada.
- Estandarditzar el model de pneumònia experimental en rata, produït per soques isogèniques de *K. pneumoniae* resistents. Avaluar la possibilitat d'utilitzar un model de pneumònia amb rata afectada d'insuficiència renal.
- Estudiar l'eficàcia terapèutica de cefepime, imipenem i meropenem en el model de pneumònia en rata per cadascuna de les soques de *K. pneumoniae* resistents, administrats a dosis i intervals de temps establerts segons estudis de farmacocinètica, en comparació amb un grup control sense tractament.
- Determinar de la freqüència d'aparició *in vivo* de mutants resistents, als antibiòtics estudiats, durant el tractament.

2. 2 MATERIALS I MÈTODES

Microorganismes

La soca de *K. pneumoniae* 52145 és un aïllat clínic amb fenotip capsulat (serotip K2) i virulent, descrit anteriorment [180]. La soca *K. pneumoniae* 12 és una soca derivada de *K. pneumoniae* 52145 que conté un plasmidi codificant del gen *ampC* ACT-1. El plasmidi que codifica ACT-1 es va introduir a *K. pneumoniae* 52145 per conjugació amb *K. pneumoniae* C2 (pMG246), que conté el plasmidi pMG246 codificant pel gen *ampC*. La soca *K. pneumoniae* dp és un mutant espontani deficient en porines, derivat de la soca *K. pneumoniae* 52145 i obtinguda mitjançant el plaqueig i cultiu durant 24 hores de *K. pneumoniae* 52145 en caldo de LB enriquit amb cefoxitina a 64 mg/ml, una concentració 32 vegades superior a la CMI de cefoxitina per a *K. pneumoniae* 52145. La soca *K. pneumoniae* 12dp és la soca deficient en porines i que expressa ACT-1 derivada de *K. pneumoniae* 52145. Aquesta es va obtenir conjugant la soca *K. pneumoniae* C2 (pMG246) amb la soca deficient en porines *K. pneumoniae* dp.

L'expressió de la beta-lactamasa AmpC a ambdues soques *K. pneumoniae* 12 o *K. pneumoniae* 12dp es va comprovar amb la hidròlisi de nitrocefina, tenint en compte que la soca original *K. pneumoniae* 52145 no expressava la beta-lactamasa cromosòmica.

El dèficit de l'expressió de les porines OmpK35 i OmpK36 es va comprovar mitjançant aïllament de les proteïnes de membrana externa seguint el protocol prèviament descrit pel nostre grup i separació de les proteïnes per electroforesis en gels de poliacrilamida que contenen dodecilsulfat sòdic. Posteriorment les porines varen ser identificades per anàlisi per Western blot amb anticossos específics contra les porines OmpK36 i OmpK35 descrits anteriorment [78].

Medis de cultiu

Les soques es varen créixer en caldo Luria Bertani (Scharlau). Pels estudis d'eficàcia terapèutica es va utilitzar agar Mac Conkey (BioMérieux) i per les proves de sensibilitat a antibiòtics es va utilitzar medi de Mueller Hinton complementat amb cations Ca^{2+} i Mg^{2+} (BioMérieux). Pels creixements en placa, els medis es van solidificar amb 1,5% d'agar (ADSA Micro). Quan va ser necessari es varen afegir els antibiòtics corresponents a les concentracions indicades en cada cas (meropenem, imipenem i cefepime a concentracions 4 vegades les CMIs corresponents a cada soca)

Pels estudis de farmacocinètica, els medis utilitzats a la tècnica de bioassaig varen ser medi antibiòtic núm. 5 per l'imipenem i meropenem i el núm. 1 pel cefepime (Scharlau).

Estudis de sensibilitat

La CMI dels diferents agents antimicrobians es va determinar mitjançant el mètode d'Etest (AB Biodisk) en agar Mueller Hinton i d'acord amb les instruccions del fabricant. Per determinar els valors de les CMIs d'imipenem, meropenem, ertapenem i cefepime les plaques es varen incubar a 35°C durant 18 hores. L'imipenem-cilastatina, cilastatina i ertapenem varen ser subministrats per Merck Sharp & Dohme-Chibret, el meropenem per Astra Zeneca Pharma i el cefepime per Bristol-Myers Squibb. La substància pura de cadascun es va diluir amb sèrum fisiològic (meropenem i imipenem) i Ringer lactat (cefepime) abans de cada experiment amb animals, d'acord amb les instruccions del fabricant.

Estudis amb animals

Animals

Els estudis de DL₅₀ es varen realitzar amb ratolins mascles de la raça ICR (CD-1) de pes entre 20-25 g. El model experimental i els estudis de farmacocinètica es van realitzar amb rates mascles de la raça Wistar, de pes entre 200-250 g. Tots els animals provenien de Harlan Ibèrica S.L., eren lliures de patògens i varen ser transportats al laboratori amb filtres HEPA. Es varen mantenir en observació durant una setmana per assegurar que no presentaven cap patologia. L'estabulari on s'allotjaven mantenia un cicle de llum i obscuritat constant, mantenint el ritme circadià dels animals. Se'ls va subministrar aigua i menjar *ad libitum*.

Determinació de la dosi letal 50

La DL₅₀ de les soques es va determinar utilitzant concentracions diferents de cada soca creixuda fins a la fase exponencial. Es feren 4 grups de 10 ratolins per cada concentració i es varen inocular intraperitonealment 50 µl del microorganisme. Els ratolins es varen controlar diàriament durant 7 dies consecutius després de la infecció per determinar el nombre de supervivents.

Estudis de farmacocinètica

Degut a que la farmacocinètica dels antibiòtics influeix a la resposta *in vivo* dels antimicrobians i donat que varia en funció de l'animal d'experimentació utilitzat, es varen realitzar estudis de farmacocinètica per conèixer les dosis que s'havien d'administrar als animals per assolir la concentració màxima sèrica similar a la que s'obté en humans a les dosis utilitzades habitualment. De la mateixa manera, vàrem calcular els paràmetres farmacocinètics a l'animal que varen permetre adequar l'interval de dosificació que es corresponia a quatre vegades la vida mitja del fàrmac.

Es van fer estudis de farmacocinètica utilitzant fàrmacs que augmenten la vida mitja dels antibiòtics en sèrum, per tal d'optimitzar els intervals de dosificació, intentant així, disminuir la rapidesa en què aquests antibiòtics s'eliminen a l'animal d'experimentació i en concret a la rata, que era el nostre cas. Per això, es va utilitzar cisplatí a una dosi de 8 mg/Kg, administrat intraperitonealment una vegada durant els tres dies previs al començament de l'experiment. Calculant al final de l'experiment els paràmetres farmacocinètics corresponents i també determinant el valor de la creatinina per valorar el dany renal ocasionat.

També, es van fer estudis de farmacocinètica administrant alhora l'antibiòtic amb el probenecid, per aconseguir un augment de la vida mitja de l'antibiòtic en sèrum i un augment de l'àrea sota la corba. El probenecid (dissolt en HCO_3Na^+ 0,5N) [150-151] es va administrar de forma subcutània a una dosi de 50 mg/Kg/dia.

Per la determinació dels paràmetres farmacocinètics es va utilitzar el mateix mètode pels tres casos estudiats; sense tractament adjuvant, amb cisplatí i amb probenecid.

Les concentracions sèriques es van determinar després de l'administració intraperitoneal d'una dosi única de 40 mg/Kg d'imipenem i meropenem i 60 mg/Kg de cefepime als 15, 30, 60 i 90 minuts després de l'administració dels antimicrobians. Les concentracions d'antibiòtic en sang es van determinar per mètode de bioassaig en disc placa [181-182]. El microorganisme utilitzat pel bioassaig va ser *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pel meropenem i imipenem i *E. coli* ATCC 25922 pel cefepime. Es varen utilitzar els medis corresponents per cada antibiòtic abans esmentats i s'utilitzaren discs de paper de 6 mm (Difco Laboratories) saturats amb diferents concentracions d'antibiòtic amb un volum de 20 µl. Els discs es col·locaren a les plaques amb el medi corresponent i prèviament inoculades amb una suspensió 0,5 McFarland dels microorganismes de referència. Les plaques s'incubaren a 37°C durant 24 hores i es mesuraren els halos d'inhibició. Les corbes estàndard es van establir amb les solucions d'antibiòtics en tampó fosfat des de 1,5 fins a 12 mg/l. La linealitat de les corbes estàndard utilitzada en els estudis de bioassaig en placa va ser de com a mínim 0,9 (R^2). Les concentracions en sèrum del meropenem, imipenem i cefepime es van obtenir a través de les corbes estàndard. L'experiment es va repetir 3 vegades per disminuir la magnitud de la variabilitat que en resulta dels experiments realitzats en diferents moments. Degut a que les rates produeixen l'enzim dehidropeptidasa capaç d'hidrolitzar el meropenem, es va administrar cilastatina (1:1) [158] juntament amb el meropenem.

L'estimació de la concentració màxima de l'antibiòtic en sèrum ($C_{\text{màx}}$ en mg/l), i la vida mitja ($t_{1/2}$ en h) es varen calcular mitjançant una anàlisi de regressió lineal de la corba de concentracions d'antibiòtic en sèrum respecte el temps en base a un model obert monocompartimental.

També es va calcular el temps en què les concentracions en sèrum es mantenien per damunt de la CMI, que es va extrapolar de la línia de regressió utilitzant una CMI obtinguda d'un inòcul de 10^5 UFC/ml.

Model de pneumònia a rata

El model de pneumònia per *K. pneumoniae* en rates es va realitzar segons el model descrit per Mimos *et al.*[145, 153-154, 167]. Les rates varen ser anestesiades intramuscularment amb ketamina (Pfizer) (100 mg/Kg de pes) i xilazene (Sigma-Aldrich) (10 mg/Kg de pes). De forma asèptica i mitjançant una incisió a la línia mitja del coll es visualitzava i separava la tràquea dels diferents plans per tal de poder inocular entre els dos cartílags 200 µl de la suspensió bacteriana. La preparació de la suspensió bacteriana es va realitzar immediatament abans de la inoculació mitjançant el creixement en fase exponencial de les soques en caldo LB. Una vegada obtingut el creixement exponencial es va centrifugar i es va resuspendre amb solució salina 0,9% complementada amb 0.5% d'agar (Oxoid SA) per l'obtenció d'una concentració final d' aproximadament 10^6 - 10^7 UFC.

Una vegada inoculada la suspensió bacteriana, es mantenia l'animal en posició vertical de 35 a 40 segons per assegurar que l'inòcul hagués penetrat als pulmons abans de continuar amb la sutura quirúrgica. Es van inocular vint rates amb cada soca per estandarditzar la pneumònia bilateral. El sacrifici dels animals es va realitzar després de 3 dies de la inoculació i es van cultivar els pulmons quantitativament per contar i comprovar la persistència de l'expressió de ACT-1 i/o la presència de porines dels aïllats obtinguts dels pulmons.

Per comprovar la presència de pneumònia, es va separar una part del pulmó de les rates i es va fixar en 10 volums de formol al 10%. Les seccions de teixit es van tenyir amb hematoxilina-eosina i es van examinar microscòpicament pel patòleg per comprovar la presència de pneumònia [183].

Estudis d'eficàcia terapèutica

En aquests estudis les soques *K. pneumoniae* 12 i *K. pneumoniae* 12dp es van estudiar per separat i per triplicat. Un total de 79 i 68 rates es van infectar amb les soques *K. pneumoniae* 12 i *K. pneumoniae* 12dp respectivament, distribuïdes en 3 grups de tractament. Cada experiment va incloure 3 rates control (total de 9 per cada soca). Els grups de tractament rebien injeccions intraperitoneals o bé d'imipenem-cilastatina (40 mg/Kg/2h), o meropenem-cilastatina (40 mg/Kg/2h), o cefepime (60 mg/Kg/4h).

El tractament es va començar 4 hores després de la inoculació bacteriana i la durada del tractament va ser de 3 dies. El sacrifici dels animals es va realitzar 8 hores després de la última dosi antibiòtica.

Els pulmons es varen extreure asèpticament, es varen pesar, homogeneïtzar i sembrar en agar Mac Conkey. Després de 24 hores d'incubació a 37°C, es va contar el nombre de bacteris viables. Els resultats dels cultius quantitius es varen expressar en \log_{10} UFC/g de teixit pulmonar. El valor límit de detecció va ser de 4 UFC. També es va realitzar un registre de la supervivència als 3 dies.

A més, el patòleg, sense conèixer-ne la procedència, va examinar un total de 24 blocs de teixit pulmonar incloent diferents grups terapèutics i controls, així com està descrit a l'apartat d'estandardització del model de pneumònia.

Determinació de l'aparició de mutants durant el tractament antibiòtic

L'aparició de resistències durant el tractament amb betalactàmics es va comprovar després de cada experiment. Per tal de detectar-ho es varen sembrar 400 μ l de l'homogeneïtzat de teixit pulmonar en agar Mac Conkey que contenia una concentració d'antibiòtic 4 vegades superior a la CMI corresponent d'imipenem, meropenem o cefepime (μ g/ml) per les dues soques.

Després d'incubar les plaques 24 hores a 37°C, es definia l'aparició d'una soca/es resistent com el creixement d'almenys una colònia de *K. pneumoniae*.

Anàlisi estadístic

La comparació entre els diferents grups de tractament i els controls es va realitzar comparant les medianes de recomptes pulmonars (\log_{10} UFC/g de teixit pulmonar) mitjançant l'anàlisi no paramètric de la variància (test de Kruskal-Wallis). Quan el valor d'aquest test va ser estadísticament significatiu, cada grup de tractament es va comparar amb el grup control i la resta de grups mitjançant el test de la U de Mann-Whitney. En tots els casos es considerà significatiu un valor de $P < 0.05$. Quan no es va detectar creixement es va utilitzar pels anàlisis estadístics, el valor límit de detecció. Per la realització dels tests estadístics vàrem utilitzar el programa SPSS 8.0 (SPSS Inc.).

2. 3 RESULTATS

Resultats *in vitro*

Segons les categories estandarditzades pel CLSI d'interpretació de les CMI, les soques de *K. pneumoniae* 12 i *K. pneumoniae* 12dp, portadores del plasmidi que conté la beta-lactamasa del tipus AmpC ACT-1, varen ser resistents a l'ampicil·lina, amoxicil·lina + àcid clavulànic, cefoxitina, cefotaxima i ceftazidima, en comparació amb la soca original de *K. pneumoniae* 52145 que va ser sensible a tots els antimicrobians anteriors. La soca *K. pneumoniae* dp, mancada de les principals porines (OmpK35 i OmpK36), va ser resistent a cefazolina, cefuroxima i cefoxitina.

Els resultats de les CMI d'imipenem, meropenem, ertapenem i cefepime de la soca original de *K. pneumoniae* 52145 i de les seves derivades estan indicades a la Taula 2. 1.

Les soques *K. pneumoniae* 52145, dp i 12 varen ser sensibles a cefepime i a tots els carbapenems testats. La soca *K. pneumoniae* 12dp, mancada de porines, va presentar unes CMI més elevades. En aquesta soca la deficiència de les principals porines va augmentar les CMI d'imipenem, ertapenem, meropenem i cefepime, fins a 64, 32 i 8 vegades, respectivament.

Es va descartar l'opció d'utilitzar l'ertapenem com a possible tractament en aquest tipus d'infecció perquè en valorar les seves CMI per aquestes soques, ens aportava menys que els altres dos carbapenems.

Taula 2. 1. Sensibilitat *in vitro* de *K. pneumoniae* 52145 i les soques derivades dp, 12 i 12dp.

Soques	CMI (µg/ml)			
	imipenem (<4 / 8 / ≥16) ^a	meropenem (<4 / 8 / ≥16) ^a	ertapenem (<2 / 4 / ≥8) ^a	cefepime (<8 / 16 / ≥32) ^a
<i>K. pneumoniae</i> 52145	0,25	0,03	<0,03	0,03
<i>K. pneumoniae</i> dp	1	0,03	<0,03	0,3
<i>K. pneumoniae</i> 12	0,25	<0,03	<0,25	0,25
<i>K. pneumoniae</i> 12dp	16	8	>16	2

^a Punts de tall establerts pel CLSI de les CMI pel grup *Enterobacteriaceae* segons les categories d'interpretació Sensible/ Entremig/ Resistent [169].

Model de pneumònia

Per tal de comparar els tractaments i d'estandarditzar l'inòcul per aconseguir una pneumònia bilateral es van realitzar estudis previs per assegurar el millor inòcul per cada soca. Va ser necessari provar diferents inòculs per tal d'obtenir similars recomptes bacterians als teixits pulmonars amb les diferents soques donat que presentaven lleugeres diferències en la DL_{50} (10 UFC per les soques 52145 i 12 i 100 UFC per les soques dp i 12dp deficient en porines). Es va aconseguir una pneumònia bilateral amb importants signes de pneumònia caracteritzats per abundants infiltrats de cèl·lules polimorfonucleades, vasculitis i edema a tots els animals amb uns inòculs de 10^6 UFC de *K. pneumoniae* 12 i 10^7 UFC per *K. pneumoniae* 12dp, respectivament. Aquests signes importants de pneumònia es poden observar a la Figura 2. 1 que corresponen a pulmons obtinguts de rates infectades amb les soques *K. pneumoniae* 12 (panell A) i 12dp (panell B).

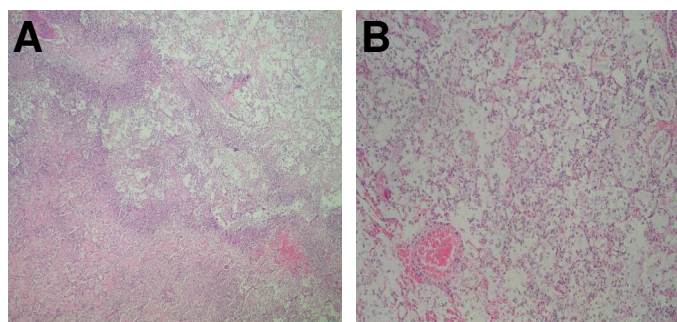


Figura 2. 1 Histopatologia dels pulmons de rata infectats per *K. pneumoniae*. La figura mostra la tinció amb hematoxilina-eosina de les seccions de pulmó infectat amb la soca *K. pneumoniae* 12 (A) o el mutant sense porines 12dp derivat d'aquesta (B).

Resultats de farmacocinètica

Els resultats dels paràmetres farmacocinètics estan resumits a la Taula 2. 2. D'acord amb aquests resultats es va establir l'administració de meropenem i d'imipenem de 40 mg/Kg cada dues hores i pel cefepime 60 mg/Kg cada quatre hores.

Els resultats dels paràmetres farmacocinètics realitzats amb cisplatí i probenecid varen demostrar una alta toxicitat en el cas del cisplatí i un allargament insuficient de la vida mitja dels antibiòtics a avaluar en el cas de l'administració conjunta de l'antibiòtic amb el probenecid. Els resultats de farmacocinètica obtinguts després de l'administració de 8mg/Kg de cisplatí 3 dies abans de la determinació varen mostrar un augment evident de la vida mitja de l'antibiòtic en sèrum, però l'estat general en què es trobava l'animal d'experimentació alhora de l'inici de la

infecció era força deteriorat. Tot i que els valors de creatinina dels animals eren compatibles amb els descrits en una insuficiència renal moderada (valors entre 2,9-3,7mg/dl), vàrem considerar que l'estat de l'animal previ a la infecció pulmonar era un factor important a tenir en compte. L'estat general previ a la infecció podia alterar els resultats dels experiments afectant sobretot la recuperació després de l'anestèsia, la infecció, el recompte pulmonar i la mortalitat acumulada.

El cas dels resultats obtinguts en els estudis dels paràmetres farmacocinètics realitzats conjuntament amb l'antibiòtic a estudiar i el probenecid va ser diferent. Vàrem desestimar l'opció perquè l'augment de la vida mitja que obtinguérem amb l'administració conjunta amb probenecid no era la mateixa per tots tres antibiòtics, mostrava força variabilitat entre experiments i entre animals i l'augment obtingut oscil·lava entre 10-20%. Per tant, l'augment obtingut a la vida mitja no suposava un gran canvi en els intervals de dosificació i sí que augmentava les possibles interferències.

Taula 2. 2 Paràmetres farmacocinètics dels antibiòtics obtinguts en un model animal amb les soques *K. pneumoniae* 12 i 12dp.

Tractament	Dosi (mg/Kg)	C _{màx} (mg/l)	t _{1/2} (h)	t _{1/2} a humans (h)	T>CMI (h)	
					Soca 12	Soca 12dp
Imipenem	40	49,65	0,52	1	1,4	1
Meropenem	40	63,77	0,52	1	1,4	1,2
Cefepime	60	209,2	1,1	2	2,5	2,4

C_{màx}: concentració màxima; t_{1/2}: vida mitja; T>CMI: temps durant el qual la concentració d'antibiòtic està per damunt de la CMI.

Eficàcia terapèutica a la infecció pulmonar experimental

Al final del període d'estudi (tres dies) i després de l'administració de la última dosi d'antibiòtic, tots els animals que no havien estat tractats presentaven una pneumònia bilateral segons els resultats histològics, amb una mediana del recompte bacterià de 8,01 (rang, 5,72 a 9,57 log₁₀ UFC/g de pulmó) amb la soca *K. pneumoniae* 12 i de 9,6 (rang, 7,56 a 10,28 log₁₀ UFC/g de pulmó) amb la soca *K. pneumoniae*12dp (Taula 2. 3). Els animals infectats i no tractats presentaren una mortalitat del 50% amb les dues soques, *K. pneumoniae*12 i *K. pneumoniae*12dp.

Els recomptes bacterians dels grups tractats i infectats amb la soca *K. pneumoniae*12 varen ser els següents: pel grup tractat amb meropenem la mediana del recompte bacterià va ser 1,71

(rang, 0,21 a 2,95 log₁₀ UFC/g de pulmó); pel grup dels que van rebre imipenem com a tractament la mediana del recompte va ser de 1,87 (rang, 0,20 a 3,53 log₁₀ UFC/g de pulmó); i el grup tractat amb cefepime de 2 (rang 0,21 a 4,30 log₁₀ UFC/g de pulmó) (Taula 2. 3).

Els resultats dels recomptes bacterians obtinguts dels experiments realitzats amb la soca mutant *K. pneumoniae*12dp varen ser els següents: pel grup tractat amb meropenem la mediana del recompte bacterià va ser 2,42 (rang, 0,86 a 3,54 log₁₀ UFC/g de pulmó); pel grup dels que van rebre imipenem com a tractament la mediana del recompte era de 2,98 (rang, 1,98 a 4,41 log₁₀ UFC/g de pulmó); i el grup tractat amb cefepime de 2,77 (rang 1,98 a 3,68 log₁₀ UFC/g de pulmó) (Taula 2. 3).

No va morir cap animal dels infectats durant els 3 dies de tractament antibiòtic, i en finalitzar tots els animals presentaven pulmons histològicament normals o amb focus mínims d'inflamació com a conseqüència de la infecció passada, com es pot observar als panells A, B i C de la Figura 2. 2 que corresponen a talls histològics de pulmons de rates que havien estat tractades amb meropenem, cefepime i imipenem, respectivament.

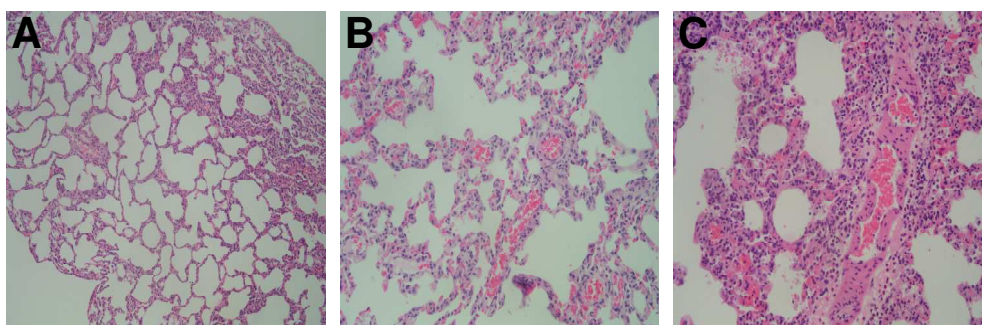


Figura 2. 2 Histopatologia representativa dels pulmons de rates infectades per *K. pneumoniae* i tractades amb distints antibiòtics. La figura mostra la tinció amb hematoxilina-eosina de les seccions de pulmó de rata infectada amb la soca *K. pneumoniae* 12 i tractada amb meropenem (A), infectada amb *K. pneumoniae* 12dp i tractada amb cefepime (B) i infectada amb *K. pneumoniae* 12dp i tractada amb imipenem (C).

