

β -Lactamasas adquiridas en enterobacterias aisladas en Argentina

Di Conza, J.¹; Radice, M.²; Gutkind, G.²

1- Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas (UNL). CC 242. Paraje "El Pozo". Ciudad Universitaria. (3000). Santa Fe.

2- Cátedra de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Junin 956 (1113). Buenos Aires.

RESUMEN: El mecanismo más común de resistencia bacteriana a antibióticos β -lactámicos en enterobacterias es la producción de β -lactamasas. Existe una amplia diversidad molecular de β -lactamasas cuyas actividades sobre los distintos sustratos son también variables. La mayoría de estas enzimas, de distribución cosmopolita, son adquiridas por el microorganismo. La selección de cepas con multiresistencia a antibióticos β -lactámicos (generalmente debido a la presencia de β -lactamasas de espectro extendido, BLEEs) y la prevalencia de las β -lactamasas involucradas están determinadas, en parte, por el uso racional e incluso muchas veces innecesario de ciertos antibióticos en una región establecida. En este artículo se realizó una revisión de las β -lactamasas adquiridas descritas en distintas enterobacterias, haciendo especial mención de las enzimas prevalentes en Argentina y países limítrofes.

Palabras claves: β -lactamasas, cefotaximasas, enterobacterias.

SUMMARY: Acquired β -lactamases in enterobacteria isolated in argentina. Di Conza, J.; Radice, M.; Gutkind, G. The most common mechanism of bacterial resistance to β -lactam antibiotics in enterobacterial species is β -lactamase production. There is a broad molecular diversity of β -lactamasas with variable activity on different substrates. Many of these enzymes are acquired by microorganism. The selection of strains multiresistant to β -lactams (generally due to extended spectrum β -lactamasas, ESBL) and the prevalence of β -lactamasas are determined, in part, by the rational or unnecessary use of certain antibiotics in a particular region. In this review, the β -lactamasas acquired in different enterobacterial species were analyzed, with special attention to enzymes prevalent in Argentina and neighbouring countries.

KEY WORDS: β -lactamasas, cefotaximasas, enterobacteria.

Correspondencias:

Di Conza, José. Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas (UNL). CC 242. Paraje "El Pozo". (3000). Santa Fe. Argentina.
Tel: (0342) 4575206, Fax: (0342) 4575221.
e-mail: jdiconza@fbc.unl.edu.ar

Consideraciones generales

El mecanismo más común de resistencia bacteriana a los antibióticos β -lactámicos en las bacterias Gram negativas es la producción de β -lactamasas, las cuales hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico. Se han descrito más de 200 enzimas asociadas a fenotipos de resistencia bien caracterizados.

La localización periplásmica de estas enzimas en los microorganismos Gram negativos resulta ventajosa, ya que pequeñas cantidades de enzima producidas pueden ser suficiente para hidrolizar el antibiótico que logra atravesar la membrana externa, confiriéndole resistencia (1).

Los genes que codifican para las β -lactamasas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. Así, la presencia de genes de resistencia en plásmidos u otros elementos genéticos móviles, permite que estos genes se transfieran a bacterias relacionadas (o no) filogenéticamente, ya sea por conjugación, transformación o transducción (1-4).

Muchas β -lactamasas codificadas en el cromosoma bacteriano, como las cefalosporinas AmpC de las enterobacterias, son típicamente inducibles. Sin embargo, en muchas especies, pueden ocurrir mutantes con hiperproducción permanente (desreprimidas) de β -lactamasas cromosómicas (5). Las β -lactamasas codificadas en plásmidos son producidas, en general, en mayor cantidad que las cromosómicas. Hay muchos ejemplos de β -lactamasas plasmídicas que guardan estrecha relación con las enzimas cromosómicas (AmpC) de algunas bacterias como *Enterobacter* spp. y *Citrobacter* spp. Es probable que todas las β -lactamasas codificadas en plásmidos tengan origen cromosomal aunque el microorganismo de origen, en muchos tipos de enzimas, permanece aún desconocido (6).

Es frecuente la producción simultánea de múltiples β -lactamasas, ya que si bien casi todas las especies producen una β -lactamasa cromosómica característica, la adquisición de una enzima plasmídica adicional es un mecanismo frecuente para incrementar los niveles de resistencia y el rango de antibióticos afectados (1,7,8).

Lo cierto es que la utilización de estos agentes en forma masiva y en muchos casos innecesaria es actualmente el principal factor de selección de cepas resistentes.

β -Lactamasas plasmídicas

Una de las secuelas importantes que produjo la introducción de los β -lactámicos de amplio espectro (aminopenicilinas y cefalosporinas clásicas) fue la diseminación de β -lactamasas mediada por plásmidos. TEM-1, considerada como la β -lactamasa de amplio espectro (BLEA) tipo, fue la primer β -lactamasa de localización plasmídica descrita en las bacterias Gram negativas (9). La localización del gen codificante en un plásmido lo suficientemente "promiscuo" y/o en un transposón, ha determinado su diseminación alcanzando una frecuencia entre 20-60% en los aislamientos de enterobacterias, dependiendo de la especie y la región (1). Más aún, TEM-1 no sólo se ha detectado en la mayoría de las enterobacterias, sino también en aislamientos de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas* spp. y *Vibrio cholerae* (1,10).

Otras BLEA de localización plasmídicas como SHV-1, TEM-2 y OXA-1, han sido también recuperadas de enterobacterias pero TEM-1 es al menos 10 veces más prevalente que el resto. TEM-1, SHV-1 y la mayoría de las β -lactamasas plasmídicas pertenecen a la clase molecular A de Ambler, en cambio OXA-1 pertenece a la clase molecular D (1,11,12).

A mediados de la década del '80, comienza una nueva amenaza contra los β -lactámicos de última generación (cefalosporinas modernas), debido a la emergencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), con capacidad de hidrolizarlos. La primera de estas enzimas, SHV-2, se encontró en una cepa de *Klebsiella ozaenae*, aislada en 1983 en Alemania (10,11,13).

Independientemente de la afinidad en particular por los sustratos a hidrolizar o de la clase molecular a la que pertenezcan, la mayoría de las BLEEs de importancia clínica están codificadas en plásmidos; sólo unas pocas están localizadas en el cromosoma (14).

En la actualidad, se han descrito más de 150 BLEEs diferentes. Estas β -lactamasas, presentes en todo el mundo, han sido recuperadas de la mayoría

de las enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* (10). Un gran número de BLEEs contienen serina en su sitio activo, un PM de aproximadamente 29 kDa, pertenecen a la clase A de la clasificación de Ambler y al grupo 2be de Bush *et al* (12,15). Usualmente se definen como β -lactamasas capaces de hidrolizar oximino-cefalosporinas y que, en general, son inhibidas por ácido clavulánico. No resultan activas frente a cefamicinas y la mayoría de las cepas que las expresan son susceptibles a cefoxitina y cefotetan (cefalosporinas de segunda generación) (10).

La mayoría de las BLEEs se originaron por mutaciones en los genes que codifican las clásicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Si bien en general los cambios no superan los cuatro aminoácidos al compararlos con su antecesor, éstos son suficientes para remodelar el sitio activo y ampliar el perfil de sustratos a drogas antes no hidrolizables (11,16-18). Actualmente hay más de 100 β -lactamasas derivadas de TEM y más de 50 de SHV, las cuales son comúnmente recuperadas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (10). TEM-3, originalmente reportada en 1989, fue la primer β -lactamasa derivada de TEM que presentó el fenotipo de BLEE (19). Sin embargo se han descrito también enzimas derivadas de TEM que resultan resistentes a los inhibidores (TRI) y no son capaces de hidrolizar cefalosporinas modernas (20,21). Las enzimas derivadas de SHV, hasta el momento presentan el fenotipo BLEE y son inhibidas por inhibidores clásicos, excepto una única variante de SHV resistente a los inhibidores (SHV-10) (13).