Comparant l'aclariment bacterià obtingut al final del tractament dels animals tractats amb els controls (no tractats), s'observen diferències significatives ($P \leq 0.001$) entre els dos grups.

Els animals de tots els grups terapèutics que van ser infectats amb la soca *K. pneumoniae*12 presentaren una disminució en 5 log₁₀ dels recomptes bacterians. Les diferències observades entre els diferents grups terapèutics van ser petites i estadísticament no significatives ($P \geq 0.05$).

No es va observar creixement bacterià en 6/24 pulmons d'animals tractats amb imipenem, 4/24 del grup del meropenem i 5/23 del grup del cefepime.

En els animals infectats amb la soca *K. pneumoniae*12dp també es va observar una disminució de 5 log₁₀ dels recomptes bacterians. Però, quan es van comparar els grups tractats amb carbapenems, el meropenem va ser estadísticament més actiu que l'imipenem ($P \leq 0.05$). En aquest cas, es va observar creixement bacterià a tots els animals de tots els grups terapèutics.

Finalment, és important destacar que no es varen detectar mutants que haguessin augmentat en 4 dilucions la CMI basal d'imipenem, cefepime i meropenem en cap dels animals tractats i infectats amb les soques *K. pneumoniae*12 i *K. pneumoniae*12dp.

Taula 2. 3 Resultats d'eficàcia terapèutica

Tractament	<i>K. pneumoniae</i> 12					<i>K. pneumoniae</i> 12dp								
	Nombre d'animals	% mortalitat	Min*	Màx.*	Mediana*	Desviació estàndard	Variància	Nombre d'animals	% mortalitat	Min*	Màx.*	Mediana*	Desviació estàndard	Variància
Meropenem	24	0	0,21	2,95	1,71	0,86	0,74	20	0	0,86	3,54	2,42	0,74	0,54
Imipenem	24	0	0,20	3,53	1,87	1,05	1,11	20	0	1,98	4,41	2,98	0,59	0,36
Cefepime	23	0	0,21	4,30	2,00	1,06	1,13	20	0	1,98	3,68	2,77	0,45	0,20
Control	8	50	5,72	9,57	8,01	1,49	2,22	8	50	7,56	10,28	9,61	1,05	1,11

*Els valors del mínim (Min), màxim (Màx) i mediana estan expressats en log₁₀ UFC/g de teixit pulmonar.

2. 4 DISCUSSIÓ

La presència a les infeccions humanes causades per bacils gramnegatius productors d'una beta-lactamasa del tipus AmpC mitjançada per plasmidis està augmentant a tot el món [32-33, 184-185]. Aquest fet suposa una limitació important a les opcions terapèutiques, essent els carbapenems i les cefalosporines de 4^a generació els tractaments d'elecció. Però, també s'han descrit nivells elevats de CMI's en aquests dos grups amb soques productores d'AmpC i alteracions de la permeabilitat [32, 85, 186-187], agreujant el problema i limitant encara més les opcions terapèutiques. Aquests resultats descrits *in vitro* s'han estudiat amb models animals per conèixer els seus efectes reals utilitzant soques que expressaven beta-lactamases del tipus FOX, CMY-2 i ACT-1 [33, 142-143]. Per això, el nostre grup va decidir de comprovar l'efecte de l'imipenem, meropenem i cefepime en un model de pneumònia experimental amb una soca de *K. pneumoniae* productora de beta-lactamasa del tipus AmpC ACT-1 amb i sense pèrdua de porines a la membrana. Per dur a terme el projecte vàrem utilitzar una soca de *K. pneumoniae* coneguda, 52145, altament virulenta (LD₅₀: 10 UFC), sense cap tipus de beta-lactamasa, amb una expressió baixa del mecanisme d'efluxió i com a mínim amb la presència de les porines principals OmpK35 i OmpK36, per tal de poder desenvolupar mutants d'aquesta soca que presentessin una beta-lactamasa ACT-1 (*K. pneumoniae* 12), la pèrdua de les porines (*K. pneumoniae* dp) o la combinació d'ambdues (*K. pneumoniae* 12dp).

Els carbapenems s'han descrit estables a la presència de les beta-lactamases del tipus AmpC (mitjançades per plasmidis o cromosòmiques) tal i com també mostren els nostres resultats *in vitro*, i són considerats tractament d'elecció a les infeccions causades per aquestes soques [188]. El cefepime, cefalosporina zwitteriònica, també manté la seva activitat *in vitro* front aquestes soques, segurament degut a la combinació de diferents factors, incloent-hi la penetració superior i més ràpida de la membrana dels bacteris gramnegatius a través de les porines (que les diferencia de les cefalosporines de 3^a generació), la pobra afinitat a aquestes beta-lactamases, i una resistència alta a la hidròlisi [53].

En el nostre estudi, la introducció del plasmidi que contenia l'AmpC del tipus ACT-1 a la soca original de *K. pneumoniae* 52145 (*K. pneumoniae* 12) no va variar les CMI's als carbapenems però sí que va augmentar lleugerament la del cefepime, passant de 0,03 a 0,25 µg/ml. Quan aquesta soca perdia les porines principals OmpK35 i OmpK36 (*K. pneumoniae* 12dp) les CMI's augmentaven en els tres antibiòtics estudiats, l'imipenem passava de 0,25 a 16 µg/ml, el meropenem de 0,03 a 8 µg/ml i el cefepime de 0,25 a 2 µg/ml. Bradford *et al.* varen demostrar per primera vegada la resistència *in vitro* de l'imipenem en soques de *K. pneumoniae* que presentaven una combinació de la pèrdua de porines i la presència de ACT-1 [186]. Resultats similars s'han descrit posteriorment amb soques que contenien altres betalactamases del tipus AmpC [82].

Per tal de comprovar si aquests canvis *in vitro* es mantienien *in vivo* vàrem reproduir un model de pneumònia en rates immunocompetents infectades amb les soques *K. pneumoniae* 12 i *K. pneumoniae* 12dp i comparant els tractaments amb imipenem, meropenem i cefepime utilitzant un model de règim terapèutic similar al dels humans. Vàrem utilitzar uns intervals de dosificació bastant inferiors als dels humans per tal d'ajustar-ho als paràmetres farmacocinètics obtinguts en el model animal [189].

El model de pneumònia es va obtenir mitjançant la inoculació intratraqueal de 10^6 UFC de *K. pneumoniae* 12 i 10^7 UFC de *K. pneumoniae* 12dp. L'augment de l'inòcul utilitzat a la infecció causada per la soca de *K. pneumoniae* amb els dos mecanismes de resistència (*K. pneumoniae* 12dp) es pot explicar per l'increment proporcional de la seva DL_{50} , que s'observa quan les soques de *K. pneumoniae* perden les porines principals de la seva membrana. En els dos casos d'infecció (per *K. pneumoniae* 12 i *K. pneumoniae* 12dp) es va aconseguir una pneumònia bilateral amb altes densitats de bacteris al teixit pulmonar (\log_{10} UFC/g: 8,1 amb *K. pneumoniae* 12 i 9,61 amb *K. pneumoniae* 12dp) i una mortalitat del 50%.

Els resultats d'eficàcia terapèutica varen mostrar que el tractament de la pneumònia causada per les soques de *K. pneumoniae* productora d'ACT-1 amb pèrdua o no de les porines, produïen resultats similars en els tres grups (imipenem, meropenem i cefepime), amb unes reduccions del contingut de bacteris en teixit pulmonar de fins $5 \log_{10}$ UFC/g i una mortalitat del 0%. No obstant, els animals que varen ser infectats per la soca de *K. pneumoniae* productora d'AmpC i sense porines, no varen assolir l'esterilitat dels seus pulmons després del tractament en els grups de tractament amb carbapenems, i el meropenem va semblar ser lleugerament més actiu que l'imipenem. El grup de Pichardo *et al.* varen utilitzar un model de pneumònia en cobais infectats amb una soca de *K. pneumoniae* amb alteració de les principals porines o també amb la mateixa soca amb una beta-lactamasa AmpC del tipus FOX-5, per demostrar que tant els carbapenems com el cefepime aconseguïen una reducció similar d'entre 1 i $2 \log_{10}$ dels recomptes pulmonars, tot i que l'imipenem va mostrar un millor aclariment [142-143]. Un altre estudi de pneumònia experimental amb una soca de *K. pneumoniae* que expressava CMY-2 [143] va demostrar que la concentració bacteriana al teixit pulmonar disminuïa significativament amb el tractament amb cefepime i imipenem, amb millors resultats de supervivència obtinguts amb el grup de tractament de l'imipenem.

No es va observar l'aparició de clons resistents als antibiòtics després dels 3 dies de tractament. Pichardo *et al.* tampoc varen seleccionar mutants en els grups de tractament del meropenem i imipenem, en cap de les dues soques estudiades [142-143]. Només varen seleccionar mutants en els animals que havien estat infectats amb la soca de *K. pneumoniae* deficient en porines i havien estat tractats amb cefepime; els autors varen justificar l'aparició de mutants degut a que la soca utilitzada sobreproduïa una beta-lactamasa de forma constitutiva. En el nostre estudi no vàrem observar aquest fenomen, podria ser degut a que la densitat de

bacteris en el teixit pulmonar dels animals tractats era massa baixa com per detectar-s'hi subpoblacions resistents, ja que aquest tipus de mutants s'han descrit en 1 de cada 10^5 - 10^8 soques salvatges que expressen beta-lactamases del tipus AmpC [82].

L'activitat dels tres antibiòtics, imipenem, meropenem i cefepime *in vivo* va ser realment eficaç amb disminucions significatives dels recomptes bacterians en teixit pulmonar a pneumònies causades per *K. pneumoniae* productora d'ACT-1 amb o sense porines, segurament degut a les bones concentracions de l'antibiòtic en teixit pulmonar obtingudes amb aquests règims terapèutics. Tot i així, es varen observar lleugeres diferències en la capacitat de disminuir el recompte bacterià després del tractament obtingudes entre alguns dels antibiòtics utilitzats en els experiments amb la soca productora d'AmpC i deficient en porines.

Tots aquests resultats extrets del model animal de pneumònia poden ajudar en el disseny de futurs protocols clínics. A la vegada, són necessaris més resultats clínics i *in vivo* d'infeccions causades per soques productores de beta-lactamases del tipus AmpC o BLEE i amb pèrdua de porines per valorar la millor opció terapèutica.

CAPÍTOL 3

La bomba d'efluxió AcrAB de *K. pneumoniae* contribueix a la resistència als antimicrobians i a la virulència

3.1 OBJECTIUS

A part de les mutacions a les topoisomerases i alteracions de la permeabilitat, els sistemes d'efluxió depenents d'energia també s'han vist involucrats en el fenotip de resistència a quinolones a *K. pneumoniae* [190]. Un dels sistemes d'efluxió implicats en aquest fenotip de resistència és el sistema d'efluxió multidroga AcrAB que a *K. pneumoniae* està codificat per l'operó *acrRAB*. Estudis realitzats per Mazzariol i Hasdemir han descrit la relació entre la disminució de la sensibilitat a quinolones i la sobreexpressió d'AcrA a varis aïllats clínics de *K. pneumoniae* resistents a quinolones, tot i que no es varen descriure les bases de la sobreexpressió [191-192]. De totes maneres, es coneix poc sobre quin és el paper directe i específic de la bomba d'efluxió en la resistència de *K. pneumoniae* a d'altres antimicrobians.

Per altra banda, és conegut que algunes bombes d'efluxió tenen la funció d'expulsar substàncies com detergents i tincions i també, pèptids antimicrobians propis de l'hoste [193]. A més, hi ha suficient evidència de que les bombes d'efluxió que contribueixen de forma clínicament rellevant en la resistència antibiòtica, són importants per la patogenicitat del bacteri. Tot i que, el paper de la bomba d'efluxió *acrAB* en la patogenicitat de *K. pneumoniae* a les infeccions respiratòries encara no ha estat estudiat.

L'objectiu del treball ha estat conèixer el paper de la bomba AcrAB d'efluxió en la resistència a quinolones i d'altres antimicrobians incloent els pèptids humans antimicrobians. També, conèixer la funció que juga la bomba en el model de pneumònia per *K. pneumoniae*.

Aquests objectius generals s'han dividit amb els següents objectius concrets:

- Construir mutants isogènics de *K. pneumoniae* 52145R, un deficient en el component AcrB del sistema d'efluxió: 52 Δ acrB i l'altre deficient en el repressor de bomba 52 Δ acrR.
- Determinar les CMI's a diferents antibiòtics de la soca salvatge i de les mutants.
- Realitzar experiments de supervivència amb pèptids antimicrobians humans, defensines humanes i BAL amb la soca salvatge i les mutants.
- Realitzar experiments *in vivo*, mitjançant un model de pneumònia en ratolins per tal de determinar el percentatge de supervivència de les soques en el teixit pulmonar.

3. 2 MATERIALS I MÈTODES

Soques bacterianes, plasmidis i medis

La soca de *K. pneumoniae* 52145 és un aïllat clínic amb fenotip capsulat (serotip K2) i virulent, descrit anteriorment [180]. En aquest estudi es va utilitzar un mutant espontani de la soca 52145, resistent a la rifampicina, anomenat 52145R. Les soques d'*E.coli* que es varen utilitzar en els experiments de clonació varen ser DH5 α i S17-1 λ pir, a on el gen *pir* codificava la proteïna π , proteïna necessària per la replicació del plasmidi pFS100 [194]. Els plasmidis pCR2,1 i pGEM-T (Invitrogen) eren els vectors de clonació TA que es van utilitzar per clonar els productes de PCR. El plasmidi pFS100 es va utilitzar per crear mutacions d'inserció-duplicació per recombinació homòloga [194]. Les cèl·lules bacterianes es van fer créixer en caldo LB a 37 °C amb agitació, o bé en agar; en els casos que va ser necessari, el medi de cultiu es va complementar amb kanamicina (Sigma-Aldrich) (50 μ g/ml) o rifampicina (Sigma-Aldrich) (50 μ g/ml).

Tècniques d'ADN

L'ADN plasmídic es va aïllar mitjançant la utilització del kit Wizard Miniprep (Promega) seguint les instruccions del fabricant. L'aïllament de l'ADN genòmic, les PCRs, les transformacions i les conjugacions es van dur a terme seguint les tècniques estàndards [195]. La ligasa T4 ADN i els enzims de restricció es van utilitzar seguint les recomanacions del fabricant (GE Healthcare). Els fragments d'ADN que es van digerir amb enzims de restricció, es van separar per electroforesi en gel d'agarosa i es van tenyir amb bromur d'etidi per poder-los visualitzar. Per l'anàlisi de Southern blot i marcatge i detecció de les sondes es va utilitzar el kit ECL (GE Healthcare), seguint el protocol del fabricant. Les sondes per *acrB* i *acrR* es van obtenir a través de l'amplificació de la PCR de l'ADN genòmic de *K. pneumoniae* 52145R amb els encebadors AcrU6/AcrL3 i AcrRF1/AcrRR1, respectivament (Taula 3. 1).

Creació dels mutants d'*acrB* i *acrR* a partir de la soca de *K. pneumoniae* 52145R

Per tal de construir un mutant d'*acrB* (gen que codifica la proteïna interna de la bomba d'efluxió) a partir de la soca de *K. pneumoniae* 52145R, primer es va obtenir el gen complet d'*acrB* per amplificació mitjançant PCR amb els encebadors AcrB1 i AcrB2 (Taula 3. 1) per després clonar-ho en pCR2,1 i obtenir el plasmidi pQE57. A partir de la digestió de pQE57 amb *KpnI* es va obtenir un fragment intern del gen *acrB* de 800 parells de bases que es va clonar en el vector suïcida dependent de la proteïna π , pFS100, obtenint el plasmidi pQE58. Per tal de construir un mutant d'*acrR* (gen necessari per la síntesi del repressor de l'expressió de la bomba) es va amplificar mitjançant PCR un fragment intern d'*acrR* a partir de l'ADN genòmic de 52145R, amb els encebadors AcrRF1/AcrRR1 (Taula 3. 1). El producte de la PCR es va clonar

a pGEM-T per obtenir pQE60. Un fragment de pQE60, obtingut després de la digestió amb *EcoRI*, que contenia un fragment intern d'*acrR* es va clonar en el vector transportador pFS100 per obtenir el plasmidi pQE61. Finalment, els plasmidis pQE58 i pQE61 es varen introduir per conjugació a *K. pneumoniae*. Per tal de seleccionar mutants amb la integració en el cromosoma de la soca 52145R dels plasmidis pQE58 o pQE61, i que provocaven la interrupció de l'expressió d'*acrB* o *acrR*, respectivament, es va sembrar una alíquota de cada conjugació en plaques de LB amb rifampicina i kanamicina. Pels estudis posteriors, es va utilitzar un integrant de cada conjugació anomenats: *K. pneumoniae* 52145Δ*acrB* o *K. pneumoniae* 52145Δ*acrR*.

Taula 3. 1 Encebadors d'oligonucleòtids utilitzats en aquest estudi

Nom	Seqüència 5'-3'	Gen diana	Finalitat
AcrU6	GTGGTTAAAACGCTGG	fragment	Sonda <i>acrB</i>
AcrL3	ATTAATGATGCTCAACCTGATG	intern <i>acrB</i>	
AcrB1	AAGCTTAACTTAAACAGGAGC	<i>acr B</i>	Construcció del plasmidi integrant pQE58
AcrB2	TTCGAAGAAGATTAATGATGCTC		
AcrRF1	GATTCTAGATGTTGCTCTGC	fragment	Sonda <i>acrR</i> , Construcció del plasmidi integrant pQE61, i amplificació RT-PCR d' <i>acrR</i>
AcrRR1	CGTCGTCTAGAATTGATAC	intern <i>acrR</i>	
AcrU7	GAGCTGATTGACCAGG	fragment	amplificació RT-PCR d' <i>acrB</i>
AcrL4	CTGATAAGACATCCCGGTCCA	intern <i>acrB</i>	
U681	CGGTTACGGCCAGTGGAATA	fragment	amplificació RT-PCR del gen d' <i>ompK36</i>
L1316	GACGCAGACCGAAATCGAACT	intern <i>ompK36</i>	

Extracció d'ARN i RT-PCR

L'ARN cel·lular total de *K. pneumoniae* es va aïllar utilitzant el Kit Qiagen Rneasy (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant.

Per obtenir els productes de les transcripcions d'*acrB*, *acrR* i *ompK36* es va realitzar una RT-PCR utilitzant el sistema Access (RT)-PCR amb els encebadors AcrU7/AcrL4, AcrRF1/AcrRR1, i U681/L1316, respectivament (Taula 3. 1); es va fer la reacció utilitzant 15 ng d'ARN total, 45 min a 48°C, seguit de 40 cicles seguint les següents condicions: 30 s a 94°C, 1 min a 50°C i 2

min a 72°C. Els productes de PCR es varen separar per electroforesi en gel d'agarosa i es van visualitzar mitjançant la tinció amb bromur d'etidi.

Determinació de l'expressió del polisacàrid capsular i el lipopolisacàrid

La determinació de l'expressió del polisacàrid capsular i del LPS es va realitzar mitjançant la tècnica immunoenzimàtica d'ELISA. Amb aquest propòsit, cada pouet de la placa es va recobrir amb 1 µg de polisacàrid capsular serotip K2 o 1 µg de LPS serotip O1. Després de saturar la superfície dels pouets amb PBS pH 7,4 amb 1% albúmina de sèrum boví, les plaques es varen incubar amb dilucions seriades d'extractes de polisacàrid capsular o LPS i anticossos front polisacàrid capsular serotip K2 o LPS serotip O1, respectivament. Els anticossos units es varen detectar amb immunoglobulina G de cabra anti-conill marcada amb fosfatasa alcalina i utilitzant p-nitrofenil fosfat. Les incubacions es van dur a terme a 37 °C durant una hora amb antisèrum diluït amb PBS-1% albúmina de sèrum boví i seguides de rentats amb PBS. Per construir una corba estàndard es van utilitzar quantitats conegudes de polisacàrid capsular i lipopolisacàrid purificats amb els mètodes de Wilkinson i Sutherland [196] i de Westphal i Jann [197].

Anàlisi de les sensibilitats

La CMI dels diferents antimicrobians es va determinar mitjançant el mètode d'Etest (AB Biodisk) en agar Mueller Hinton d'acord amb les instruccions del fabricant. Les plaques es varen incubar a 35°C durant 18 hores per determinar les diferents CMIs.

Experiments de supervivència bacteriana

Pels experiments amb BAL es va recollir aquest fluid d'individus sans, així com ja estava descrit prèviament [198]. Aquest procediment es va aprovar pel Comitè Ètic Local i abans d'obtenir les mostres se'n firmava un consentiment informat. El BAL (120-200 ml de cada individu) es va centrifugar, i se li va afegir un còctel d'inhibidors de la proteasa (Sigma-Aldrich) al sobrenedant. Després de la liofilització, el BAL es va resuspendre amb aigua estèril per obtenir una solució concentrada 200 vegades respecte el volum inicial. En els experiments es va utilitzar una mescla dels BAL de diferents individus. Per la realització dels assajos de supervivència amb el BAL es van utilitzar 10^3 cèl·lules bacterianes crescudes fins a la fase de creixement exponencial, aquestes es van resuspendre amb 150 µl de PBS i es van mesclar amb 50 µl de BAL. La mescla es va incubar a 37°C durant 1 hora i es van plaquejar dilucions seriades en plaques de LB, on es varen poder comptar el nombre de bacteris viables. Els efectes bactericides del BAL es van calcular com el percentatge de supervivència, prenent com el 100% aquells recomptes bacterians obtinguts sense la presència de BAL.

També vàrem testar l'efecte de la polimixina B. La polimixina B és un pèptid que es troba comercialitzat pel seu ús clínic des dels anys 50, però que se'n va limitar el seu ús pels seus

efectes tòxics. Actualment, degut a l'augment de microorganismes multirresistents aquest pèptid antimicrobià és candidat per ser utilitzat com agent terapèutic en les infeccions bacterianes. Per conèixer l'efecte de la polimixina B es va preparar una suspensió bacteriana amb triptona-PBS (pH 7,4) que contenia $2,1 \times 10^5$ UFC/ml de *K. pneumoniae* crescuda fins a la fase de creixement exponencial. D'aquesta suspensió se'n van agafar 10 µl i es van mesclar amb 200 µl de polimixina B (Sigma-Aldrich) (0,1 µg/ml) en tubs Eppendorf. La mescla es va incubar 30 minuts a 37°C. En paral·lel es van calcular les supervivències bacterianes relatives a les suspensions bacterianes tractades amb carbonyl-cianida-m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich), un desacoplador energètic que inhibeix el funcionament de les bombes d'efluxió, i tractades amb glucosa (0,4%) per tal d'avaluar l'efecte activador d'aquest component. Els recomptes bacterians i els resultats es van expressar en percentatges respecte els recomptes bacterians obtinguts d'aquells bacteris que no havien estat exposats als agents antibacterians. Finalment, per conèixer l'efecte de la defensina dels neutròfils humans (HNP-1) (Sigma-Aldrich) i de les beta-defensines 1 (HBD-1) i 2 (HBD-2) (Prepotech) es va preparar una suspensió bacteriana que contenia 10^5 UFC/ml en 10 mM PBS (pH 6,5)-0,1% TSB (Caldo Triptona-Soja)-100 mM NaCl. Es van mesclar en tubs Eppendorf 5 µl de la suspensió bacteriana amb 20 µl de la defensina corresponent. Es varen incubar durant 1 hora i es van plaquejar en plaques LB. Els recomptes bacterians es van expressar així com està descrit en el cas de la polimixina.

Tots els experiments de supervivència bacteriana es van realitzar per duplicat i en tres vegades diferents i independents.