Se han descrito otras β -lactamasas clase A no derivadas de la familia TEM y SHV. Un ejemplo importante es la enzima PER-1 detectada por primera vez en *P. aeruginosa* (aislada en Turquía) y hallándose luego en algunas enterobacterias (1,10). Una enzima similar, PER-2, se ha descrito en Argentina. Ambas son especialmente activas sobre ceftazidima y ceftibuten (22). Otras BLEEs exóticas han aparecido en una única ocasión como por ejemplo las enzimas FEC, FPM y FUR encontradas en Japón (1) u otras que tienen poca relación con las BLEEs descritas, como es el caso de GES-1 (10).

Así también se han reportado muchas enzimas de espectro extendido derivadas de OXA-2 y -10. Las enzimas tipo-OXA constituyen otra familia de BLEEs en crecimiento y pertenecen a la clase

molecular D y al grupo 2d (12,15). Esta familia confiere resistencia a ampicilina y cefalotina, se caracteriza por su elevada actividad hidrolítica de oxacilina y cloxacilina, y son muy poco inhibidas por el ácido clavulánico (10,23).

La secuencia de aminoácidos de las β -lactamasas derivadas de TEM, SHV y OXA, (incluidas las CTX-M, ver más adelante), se encuentran analizadas en la página web: <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>

Recientemente, se han reportado varios casos de enzimas AmpC codificadas en plásmidos, en aislamientos de *E. coli*, *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp. A modo de ejemplos podemos citar a las enzimas ACT-1, BIL-1, CMY-1, -2 y -3, FOX-1, -2, -3, LAT-1, -2, MIR-1, y MOX-1 (1,6). Incluso, este tipo de enzimas se han hallado en cepas de *Salmonella*, género donde hasta el momento no se ha descrito la presencia de AmpC cromosómicas. Es el caso del plásmido pSAL-1 que porta el gen que codifica para la enzima DHA-1 con su regulador *ampR* (β -lactamasa AmpC inducible de *Morganella morganii*) presente en *Salmonella* Enteritidis (6,24).

Cefotaximasas

Una nueva familia de enzimas, las β -lactamasas tipo CTX-M (cefotaximasas), son BLEEs inhibibles por el ácido clavulánico y tazobactam, pertenecientes al grupo 2be de la clasificación de Bush, y a la clase molecular A de Ambler (10,25).

Esta familia de enzimas muestra una eficiente hidrólisis de las oximino-cefalosporinas y dentro de ellas preferentemente sobre cefotaxima (de ahí la designación) y sobre ceftriaxona. Sin embargo, estas enzimas hidrolizan ceftazidima con una baja eficiencia catalítica. Así, los aislamientos clínicos o las cepas de laboratorio productoras de CTX-M presentan altos niveles de resistencia a cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam pero sólo tienen efectos moderados o mínimos sobre la concentración inhibitoria mínima de ceftazidima (10,25).

La primer β -lactamasa CTX-M (CTX-M-1/MEN-1) fue caracterizada en una cepa de *E. coli* aislada en pacientes de Alemania e Italia (26,27). Esta creciente familia de enzimas actualmente comprende más de 30 miembros y todas ellas muestran una identi-

dad entre el 77 al 99% en su secuencia de aminoácidos (10,28).

El estudio filogenético de la familia CTX-M muestra cinco subgrupos principales: el subgrupo CTX-M-1, que incluye CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23 y -28; el subgrupo CTX-M-2, que incluye CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20 y Toho-1; el subgrupo CTX-M-8 (con un único miembro hasta el momento); el que podría llamarse subgrupo CTX-M-9, que incluye CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, -24, -27 y Toho-2; y el denominado subgrupo CTX-M-25 que incluye CTX-M-25 y -26 (2,10,25,29).

Todas estas de enzimas muestran un 40% o menos de identidad con las familias de β -lactamasas TEM o SHV lo cual sugiere que las β -lactamasas tipo CTX-M, no estarían relacionadas con ninguna de esta 2 familias. Recientemente se encontró que hay un alto grado de homología entre las β -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera* spp. y las BLEEs tipo CTX-M. Así, la relación entre la β -lactamasa cromosómica KLUA-1 de *Kluyvera ascorbata* (Nº Acceso: AJ272538, EMBL, database) y CTX-M-2 es del 99% de identidad en su secuencia de aminoácidos (29,30).