Model de pneumònia en ratolí

En el model de pneumònia, els ratolins mascles raça ICR-CD1 (Harlan Ibèrica) de 16-20 g de pes van ser anestesiats i posteriorment intubats intratraquealment utilitzant una agulla d'alimentació despuntada [5]. Se'ls va inocular 50 µl d'una suspensió que contenia aproximadament 10^3 UFC de *K. pneumoniae* obtinguda d'un cultiu líquid en fase de creixement exponencial. Es van fer grups de 10 animals i es van sacrificar a les 24, 48 i 72 hores; se'n van extreure els pulmons de forma asèptica, es van homogeneïtzar i es van cultivar de forma quantitativa en plaques LB. Tots els experiments amb animals es varen fer seguint les guies institucionals i nacionals i varen ser aprovats pel Comitè d'Experimentació Animal de la institució.

Mètodes estadístics

Les comparacions entre els diferents grups es van realitzar mitjançant la t Student o pel test U Mann-Whitney quan es va requerir. Un valor de $P < 0,05$ es va considerar estadísticament significatiu.

3. 3 RESULTATS

Caracterització fenotípica i genotípica de l'operó AcrRAB

Per tal de conèixer el paper de la bomba d'efluxió AcrAB en la resistència antimicrobiana i virulència a *K. pneumoniae* es van construir dos mutants isogènics partint de la soca salvatge 52145R. Aquesta soca es va escollir per la seva alta virulència demostrada en el model de pneumònia en ratolins [5]. Es va utilitzar la tècnica de mutagènesi per inserció-duplicació per interrompre *acrB*, necessari per la síntesi d'una bomba d'efluxió funcional, o *acrR*, necessari per la síntesi del repressor de l'expressió de la bomba. A la Figura 3. 1 es representa esquemàticament el cromosoma de les soques 52145R i les seves mutants. L'anàlisi per Southern blot de l'ADN genòmic amb sondes específiques d'*acrB* i *acrR* va confirmar la generació de dues còpies incompletes dels gens per la integració del plasmidi. L'anàlisi de RT-PCR va confirmar que les mutacions produïen l'abolició de la transcripció d'*acrB* o *acrR*. Es va utilitzar com a control *ompK36*, gen que codifica la porina OmpK36, per comprovar que es transcrivía de forma eficient en ambdós mutants.

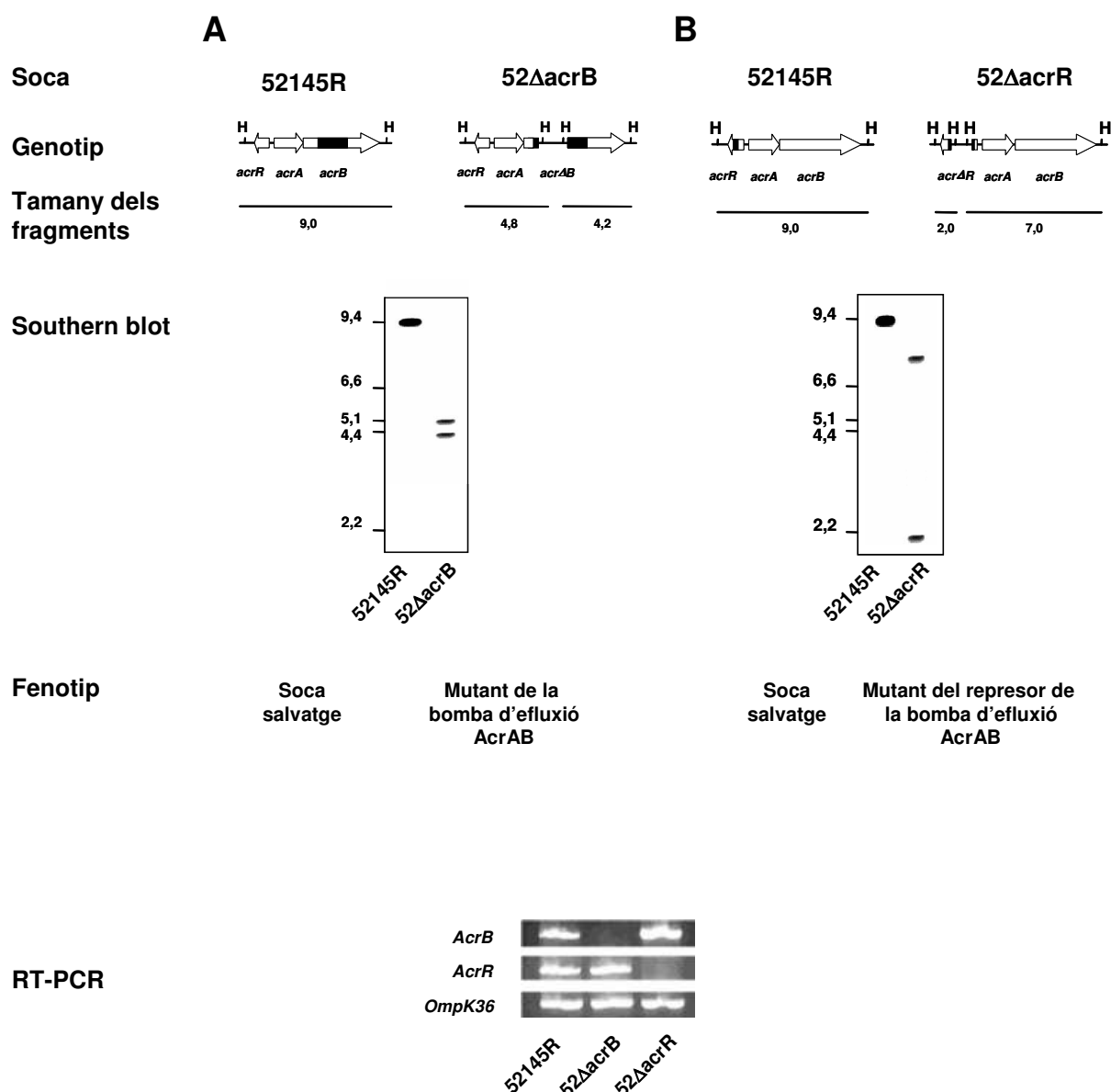


Figura 3. 1 Representació esquemàtica del cromosoma de *K. pneumoniae* a la soca virulenta 52145R i els seus mutants isogènics 52ΔacrB (A) i 52ΔacrR (B). La mida dels fragments d'ADN a l'esquema no està a escala. Les caixes negres indiquen les sondes utilitzades en l'anàlisi per Southern blot. La línia entre les caixes negres en el genoma dels mutants representa el plasmidi d'ADN integrat en el cromosoma. H és l'abreviatura de l'enzim de restricció *Hind*III. Els pesos esperats dels fragments cromosòmics que hibriden amb les sondes estan indicats en kilobases. A la figura es mostra l'anàlisi per Southern blot del cromosoma de *K. pneumoniae* salvatge i dels mutants isogènics digerits per *Hind*III. Els marcadors de pes molecular estan indicats a l'esquerre de les membranes. L'expressió dels gens mutats a cada soca es va determinar per RT-PCR. A la Figura 3. 1 es mostra, els productes de la RT-PCR per cada soca utilitzant els encebadors específics per *acrB* o *acrR*, i els encebadors específics per *ompK36*, com a gen de control.

Paper de la bomba d'efluxió AcrAB en la resistència antibiòtica de *K. pneumoniae*

Per conèixer el paper de la bomba d'efluxió AcrAB en la resistència antibiòtica, es va determinar la sensibilitat de la soca salvatge *K. pneumoniae* 52145R i les seves derivades mutants isogènics de la bomba d'efluxió 52ΔacrB i 52ΔacrR a diversos antimicrobians (Taula 3. 2). És important tenir en compte que les CMI de la majoria d'antibiòtics per la soca 52145R de partida eren baixes. Malgrat això, es varen observar diferències entre la soca salvatge i les soques mutants en les CMI de varis antibiòtics.

Com era d'esperar, les CMI de totes les quinolones eren menors per la soca 52ΔacrB que per la soca salvatge, mentre que es va observar un lleuger increment de les CMI d'aquest grup d'antibiòtics per la soca 52ΔacrR. La mateixa tendència es va apreciar pels betalactàmics. Les CMI eren menors per 52ΔacrB i més alts per 52ΔacrR que per la soca salvatge.

Les CMI dels carbapenems per les soques mutants no varen variar respecte als valors obtinguts per la soca parental. La CMI de la eritromicina per la soca mutant 52ΔacrB va disminuir de forma marcada, mentre que per altres antibiòtics com els aminoglicòsids, la tetraciclina, i el cloramfenicol, les disminucions de la CMI varen ser menys importants.

En conjunt, aquests resultats confirmen la fiabilitat dels nostres mutants i demostren el fet de que la bomba d'efluxió AcrAB està implicada en l'expulsió de diversos agents antimicrobians.

Taula 3. 2 Sensibilitat antimicrobiana de la soca 52145R i els mutants derivats isogènics 52ΔacrB i 52ΔacrR

Antibiòtic	52145R	52ΔacrB	52ΔacrR
Àcid nalidíxic	4	0,5	8
Ciprofloxacina	0,06	0,008	0,12
Levofloxacina	0,09	0,006	0,19
Imipenem	0,125	0,125	0,125
Ertapenem	0,012	0,012	0,012
Meropenem	0,03	0,03	0,03
Cefoxitina	8	4	32
Cefotaxima	0,125	0,06	4
Eritromicina	32	8	32
Tetraciclina	2	0,25	4
Cloramfenicol	2	1	4
Tobramicina	0,25	0,125	0,25
Gentamicina	0,25	0,06	0,25

Paper de la bomba d'efluxió AcrAB en la pneumònia produïda per *K. pneumoniae*

Està descrit que les bombes d'efluxió no només transporten antibiòtics sinó que també transporten substàncies antimicrobianes pròpies de l'hoste. Per això, ens vàrem plantejar la hipòtesi de que les bombes d'efluxió podrien contribuir a la supervivència dels bacteris en els teixits de l'hoste.

El fet de que *K. pneumoniae* fos una causa important de pneumònia nosocomial, ens va fer qüestionar quin podia ser el paper de la bomba d'efluxió AcrAB front els agents antimicrobians que es troben al BAL. La soca mutant de bomba 52 Δ acrB va ser més sensible als agents antimicrobians del BAL que la soca salvatge 52145R. Una hora d'incubació amb la presència de BAL va ser suficient per inhibir el creixement del mutant 52 Δ acrB ($5\% \pm 3\%$ supervivència), mentre que les supervivències de la soca parental 52145R i la mutant 52 Δ acrR es varen afectar molt menys ($53\% \pm 5\%$ i $62 \pm 7\%$ de supervivència, respectivament). Tenint en compte que els pèptids antimicrobians són un dels tipus de components antibacterians presents en el BAL, vàrem hipotetitzar que la soca 52 Δ acrB podria ser més sensible a aquests pèptids que la parental 52145R (Figura 3. 2).

La polimixina B és considerada com el model de pèptid antimicrobià i les beta-defensines 1 i 2 (HBD-1, HBD-2) i la defensina 1 de neutròfils humans (HNP-1) són tres pèptids antimicrobians presents al BAL humà. Confirmant la nostra hipòtesi, la soca 52 Δ acrB va ser significativament més sensible a la polimixina B, HBD-1 i 2 i HNP-1 (Figura 3. 2, $p < 0.05$) que la parental 52145R. Aquestes diferències no varen ser degudes a la reducció de l'expressió de la càpsula o el LPS, que estan involucrades en la resistència al pèptids antimicrobians a *K. pneumoniae* [198], perquè l'expressió d'ambdues va ser similar (no es mostren les dades). Els resultats també varen mostrar que la soca 52 Δ acrR va ser lleugerament més resistent a la polimixina B i HNP-1 que la soca salvatge, tot i que les diferències no varen ser estadísticament significatives.

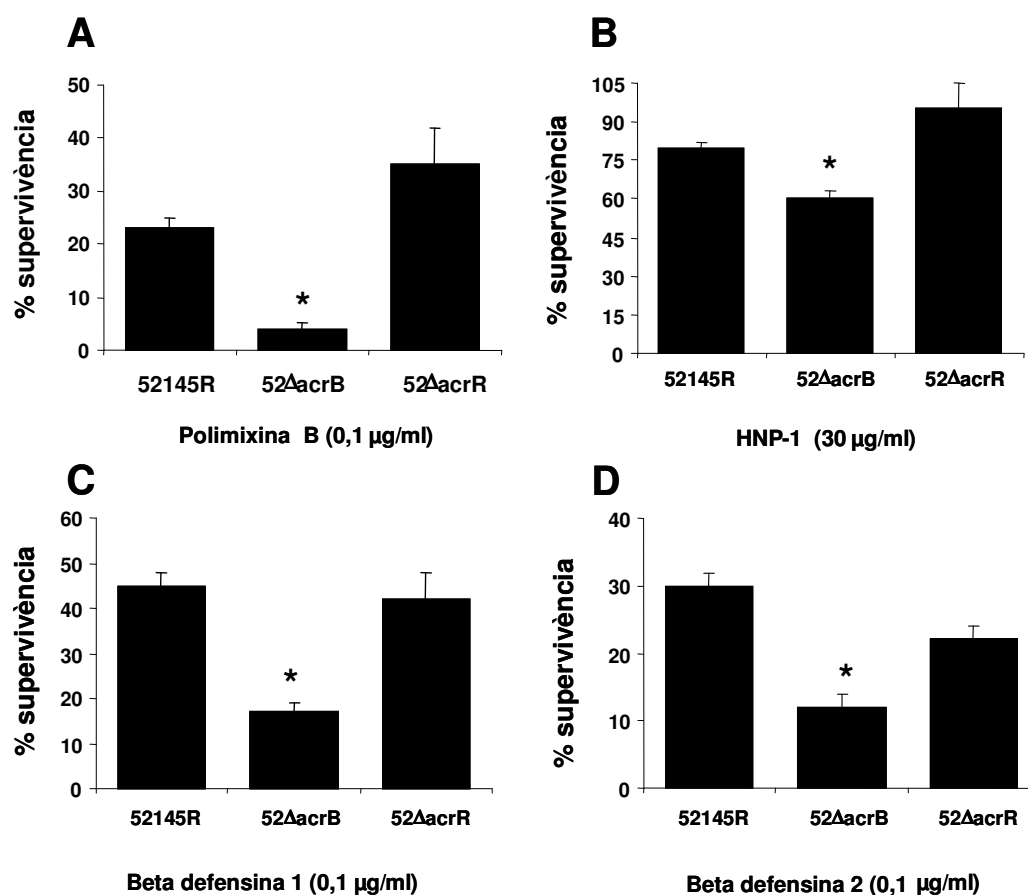


Figura 3. 2 Resistència de *K. pneumoniae* 52145R i els mutants derivats isogènics a la polimixina B i pèptids antimicrobians humans. Les cèl·lules bacterianes es varen incubar amb polimixina B (0,1 µg/ml) (A), HNP-1 (30 µg/ml) (B), Beta-defensina 1 (0,1 µg/ml) o Beta-defensina 2 (0,1 µg/ml). Es mostra la supervivència bacteriana a l'eix d'ordenades (percentatge de recomptes cel·lulars no afectats pels agents). Cada punt representa la mitja i la desviació estàndard a com a mínim tres experiments realitzats per duplicat i de forma independent. Les diferències significatives ($P < 0,05$) entre les diferents soques estan indicades amb asteriscs

Per tal de confirmar que els pèptids antimicrobians utilitzaven l'energia de les bombes d'efluxió es van realitzar experiments amb CCCP per interferir la seva acció. El CCCP va reduir la supervivència de 52145R a la polimixina B indicant que aquesta s'expulsava a l'exterior mitjançant un mecanisme que requereix d'energia (Figura 3. 3). Per contra, l'addició de glucosa a les cèl·lules tractades amb CCCP augmentava els nivells relatius de supervivència bacteriana fins a valors similars a aquells observats en els bacteris no tractats.

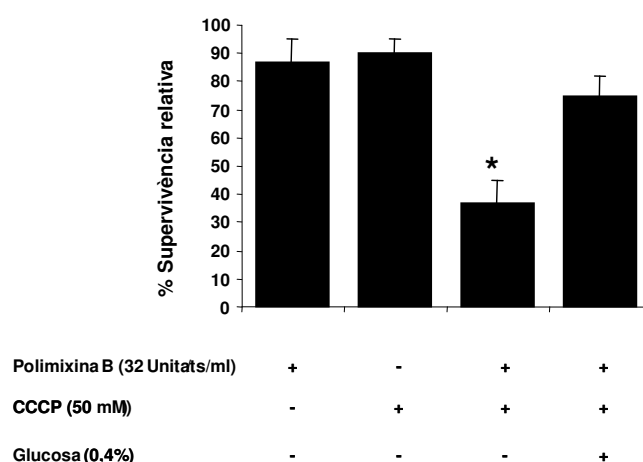
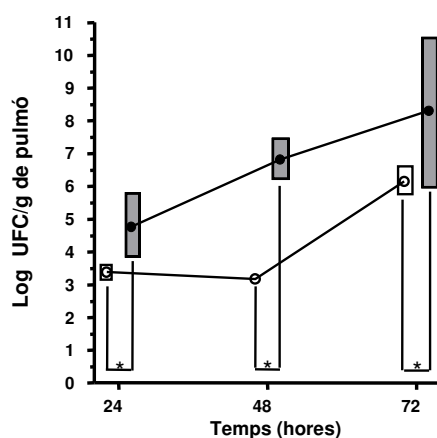


Figura 3. 3 Efecte de la polimixina B a la soca 52145R de *K. pneumoniae*. Les cèl·lules bacterianes es varen exposar a polimixina B (0,1 µg/ml) sola o amb la presència de glucosa (0,4%), CCCP (50 µM), i CCCP més glucosa. La supervivència bacteriana s'expressa com el percentatge de colònies bacterianes no afectades per la polimixina B després d'una hora d'incubació. A l'eix d'ordenades es mostren els percentatges de supervivència. Cada experiment es va realitzar per duplicat. Les diferències significatives ($P < 0,05$) entre les diferents soques estan indicades amb asteriscs

Finalment, es va provar la capacitat de produir pneumònia de la soca mutant 52ΔacrB en un model de pneumònia en ratolí. Els ratolins es van infectar intratraquealment amb 52145R i 52ΔacrB i es va determinar la quantitat de bacteris per gram de teixit pulmonar al 1er, 2on i 3er dia de la infecció per ambdues soques. Tal i com es mostra a la Figura 3. 4, els pulmons dels ratolins infectats amb la soca 52ΔacrB varen presentar recomptes bacterians significativament inferiors (Figura 3. 4, $p < 0,05$) que els presentats en els pulmons dels ratolins infectats amb la soca salvatge.



Temps (h) post-infecció

Figura 3. 4 Efecte de la deficiència de la bomba d'efluxió en la infecció pulmonar *in vivo* a *K. pneumoniae*. Els ratolins (n:10 per grup) es varen inocular intratraquealment amb la soca salvatge 52145R (barres grises) o amb la soca deficient de bomba 52ΔacrB (barres negres). El nombre de bacteris recuperats en els homogeneïtzats de pulmó expressat en forma de logaritme de les UFC per gram de pulmó (eix ordenades) es va determinar a les 24, 48 i 72 hores després de la infecció. Els resultats que són significativament diferents s'han marcat amb asterisc.

3. 4 DISCUSSIÓ

La seqüenciació dels genomes de gran varietat d'espècies bacterianes ha demostrat que a la majoria es poden trobar codificats varis sistemes d'efluxió. *K. pneumoniae* codifica un sistema d'efluxió, AcrAB, que és homòleg al sistema descrit a *E. coli*. A *Klebsiella* spp. s'han caracteritzat pocs sistemes d'efluxió multidroga [199-201], tot i que les dades de la seqüència de la soca de *K. pneumoniae* MGH78578 podrien suggerir la presència potencial de moltes altres. La majoria d'estudis relacionats amb les bombes d'efluxió s'han centrat en la seva relació amb la resistència antibiòtica. Però, és raonable pensar que la funció d'aquestes bombes seria la d'expulsar components tòxics presents en el seu entorn natural, com sals biliars, àcids grassos i hormones. Pocs estudis han estudiat la contribució de les bombes d'efluxió a la virulència bacteriana.

En aquest estudi hem caracteritzat la contribució de la bomba d'efluxió AcrAB de *K. pneumoniae* en la resistència a les quinolones i d'altres antibiòtics utilitzant els mutants *acrB* i *acrR* derivats de la soca virulenta 52145R. La deficiència d'*acrB* va comportar un augment de la sensibilitat a quinolones, que coincideix amb el què s'havia descrit anteriorment, on demostraven que la sobreexpressió d'AcrAB deguda a mutacions a *acrR* causava resistència a ciprofloxacina a varis aïllats clínics de *K. pneumoniae* [137, 191-192, 202]. A més, vàrem observar a la soca 52145 Δ *acrB* una disminució de les CMI's d'eritromicina, tetraciclina, cloramfenicol, aminoglicòsids i betalactàmics, excepte carbapenems quan la comparàvem amb la soca salvatge, que ens indicaria que els sistema d'efluxió podria reconèixer varis substrats, així com passa a *Enterobacter cloacae* i *E. coli* [202-203]. Aquest fet suggereix que el sistema d'efluxió en combinació amb BLEE i alteracions a les porines podrien contribuir de forma significativa a l'aparició del fenotip de multiresistència observat a algunes soques de *K. pneumoniae*, i aniria a favor de que les bombes d'efluxió estarien involucrades en la resistència a betalactàmics [179].

La soca mutant d'*acrR* va mostrar increments moderats de les CMI's a la majoria d'antimicrobians que es varen testar en comparació amb la soca original 52145R. Aquest fet contrasta amb els resultats obtinguts a estudis anteriors, on s'havien observat increments marcats de la resistència a quinolones en aquelles soques que tenien mutacions en el repressor, i que produïen una sobreexpressió d'AcrAB [137, 192]. En el nostre treball, la deficiència d'AcrR no va augmentar de forma exagerada les CMI's de les quinolones. Hi hauria dues hipòtesis per explicar aquest fet. La primera, hi hauria altres factors, com RamA, que estarien involucrats en la regulació de l'expressió de la bomba d'efluxió en aquesta soca. I segon, que aquesta soca necessitaria altres mecanismes de resistència, a part de la bomba d'efluxió, per forçar la resistència a les quinolones.

En aquest estudi hem demostrat que la bomba d'efluxió AcrAB de *K. pneumoniae* també contribueix a la resistència front els pèptids antimicrobians que trobem als pulmons. En aquest sentit, HBD-1 i HBD-2 se sintetitzen a les cèl·lules epitelials pulmonars, mentre que HNP-1 s'allibera pels neutròfils en el lloc de la infecció. Les concentracions dels pèptids antimicrobians pulmonars que es van utilitzar a l'estudi, coincidien amb les concentracions en què els trobem de forma habitual als BALs de les persones sanes [204], donant rellevància fisiològica als resultats del nostre treball. Curiosament, la bomba homòloga d'AcrAB que trobem a la planta *Erwinia amylovora* també intervé en la resistència a toxines antibacterianes derivades de la planta, com flavonoides i alcaloides [205].

Fins al moment, no s'han descrit gaires sistemes d'efluxió que intervinguin en la mediació a la resistència front els pèptids antimicrobians, potser els millors exemples i més ben caracteritzats han estat la bomba d'efluxió MtrC-MtrD-MtrE de *N. gonorrhoeae* i *N. meningitidis*, la bomba OprM de *P. aeruginosa*, i la bomba de *Yersinia enterocolitica* [206-209]. Per això, ens podríem atrevir a dir que una de les primeres funcions de les bombes d'efluxió seria la d'expulsar els pèptids antimicrobians presents en els teixits de l'hoste. De fet, els pèptids antimicrobians són considerats com una de les primeres barreres primàries de defensa contra les infeccions bacterianes.