Los genes de las β -lactamasas CTX-M están generalmente localizados en plásmidos, aunque una enzima tipo Toho-1 ha sido localizada en el cromosoma. *E. coli* y *S. Typhimurium* son las especies donde más frecuentemente se ha descrito la producción de esta familia de β -lactamasas (25,29).

Las cepas productoras de las enzimas tipo CTX-M son endémicas de Latinoamérica, Japón y algunas áreas de Europa del este (10,25). Además, se han reportado aislamientos de enterobacterias productoras de β -lactamasas tipo CTX-M en otros países como Francia, España, Kenia y Grecia (10,28,31-34).

Breve reseña de las BLEE en Argentina

Si bien los primeros reportes de β -lactamasas con capacidad de hidrolizar a las cefalosporinas de espectro extendido surgieron en Europa a mediados de la década de los '80, su aparición en nuestro país fue recién a fines de esa década.

En 1987 se analizaron los primeros aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE, causantes de sepsis neonatal, asociadas a fracasos terapéuticos. En uno de los casos se describió la

presencia de una enzima de tipo SHV (Rossi *et al*, 1990, II Congreso Internacional de SADEBAC, abstr. B35) mientras que en el otro se detectó la presencia de una enzima de pl 6,6 no identificada (Rossi *et al*, 1990, II Congreso Internacional de SADEBAC, abstr. B34).

En 1989 se describió el primer aislamiento de *Salmonella* Agona resistente a cefotaxima en el Hospital "Sor María Ludovica" de La Plata. Este patrón de resistencia se extendió rápidamente a otros puntos de Buenos Aires y se recuperó en otras serovariedades de *Salmonella* como *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Derby* y *S. Paratyphi* (Picandet *et al*, abstr. A-16, Lopardo *et al*, abstr. A-15, Maiorini *et al*, abstr. A-17, 1990, II Congreso Internacional de SADEBAC, Antimicrobianos '90).

Hasta entonces *Salmonella* presentaba un 14% de resistencia a ampicilina, resultando sensible a cefotaxima, sin embargo para mediados de 1990 se observó un vertiginoso aumento de la resistencia que alcanzó niveles de 37% para ampicilina y 12% para cefotaxima. A su vez seis meses más tarde los valores alcanzaron el 72% y 54% respectivamente. En 5 cepas representativas, identificadas como *S. Typhimurium*, recuperadas en los Hospitales de pediatría "P. Garrahan" y "Sor María Ludovica", se determinó que la resistencia observada era debida a la producción de un β -lactamasa de pl aparente 8,2 que hidrolizaba eficientemente cefotaxima pero no así ceftazidima, la cual no correspondía a ninguna de las enzimas descritas hasta ese momento. Este constituye el primer reporte de cefotaximasas en nuestro país (35). En 1992 se determinó la secuencia del gen estructural de esta nueva BLEE denominada CTX-M-2 (27).

En 1991 se detectó por primera vez en *Proteus mirabilis* en Argentina, una enzima de pl 5,4 con alta eficiencia de hidrólisis tanto sobre ceftazidima como cefotaxima (Rossi *et al*, 1991, ICCAC, Abstr.939), la cual posteriormente correspondió a la nueva enzima denominada PER-2 descrita en *Salmonella* Typhimurium (22).

En 1993 se reportaron 4 aislamientos de *Vibrio cholerae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación, pertenecientes al brote de cólera que tuvo lugar en el noroeste de nuestro país, los cuales presentaban un patrón de resistencia no reportado previamente en esta especie. La enzima responsable

de dicho patrón de resistencia correspondió a CTX-M-2 (36,37).

En 1994 CTX-M-2 fue descrita en *Escherichia coli* (Radice *et al.*, 1994, XVI Congreso Chileno de Microbiología, abstr. p. 31) y desde entonces su presencia ha sido demostrada en diferentes enterobacterias como *M. morgani*, *Shigella sonnei*, *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *Serratia marcescens* (Quinteros *et al.*, 1999, II Int. Congr. β -Lactamasas, abstr. A-27) (37-42), además de otros microorganismos como *Aeromonas* spp. (Quinteros *et al.*, 2000, 9th Int. Congr. Infect. Dis., abstr. 74020). Recientemente se ha identificado en nuestro país una nueva β -lactamasa de la familia CTX-M, la enzima CTX-M-31 (39), la cual presenta una sustitución de aminoácidos respecto a CTX-M-2.