Els experiments *in vivo* varen revelar que els animals infectats amb la soca 52145 Δ acrB presentaven quantitats de bacteris en el teixit pulmonar menors que els animals que s'havien infectat amb la soca salvatge. Aquestes diferències varen ser significatives però no eren exageradament marcades, potser degut a la presència d'altres factors de virulència, com el polisacàrid capsular i el lipopolisacàrid, [5, 210] que podrien haver emmascarat els efectes. Però aquest sistema d'efluxió podria jugar un paper important en la resistència bacteriana contra els mecanismes primaris de defensa en aquelles soques que degut al tractament *in vivo* amb quinolones sobreexpressen la bomba AcrAB. L'associació entre la sobreexpressió de la bomba d'efluxió AcrAB i la resistència als pèptids antimicrobians planteja una greu preocupació, que podria suposar l'ús de determinats agents antimicrobians pel tractament de la pneumònia en pacients immunocompromesos.

En resum, en aquest treball s'ha descrit l'ús de dos mutants, 52145 Δ acrB i 52145 Δ acrR, per provar quina es la implicació de la bomba d'efluxió AcrAB en la resistència antimicrobiana, no només a les quinolones, sinó també a d'altres agents antimicrobians. A més, s'ha demostrat un nou paper del sistema AcrAB de *K. pneumoniae*: la seva implicació en la resistència als pèptids antimicrobians del propi hoste. La troballa d'aquesta nova funció incita al desenvolupament i la recerca d'inhibidors que afectin els sistemes d'efluxió.

CONCLUSIONS

Conclusions

1. L'anàlisi dels aïllaments de *K. pneumoniae* productors de BLEE de l'hospital de referència de Sarajevo (Bòsnia i Hercegovina) ha demostrat que CTX-M-15 és el tipus de BLEE més prevalent, essent aquesta, la primera vegada que es descriu la presència de CTX-M-15 en aquest país.
2. La prevalença de CTX-M-15 en les diferents unitats de l'hospital està causada sobretot per la disseminació de dos clons majoritaris que presenten aquesta BLEE en plasmidis diferents i que a més, aquests plasmidis cotransfereixen resistència a d'altres grups d'antibiòtics.
3. En alguns aïllaments, el fenotip de resistència està atribuït, no només a la presència del plasmidi portador de CTX-M-15 sinó també a la deficiència en l'expressió de porines.
4. S'ha posat a punt un model de pneumònia experimental per *K. pneumoniae* en rata per tal de poder estudiar l'eficàcia terapèutica de varis antibiòtics. L'ús d'aquest model ha demostrat que el tractament de la pneumònia causada per soques de *K. pneumoniae* productores d'ACT-1, amb i sense porines, amb els tres règims terapèutics assajats (imipenem, meropenem i cefepime) és altament eficaç. Segons aquests resultats, imipenem, meropenem i cefepime poden ser tractament d'elecció en les pneumònies produïdes per soques de *K. pneumoniae* resistent.
5. Els resultats obtinguts *in vivo* mostren que en termes d'aclariment bacterià al teixit pulmonar, el meropenem és més eficaç que l'imipenem en el tractament de la pneumònia en rata causada per una soca de *K. pneumoniae* productora de beta-lactamasa del tipus AmpC i deficient en porines.
6. La determinació de la CMI de diferents antibiòtics en mutants isogènics específics dels gens d'AcrB i AcrR ens permeten concloure que la bomba d'efluxió AcrAB de *K. pneumoniae* contribueix en diferents graus en la resistència front a quinolones (àcid nalidíxic, ciprofloxacina i levofloxacina) aminoglicòsids (gentamicina i tobramicina), eritromicina, tetraciclina, cloramfenicol i alguns betalactàmics, però no tenen efecte sobre els carbapenems.
7. Els assajos de supervivència de la soca parental i el mutant deficient en l'expressió d'AcrB front a pèptids antimicrobians humans presents en el parènquima pulmonar han demostrat que la bomba d'efluxió AcrAB contribueix en la resistència front aquests components de la resposta immune innata.

8. La càrrega bacteriana dels pulmons de ratolins infectats amb el mutant deficient en l'expressió d'AcrB va ser menor que l' observada en els pulmons de ratolins infectats amb la soca parental demostrant que la bomba d'efluxió AcrAB contribueix a la virulència de *K. pneumoniae* en un model d'infecció respiratòria.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

1. Podschun, R., i U. Ullmann. *Klebsiella* spp. as a nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998. 11(4): p. 589-603
2. Bergey, D.H., F. C. Harrison, R. S. Breed, B. W. Hammer, i F. M. Huntton. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, ed. W.a. Wilkins. 1994, Baltimore, USA.
3. Brochert, A., *Klebsiella*: one potentially nasty bacteria. International Speciality Supply, 2004.
4. Álvarez, D., S. Merino, J. M. Tomás, V. J. Benedí, i S. Albertí. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect. Immun.*, 2000. 68: p. 953-5.
5. Cortés, G., D. Álvarez, C. Saus, i S. Albertí. Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect. Immun.*, 2002. 70: p. 1075-80.
6. Cortés, G., N. Borrell, B. de Astorza, C. Gomez, J. Sauleda, i S. Albertí. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect. Immun.*, 2002. 70: p. 2583-90.
7. Cryz, S.J.J., P. M. Mortimer, V. Mansfield, i R. Germanier. Seroepidemiology of *Klebsiella* bacteremic isolates and implications for vaccine development. *J. Clin. Microbiol.*, 1986. 23 p. 687-690.
8. Held, T.K.M., M. E. Mielke, H. Neudeck, S. J. Cryz, i A. Cross. Monoclonal antibody against *Klebsiella* capsular polysaccharide reduces severity and hematogenic spread of experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect. Immun.*, 1992. 60: p. 1771-1778.
9. Allen, P.M., D. Fisher, J. R. Saunders, i C. A. Hart. The role of capsular polysaccharide K21b of *Klebsiella* and of the structurally related colanic-acid polysaccharide of *Escherichia coli* in resistance to phagocytosis and serum killing. *J. Med. Microbiol.*, 1987. 24 p. 363-370
10. Podschun, R., Phenotypic properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed*, 1990. 189: p. 527-535.
11. Podschun, R., D. Sievers, A. Fisher, i U. Ullmann. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. *J. Infect Dis.*, 2003. 168 (6): p. 1415-21.
12. Hansen, D.S., F. Mestre, S. Albertí, S. Hernández-Allés, A. Doménech-Sánchez, J. Gil, S. Merino, J. M. Tomás, i V. J. Benedí. *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharide O Typing: Revision of Prototype Strains and O-Group Distribution among Clinical Isolates from Different Sources and Countries. *J. Clin. Microbiol.*, 1999. 37: p. 56-62.
13. Merino, S., S. Camprubí, S. Albertí, V. J. Benedí, i J. M. Tomás. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect. Immun.*, 1992. 60: p. 2529-2535.

14. Clements, A., F. Gaboriaud, J. F. L. Duval, J. L. Farn, T. Lithgow, O. L. C. Wijburg, E. L. Hartland, i R. A. Strugnell. The Major Surface-Associated Saccharides of *Klebsiella pneumoniae* Contribute to Host Cell Association. PLoS One., 2008. 3(11): p. e3817.
15. Podschun, R., D. Sievers, A. Fischer, i U. Ullmann. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. J. Infect. Dis., 1993. 168(6): p.1415-1421.
16. Ayars, G.H., L. C. Altman, i M. D. Fretwell. Effect of decreased salivation and pH on the adherence of *Klebsiella* species to human buccal epithelial cells. Infect. Immun., 1982. 38: p. 179-182.
17. Maayan, M.C., I. Ofek, O. Medalia, i M. Aronson. Population shift in mannose-specific fimbriated phase of *Klebsiella pneumoniae* during experimental urinary tract infection in mice. Infect. Immun., 1985. 49: p. 785-789.
18. Clegg, S., i G. F. Gerlach. Enterobacterial fimbriae. J. Bacteriol, 1987. 169: p. 934-938.
19. Sebghati, T.A., T. K. Korhonen, D. B. Hornick, i S. Clegg. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. Infect. Immun., 1998. 66: p. 2887-2894.
20. Di Martino, P., V. Livrelli, D. Sirot, B. Joly, i A. Darfeuille-Michaud. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. Infect. Immun., 1996. 64: p. 2266-2273.
21. Brock, J.H., P. H. Williams, J. Licéaga, i K. G. Wooldridge. Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterobactin-producing strains of *Escherichia coli* and to other organisms. Infect. Immun., 1991. 59: p. 3190.
22. Nassif, X., i P. J. Sansonetti. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. Infect. Immun., 1986. 54: p. 603-608.
23. Horan, T., D. Culver, W. Jarvis, G. Emori, S. Banerjee, W. Martone, i C. Thornsberry. Pathogens causing nosocomial infections. Antimicrobic Newsl, 1988. 5: p. 65-67.
24. Schaberg, D.R., D.H. Culver, i R.P. Gaynes. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am. J. Med., 1991. 91: p. 72S-75S.
25. Peña, C., M. Pujol, C. Ardanuy, A. Ricart, R. Pallares, J. Liñares, J. Ariza, i F. Gudiol. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum betalactamases. Antimicrob. Agents Chemother., 1998. 42(1): p. 53-58.
26. Hervas, J. A., A. Alomar, F. Salva, J. Reina, i V. J. Benedí. Neonatal sepsis and meningitis in Mallorca, Spain, 1977-1991. Clin. Infect. Dis., 1993. 16: p. 719-24.
27. Berendt, R.F., G. G. Long, F. B. Abeles, M. R. Canonico, M. R. Elwell, i M. C. Powanda. Pathogenesis of respiratory *Klebsiella pneumoniae* infection in rats: bacteriological and histological findings and metabolic alterations. Infect. Immun., 1977. 15: p. 586-893.
28. Salhy, H., R. Podschun, i U. Ullmann. *Klebsiella* infections in the immunocompromised host. Adv Exp Med Biol, 2000. 479: p. 237-49.

29. Deguchi, T., T. Kawamura, M. Yasuda, M. Nakano, H. Fukuda, H. Kato, N. Kato, Y. Okano, i Y. Kawada. In vivo selection of *Klebsiella pneumoniae* strains with enhanced quinolone resistance during fluoroquinolone treatment of urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997. 41: p. 1609-11.
30. Martínez-Martínez L, A.Pascual, i G. A. Jacoby. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 1998. 14: p. 797-799.
31. Wang, M., D. F. Sahm, G. A. Jacoby, i D. C. Hooper. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004. 48: p. 1295-1299.
32. Babini, G.S. i D.M. Livermore. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J. Antimicrob Chemother.*, 2000. 45: p. 183-189
33. Coudron, P.E., N.D. Hanson, i M. W. Climo. Occurrence of extended-spectrum and AmpC betalactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC betalactamases. *J. Clin. Microbiol.*, 2003. 41: p. 772-777.
34. Rebeck, J.A., Characterization of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit trasplant population. *Clin. Infect. Dis.*, 2000. 31: p. 1368-1372.
35. Paterson, D.L., i G. M. Trenholme. *Klebsiella* species, in antimicrobial therapy and vaccines, T.C.M. Victor L. Yu, Jr., i Steven L. Barriere, Editor. 1999, Williams and Wilkins: Baltimore, Maryland. p. 239-241.
36. Lucet, J.C., S .Chevret, D. Decre, A. Vanjak, A. Macrez, M. Bedos, M. Wolff, i B. Regnier. Outbreak of multiply resistant enterobacteriaceae in an intensive care unit: Epidemiology and risk factors for acquisition. *Clin. Infect. Dis.*, 1996. 22: p. 430-436.
37. Martin, C.M., N. S. Ikari, J. Zimmerman i J. A. Naitz. A virulent nosocomial *Klebsiella* with a transferable R factor for gentamicin: emergence and supression. *J. Infect. Dis.*, 1971. 124(Suppl): p. S24-S29.
38. Bush, K., G. A. Jacoby, i A. A. Medeiros. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995. 39: p. 1211-1233.
39. Bush, K., i G. A. Jacoby. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010. 54: p. 969-976.
40. Corgnaglia, G., J. Garau, i D. M. Livermore, Living with ESBLs. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008. 14(Supplement 1): p. 1-2.
41. Cantón, R., A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero, i T. M. Coque. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008. 14: p. 144-153.

42. Kliebe, C., B. A. Nies, J. F. Meyer, R. M. Tolxdorff-Neutzling, i B. Wiedemann. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.*, 1985. 28: p. 302-307.
43. Sougakoff, W., S. Goussard, G. Gerbaud, i P. Courvalin. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis*, 1988. 10: p. 879-884.
44. Livermore, D.M., Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect.*, 2008. 14: p. 3-10.
45. Livermore, D.M., R. Canton, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G. M. Rossolini, G. Arlet, J. Ayala, T. M. Coque, I. Kern-Zdanowicz, F. Luzzaro, L. Poirel, i N. Woodford, CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007. 59(165-74).
46. Bonnet, R., Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48: p. 1-14.
47. Rossolini, G.M., M. M. D'Andrea, i C. Mugnaioli. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.*, 2008. 14(Supplement 1): p. 33-41.
48. Hernandez, J.R., L. Martínez-Martínez, R. Cantón T. M. Coque, A. Pascual, i Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. 49: p. 2122-2125.
49. Elliot, E., A. J. Brink, J. Van Greune, Z. Els, N. Woodford, J. Turton, M. Warner M, i D. M. Livermore. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Infect Dis.*, 2006. 42: p. e95-e98.
50. Mena, A., V. Plasencia, L. Garcia, O. Hidalgo, J. I. Ayestarán, S. Albertí, N. Borrell, J. L. Pérez, i A. Oliver. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1 producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J. Clin. Microbiol.*, 2006. 44: p. 2831-2837.
51. Naas, T., L. Poirel i P. Nordmann. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.*, 2008. 14(Supplement 1): p. 42-52.
52. Bradford, P.A., C. Urban, N. Mariano, S. J. Projan, J. J. Rahal, i K Bush. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997. 41: p. 563-569.
53. Hancock, R.E., i F. Bellido. Factors involved in the enhanced efficacy against gram-negative bacteria of fourth generation cephalosporins. *J. Antimicrob Chemother.*, 1992. 29 (Supl A): p. 1-6.
54. Hanson, N.D., AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J. Antimicrob Chemother.*, 2003. 52: p. 2-4.

55. Lee, J., H. I., Jung, J. H. Jung, J. S. Park, J. B. Ahn, S. H. Jeong, B. C. Jeong, J. H. Lee i S. H. Lee. Dissemination of transferable AmpC-type beta-lactamase (CMY-10) in Korean hospital. *Microb. Drug Resist.*, 2004. 10: p. 224-230.
56. Papanicolaou, G.A., A.A. Medeiros, i G.A. Jacoby, Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxymino-and alfa-methoxy betalactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1990. 34: p. 2200-2209.
57. Yan, J.J., W. C. Ko, Y. C. Jung, C. L. Chuang i J. J. Wu. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 beta-lactamase in university hospital in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.*, 2002. 40: p. 3121-3126.
58. Jacoby, G.A., AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.*, 2009. 22: p. 161-182.
59. Nikaido, H., Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol REv*, 2003. 67: p. 593-656.
60. Hernández-Allés, S., S. Albertí, X. Rubires, S. Merino, J.M. Tomás, i V.J. Benedí. Isolation of FC3-11, a bacteriophage specific for the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36, and its use for the isolation of porin deficient mutants. *Can J Microbiol.*, 1996. 41: p. 399-406.
61. Doménech-Sánchez, A., L. Martínez-Martínez, S. Hernández-Allés M. C. Conejo, A. Pascual, J. M. Tomás, S. Albertí, i V. J. Benedí. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003. 47: p. 3332-3335.
62. Albertí, S., F. Rodríguez-Quiñones, T. Schirmer, G. Rummel, J. M. Tomas, J. P. Rosenbusch, i V. J. Benedí. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional structure, and complement binding. *Infect. Immun.*, 1995. 63: p. 903-910.
63. Cowan, S.W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R. A. Pauptit, J. N. Jansonius, i J. P. Rosenbusch. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature*, 1992. 358: p. 727-33.
64. Dutzler, R., G. Rummel, S. Alberti, S. Hernandez-Alles, P. Phale, J. Rosenbusch, V. Benedí, i T. Schirmer. Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure Fold Des*, 1999. 7: p. 425-34.
65. Jap, B.K., K. H. Downing, i P. J. Walian. Structure of PhoE porin in projection at 3.5 Å resolution. *J Struct Biol.*, 1990. 103: p. 57-63.
66. Walian, P.J., i B. K. Jap., Three-dimensional electron diffraction of PhoE porin to 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 1990. 215: p. 429-38.
67. Nabedryk, E., R. M. Garavito, i J. Breton. The orientation of beta-sheets in porin. A polarized Fourier transform infrared spectroscopic investigation. *Biophys J.*, 1988. 53: p. 671-6.

68. Nikaido, H., Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porines and phage lambda receptor proteins. *Methods Enzymol.*, 1983. 97: p. 85-100.
69. Weiss, M.S., U. Abele, J. Weckesser, W. Welte, E. Schiltz, i G. E. Schulz. Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science*, 1991. 254: p. 1627-30.
70. Yau, W.M., W. C. Wimley, K. Gawrisch, i S. H. White. The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 1998. 37: p. 14713-8.
71. Bauer, K., M. Struyve, D. Bosch, R. Benz, i J. Tommassen. One single lysine residue is responsible for the special interaction between polyphosphate and the outer membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, 1989. 264: p.16393-8.
72. Karshikoff, A., V. Spassov, S. W. Cowan, R. Ladenstein, i T. Schirmer. Electrostatic properties of two porin channels from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.*, 1994. 240: p. 372-84.
73. Nikaido, H., i E. Y. Rosenberg, Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J Bacteriol*, 1983. 153: p. 241-52.
74. Schulz, G.E., The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1565: p. 308-17.
75. Doménech-Sánchez, A., S. Hernández-Allés, L. Martínez-Martínez, i V. J. Benedí. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.*, 1999. 181: p. 2726-2732.
76. Schirmer, T., T. A. Keller, Y. F. Wang, i J. P. Rosenbusch. Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science*, 1995. 267: p. 512-4.
77. Death, A., L. Notley, i T. Ferenci., Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress. *J Bacteriol.*, 1993. 175: p. 1475-83.
78. Hernández-Allés, S., S. Albertí, D. Álvarez, A. Doménech-Sánchez, L. Martínez-Martínez, J. Gil, J.M. Tomás, i V.J. Benedí, Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*, 1999. 145 p. 673-679.
79. Martínez-Martínez, L., S. Hernández-Allés, S. Albertí, J. M. Tomás, V. J. Benedí, i G. A. Jacoby, In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996. 40: p. 342-348
80. Hernández-Allés, S., V. J. Benedí, L. Martínez-Martínez, A. Pascual, A. Aguilar, J. M. Tomás, i S. Albertí, Development of resistance during antimicrobial therapy caused by Insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999. 43: p. 937-939.
81. Crowley, B., V. J. Benedí, i A. Doménech-Sánchez. Expression of SHV-2 beta-lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results

- increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. 46: p. 3679-3682.
82. Martínez-Martínez, L., A. Pascual, S. Hernández-Allés, D. Álvarez-Díaz, A. I. Suárez. García, J. Tran, V. J. Benedí, i G. A. Jacoby. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999. 43: p. 1669-1673.
83. Kaczmarek, F.M., F. Fib-Hajj, i W. Shang, T. D. Gootz. High level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combiantion of bla (ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006. 50: p. 3396-3406.
84. Jacoby, G. A., D. M. Mills, i N. Chow. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004. 48: p. 3203-3206.
85. Ardanuy, C., J. Liñares, M. A. Domínguez, S. Hernández-Allés, V. J. Benedí, i L. Martínez-Martínez. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolate form clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998. 45: p. 183-189
86. Martínez-Martínez, L., A. Pascual, M. C. Conejo, I. García, P. Joyanes, A. Doménech-Sánchez, i V. J. Benedí. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002. 46: p. 3926-3932.
87. Martínez-Martínez, L., Extended-spectrum beta-lactamases and ther permeability barrier. *Clin. Microbiol. Infect*, 2008. 14: p. 82-89.
88. Begley, M., C. G. M. Gahan, i C. Hill., The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005. 29: p. 625-651.
89. Lacroix, F.J.-C., A. Cloeckert, O. Grepinet, C. Pinault, M. Y. Popoff, H.Waxin, i P. Pardon. *Salmonella typhimurium* acrB-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. *FEMS Microbiol.*, 1996. 135: p. 161-167.
90. Lin, J., L. M. Overbye i Q. Zhang. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002. 46: p. 2124-2131.
91. Lin, J., O. Sahin, L. O. Michel, i Q. Zhang. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.*, 2003. 71: p. 4250-4259.
92. Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, i J. E. Hearst. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1993. 175: p. 6299-6313.

93. Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, i J. E. Hearst. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 1995. 16: p. 45-55.
94. Thanassi, D.G., L. W. Cheng, i H. Nikaido. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1997. 179: p. 2512-2518.
95. Pumbwe, L., L. P. Randall, M. J. Woodward, i L. J. V. Piddock. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiply antibiotic-resistant *Campylobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2004. 54: p. 341-347.
96. Hirakata, Y., R. Srikumar, K. Poole, N. Gotoh, T. Suematsu, S. Kohno, S. Kamihira, R. E. Hancock, i D. P. Speert. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.*, 2002. 196: p. 109-118.
97. Jerse, A.E., N. D. Sharma, A. N. Simms, E. T. Crow, L. A. Snyder, i W. M. Shafer. A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. *Infect. Immun.*, 2003. 71: p. 5576-5582.
98. Baucheron, S., C. Mouline, K. Praud, E. Chaslus-Dancla, i A. Cloeckaert. TolC but not AcrB is essential for multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* colonization of chicks. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005. 55: p. 707-712.
99. Buckley, A., S. Cooles, L. Randall, R. M., La Ragione, M. Woodward, i L. J. V. Piddock. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol.*, 2006. 8: p. 847-856.
100. Evans, K., L. Passador, R. Srikumar, E. Tsang, J. Nezezon, i K. Poole. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 1998. 180: p. 5443-5447.
101. Poole, K., Efflux mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005. 56: p. 20-51.
102. Linares, J.F., J. A. Lopez, E. Camafeita, J. P. Albar, F. Rojo, i J. L. Martinez. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCDOprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 2005. 187: p. 1384-1391.
103. Saier, M.H., Jr., i I. T. Paulsen. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2001. 12: p. 205-213.
104. Ren, Q., K. H. Kang, i I. T. Paulsen. TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Res.* 2004. 32: p. D284-D288.
105. Paulsen, I.T., J. Chen, K. E. Nelson, i M. H. Saier, Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2001. 3: p. 145-150.
106. Koronakis, V., J. Eswaran, i C. Hughes. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu. Rev. Biochem.*, 2004. 73: p. 467-489.
107. Doménech-Sánchez, A., S. Albertí, L. Martínez-Martínez, A. Pascual, I. Garcia, i V. J. Benedí, in *Abstr 41st Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001.

108. Aires, J.R., i H. Nikaido. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2005. 187: p. 1923-1929.
109. Eswaran, J., E. Koronakis, M. K. Higgins, C. Hughes, i V. Koronakis. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2004. 14: p. 741-747.
110. Aires, J.R., T. Kohler, H. Nikaido, i P. Plesiat. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999. 43: p. 2624-2628.
111. Paulsen, I.T., Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2003. 6: p. 446-451.
112. Akama, H., M. Kanemaki, M. Yoshimura, T. Tsukihara, T. Kashiwagi, H. Yoneyama, S. Narita, A. Nakagawa, i T. Nakae. Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *J. Biol. Chem.*, 2004. 279: p. 52816+52819.
113. Akama, H.T., T. Matsuura, S. Kashiwagi, H. Yoneyama, S. Narita, T. Tsukihara, A. Nakagawa, i T. Nakae. Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 2004. 279: p. 25939-25942.
114. Higgins, M.K., E. Bokma, E. Koronakis, C. Hughes, i V. Koronakis. Structure of the periplasmic component of a bacterial efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004. 101: p. 9994-9999.
115. Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, i C. Hughes. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 2000. 405: p. 914-919.
116. Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, i A. Yamaguchi. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, 2002. 419: p. 587-593.
117. Fernandes, P., B. S. Ferreira, i J. M. Cabral. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2003. 22: p. 211-216.
118. Olliver, A., M. Valle, E. Chaslus-Dancla, i A. Cloeckaert. Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS1 or IS10 elements in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005. 49: p. 289-301.
119. Tegos, G., F. R. Stermitz, O. Lomovskaya, i K. Lewis. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002. 46: p. 3133-3141.
120. Wolter, D.J., E. Smith-Moland, R. V. Goering, N. D. Hanson, i P. D. Lister. Multidrug resistance associated with *mexXY* expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Texas hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2004. 50: p. 43-50.

121. Eaves, D.J., V. Ricci, i L. J. Piddock. Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*: role in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004. 48: p. 1145-1150.
122. Baucheron, S., S. Tyler, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla, i A.Cloeckaert. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004. 48: p. 3729-3735.
123. Ricci, V., P. Tzakas, A. Buckley, N. Coldham, i L. J. V. Piddock. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains are difficult to select in the absence of AcrB and TolC. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2005. 50: p. 38-42.
124. Piddock, L.J.V., D. G. White, K. Gensberg, L. Pumbwe, i D. J. Griggs. Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000. 44: p. 3118-3121.
125. Giraud, E., A. Cloeckaert, D. Kerboeuf, i E. Chaslus-Dancla. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000. 44: p. 1223-1228.
126. Okusu, H., D. Ma, i D. Nikaido. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multipleantibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.*, 1996. 178: p. 306-308.
127. Li, X., i H. Nikaido. Efflux mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 2004. 64: p. 159-204.
128. Kaczmarek, F.S., T. D. Gootz, F. Dib-Hajj, W. Shang, S. Hallowell, i M.Cronan. Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004. 48: p. 1630-1639.
129. Pradel, E., i J. M. Pagès, The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* , 2002. 46: p. 2640-2643.
130. Webber, M.A., i L. J. V. Piddock. Absence of mutations in *marAB* or *soxRS* in *acrB*-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001. 45: p. 1550-1552.
131. Alekshun, M.A., i S. B. Levy. The *Escherichia coli* *mar* locus—antibiotic resistance and more. *ASM News* 70:451–456., 2004. 70: p. 451-456.
132. George, A.M., i S. B. Levy. Gene in the major co-transduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J. Bacteriol.*, 1983. 155: p. 541-548.
133. Martin, R.G., W. K. Gillette, i J. L. Rosner. Promoter discrimination by the related transcriptional activators MarA and SoxS: differential regulation by differential binding. *Mol. Microbiol.*, 2000. 35: p. 623-634.

134. Miller, P.F., L. F. Gambino, M. C. Sulavik, i S. J. Gracheck. Genetic relationship between *soxRS* and *mar* loci in promoting multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994. 38: p. 1773-1779.
135. Chollet, R., J. Chevalier, C. Bollet, J. M. Pages, i A. Davin-Regli. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004. 48: p. 2518-2523.
136. George, A.M., R. M. Hall, i H. W. Stokes. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gene, *ramA*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 1995. 141: p. 1909-1920.
137. Schneiders, T., S. G. Amyes, i S. B. Levy. Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003. 47: p. 2831-2837.
138. van der Straaten, T., R. Janssen, D. J. Mevius, i J. T. van Dissel. *Salmonella* gene *rma* (*ramA*) and multiple-drug-resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004. 48: p. 2292-2294.
139. French, G.L., K.P. Shannon, i N. Simmons. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and betalactam-betalactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *J. Clin. Microbiol.*, 1996. 34: p. 358-363.
140. Paterson, D.L., W. C. Ko, S. Mohapatra, A. Von Gottberg, L. Mulazimoglu, J. M. Casellas, K. P. Klugman, G. M. Trenholme, M. M. Wagener, V. L. Yu. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: impact of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) production in a global study of 216 patients. 37th Interscience conference on Antimicrob Agents Chemother, 1997.
141. Schiappa, D.A., M. K. Hayden, M. G. Matussek, F. N. Hashemi, J. Sullivan, K.Y. Smith, D. Miyashiro, J. P. Quinn, R. A. Weinstein, i G. M. Trenholme. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection: a case control and molecular epidemiologic investigation. *J. Infect. Dis.*, 1996. 174: p. 529-536.
142. Pichardo, C., M. C. Conejo, M. Bernabéu-Wittel, A. Pascual, M. E. Jiménez-Mejías, M. de Cueto, M. E. Pachón-Ibáñez, I. García, J. Pachón, i L. Martínez-Martínez. Activity of cefepime and carbapenems in experimental pneumonia caused by porin-deficient *Klebsiella pneumoniae* producing FOX-5 betalactamase. *Clin. Microbiol. and Infect.*, 2005. 11: p. 31-38.
143. Pichardo, C., J. M. Rodríguez-Martínez, M. E. Pachón-Ibáñez, M. C. Conejo, J. Ibáñez-Martínez, L. Martínez-Martínez, J. Pachón, A. Pascual. Efficacy of cefepime and imipenem in experimental murine pneumonia caused by porin-deficient *Klebsiella pneumoniae* producing CMY-2 betalactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005. 49: p. 3311-3316.

144. Chen, H.Y., i D.M. Livermore. Activity of cefepime and other beta-lactam antibiotics against permeability mutants of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob Chemother., 1993. 32 Suppl B: p. 63-74.
145. Mimoz, O., A. Jacolot, C. Padoin, M. Tod, K. Samii, i O. Petitjean. Cefepime and amikacin synergy in vitro and in vivo against a ceftazidime-resistant strain of *Enterobacter cloacae*. J. Antimicrob Chemother., 1998. 41: p. 367-372.
146. Esteve, F.D.A., ed. Modelos experimentales de patología infecciosa. 2000: Barcelona.
147. RETELDEA, ed. Legislación y aspectos éticos de la experimentación con animales. 2000: Palma de Mallorca.
148. Gavalda, J., J. A. Capdevila, B. Almirante, J. Otero, I. Ruiz, M. Laguarda, H. Allende, E. Crespo, C. Pigrau, i A. Pahissa. Treatment of experimental pneumonia due to penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in immunocompetent rats. Antimicrob. Agents Chemother., 1997. 41: p. 795-801.
149. Piroth, L., L. Martin, A. Coulon, C. Lequeu, M. Duong, M. Buisson, H. Portier, P. Chavanet. Development of a new experimental model of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* pneumonia and amoxicillin treatment by reproducing human pharmacokinetics. Antimicrob. Agents Chemother., 1999. 43: p. 2484-2492.
150. Kim, S.O., W.B. Kim, and M.G. Lee. Effect of probenecid on the renal excretion mechanism of a new carbapenem, DA-1131, in rats and rabbits. Antimicrob. Agents Chemother., 1999. 43: p. 96-99.
151. Kunst, M.W. i H. Mattie. Probenecid and the antibacterial activity of cephadrine in vivo. J. Infect. Dis., 1978. 137: p. 830-834.
152. Finch, R.G., D. Greenwood, S. Ragnar Norrby i R. J. Whitley ed. Antibiotic and Chemotherapy. Antiinfective agents and their use in therapy. 2003.
153. Mimoz, O., A. Jacolot, S. Leotard, N. Hidri, K. Samii, P. Normann, i O. Petitjean. Efficaces of cefepime, ceftazidime and imipenem alone or in combination with amikacin in rats with experimental pneumonia due to ceftazidime-susceptible or-resistant *Enterobacter cloacae* strains. Antimicrob. Agents Chemother., 1998. 42: p. 3304-3308.
154. Mimoz, O., S. Leotard, A. Jacolot, C. Padoin, K. Louchahi, O. Petitjean i P. Normann. Efficaces of imipenem, meropenem, cefepime, and ceftazidime in rats with experimental pneumonia due to carbapenems-hydrolyzing beta-lactamase-producing strain of *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother., 2000. 44: p. 885-890.
155. Szabó, D., A. Máthé, Z. Filetóth, P. Anderlik, L. Rókus, i R. Rozgonyi. In vitro and in vivo activities of amikacin, cefepime, amikacin plus cefepime, and imipnem against an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. Antimicrob. Agents Chemother., 2001. 45: p. 1287-1291.
156. Dale, O., B. Mortensen, L. Thommensen, i B. Hagen. Cisplatin toxicity in the rat may be influenced by anesthetic agents. Acta Anaesthesiol Scand., 2000. 44: p. 770.
157. Laurent, G., V. Yernaux, D. Nonclercq, G. Toubeau, P. Maldague, P. M. Tulkens, i J. A. Heuson-Stiennon. Tissue injury and proliferative response induced in rat kidney by cis-

- diamminedicholoplatinum (II). *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*, 1988. 55: p. 129-45.
158. Fukasawa, M., Y Sumita, T. Harabe, T. Tanio, H. Nouda, T. Kohzuki, H. Okuda, H. Matsumara, i M. Sunagawa. Stability of meropenem and effect of 1beta-methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992. 36: p. 1577-1579.
159. Moon, Y.S.K., K.C. Chung, i M.A. Gill. Pharmacokinetics of meropenem in animals, healthy volunteers, and patients. *Clin. Infect. Dis.*, 1997. 24 (Suppl 2): p. S249-55.
160. Fournier, J.L., F. Ramisse, A. Jacolot, M. Szatanik, O. Petitjean, J.M. Alonso, i M.R. Scavizzi. Assessment of two penicillins plus beta-lactamase inhibitors versus cefotaxime in treatment of murine *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996. 40: p. 325-330.
161. Rodríguez-Hernández, M.J., C. Pichardo, F. J. Cuberos, I. Caballero, I. Moreno, B. Becerril, M. E. Jiménez-Mejías, i J. Pachón. Efficacy of imipenem, doxycycline and amikacin in experimental murine pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*, in 9th European Congress of clinical microbiology and infectious diseases., 1999: Berlin.
162. Gentry-Nielsen, M.J., K. M. Olsen, i L. C. Preheim. Pharmacodynamic activity and efficacy of linezolid in a rat model of pneumococcal pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002. 46: p. 1345-1351.
163. Montero, A., X. Corbella, C. Cabellos, A. Domenech, J. Ayats, F. Tubau, C. Ardanuy, F. Gudiol, i J. Ariza. Single and combined therapy against highly carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in an immunocompetent mouse pneumonia model, in 41st ICAAC. 2001: Chicago.
164. Knudsen, J.D., K. Fursted, N. Frimodt-Moller, i F. Espersen. Comparison of the effect of cefepime with four cephalosporins against pneumococci with various susceptibilities to penicillin, in vitro and in mouse peritonitis model. *J. Antimicrob Chemother.*, 1997. 40: p. 679-686.
165. Bakker-Woundenberg, I., T. Kate, L. Guo, P. Working, i J. W. Mouton, Improved efficacy of ciprofloxacin administred in polyethylene glycol-coated liposomes for treatment of *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001. 45: p. 1487-1492.
166. Schifflerers, R.M., G. Strom, T. Marian, T. Kate, i I. A. J. Bakker-Woundenberg. Therapeutic of liposome-encapsulated gentamicin in rat *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in relation to impaired host defense and low bacterial susceptibility to gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001. 45: p. 464-470.
167. Mimos, O., A. Jacolot, C. Padoin, M. Tod, K. Samii, i O. Petitjean. Cefepime and amikacin synergy in vitro and in vivo against a ceftazidime-resistant strain of *Enterobacter cloacae*. *J. Antimicrob Chemother.*, 1998. 41: p. 367-372.

168. Uzunovic-Kamberovic, S., B. Bedenic, i J. Vranes. Predominance of SHV-5 betalactamase in enteric bacteria causing community-acquired urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007. 13: p. 820-823.
169. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2007, Clinical Laboratory Standards Institute.
170. Tan, T.Y., L.S. Ng, J. He, T.H. Koh, i L.Y. Hsu. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2009. 10: p. 867-878.
171. Kaufmann, M.E., Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med.*, 1998. 15: p. 17-31.
172. Tenover, F.C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, i B. Swaminathan. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 1995. 33: p. 2233-2239.
173. Coque, T.M., A. Oliver, J. C. Pérez-Díaz, F. Baquero, i R. Cantón. Genes encoding TEM-4, SHV-2, AND CTX-M10 extended-spectrum betalactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid 1989 to 2000). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002. 46: p. 500-510.
174. Hernández-Allés, S., C. Conejo, A. Pascual, J. M. Tomás, V. J. Benedí, i L. Martínez-Martínez. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000. 46: p. 273-7.
175. Boyd, D.A., S. Tyler, S. Christianson A. McGeer, M. P. Muller, B.M. Willey, E. Bryce, M. Gardam, P. Nordmann, i M. R. Mulvey. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M15 extended spectrum betalactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004. 48: p. 3758-3764.
176. Karisik, E., M. J. Ellington, R. Pike, R. E. Warren, D. M. Livermore, i N. Woodford. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 beta-lactamase from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.*, 2006. 58: p. 665-668.
177. Lavollay, M., K. Mamlouk, T. Frank A. Akpabie, B. Burghoffer, S. Ben Redjeb, R. Bercion, V. Gautier, i G. Arlet. Clonal dissemination of a CTX-M15 betalactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis and Bangui. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006. 50: p. 2433-2438.
178. Dé, E., A. Baslé, M. Jaquinod, N. Saint, M. Malléa, G. Molle, i J.M. Pagès. A new mechanism of antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* induced by a structural modification of the major porin. *Mol. Microbiol.*, 2001. 48: p. 189-198.

179. Pages, J.M., J. P. Lavigne, V. Leflon-Guibout, E. Marcon, F. Bert, L. Noussair, i M. H. Nicolas-Chanoine. Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. PLoS Pathog., 2009. 4:e4817.
180. Nassif, X., J. M. Fournier, J. Arondel, i P. Sansonetti. Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. Infect. Immun., 1989. 57: p. 546-552.
181. Washington, J.A., ed. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. Antimicrobial assays. II Bioassays. 1985.
182. Lorian, V., ed. Antibiotics in Laboratory Medicine. Measurement of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. 1991: Baltimore.
183. Prophet, E.B., et al., eds. Laboratory methods histotechnology., ed. C. eds. 1992, American Registry of Patology: Washington D. C.
184. Alvarez, M., J. H. Tran, N. Chow, i G. A. Jacoby. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC betalactamases in the United States. Antimicrob. Agents Chemother., 2004. 48: p. 533-537
185. Villegas, M.V., K. Lolans, A. Correa, C. J. Suarez, J. A. López, M. Vallejo, J. P Quinn, i Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of the plasmid-mediated Class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. Antimicrob. Agents Chemother., 2006. 50: p. 2880-2882.
186. Bardford, P.A., C. Urban, N. Mariano, S. J. Projan, J. J. Rahal, i K Bush. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC betalactamase, and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob. Agents Chemother., 1997. 41: p. 563-569.
187. Charrel, R.N., J. Pagès, P. Micco, i M. Mallea. Prevalence of outer membrane porin alteration in betalactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob. Agents Chemother., 1996. 40: p. 2854-2858.
188. Philippon, A.G., G. Arlet, i G.A. Jacoby. Plasmid-determined AmpC-type betalactamases. Antimicrob. Agents Chemother., 2002. 46: p. 1-11.
189. Craig, W., Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antimicrobial dosing of mice and men. Clin. Infect. Dis, 1998. 26: p. 1-12.
190. Martínez-Martínez, L., I. García, S. Ballesta, V. J. Benedí, S. Hernández-Allés, i A. Pascual. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. Antimicrob. Agents Chemother., 1998. 42: p. 1850-1852.
191. Hasdemir, U.O., J. Chevalier, P. Nordmann, i J. M. Pagès, Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. J. Clin. Microbiol., 2004. 42: p. 2701-2706.
192. Mazzariol, A., J. Zuliani, G. Cornaglia, G. M. Rossolini, i R. Fontana. AcrAB efflux system: expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp. Antimicrob. Agents Chemother., 2002. 46: p. 3984-3986.

193. Piddock, L.J., Multidrug-resistance efflux pumps- not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006. 4: p. 629-636.
194. Rubirés, X., F. Saigi, N. Piqué, N. Climent, S. Merino, S. Albertí, J. M. Tomás, i M. Regué. A gene (*wbbL*) from *Serratia marcescens* N28b (O4) complements the *rfb-50* mutation of *Escherichia coli* K-12 derivatives. *J. Bacteriol.*, 1997. 179: p. 7581-7586.
195. Ausubel, F.M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, i K. Struhl, ed. *Current protocols in molecular biology*. 1997, Wiley Interscience: New York, NY.
196. Wilkinson, J.F., i I. W. Sutherland. Chemical extraction methods of microbial cells. *Methods Microbiol.*, 1971. 5B: p. 345-383.
197. Westphal, O., i K. Jann. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.*, 1965.5: p. 83-91
198. Campos, M.A., M. A. Vargas, V. Regueiro, C. M. LLompart, S. Albertí, i J. A. Bengoechea. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.*, 2004. 72: p. 7107-7114.
199. Fang, C.T., H. C. Chen, Y. P. Chuang, S. C. Chang, i J. T. Wang. Cloning of a cation efflux pump gene associated with chlorhexidine resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002. 46: p. 2024-2028.
200. Ogawa, W., M. Koterawasa, T. Kuroda, i T. Tsuchiya. *KmrA* multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Biol. Pharm. Bull.*, 2006. 29: p. 550-553.
201. Coudeyras, S., L. Nakusi, N. Charbonnel, i C. Forestier. A tripartite efflux pump involved in gastrointestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae* confers a tolerance response to inorganic acid. *Infect. Immun.*, 2008. 76: p. 4633-4641.
202. Nikaido, H., i Y. Yakatsuka. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009. 1794: p. 769-781.
203. Pérez, a., D. Canle, C. Latasa, M. Poza, A. Beceiro, M. D. M. Tomás, A. Fernández, S. Mallo, S. Pérez, F. Molina, R. Villanueva, I. Lasa, i G. Bou. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the *Acr-TolC* efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2007. 51: p. 3247-3253.
204. Ganz, T., Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J. Clin. Invest.*, 2002. 109: p. 693-697.
205. Burse, A., H. Weingart, i M. S. Ullrich. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump *AcrAB* contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2004. 17: p. 43-54.
206. Shafer, W.M., X. Qu, A. J. Waring, i R. I. Lehrer. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. 95: p. 1829-1833.

207. Tzeng, Y.L., K. D. Ambrose, S. Zughaier, X. Zhou, Y. K. Miller, W. M. Shafer, i D. S. Stephens. Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.*, 2005. 187: p. 5387-5396.
208. Pamp, S.J., M. Gjermansen, H. K. Johansen, i T. Tolker-Nielsen. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol. Microbiol.*, 2008. 68: p. 223-240.
209. Bengoechea, J.A., i .M. Skurnik. Temperature-regulated efflux-pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Mol. Microbiol.*, 2000. 37: p. 67-80.
210. Shankar-Sinha, S., G. A. Valencia, B. K. Janes, J. K. Rosenberg, C. Whitfield, R. A. Bender, T. J. Standiford, i J. G. Younger. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infect. Immun.*, 2004. 72: p. 1423-1430.

ANNEX: Articles publicats

1. A. Dedeic-Ljubovic, M. Hukic, Y Pfeifer, W. Witte, E. Padilla, I. López-Ramis i S. Albertí. Emergence of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Bosnia and Herzegovina. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010. 16: p. 152-156.
2. E. Padilla, D. Alonso, A. Doménech-Sánchez, C. Gómez, J. L. Pérez, S. Albertí i N. Borrell. Effect of porins and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases on the efficacy of beta-lactams in rat pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006. 50: p. 2258-2260.
3. E. Padilla, E. Llobet, A. Doménech-Sánchez, L. Martínez-Martínez, J. A. Bengoechea i S. Albertí. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010. 54: p. 177-183.

Emergence of CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Bosnia and Herzegovina

A. Dedeic-Ljubovic¹, M. Hukic¹, Y. Pfeifer², W. Witte², E. Padilla³, I. López-Ramis³ and S. Alberti³

1) Institute of Clinical Microbiology, University of Sarajevo Clinics Centre, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, 2) Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany and 3) Departamento de Biología and Institut Universitari d'Investigacions en Ciències de la Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears (UIB), Palma de Mallorca, Spain

Abstract

Fifty-seven nosocomial *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) were collected between February 2007 and November 2007 in different wards of the Sarajevo (Bosnia-Herzegovina) reference hospital. These isolates comprise two major epidemic pulsed-field electrophoresis-defined clones plus two minor clones. In addition to the ESBL-mediated resistance, all strains uniformly showed resistance to ciprofloxacin, gentamicin and tobramycin. The β -lactamases involved in this resistance phenotype were TEM-1, SHV-1, and CTX-M-15, as demonstrated by isoelectric focusing, PCR amplification, and sequencing. TEM-1 and CTX-M-15 β -lactamases, as well as the aminoglycoside resistance determinants, were encoded in plasmids that could be transferred to *Escherichia coli* by conjugation. In three of the infected patients with the predominant clone, ceftazidime resistance development (MICs >128 mg/L) was documented. The analysis of the outer membrane proteins of the ceftazidime-susceptible and ceftazidime-resistant isolates revealed that the former expressed only one of the two major porins, OmpK36, whereas in the latter, the expression of OmpK36 was altered or abolished. This is the first report of CTX-M-15-producing *K. pneumoniae* in Bosnia-Herzegovina. Furthermore, we document and characterize for the first time ceftazidime resistance development in CTX-M-15-producing *K. pneumoniae*.

Keywords: CTX-M-15, ESBL, *K. pneumoniae*, porin

Original Submission: 23 February 2009; **Revised Submission:** 14 June 2009; **Accepted:** 28 June 2009

Editor: R. Canton

Article published online: 17 August 2009

Clin Microbiol Infect 2010; **16**: 152–156

Corresponding author and reprint requests: S. Alberti, Edificio Guillem Colom, CAMPUS-UIB, Crtra. Valldemosa, km 7.5, Palma de Mallorca 07122, Spain
E-mail: sebastian.alberti@uib.es

Introduction

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) represent a major threat among multidrug-resistant bacterial isolates. The production of ESBLs in *Enterobacteriaceae* confers resistance to all penicillins and cephalosporins (with the exception of cephamycins, in some cases), with the organisms generally remaining susceptible only to β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations, such as amoxicillin-clavulanate, and the carbapenems, which are frequently the only therapeutic options available for treatment of hospital-acquired severe infections caused by these microorganisms [1]. Co-resistance to non- β -lactam antibiotics is also frequent, either by the co-transfer

of the resistance determinants in the same genetic elements (such as aminoglycoside resistance) or simply by the co-selection of both resistance mechanisms, as occurs with fluoroquinolones [2].

The classical ESBLs are those derived from the broad-spectrum enzymes TEM-1, TEM-2 and SHV-1 by the acquisition of specific point mutations that expand their spectrum of hydrolysis to oxyimino-cephalosporins and aztreonam [3]. Nevertheless, the most widespread plasmid-mediated ESBLs nowadays are the CTX-M enzymes, which are directly derived from the chromosomal β -lactamases of several species of the genus *Kluyvera* [4]. Five different groups of CTX-Ms, containing a total of over 80 different variants, have been described so far, but CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-14 and CTX-M-15 are the most widespread enzymes [4].

To date, only SHV-5 β -lactamase has been reported in 14 *Klebsiella pneumoniae* community-isolated strains in Bosnia-Herzegovina [5], with no record of CTX-M ESBLs in any species. Given the scarcity of data from this country, the aim of the present study was to characterize the ESBL-producing

isolates of *K. pneumoniae* at the molecular level in the reference hospital of the capital of this country, to investigate whether the CTX-M-type ESBLs have appeared in *K. pneumoniae* from Bosnia-Herzegovina.

Materials and Methods

Clinical strains and antibiotic susceptibility testing

The isolates included in this study comprised one from each adult patient admitted between February and November of 2007 to the clinical centre (1762 beds, reference public hospital from the city of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina) and infected with an ESBL-producing *K. pneumoniae* strain.

Bacterial identification and initial susceptibility testing was performed with the VITEK-2 system (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA). Additionally, the MICs of several antibiotics were determined by microdilution or by using Etest strips (AB Biodisk, Solna, Sweden), following the manufacturer's recommendations.

Double-disk synergy testing (DDST) for the detection of ESBL production was performed using amoxicillin-clavulanate, cefotaxime, ceftazidime, cefepime and aztreonam disks that were applied 30 and/or 20 mm apart [6]. Phenotypic detection of AmpC was performed using the disk-based inhibitor assay, using boronic acid or cloxacillin as an AmpC inhibitor [7].