Hacia fines de la década del '80, la Subcomisión de Antimicrobianos (Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica (SADEBAC), Asociación Argentina de Microbiología) propuso puntos de cortes locales para detectar BLEE en enterobacterias, sugiriendo que cualquier enterobacteria con halos de inhibición iguales o menores a 26 mm para el disco de cefotaxima tradicional (30 mg) debía ser considerada como sospechosa de estar produciendo una BLEE, muy relacionado con el criterio de corte adoptado por el "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) en el año 2001 (en las que mayor de 27 mm es considerado sensible).

Prevalencia de BLEE en Argentina

La resistencia a cefalosporinas de tercera generación mediada por BLEE en nuestro país constituye un problema creciente. A diferencia de lo que ocurre en otras regiones del planeta estas enzimas no derivan de las β -lactamasas de espectro ampliado típicas TEM o SHV. Enzimas del tipo de CTX-M o PER han sido implicadas en dicha resistencia en nuestro medio a lo largo de la última década. Desde su primera detección CTX-M-2 ha sido reportada en todas especies de enterobacterias, y en otros bacilos Gram negativos como *Vibrio cholerae* y *Aeromonas hydrophila* (43). PER-2 por su parte ha sido descrita actualmente en *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Proteus mirabilis* (39,44,45).

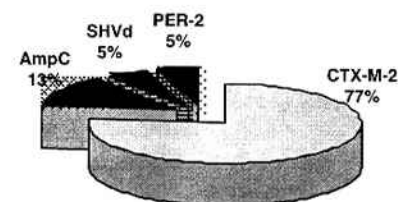
Muchos trabajos han determinado la incidencia de las distintas BLEE en las enterobacterias más frecuentemente aisladas, los resultados reportados por los diferentes grupos de trabajo son coincidentes. En *Escherichia coli* (Galas *et al.*, 1999, ICCAC, abstr. 896, Casellas *et al.*, 2000, 9th Int. Congr. Infect. Dis., abstr. 74021), en *Klebsiella pneumoniae* (Galas *et al.*, 1999, ICCAC, abstr. 1474, Casellas *et al.*, 2000, 9th Int. Congr. Infect. Dis., abstr. 74021), en *Proteus mirabilis* (Radice *et al.*, 2000, 9th Int. Congr. Infect. Dis., abstr. 13022) se ha demostrado un amplio predominio de cefotaximas respecto de otras BLEE, como se puede observar en la Figura 1 (gráficos 1, 2 y 3). A su vez en *Klebsiella pneumoniae* se ha demostrado que hasta un 5 % de las cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación producen simultáneamente más de una BLEE, correspondiendo generalmente a una enzima tipo CTX-M y otra BLEE del tipo SHV derivada o PER-2.

La hiperproducción de AmpC constituye en *Enterobacter cloacae* el principal mecanismo de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, y a diferencia del resto de las enterobacterias, PER-2 resulta prevalente, como se puede observar en la Figura 1 (gráfico 4) (Pasteran *et al.*, 1999, ICCAC, abstr. 1475).

En el año 2000 se realizó un estudio de prevalencia de BLEE del cual participaron los Hospitales e Institutos de Salud de la Ciudad de Buenos Aires. Se realizó el estudio de todas las enterobacterias de origen intrahospitalarios resistentes a cefotaxima (39). La producción de BLEEs constituyó el mecanismo principal de resistencia en enterobacterias, si bien se observó un 5% de hiperproducción de AmpC. Las enzimas CTX-M fueron prevalentes en enterobacterias en nuestros Hospitales, correspondiendo al 67% de las BLEE caracterizadas. Fueron encontradas en todas las especies, siendo las únicas detectadas en *Proteus mirabilis* y *Serratia marcescens*. PER-2 fue detectada en el 18% de los aislamientos y SHV derivadas (SHVd) sólo en *Klebsiella pneumoniae*. La secuenciación de los genes codificantes de CTX-M permitió confirmar la presencia de *bla*_{CTX-M-2} en todos excepto dos aislamientos donde correspondió a una nueva cefotaximasa denominada CTX-M-31, que presenta un 99% de identidad con CTX-M-2.