Molecular strain typing

The clonal relationship between the different isolates was studied by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Agarose plugs containing total bacterial DNA were prepared as described elsewhere [8]. Plugs were then digested with *Xba*I and loaded into a 1% Megabase agarose (Bio-Rad, La Jolla, CA, USA) gel. DNA separation was performed in a CHEF-DRIII apparatus (Bio-Rad) under the following conditions: 6 V/cm² for 20 h at 14°C, with initial and final pulse times of 2 s and 35 s, respectively. The results were interpreted following the criteria of Tenover et al. [9]. Comparison of sample profiles and generation of dendrograms was carried out by hierarchical clustering analysis using the unweighted pair group moving average method and the Dice coefficient for distance measure, using the software PAST-Paleontological Statistics v.1.29.

Characterization of β -lactamases and their genes

The pIs of the β -lactamases were determined by isoelectric focusing, applying the supernatants of crude sonic cell extracts to Phast gels (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) with a pH gradient of 3–9 in a Phast system (Pharmacia AB). β -Lactamases with known pI values (TEM-1, TEM-2, TEM-4, TEM-3, SHV-1,

CTX-M-10 and CTX-M-1) were included as controls. Gels were stained with 500 mg/L nitrocefin (Oxoid, Madrid, Spain) to identify the bands corresponding to β -lactamases.

PCRs for genes encoding TEM, SHV and CTX-M β -lactamases were performed using primers and conditions described previously [10,11]. PCR products were sequenced on both strands, using the BigDye terminator kit (PE-Applied Biosystems, Barcelona, Spain) for performing the sequencing reactions, which were analysed with the ABI Prism 3100 DNA sequencer (PE-Applied Biosystems).

Conjugation and plasmid analysis

Conjugation experiments were performed by filter mating, using a rifampin-resistant mutant of *Escherichia coli* strain HB101 as the recipient at a 1 : 1 ratio. Transconjugants were selected in Luria-Bertani agar plates containing 100 mg/L rifampin and 2 mg/L cefotaxime. Transconjugants were checked by DDST, PCR amplification, and sequencing of the appropriate ESBL-encoding gene, and Etest testing of susceptibility to all β -lactams and non- β -lactams to determine the resistance determinants co-transferred with the ESBL. For the analysis of the plasmids, plasmid DNA was obtained from the transconjugants using the QIAGEN plasmid Midi kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Plasmids were digested with *Eco*RI or *Bam*HI, and the resulting restriction fragments were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel.

Isolation and analysis of outer membrane proteins (OMPs)

Isolation of OMPs was performed as previously described [12]. Electrophoretic analysis of OMPs by SDS-PAGE was performed with 11% acrylamide–0.35% bisacrylamide–0.1% SDS by using Laemmli's buffer and Coomassie blue staining. Western blot analysis of SDS-PAGE-separated OMPs was performed with the buffers and conditions described by Hernández-Allés et al. [12].

Results

In 2007, the prevalence of ESBL-producing microorganisms at the Sarajevo clinical centre was 19.6%, *K. pneumoniae* being the most prevalent species (88.8%). In fact, 68.8% of the *K. pneumoniae* clinical isolates produced an ESBL. To characterize these isolates, all nosocomial ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates infecting adult patients admitted to the clinical centre between February and November of 2007 were collected, and one randomly selected isolate from each patient was further characterized by PFGE.

Representative PFGE profiles of these isolates ($n = 57$) are shown in Fig. 1. Four distinct PFGE types, designated A,

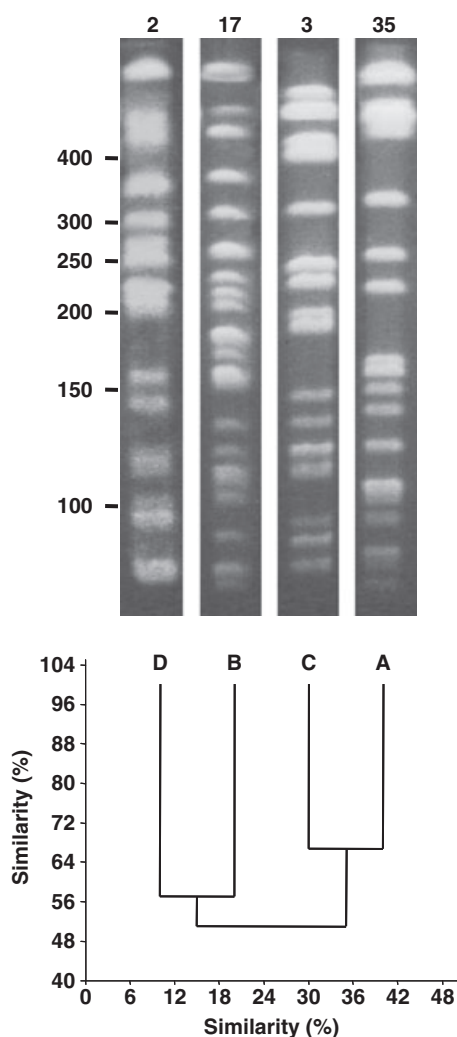


FIG. 1. Dendrogram obtained following pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Xba*I-digested genomic DNA from representative ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* PFGE types. Capital letters below the lanes refer to PFGE types, and numbers above the lanes refer to the number of isolates of each type. Molecular size markers (in kb) are indicated on the left.

B, C and D, were identified. The prevalent PFGE types encountered were type A and type B, with 35 and 17 isolates, respectively. Altogether, these PFGE types represented 91.2% of the isolates.

The first clonal ESBL-producing isolate appeared in February, and it was a PFGE type B strain. PFGE type A and type B strains were isolated throughout the year, reaching a maximum in August and February, respectively. They were isolated from urine infections (30 type A and eight type B), blood (four type A and five type B), and wound infections (one type A and one type B). Three PFGE type B strains were isolated from respiratory infections. Both types were isolated in at least seven different wards of the hospital.

All of the *K. pneumoniae* isolates had the same pattern of multiresistance, showing, in addition to the ESBL-mediated resistance to penicillins and cephalosporins, resistance to ciprofloxacin, gentamicin, and tobramycin (Table 1). All isolates with this pattern of multiresistance were uniformly susceptible to imipenem.

In order to identify the β -lactamases present in these isolates, we amplified the DNA from all ESBL-producing isolates, using the specific primers described previously [10,11]. Sequencing of the PCR products confirmed the presence of TEM-1, SHV-1 and CTXM-15 in all *K. pneumoniae* isolates, independently of the PFGE type exhibited. Isoelectrofocusing confirmed the presence of three β -lactamase bands with pIs of 5.4, 7.6 and 8.6, co-focusing with TEM-1, SHV-1 and CTXM-15, respectively.

We investigated whether the multiresistant phenotype exhibited by these isolates was due to the transference of a unique plasmid encoding the β -lactamases. Plasmid location of these β -lactamases was demonstrated by conjugation experiments. Plasmid DNA from two randomly selected isolates from each PFGE type was transferred to *E. coli*, and transconjugants growing on Luria-Bertani agar plates containing 2 mg/L cefotaxime were checked by DDST, followed by PCR amplification and sequencing with the specific primers.

The MICs for the *E. coli* transconjugants are shown in Table 1. As can be observed, in addition to the ESBL-mediated resistance pattern, aminoglycoside (gentamicin and tobramycin) resistance was co-transferred in the same plasmid. PCR and sequencing analysis of transconjugated plasmids showed that TEM-1 co-transferred with the CTX-M-15 gene in all of the isolates, independently of the PFGE type.

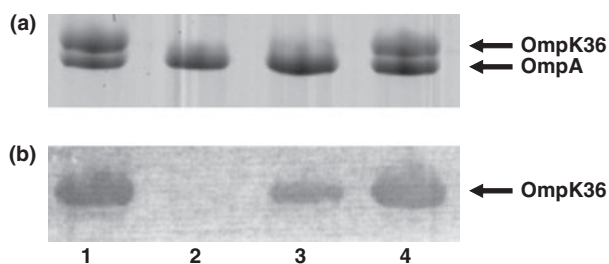
DNA plasmid analysis showed that transconjugants derived from clinical isolates with the same PFGE type harboured the same plasmid. However, they differed from transconjugants derived from isolates with different PFGE types. The size of the plasmids determined by the analysis of the *Eco*RI and *Bam*HI restriction enzymes were estimated to range between 50 kb and 100 kb for all PFGE types.

Interestingly, three isolates of PFGE type A were resistant to ceftioxin (MIC 128 mg/L). In order to investigate whether ceftioxin resistance was caused by alterations of the outer membrane permeability, we analysed the OMPs of susceptible and resistant *K. pneumoniae* clinical isolates of PFGE type A. SDS-PAGE analysis of the OMP of *K. pneumoniae* showed only two major proteins, of about 33 kDa and 36 kDa, in the 31–45-kDa range for the ceftioxin-susceptible isolate (Fig. 2a, lane 1), corresponding to OmpA and OmpK36, respectively. On the other hand, the expression of the 36-kDa protein was reduced or absent in two ceftioxin-

TABLE 1. MICs of several β -lactam and non- β -lactam antibiotics for the extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates and the *Escherichia coli* transconjugants harbouring the ESBL-encoding plasmids

Antibiotic	MIC (mg/L) for:									
	<i>K. pneumoniae</i> isolates from patients of PFGE type ^a :					<i>E. coli</i> Hb101	<i>E. coli</i> Hb101 transconjugants harbouring plasmid from PFGE types:			
	A	B	C	D	A		B	C	D	
Amoxicillin-clavulanate	8 to >32	16 to >32	16 to >32	>32	<2	4	4	8	4	
Piperacillin-tazobactam	32 to >128	<4-64	<4-64	<4-64	<4	<4	<4	<4	<4	
Cefoxitin	<4-128	<4-8	<4-16	<4	<4	<4	<4	<4	<4	
Ceftazidime	16 to >64	>64	16-64	16 to >64	<1	16	4	4	4	
Cefotaxime	>64	>64	>64	>64	<1	>64	>64	>64	>64	
Cefepime	2 to >64	8 to >64	>64	<1-32	<1	<1	<1	<1	<1	
Imipenem	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	
Ciprofloxacin	>4	>4	>4	>4	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	
Gentamicin	>16	8 to >16	>16	>16	<1	>16	8	8	8	
Tobramycin	8 to >16	>16	>16	>16	<1	8	8	8	>16	

PFGE, pulsed-field gel electrophoresis.

^aRange of MICs for all ESBL-producing isolates, each recovered from different patients.**FIG. 2.** SDS-PAGE (a) and western blotting with anti-OmpK36 serum (b) of outer membrane proteins (OMPs) from the cefoxitin-susceptible *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate (lane 1), and their respective *in vivo*-selected cefoxitin-resistant mutants (lanes 2, 3 and 4). The bands corresponding to OmpK36 and OmpA are indicated by arrows on the left of both panels. Only the relevant parts of the gel and western blot are shown.

resistant isolates (Fig. 2a, lanes 2 and 3, respectively). Interestingly, both OmpK36-deficient strains were also resistant to ertapenem. By contrast, one of the cefoxitin-resistant isolates did not present alterations in the expression of OmpK36 (Fig. 2a, lane 4). The porin nature of the 36-kDa protein present in the cefoxitin-susceptible isolates and absent or showing reduced expression in two of the resistant isolates was confirmed by western blot analysis, using specific antibodies (Fig. 2b).

Discussion

The dissemination of ESBL-producing *K. pneumoniae* in the hospital setting is a major threat with important therapeutic and epidemiological consequences, particularly when it affects wards caring for critically ill patients. Nowadays, CTX-M-2,

CTX-M-3, CTX-M-14 and CTX-M-15 are the most widespread CTX-M enzymes in different European countries [4]. However, data on ESBL epidemiology in Bosnia-Herzegovina are scarce.

In this article, we document for the first time the presence of CTX-M-15 in one of the most important hospitals of this country. We show evidence that most of the CTX-M-15-producing isolates belonged to two predominant clones, indicating that, at least in part, dissemination of CTX-M-15 through different wards of the hospital was due to the spread of these clones. Nevertheless, we also demonstrate that, in both clones, CTX-M-15 genes were found to be encoded on large transferable plasmids that might contribute to the endemic situation that is facing this hospital. Furthermore, TEM-1 and the aminoglycoside resistance genes were co-transferred with CTX-M-15. This phenomenon has been previously reported; molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 from *E. coli* strains involved in outbreaks in different countries have demonstrated that they additionally carried other antibiotic resistance genes, such as *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1}, *tetA*, *aac(6)-Ib-cr*, and *aac(3)-II* [13–15].

Given that β -lactamases degrading cefoxitin are uncommon, cefoxitin is frequently an alternative therapeutic option for the treatment of hospital-acquired severe infections caused by multiresistant ESBL-producing *K. pneumoniae* strains, such as those described in this work. Nevertheless, universal susceptibility to this antimicrobial agent in *K. pneumoniae* is no longer guaranteed. Indeed, cefoxitin resistance development in strains producing ESBLs due to the selection of mutants with reduced permeability to these antimicrobials is being increasingly reported [16]. Previous work has shown that the expression of both major *K. pneumoniae* porins, OmpK35 and OmpK36, plays a role in the susceptibility to

cefoxitin antibiotics, and that mutants lacking or having reduced expression of both OMPs show reduced susceptibility to this antimicrobial agent. Nevertheless, in this work, we document and characterize, for the first time, development of *in vivo* resistance to cefoxitin in CTX-M-15-producing *K. pneumoniae* due to the selection of mutations leading to the lack of porin expression. As frequently occurs in clinical ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates [12], the epidemic strains described in this work did not express OmpK35, favouring cefoxitin resistance development through the inactivation of OmpK36. Overall, CTX-M-15-producing *K. pneumoniae* isolates from three of the 36 adult patients infected with the prevalent clone type A (8.3%) developed cefoxitin resistance in clinical samples. Two of them were deficient in the expression of OmpK36, but one did not show altered expression of this porin, suggesting that another resistance mechanism is involved in the observed phenotype. Given that the disk-based inhibitor phenotypic assay using boronic acid or cloxacillin excluded the presence of an AmpC-type enzyme (data not shown), we hypothesized that cefoxitin resistance may be caused by mutations in the pore structure [17] or expression of an efflux pump [18].

In summary, we have described for the first time the emergence of CTX-M-15-producing *K. pneumoniae* isolates in Bosnia-Herzegovina, and have characterized the mechanisms leading to *in vivo* cefoxitin resistance development due to porin expression deficiency in two of the CTX-M-15-producing *K. pneumoniae* epidemic strains.

Acknowledgements

We thank C. Juan for his technical assistance.

Transparency Declaration

This study was supported by grant SAF2005-0466 from the Ministerio de Innovación y Ciencia and by Instituto de Salud Carlos III, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008). I. López-Ramis was supported by a contract from the Govern de les Illes Balears. None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

References

- Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1997; 8: 557–584.
- Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM *et al.* Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 473–478.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211–1233.
- Cantón R, Novais A, Valverde A *et al.* Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 144–153.
- Uzunovic-Kamberovic S, Bedenic B, Vranes J. Predominance of SHV-5 β -lactamase in enteric bacteria causing community-acquired urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 820–823.
- Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 867–878.
- Tan TY, Ng LS, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 146–149.
- Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med* 1998; 15: 17–31.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233–2239.
- Coque TM, Oliver A, Perez-Diaz JC, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 500–510.
- Mena A, Plasencia V, García L *et al.* Characterization of a large outbreak by CTX-M-1 producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to *in vivo* carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2831–2837.
- Hernández-Allés S, Conejo MC, Pascual A, Tomás JM, Benedi VJ, Martínez-Martínez L. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 273–277.
- Boyd DA, Tyler S, Christianson S *et al.* Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended spectrum β -lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3758–3764.
- Karisik E, Ellington MJ, Pike R, Warren RE, Livermore DM, Woodford N. Molecular characterization of plasmids encoding CTXM-15 β -lactamase from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 665–668.
- Lavollay M, Mamlouk K, Frank T *et al.* Clonal dissemination of a CTX-M-15 β -lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 58: 2433–2438.
- Martínez-Martínez L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 82–89.
- Dé E, Baslé A, Jaquinod M, Mallaé M, Molle G, Pagès JM. A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. *Mol Microbiol* 2001; 48: 189–198.
- Pages JM, Lavigne JP, Leflon-Guibout V *et al.* Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS ONE* 2009; 4: e4817.

Effect of Porins and Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases on the Efficacy of β -Lactams in Rat Pneumonia Caused by *Klebsiella pneumoniae*

Emma Padilla,^{1,3} Diana Alonso,³ Antonio Doménech-Sánchez,³ Cristina Gomez,² José Luis Pérez,^{1,3} Sebastián Albertí,³ and Nuria Borrell^{1,3*}

Servicio de Microbiología¹ and Anatomía Patológica,² Hospital Son Dureta, IUNICS, and Departamento de Biología, Universitat de les Illes Balears,³ Palma de Mallorca, Spain

Received 25 November 2005/Returned for modification 12 January 2006/Accepted 21 March 2006

The in vivo activities of imipenem, meropenem, and cefepime were studied in a model of rat pneumonia caused by a plasmid-mediated AmpC β -lactamase ACT-1-producing *Klebsiella pneumoniae* strain (*K. pneumoniae* strain 12) and a derivative porin-deficient mutant (*K. pneumoniae* strain 12dp). No differences between these activities were seen with *K. pneumoniae* 12. Only meropenem showed an activity slightly better than that of imipenem with *K. pneumoniae* 12dp.

The number of infections caused by gram-negative bacteria producing plasmid-mediated AmpC-type β -lactamases (PACBL) has increased in the last 10 years (3, 7, 15, 18), including three reports of outbreaks (9, 15, 20). The only active β -lactams in those cases are carbapenems (imipenem, meropenem, and ertapenem) and zwitterionic cephalosporins (cefepime and cefpirome). However, cooperation with other mechanisms of resistance, such as decreased permeability, results in the subsequent elevation of the MICs of antibiotics with good activity, in some cases up to resistance level (2, 3, 10).

The aim of this study was to evaluate the in vivo efficacies of human regimens of imipenem, meropenem, and cefepime against a PACBL ACT-1-producing *Klebsiella pneumoniae* strain (*K. pneumoniae* 12) and its derived in vitro-obtained mutant deficient in porins (*K. pneumoniae* 12dp) by using a model of experimental pneumonia in immunocompetent rats.

K. pneumoniae strain 52145 is a clinical isolate that has been described previously (14). *K. pneumoniae* strain 12 is a derivative of *K. pneumoniae* 52145 containing the PACBL ACT-1 by conjugation with *K. pneumoniae* C2 (pMG246) (1). *K. pneu-*

moniae strain dp is a porin-deficient mutant derived from *K. pneumoniae* strain 52145, and it was obtained by overnight culture containing cefoxitin at 64 mg/ml and verified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis as previously described (8). *K. pneumoniae* strain 12dp is a porin-deficient derivative of *K. pneumoniae* 52145 expressing ACT-1. Expression of the AmpC β -lactamase in both *K. pneumoniae* 12 and *K. pneumoniae* 12dp was verified by nitrocefin hydrolysis.

Imipenem-cilastatin and cilastatin (Merck Sharp & Dohme-Chibret, Madrid, Spain), meropenem (Astra Zeneca Pharma, Madrid, Spain), and cefepime (Bristol-Myers Squibb, Madrid, Spain) were used according to the manufacturer's instructions. MICs of imipenem, meropenem, cefepime, and ertapenem were determined by the Etest method (AB Biodisk, Solna, Sweden) and are summarized in Table 1.

Pharmacokinetic studies were done by a single intraperitoneal dose in male Wistar rats (Harlan Ibérica S. L., Barcelona, Spain) of 40 mg/kg of body weight for imipenem, 40 mg/kg for meropenem, or 60 mg/kg for cefepime. Antibiotic concentra-

TABLE 1. In vitro susceptibilities of *K. pneumoniae* 52145 and its derivative strains

<i>K. pneumoniae</i> strain ^a	Presence (+) or absence (-) of:		MIC (mg/liter) of ^b :			
	ACT-1	Porin deficiency	Imipenem (<4/8/ \geq 16)	Meropenem (<4/8/ \geq 16)	Ertapenem (<2/4/ \geq 8)	Cefepime (\leq 8/16/ \geq 32)
52145	-	-	0.25	0.03	<0.03	0.03
12	+	-	0.25	0.03	<0.03	0.25
dp	-	+	1	0.03	<0.03	0.3
12dp	+	+	16	8	>16	2

^a *K. pneumoniae* strain 12 is *K. pneumoniae* 52145 with plasmid-mediated AmpC; *K. pneumoniae* strain dp is porin (OmpK35 and OmpK36)-deficient *K. pneumoniae* 52145; *K. pneumoniae* strain 12dp is *K. pneumoniae* 52145 with plasmid-mediated AmpC⁺ porin (OmpK35 and OmpK36) deficiency.

^b Values in parentheses are CLSI MIC breakpoints for *Enterobacteriaceae* as interpretative standard categories of susceptible/intermediate/resistant organisms.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Hospital Son Dureta, Andrea Doria no. 55, 07014 Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain. Phone: 34-71-175238. Fax: 34-71-175185. E-mail: nborrell@hsd.es.

TABLE 2. Pharmacokinetic parameters of the antimicrobials used in animal model and $t > \text{MIC}$ of the antibiotics for *K. pneumoniae* strains 12 and 12dp^a

Antimicrobial (dose in mg/kg)	C_{max} (mg/liter)	$t_{1/2}$ (h)	$t > \text{MIC}$ (h) for <i>K. pneumoniae</i> strain:	
			12	12dp
Imipenem (40)	49.65	0.52	1.4	1
Meropenem (40)	63.77	0.52	1.4	1.2
Cefepime (60)	209.2	1.1	2.5	2.4

^a C_{max} , maximum serum concentration; $t_{1/2}$, half-life; $t > \text{MIC}$, time during which the plasma concentration remained above the MIC. See footnote a of Table 1 for strain descriptions.

tions in blood were determined by the disk plate bioassay method (5). Since rats produce dehydropeptidase, which is able to hydrolyze meropenem (6), cilastatin (1:1) was given together with meropenem. Estimations of the maximum antibiotic plasma concentration (in mg/liter), half-life (in h), and time during which the plasma concentration remained above the MIC (in h) were calculated by a linear regression analysis in an open one-compartment model (Table 2).

The pneumonia model used was a modification of a model previously developed by Mimoz et al. (12, 13). Rats were intraperitoneally anesthetized with ketamine (Pfizer, Madrid, Spain) (100 mg/kg of body weight) plus xylazine (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) (10 mg/kg of body weight) and transtracheally inoculated with 10^6 CFU of *K. pneumoniae* 12 or 10^7 CFU of *K. pneumoniae* 12dp plus 0.5% agar (Oxoid SA, Madrid, Spain). Bilateral pneumonia was observed by standard techniques (19).

Treatment groups, according to pharmacokinetic parameters, received intraperitoneal injections of 40 mg/kg/2 h for imipenem or meropenem-cilastatin or 60 mg/kg/4 h for cefepime. Therapy was started 4 h after bacterial inoculation and continued for 3 days. Animal sacrifice was performed 8 h after the last antibiotic dose. The lungs were quantitatively cultured, and viable bacteria were expressed as \log_{10} CFU/g of lung. Survival at day 3 was also recorded. A Kruskal-Wallis test and a Mann-Whitney U test were used for statistical analysis by the SPSS 8.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL). Emergence of resistance during β -lactam therapy was examined at the end of each experiment by plating 400 μl of the lung homogenates onto MacConkey agar with $4 \times \text{MIC}$ (mg/liter) of imipenem, cefepime, or meropenem.

In our study, the introduction of the PACBL ACT-1 in the *K. pneumoniae* 52145 strain (*K. pneumoniae* strain 12) did not

change the MICs of carbapenems but slightly increased the cefepime MIC from 0.03 to 0.25 $\mu\text{g/ml}$. The same strain with the loss of OmpK35 and OmpK36 porins (*K. pneumoniae* strain 12dp), however, had an increase in MICs of imipenem from 0.25 to 16 mg/liter, of meropenem from 0.03 to 8 mg/liter, and of cefepime from 0.25 to 2 mg/liter (Table 1). Bradford et al. (4) demonstrated for the first time in vitro imipenem resistance in *K. pneumoniae* strains with the combination of ACT-1 and the loss of an outer membrane protein. Similar results were later reported with other PACBL (11).

Mortality and bacterial counts in the lungs of the animals in the different groups and with the different strains are summarized in Table 3. The efficacy results in rats with pneumonia infected with *K. pneumoniae* 12 and *K. pneumoniae* 12dp strains show that antimicrobial activities of imipenem, meropenem, and cefepime seem to be adequate for the treatment of pneumonia caused by AmpC β -lactamase ACT-1-producing strains with or without porin deficiency, with a reduction of 5 \log_{10} CFU/g and 0% mortality, with no differences between them ($P > 0.05$). However, for treated animals infected with *K. pneumoniae* plasmid AmpC without OmpK35 and OmpK36 porins, meropenem seems to be more active than imipenem ($P \leq 0.05$). Recently, Pichardo et al. (16, 17) have also demonstrated that carbapenems and cefepime produce similar reductions of the bacterial counts, with imipenem producing the best clearance in an animal model of pulmonary infection with a porin (OmpK35 and OmpK36)-deficient *K. pneumoniae* strain or with the same strain with a plasmid-mediated AmpC β -lactamase (FOX-5 or CMY-2). In those studies, only true stable mutants were selected by cefepime treatment. We did not observe this phenomenon, even though it may be also possible that the bacterial density of the lungs in treated animals was too low to detect such subpopulations, as these mutants are reported to occur in 1 of 10^5 to 10^8 wild-type strains possessing AmpC β -lactamases (11).

We conclude that imipenem, meropenem, and cefepime decrease bacterial lung counts in *K. pneumoniae* strains producing ACT-1 with or without the presence of porins, probably due to good antibiotic tissue concentrations (over MIC) by the compounds. However, little difference could be seen regardless of the AmpC-type β -lactamase strain used for infection, since some antibiotics could be slightly more effective in decreasing lung bacterial burden.

We thank L. Martínez-Martínez (Hospital Marqués de Valdecillas, Spain) for his critical review of the manuscript.

This work was supported by Instituto Carlos III of Spain through grants from Fondo de Investigación Sanitaria (01/0034-02), Red Española de

TABLE 3. Bacterial counts in lungs and mortality for bacterial strains studied with different therapeutic groups and placebo^a

Antimicrobial	Result for <i>K. pneumoniae</i> 12			Result for <i>K. pneumoniae</i> 12dp		
	No. of animals	% Mortality	Bacterial count in lungs (\log_{10} CFU/g [median \pm SD])	No. of animals	% Mortality	Bacterial count in lungs (\log_{10} CFU/g [median \pm SD])
Meropenem	24	0	1.71 \pm 0.86	20	0	2.42 \pm 0.74
Imipenem	24	0	1.87 \pm 1.05	20	0	2.98 \pm 0.59
Cefepime	23	0	2.00 \pm 1.06	20	0	2.77 \pm 0.45
None	8	50	8.01 \pm 1.49	8	50	9.61 \pm 1.05

^a Dosages were 40 mg/kg/2 h for imipenem and meropenem and 60 mg/kg/4 h for cefepime. See footnote a of Table 1 for strain descriptions.

Investigación en Patología Infecciosa (REIPI, C03/14), and Red Respira (RTIC C03/11).

REFERENCES

1. Alvarez, M., J. H. Tran, N. Chow, and G. A. Jacoby. 2004. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:533–537.
2. Ardanuy, C., J. Liñares, M. A. Domínguez, S. Hernández-Allés, V. J. Benedí, and L. Martínez-Martínez. 1998. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1636–1640.
3. Babini, G. S., and D. M. Livermore. 2000. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997–1998. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:183–189.
4. Bradford, P. A., C. Urban, N. Mariano, S. J. Projan, J. J. Rahal, and K. Bush. 1997. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:563–569.
5. Chapin-Robertson, K., and S. Edberg. 1991. Measurement of antibiotics in human body fluids: techniques and significance, p. 295–366. *In* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
6. Fukasawa, M., Y. Sumita, E. T. Harabe, T. Tanio, H. Nouda, T. Kohzaki, T. Okuda, H. Matsumura, and M. Sunagawa. 1992. Stability of meropenem and effect of 1 β -methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1577–1579.
7. Hanson, N. D. 2003. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:2–4.
8. Hernández-Allés, S., S. Albertí, D. Álvarez, A. Doménech-Sánchez, L. Martínez-Martínez, J. Gil, J. M. Tomás, and V. J. Benedí. 1999. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* **145**: 673–679.
9. Lee, J. H., H. I. Jung, J. H. Jung, J. S. Park, J. B. Ahn, S. H. Jeong, B. C. Jeong, J. H. Lee, and S. H. Lee. 2004. Dissemination of transferable AmpC-type beta-lactamase (CMY-10) in Korean hospital. *Microb. Drug Resist.* **10**:224–230.
10. Martínez-Martínez, L., S. Hernández-Allés, S. Albertí, J. M. Tomás, V. J. Benedí, and G. A. Jacoby. 1996. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:342–348.
11. Martínez-Martínez, L., A. Pascual, S. Hernández-Allés, D. Álvarez-Díaz, A. I. Suárez, J. Tran, V. J. Benedí, and G. A. Jacoby. 1999. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1669–1673.
12. Mimos, O., A. Jacolot, S. Leotard, N. Hidri, K. Samii, P. Nordmann, and O. Petitjean. 1998. Efficacies of cefepime, ceftazidime, and imipenem alone or in combination with amikacin in rats with experimental pneumonia due to ceftazidime-susceptible or -resistant *Enterobacter cloacae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:3304–3308.
13. Mimos, O., S. Leotard, A. Jacolot, C. Padoin, K. Louchahi, O. Petitjean, and P. Nordmann. 2000. Efficacies of imipenem, meropenem, cefepime, and ceftazidime in rats with experimental pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase-producing strain of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:885–890.
14. Nassif, X., J.-M. Fournier, J. Arondel, and P. J. Sansonetti. 1989. Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect. Immun.* **57**:546–552.
15. Papanicolou, G. A., A. A. Medeiros, and G. A. Jacoby. 1990. Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxymino- and α -methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:2200–2209.
16. Pichardo, C., M. C. Conejo, M. Bernabéu-Wittel, A. Pascual, M. E. Jiménez-Mejías, M. de Cueto, M. E. Pachón-Ibañez, I. García, J. Oachón, and L. Martínez-Martínez. 2005. Activity of cefepime and carbapenems in experimental pneumonia caused by porin-deficient *Klebsiella pneumoniae* producing FOX-5 β -lactamase. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**:31–38.
17. Pichardo, C., J. M. Rodríguez-Martínez, M. E. Pachón-Ibañez, C. Conejo, J. Ibañez-Martínez, L. Martínez-Martínez, J. Pachón, and A. Pascual. 2005. Efficacy of cefepime and imipenem in experimental murine pneumonia caused by porin-deficient *Klebsiella pneumoniae* producing CMY-2 β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3311–3316.
18. Podschun, R., and U. Ullmann. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:589–603.
19. Prophet, E. B., B. Mills, J. B. Arringtonand, and L. H. Sobin (ed.). 1992. *Laboratory methods in histotechnology*. American Registry of Pathology, Washington, D.C.
20. Yan, J.-J., W.-C. Ko, Y.-C. Jung, C.-L. Chuang, and J.-J. Wu. 2002. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 β -lactamase in a university hospital in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3121–3126.

Klebsiella pneumoniae AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence[∇]

Emma Padilla,¹ Enrique Llobet,² Antonio Doménech-Sánchez,¹ Luis Martínez-Martínez,³
José Antonio Bengoechea,^{2,4} and Sebastián Albertí^{1*}

Institut Universitari d'Investigacions en Ciències de la Salut (IUNICS) and Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears (UIB), Palma de Mallorca, Spain¹; Fundación Caubet-CIMERA Illes Balears and Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Bunyola, Spain²; Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marques de Valdecilla, and Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain³; and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain⁴

Received 27 May 2009/Returned for modification 7 July 2009/Accepted 20 October 2009

Respiratory infections caused by *Klebsiella pneumoniae* are characterized by high rates of mortality and morbidity. Management of these infections is often difficult, due to the high frequency of strains that are resistant to multiple antimicrobial agents. Multidrug efflux pumps play a major role as a mechanism of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. In the present study, we investigated the role of the *K. pneumoniae* AcrRAB operon in antimicrobial resistance and virulence by using isogenic knockouts deficient in the AcrB component and the AcrR repressor, both derived from the virulent strain 52145R. We demonstrated that the AcrB knockout was more susceptible, not only to quinolones, but also to other antimicrobial agents, including β -lactams, than the wild-type strain and the AcrR knockout. We further showed that the AcrB knockout was more susceptible to antimicrobial agents present in human bronchoalveolar lavage fluid and to human antimicrobial peptides than the wild-type strain and the AcrR knockout. Finally, the AcrB knockout exhibited a reduced capacity to cause pneumonia in a murine model, in contrast to the wild-type strain. The results of this study suggest that, in addition to contributing to the multidrug resistance phenotype, the AcrAB efflux pump may represent a novel virulence factor required for *K. pneumoniae* to resist innate immune defense mechanisms of the lung, thus facilitating the onset of pneumonia.

Klebsiella pneumoniae is one of the most prevalent nosocomial enterobacterial pathogens, causing infections that range from mild urinary infections to severe bacteremia and pneumonia with a high rate of mortality and morbidity (33). Pulmonary infections due to *K. pneumoniae* are often characterized by a rapid progressive clinical course complicated by lung abscesses and multilobular involvement that leaves scant time to establish an effective antibiotic treatment. In addition, an increasing emergence of multidrug resistance among *K. pneumoniae* nosocomial isolates has limited the therapeutic options for treatment of these infections (4).

Fluoroquinolones have been considered an adequate therapeutic option; however, several studies indicate that an increasing percentage of *Klebsiella* strains are resistant to these antimicrobials (11, 21, 41). Fluoroquinolone resistance has been associated with mutations in the quinolone resistance-determining region of the *gyrA* and/or *parC* gene (19), coding for the target proteins DNA gyrase and topoisomerase IV, respectively. Plasmid-mediated resistance to quinolones has also been described (23), and its frequency seems to be increasing in recent years (34, 41). Besides topoisomerase mutations and plasmids, altered permeability (usually because of porin loss) and energy-dependent efflux have also been shown

to contribute to the fluoroquinolone resistance phenotype in *K. pneumoniae* (21, 22). One of the efflux systems involved in this resistance phenotype is the AcrAB multidrug efflux system that in *K. pneumoniae* is encoded by the *acrRAB* operon. In this operon, *acrR* encodes the AcrAB repressor, while *acrA* and *acrB* encode a periplasmic lipoprotein of 40 kDa, anchored to the inner membrane, that bridges the outer and inner membranes and an integral membrane protein of 113.5 kDa with 12 membrane-spanning α -helices, located in the cytoplasmic membrane, respectively (12). AcrB connects with TolC, an outer membrane protein that belongs to a family of envelope proteins found in all Gram-negative bacteria and that is essential for the expulsion of a plethora of compounds (13).

Studies by Mazzariol et al. and Hasdemir et al. reported a correlation between reduced susceptibility to quinolones and AcrA overexpression in several quinolone-resistant clinical *K. pneumoniae* strains, although the genetic basis of this overexpression was not described (17, 24). Schneiders et al. found that increased AcrAB efflux pump expression in 19 fluoroquinolone-resistant *K. pneumoniae* strains was caused by either mutations in the AcrAB repressor, AcrR, or overexpression of the transcriptional regulator RamA (36). However, little is known about the specific and direct role of the AcrAB multidrug efflux pump in the resistance of *K. pneumoniae* to other antimicrobial agents.

On the other hand, it is known that some bacterial efflux pumps export not only antibiotics and other substances, such as dyes and detergents, but also host-derived antimicrobial agents (32). In addition, there is accumulating evidence that efflux

* Corresponding author. Mailing address: Universitat de les Illes Balears, Edificio Científico-técnico, CAMPUS-UIB, Crtra. Vall-demoso, km 7.5, Palma de Mallorca 07122, Spain. Phone: 34-971-173353. Fax: 34-971-259501. E-mail: sebastian.alberti@uib.es.

[∇] Published ahead of print on 26 October 2009.

TABLE 1. Oligonucleotide primers used in this study

Name	Sequence (5'-3')	Target gene	Use
AcrU6	GTGGTTAAAACGCTGG	<i>acrB</i> internal fragment	<i>acrB</i> probe
AcrL3	ATTAATGATGCTCAACCTGATG		
AcrB1	AAGCTTAACTTAAACAGGAGC	<i>acrB</i>	Construction of integrant plasmid pQE58
AcrB2	TTCGAAGAAGATTAATGATGCTC		
AcrRF1	GATTCTAGATGTTGCTCTGC	<i>acrR</i> internal fragment	<i>acrR</i> probe, construction of integrant plasmid pQE61, and RT-PCR amplification of <i>acrR</i>
AcrRR1	CGTCGTCTAGAATTGATAC		
AcrU7	GAGCTGATTGACCAGG	<i>acrB</i> internal fragment	RT-PCR amplification of <i>acrB</i>
AcrL4	CTGATAAGACATCCCGGTCCA		
U681	CGGTTACGGCCAGTGGGAATA	<i>ompK36</i> internal fragment	RT-PCR amplification of housekeeping gene <i>ompK36</i>
L1316	GACGCAGACCGAAATCGAACT		

pumps that confer clinically relevant antibiotic resistance are important for the pathogenicity of the bacterium (32). Thus, different studies have shown that lack of efflux pump expression by a Gram-negative bacterium has a deleterious effect on the ability of the bacterium to be pathogenic in animal models (5, 6, 18, 20, 27, 39). However, the role, if any, that the AcrAB efflux pump plays in the pathogenesis of *K. pneumoniae* respiratory infections has not been investigated.

In this work, we constructed knockouts in the AcrAB repressor, AcrR, and in the AcrB efflux system component to test the role of the AcrAB efflux pump in resistance to fluoroquinolones and other antimicrobial agents, including human antimicrobial peptides. Finally, we also studied whether the pump plays any role in *K. pneumoniae* pneumonia.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and media. *K. pneumoniae* strain 52145 is a previously described clinical isolate (serotype 01:K2) (25). A spontaneous rifampin-resistant mutant derived from strain 52145, designated 52145R, was used in this study. The *Escherichia coli* strains used in the cloning experiments were DH5 α and strain S17-1 *pir*, in which the *pir* gene encodes the protein π , essential for replication of plasmid pFS100 (35). Plasmids pCR2.1 and pGEM-T (Invitrogen) are TA cloning vectors used for cloning PCR products. Plasmid pFS100 was used to create insertion-duplication mutations by homologous recombination (35). Bacterial cells were grown in Luria Bertani (LB) broth at 37°C with shaking or solidified with 1.5% agar. When necessary, media were supplemented with kanamycin (50 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).

DNA procedures. Plasmid DNA was isolated using the Wizard Miniprep kit (Promega, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. Isolation of genomic DNA, PCRs, transformations, and conjugations were carried out by standard techniques (2). T4 DNA ligase and restriction endonucleases were used following the manufacturer's recommendations (GE Healthcare, Barcelona, Spain). DNA fragments prepared by restriction enzyme digestion were separated by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. For Southern blot analysis and probe labeling and detection, we used the ECL kit (GE Healthcare, Barcelona, Spain) according to the manufacturer's protocol. The probes for *acrB* and *acrR* were obtained by PCR amplification of *K. pneumoniae* 52145R genomic DNA with primers AcrU6/AcrL3 and AcrRF1/AcrRR1, respectively (Table 1).

Generation of *acrB* and *acrR* knockouts from *K. pneumoniae* strain 52145R. To construct an *acrB* knockout from *K. pneumoniae* strain 52145R, the entire *acrB* gene obtained by PCR amplification with primers AcrB1 and AcrB2 (Table 1) was cloned into pCR2.1 to give pQE57. A KpnI internal *acrB* 800-bp fragment from pQE57 was cloned into the π protein-dependent shuttle vector pFS100 to give plasmid pQE58. To generate an *acrR* knockout, an internal fragment of the *acrR* gene was amplified by PCR from *K. pneumoniae* 52145R genomic DNA with primers AcrRF1/AcrRR1. The PCR product was cloned in pGEM-T to give pQE60. An EcoRI fragment from pQE60 containing the internal fragment of *acrR* was cloned in the shuttle vector pFS100 digested with EcoRI to give plasmid pQE61. Plasmids pQE58 and pQE61 were introduced into *K. pneumoniae* by conjugation. To select integrants of plasmid pQE58 or pQE61 into the *K. pneumoniae* chromosome, thereby disrupting expression of *acrB* or *acrR*, respectively,

an aliquot of each conjugation was spread on rifampin-kanamycin-containing agar. One integrant from each conjugation, designated *K. pneumoniae* 52145 Δ *acrB* or *K. pneumoniae* 52145 Δ *acrR*, was further investigated.

RNA extraction and RT-PCR. Total cellular RNA was isolated from *K. pneumoniae* using the Qiagen Rneasy Mini Kit (Qiagen, Barcelona, Spain) according to the manufacturer's instructions. *acrB*, *acrR*, and *ompK36* transcripts were detected by reverse transcription (RT)-PCR using primers AcrU7/AcrL4, AcrRF1/AcrRR1, and U681/L1316, respectively (Table 1). RT-PCR was performed using the Access RT-PCR system (Promega, Madrid, Spain) by a 45-min reaction at 48°C using 15 ng of total cellular RNA as a template, followed by a 5-min hot start and 20 to 30 cycles with the following reaction conditions: 94°C for 30 s, 50°C for 1 min, and 72°C for 2 min. The RT-PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining.

Determination of CPS and LPS expression. Capsule polysaccharide (CPS) and lipopolysaccharide (LPS) expression was quantified by an inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA). For this purpose, plates were coated with 1 μ g of either purified CPS type 2 or LPS O side chain type 1 per well. After a blocking step with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1% bovine serum albumin (BSA), the plates were incubated with serial dilutions of CPS extracts or LPS extracts and antisera against CPS type 2 or LPS O side chain type 1, respectively. Bound antibodies were detected with alkaline phosphatase-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin G and developed with *p*-nitrophenyl phosphate. Incubations with antisera diluted in PBS-1% BSA were carried out at 37°C for 1 h and were always followed by PBS washes. Known amounts of CPS and LPS purified by the methods of Wilkinson and Sutherland (43) and Westphal and Jann (42) were used to construct a standard curve.

Susceptibility testing. The MICs of antimicrobial agents were determined using Etest strips (AB Biodisk, Solna, Sweden) following the manufacturer's instructions.

Bacterial survival experiments. For the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) bactericidal assays, BALF from healthy subjects was collected as previously described (8). This procedure was approved by the local ethics committee, and written informed consent was obtained before collection of the human samples. The BALF (120 to 200 ml from each subject) was centrifuged to eliminate the cells, and a protease cocktail inhibitor (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was added to the supernatants. After lyophilization, the BALF was resuspended in sterile water to produce a 200-fold-concentrated solution with respect to the initial BALF volume. BALFs obtained from three different subjects were pooled before the antimicrobial assay described below was performed. For the bactericidal assays using BALF, 10⁵ bacterial cells grown to the exponential phase of growth and resuspended in 150 μ l of PBS were mixed with 50 μ l of BALF. After 1 h of incubation at 37°C, viable bacteria were counted by plating appropriate dilutions on LB agar plates. The BALF bactericidal effect was calculated as the survival percentage, with the bacterial counts obtained at the beginning of the experiment set to 100%.

To test the effect of polymyxin B (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), *K. pneumoniae* strains were grown at 37°C in 5 ml of LB medium and were harvested (5,000 \times g; 15 min; 5°C) in the exponential phase of growth, and a suspension containing ca. 2.1 \times 10⁵ CFU/ml was prepared in 1% (wt/vol) tryptone-PBS (pH 7.4). Then, 10 μ l of this cell suspension was mixed in Eppendorf tubes with polymyxin B (0.1 μ g/ml) in a volume of 200 μ l, followed by incubation at 37°C for 30 min. In parallel experiments, cells were de-energized with 50 μ M carbonyl-cyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP). In order to evaluate the effect of reenergization of cells with glucose, the relative survival was also determined in bacterial suspensions treated with polymyxin B, exposed or not to CCCP, and

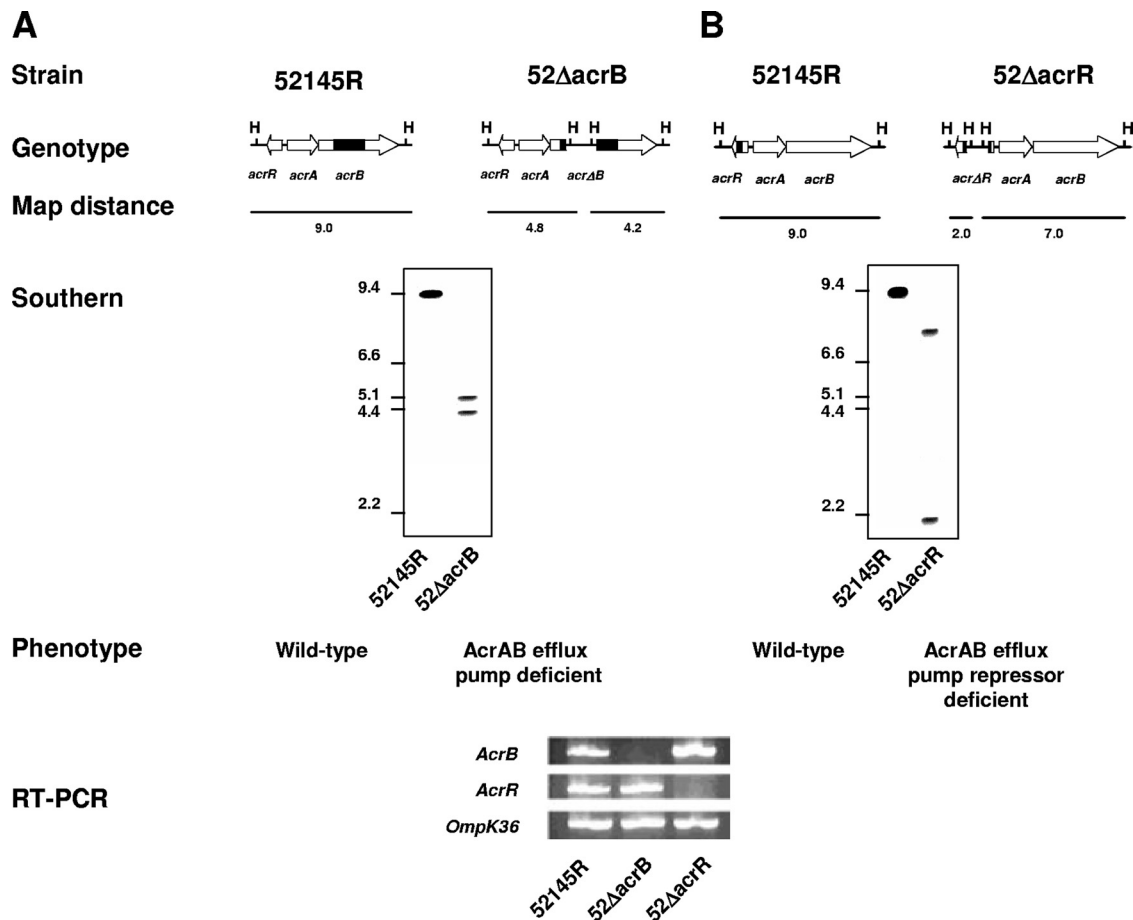


FIG. 1. Schematic representation of the *K. pneumoniae* chromosome in the virulent strain 52145R and its isogenic knockouts 52ΔacrB (A) and 52ΔacrR (B). DNA fragment sizes in the schematic are not to scale. The black boxes represent the probes used in the Southern blot analysis. The lines between the black boxes in the knockout genomes represent the DNA plasmids integrated into the chromosome. H indicates HindIII. The expected sizes of the fragments that hybridize with the probes described above are indicated in kilobases. Southern blot analysis of *K. pneumoniae* wild-type and isogenic knockout chromosomes digested with HindIII is shown. Molecular size markers (in kilobases) are shown to the left of the blots. The expression of the mutated gene in each strain was determined by RT-PCR. For each strain, the product of RT-PCR using primers specific for *acrB*, *acrR*, or *ompK36*, a control gene, is shown.

treated with glucose (0.4%). Colony counts were determined, and the results were expressed as percentages of the colony counts of bacteria not exposed to antibacterial agents.

To test the effect of human neutrophil defensin 1 (HNP-1) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), and human β -defensin 1 (HBD-1) and HBD-2 (Preprotech, Rocky Hill, NJ), a bacterial suspension containing 10^5 CFU/ml was prepared in 10 mM PBS (pH 6.5)-0.1% tryptic soy broth (TSB)-100 mM NaCl. Next, 5 μ l of this suspension was mixed in Eppendorf tubes with the corresponding defensin to get a final volume of 25 μ l. After 1 h of incubation, the contents of the Eppendorf tubes were plated on LB agar plates. Colony counts were determined, and the results were expressed as described above.

All bacterial survival experiments were done with duplicate samples on at least three independent occasions.

Murine model of pneumonia. Male (16- to 20-g) ICR-CD1 mice (Harlan Ibérica) were anesthetized and intubated intratracheally using a blunt-end feeding needle (9). Approximately 10^5 CFU of *K. pneumoniae* from an early-log-phase broth culture was suspended in 50 μ l of sterile saline solution and inoculated through the blunt-end needle. At 24 h, 48 h, and 72 h, animals ($n = 10$ per group) were sacrificed, and the lungs were aseptically removed and homogenized for quantitative bacterial cultures. All animal experiments were done according to institutional and national guidelines and approved by the Experimental Animal Committee of the institution.

Statistical methods. Comparisons among groups were made by the two-sample *t* test or, when the requirements were not met, by the Mann-Whitney U test. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Genotypic and phenotypic characterization of the *K. pneumoniae* AcrAB operon knockouts. To investigate the role of the AcrAB efflux pump in *K. pneumoniae* antimicrobial resistance and virulence, we constructed two isogenic knockouts from the wild-type strain 52145R. This strain was selected due to its high virulence in a murine model of pneumonia (9). We used insertion-duplication mutagenesis to interrupt *acrB*, required for the synthesis of a functional efflux pump, or *acrR*, required for the synthesis of the repressor of the expression of the efflux pump. A schematic representation of the wild-type 52145R and the knockout 52ΔacrB and 52ΔacrR chromosomes is shown in Fig. 1. Southern blot analysis of the genomic DNA of the knockouts using specific probes for *acrB* or *acrR* confirmed that two incomplete copies of the genes were generated by the integration of the plasmid. RT-PCR analysis confirmed that the mutations abolished the transcription of *acrB* or *acrR*. In both knockout strains, *ompK36*, a porin-coding gene used as a control, was transcribed efficiently.

TABLE 2. Antimicrobial susceptibility (MICs) of *K. pneumoniae* 52145R and its derived isogenic knockouts, 52ΔacrB and 52ΔacrR

Antimicrobial agent	MIC ^a		
	52145R	52ΔacrB	52ΔacrR
Nalidixic acid	4	0.5	8
Ciprofloxacin	0.06	0.008	0.12
Levofloxacin	0.09	0.006	0.19
Imipenem	0.125	0.125	0.125
Ertapenem	0.012	0.012	0.012
Meropenem	0.03	0.03	0.03
Cefoxitin	8	4	32
Cefotaxime	0.125	0.06	4
Erythromycin	32	8	32
Tetracycline	2	0.25	4
Chloramphenicol	2	1	4
Tobramycin	0.25	0.125	0.25
Gentamicin	0.25	0.06	0.25

^a MICs are expressed in μg/ml.

Role of the AcrAB efflux pump in *K. pneumoniae* antimicrobial resistance. The susceptibilities of the wild-type *K. pneumoniae* strain 52145R and its derived isogenic efflux pump knockouts, 52ΔacrB and 52ΔacrR, to a number of antibiotics were determined (Table 2). It is noteworthy that the MICs of most of the antibiotics tested in strain 52145R were low. However, we observed differences in the MICs of various antibiotics between the wild-type strain and the knockouts. As expected, the MICs of all quinolones were lower for 52ΔacrB than for the wild type, whereas a slight increase in the MICs was observed for 52ΔacrR. The same trend was observed for β-lac-

tams. MICs were lower for 52ΔacrB and higher for 52ΔacrR than for the wild-type strain. The MICs of carbapenems were similar for all strains. The MIC of erythromycin was dramatically reduced in the *acrB* knockout, while there were modest decreases in the MICs of tetracycline, chloramphenicol, and the aminoglycosides.

Altogether, these results confirm the reliability of our knockouts and indicate that the AcrAB efflux pump is involved in the expulsion of different antimicrobial agents.

The role of the AcrAB efflux pump in *K. pneumoniae* pneumonia. We explored whether the AcrAB efflux pump plays any role in resistance against the antibacterial agents found in the BALF. The efflux pump knockout 52ΔacrB was more susceptible to BALF than the wild-type strain 52145R. One hour of incubation in the presence of BALF was enough to kill the knockout 52ΔacrB (5% ± 3% survival), whereas the survival rates of the parent strain 52145R and the knockout 52ΔacrR were less affected (53% ± 5% and 62% ± 7% survival, respectively). Given that antimicrobial peptides are among the array of antibacterial compounds present in BALF, we hypothesized that 52ΔacrB could be more susceptible to these agents than 52145R. Thus, we tested the sensitivities of 52145R and the knockouts to different antimicrobial agents (Fig. 2). Polymyxin B is considered a model of antimicrobial-peptide action (16), whereas HNP-1, HBD-1, and HBD-2 are three antimicrobial peptides reported to be present in human BALF (1, 15). Confirming our hypothesis, 52ΔacrB was significantly more susceptible to polymyxin B, HNP-1, HBD-1, and HBD-2 (Fig. 2) ($P < 0.05$) than 52145R. These differences were not due to reduced expression of CPS and LPS, molecules involved in resistance to antimicrobial peptides in *K. pneumoniae* (8), because 52145R

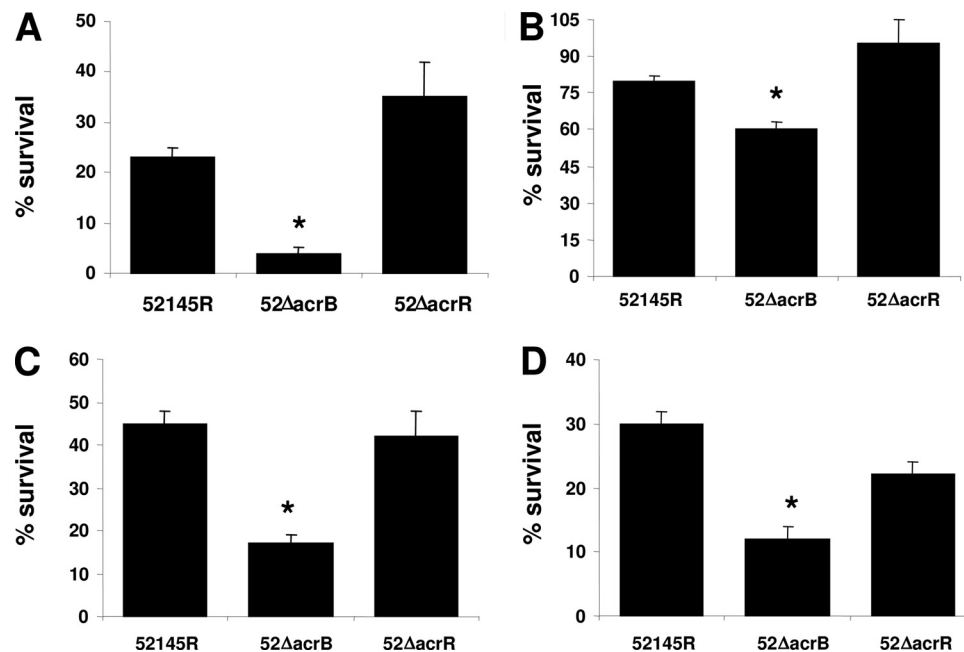


FIG. 2. Resistance of *K. pneumoniae* 52145R and the derived knockouts 52ΔacrB and 52ΔacrR to polymyxin B and human antimicrobial peptides. Bacterial cells were incubated with polymyxin B (0.1 μg/ml) (A), HNP-1 (30 μg/ml) (B), β-defensin 1 (0.1 μg/ml), or β-defensin 2 (0.1 μg/ml). The survival of bacteria (percentage of colony counts of cells not exposed to the agents) is shown. Each point represents the mean and standard deviation of at least three independent experiments run in duplicate. Significant survival differences between the strains ($P < 0.05$) are indicated by asterisks.

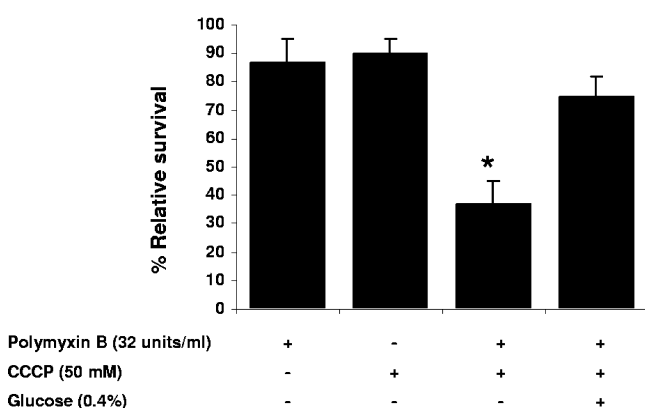


FIG. 3. Effect of polymyxin B on *K. pneumoniae* 52145R. Bacterial cells were exposed to polymyxin B (0.1 μ g/ml) alone or in the presence of glucose (0.4%), CCCP (50 μ M), and CCCP plus glucose. The survival of bacteria is expressed as the percentage of the colony counts of cells not exposed to polymyxin B after 1 h of incubation. The error bars display the standard deviations from the mean of three experiments, each one run in duplicate. Significant survival differences ($P < 0.05$) are indicated by the asterisk.

and 52 Δ acrB expressed similar amounts of both polysaccharides (data not shown). The results also showed that 52 Δ acrB was slightly more resistant to polymyxin B and HNP-1 than the wild type, although the differences were not statistically significant.

To further confirm the role of the energy-driven efflux pump of antimicrobial peptides, we asked whether dissipation of the proton-motive force increases susceptibility to polymyxin B. An uncoupler, CCCP, was used to interfere with proton-motive force-dependent efflux pumps. CCCP greatly reduced the survival of 52145R against polymyxin B (Fig. 3), indicating that polymyxin B was pumped out by a mechanism that required energy. In turn, the addition of glucose to CCCP-treated cells increased the relative survival rate to levels similar to those observed in untreated bacteria (Fig. 3).

Finally we tested the ability of the knockout 52 Δ acrB to cause pneumonia in a mouse model. Mice were infected intratracheally with 52145R or 52 Δ acrB, and the bacterial loads in lung homogenates were determined at days 1, 2, and 3 postinfection. As shown in Fig. 4, lungs from mice infected with the *acrB* knockout presented significantly lower (asterisks in Fig. 4) ($P < 0.05$) bacterial loads than those infected with the wild-type strain.

DISCUSSION

Sequencing analysis of the genomes of a wide variety of bacterial species has indicated that most of them encode several efflux pump systems. *K. pneumoniae* encodes an AcrAB system homologous to the system described in *E. coli*. In addition, only a few similar multidrug efflux systems have been characterized in *Klebsiella* spp. (14, 28, 10), although the sequencing data for *K. pneumoniae* strain MGH78578 indicate that many others potentially are present. In general, most of the clinical studies have focused on the roles of these efflux pumps in antibiotic resistance. However, it is reasonable to postulate that the function of these efflux pumps within the

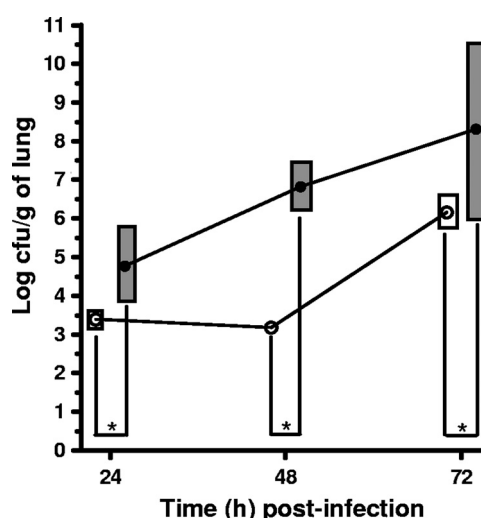


FIG. 4. Effect of AcrAB efflux pump deficiency on *K. pneumoniae* lung infection in vivo. Mice ($n = 10$ per group) were intratracheally inoculated with the wild-type strain 52145R (gray bars) or the AcrB-deficient strain 52 Δ acrB (white bars). The number of bacterial cells in lung homogenates was determined at 24, 48, and 72 h postinfection. The results that are significantly different from those in untreated controls are denoted by asterisks.

human body is the export of toxic compounds present in their natural environment, such as bile salts, fatty acids, and hormones. Furthermore, few studies have studied the contributions of these efflux pumps to bacterial virulence.

In this study, we have characterized the contribution of the *K. pneumoniae* AcrAB efflux pump in resistance to quinolones and other antibiotics by using *acrB* and *acrR* knockouts derived from the virulent strain 52145R. *acrB* deficiency resulted in an increased susceptibility to quinolones, which is consistent with previous reports showing that overexpression of AcrB due to mutations in *acrR* caused resistance to ciprofloxacin in several *K. pneumoniae* clinical isolates (17, 24, 36). Moreover, we observed a decrease in the MICs of erythromycin, tetracycline, chloramphenicol, aminoglycosides, and β -lactams, except carbapenems, for 52145 Δ acrB in comparison with those for the wild-type strain, indicating that this efflux system may recognize multiple substrates, as already noted for the homologous proteins from *Enterobacter cloacae* and *E. coli* (26, 31). This fact suggests that this efflux pump system, in combination with extended-spectrum β -lactamases and porin deficiency, may significantly contribute to the multidrug resistance phenotype observed in some epidemic *K. pneumoniae* strains and supports the idea that the involvement of efflux pumps in β -lactam resistance is especially underestimated in clinical isolates (29).

The *acrR* knockout showed a moderate increase in the MICs of most of the antimicrobial agents tested compared to the parent strain, 52145R. In contrast with previous studies, where mutations in the repressor led to a marked increase in resistance to quinolones due to overexpression of AcrAB (24, 36), in this work, AcrR deficiency did not increase the MICs of quinolones dramatically. There are two nonexclusive hypotheses to account for this result. First, there must be other factors, such as RamA, involved in the regulation of the expression of this efflux pump in this strain. Second, other

mechanisms of resistance (i.e., other efflux pumps) can be required for the strain to become resistant to quinolones.

In this study, we have presented evidence showing that the *K. pneumoniae* AcrAB system also mediates resistance against antimicrobial peptides reported to be present in the lung. Thus, HBD-1 and HBD-2 are synthesized by airway epithelial cells, whereas HNP-1 is released by neutrophils recruited to the site of infection. Furthermore, the concentrations tested were within the range reported to be present in the respiratory fluid of healthy subjects (15), giving physiological relevance to our work. Interestingly, the AcrAB homologue of the plant pathogen *Erwinia amylovora* mediates resistance to plant-derived antibacterial toxins, such as flavonoids, isoprenoids, and alkaloids (7).

Until now, few efflux pumps have been shown to mediate resistance against antimicrobial peptides, the best-characterized examples being the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump from *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*, the MexAB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*, and the efflux pump/potassium antiporter from *Yersinia enterocolitica* (37, 40, 30, 3). Therefore, it is tempting to postulate that one of the primary roles of efflux pumps is to pump out antimicrobial agents present in the host tissues. Not surprisingly, antimicrobial peptides are considered one of the first barriers against infections of the innate immune system.

In vivo experiments revealed lower bacterial loads in the lungs of mice infected with 52ΔacrB than in those infected with the wild-type strain. Although significant, these differences were not dramatic, perhaps because other virulence factors, such as CPS or LPS (9, 38), that play major roles in the outcome of pneumonia masked the effects. However, this efflux system may play a crucial role in bacterial resistance against early host defense mechanisms in those strains overexpressing AcrAB selected in vivo during therapy with quinolones. Thus, the association between overexpression of the AcrAB efflux system and resistance to the antimicrobial peptides may raise a serious concern about the use of some antimicrobial agents for the treatment of pneumonia in immunocompromised patients.

In summary, in this article we described the use of two specific knockouts, 52ΔacrB and 52ΔacrR, to test the effects of the AcrAB efflux system on antimicrobial resistance and virulence. We demonstrated that the system is involved in resistance not only to quinolones, but also to other antimicrobial agents. We further showed a novel role for the *K. pneumoniae* AcrAB system: resistance to host antimicrobial peptides. The finding of this novel function stimulates the idea of developing and seeking inhibitors affecting the efflux systems.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. T. de Francisco from Serveis Científico-tècnics (UIB) for her assistance in the animal experiments and M. Cerdá and I. López for their technical assistance.

This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2005-0466 to S.A.), by the Fondo de Investigación Sanitaria (PI052311 to J.A.B.), and by the Instituto de Salud Carlos III (Spanish Network for Research in Infectious Diseases) (REIPI RD06/0008).

REFERENCES

- Agerberth, B., J. Grunewald, E. Castanos-Velez, B. Olsson, H. Jornvall, H. Wigzell, A. Eklund, and G. H. Gudmundsson. 1999. Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**:283–290.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1997. *Current protocols in molecular biology*. Wiley Interscience, New York, NY.
- Bengoechea, J. A. and M. Skurnik. 2000. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* **37**:67–80.
- Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:933–951.
- Buckley, A. M., M. A. Webber, S. Cooles, L. P. Randall, R. M. La Ragione, M. J. Woodward, and L. J. Piddock. 2006. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol.* **8**:847–856.
- Bunikis, I., K. Denker, Y. Ostberg, C. Andersen, R. Benz, and S. Bergström. 2008. An RND-type efflux system in *Borrelia burgdorferi* is involved in virulence and resistance to antimicrobial compounds. *PLoS Pathog.* **4**:e1000009.
- Burse, A., H. Weingart, and M. S. Ullrich. 2004. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**:43–54.
- Campos, M. A., M. A. Vargas, V. Regueiro, C. M. Llompарт, S. Albertí, and J. A. Bengoechea. 2004. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* **72**:7107–7114.
- Cortés, G., N. Borrell, B. de Astorza, C. Gómez, J. Sauleda, and S. Albertí. 2002. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect. Immun.* **72**:2582–2590.
- Coudeyras, S., L. Nakusi, N. Charbonnel, and C. Forestier. 2008. A tripartite efflux pump involved in gastrointestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae* confers a tolerance response to inorganic acid. *Infect. Immun.* **76**:4633–4641.
- Deguchi, T., T. Kawamura, M. Yasuda, M. Nakano, H. Fukuda, H. Kato, N. Kato, Y. Okano, and Y. Kawada. 1997. In vivo selection of *Klebsiella pneumoniae* strains with enhanced quinolone resistance during fluoroquinolone treatment of urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1609–1611.
- Domenech-Sanchez, A., S. Alberti, L. Martinez-Martinez, A. Pascual, I. Garcia, and V. J. Benedi. 2001. Abstr. 41st Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. C1-2018.
- Eswaran, J., C. Hughes, and V. Koronakis. 2003. Locking TolC entrance helices to prevent protein translocation by the bacterial type I export apparatus. *J. Mol. Biol.* **21**:309–315.
- Fang, C. T., H. C. Chen, Y. P. Chuang, S. C. Chang, and J. T. Wang. 2002. Cloning of a cation efflux pump gene associated with chlorhexidine resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2024–2028.
- Ganz, T. 2002. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J. Clin. Invest.* **109**:693–697.
- Gunn, J. S., K. B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett, and S. I. Miller. 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabino lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* **27**:1171–1182.
- Hasdemir, U. O., J. Chevalier, P. Nordmann, and J. M. Pagès. 2004. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2701–2706.
- Hirakata, Y., R. Srikumar, K. Poole, N. Gotoh, T. Suematsu, S. Kohno, S. Kamihira, R. E. Hancock, and D. P. Speert. 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* **196**:109–118.
- Hooper, D. C. 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* **31**(Suppl. 2):S24–S28.
- Jerse, A. E., N. D. Sharma, A. N. Simms, E. T. Crow, L. A. Snyder, and W. M. Shafer. 2003. A gonococcal efflux pump system enhances bacterial survival in a female mouse model of genital tract infection. *Infect. Immun.* **71**:5576–5582.
- Martínez-Martínez, L., I. García, S. Ballesta, V. J. Benedi, S. Hernández-Allés, and A. Pascual. 1998. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1850–1852.
- Martínez-Martínez, L., A. Pascual, M. C. Conejo, I. García, P. Joyanes, A. Doménech-Sánchez, and V. J. Benedi. 2002. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3926–3932.
- Martínez-Martínez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797–799.
- Mazzariol, A., J. Zuliani, G. Cornaglia, G. M. Rossolini, and R. Fontana. 2002. AcrAB efflux system: expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3984–3986.
- Nassif, X., J. M. Fournier, J. Arondel, and P. J. Sansonetti. 1989. Muco-

- phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect. Immun.* **57**:546–552.
26. **Nikaido, H., and Y. Takatsuka.** 2009. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**:769–781.
 27. **Nishino, K., T. Latifi, and E. A. Groisman.** 2006. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **59**:126–141.
 28. **Ogawa, W., M. Koterawasa, T. Kuroda, and T. Tsuchiya.** 2006. KmrA multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Biol. Pharm. Bull.* **29**:550–553.
 29. **Pages, J. M., J. P. Lavigne, V. Leflon-Guibout, E. Marcon, F. Bert, L. Noussair, and M. H. Nicolas-Chanoine.** 2009. Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One* **4**:e4817.
 30. **Pamp, S. J., M. Gjermansen, H. K. Johansen, and T. Tolker-Nielsen.** 2008. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Mol. Microbiol.* **68**:223–240.
 31. **Pérez, A., D. Canle, C. Latasa, M. Poza, A. Beceiro, M. D. M. Tomás, A. Fernández, S. Mallo, S. Pérez, F. Molina, R. Villanueva, I. Lasa, and G. Bou.** 2007. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:3247–3253.
 32. **Piddock, L. J.** 2006. Multidrug-resistance efflux pumps—not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:629–636.
 33. **Podschun, R., and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:589–603.
 34. **Rodríguez-Martínez, J. M., A. Pascual, I. García, and L. Martínez-Martínez.** 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:703–706.
 35. **Rubirés, X., F. Saigi, N. Piqué, N. Climent, S. Merino, S. Albertí, J. M. Tomás, and M. Regué.** 1997. A gene (wbbL) from *Serratia marcescens* N28b (O4) complements the rfb-50 mutation of *Escherichia coli* K-12 derivatives. *J. Bacteriol.* **179**:7581–7586.
 36. **Schneiders, T., S. G. Amyes, and S. B. Levy.** 2003. Role of AcrR and ramA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2831–2837.
 37. **Shafer, W. M., X. Qu, A. J. Waring, and R. I. Lehrer.** 1998. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1829–1833.
 38. **Shankar-Sinha, S., G. A. Valencia, B. K. Janes, J. K. Rosenberg, C. Whitfield, R. A. Bender, T. J. Standiford, and J. G. Younger.** 2004. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infect. Immun.* **72**:1423–1430.
 39. **Stone, B. J., and V. L. Miller.** 1995. *Salmonella enteritidis* has a homologue of *tolC* that is required for virulence in BALB/c mice. *Mol. Microbiol.* **17**:701–712.
 40. **Tzeng, Y. L., K. D. Ambrose, S. Zughaier, X. Zhou, Y. K. Miller, W. M. Shafer, and D. S. Stephens.** 2005. Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **187**:5387–5396.
 41. **Wang, M., D. F. Sahn, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2004. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1295–1299.
 42. **Westphal, O., and K. Jann.** 1965. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.* **5**:83–91.
 43. **Wilkinson, J. F., and I. W. Sutherland.** 1971. Chemical extraction methods of microbial cells. *Methods Microbiol.* **5B**:345–383.