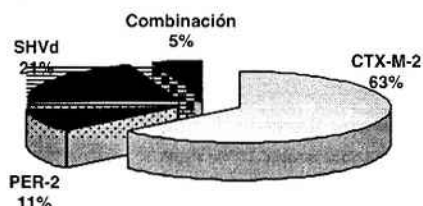
Figura 1: β -lactamasas asociadas a la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en enterobacterias.

Gráfico 1



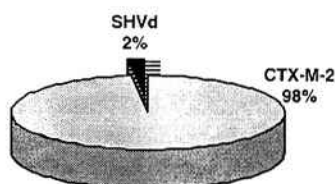
Escherichia coli
Casellas et al, 2000, ICID.

Gráfico 2



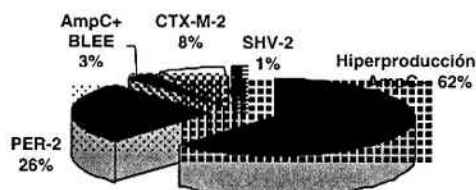
Klebsiella pneumoniae
Casellas et al, 2000, ICID.

Gráfico 3



Proteus mirabilis
Radice et al, 2000, ICID.

Gráfico 4



Enterobacter cloacae
Pasteran et al, 1999, ICCAC.

Los métodos de detección y confirmación de la presencia de BLEE pueden ser ineficientes para detectar todas las enzimas. En el caso particular de las cefotaximasas, la utilización de ensayos en los que se combina el disco conteniendo ceftazidima con el disco que contiene dicho antibiótico y el inhibidor de β -lactamasas resulta inadecuado. A su vez el uso de cefepime/cefepime-ácido clavulánico mejora la detección de BLEE en enterobacterias productoras de enzimas cromosómicas inducibles (39).

En Bolivia, Paraguay, Uruguay, Brasil y Chile la mayoría de las BLEE son cefotaximasas, mientras que en países de Norteamérica son ceftazidimasas, del tipo de TEM o SHV derivadas. En Colombia y Venezuela se han comprobado ambos tipos de

enzimas. Este hecho responde a que la ceftazidima es la cefalosporina de tercera generación de mayor prescripción en pacientes hospitalizados en Canadá, USA, México, Colombia y Venezuela, en cambio ceftriaxona ó cefotaxima son las de mayor prescripción en el Cono Sur Americano (Casellas et al, 2001, IDCCP).

Agradecimientos

Los trabajos realizados en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA fueron financiados con subsidios de UBACyT, SECyT, ANPCyT y Carrillo-Oñativia otorgados a Gabriel Gutkind y de Roemmers otorgado a Marcela Radice.

Bibliografía

1. Livermore, D. M. 1998. β -Lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**:25-41.
2. Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1-14.
3. Petrosino, J., C. Cantu, I., and Palzkill, T. 1998. β -Lactamases: protein evolution in real time. *Trends in Microbiology.* **6**:323-327.
4. Philippon, A., Dusart, J., Joris, B., and Frère, J.-M. 1998. The diversity, structure and regulation of β -lactamases. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**:341-346.
5. Bennet, P. M. and Chopra, I. 1993. Molecular basis of β -lactamase induction in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:153-158.
6. Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillet, O., Lagrange, P., and Philippon, A. 1998. *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible β -lactamase (DHA-1) with an *ampR* gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2352-2358.
7. Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science.* **264**:375-382.
8. Palzkill, T. 1998. β -Lactamases are changing their activity spectrums. In *ASM News.*, p. 90-95.
9. Datta, N. and Kontamichalou, P. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R-factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature.* **208**:239-241.
10. Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:933-951.
11. Kliebe, C., Bies, B. A., Meyer, J. F., Tolxdorff-Neutzling, R. M., and Wiedemann, B. 1985. Evolution of plasmid coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**:302-307.
12. Ambler, R. P., Coulson, A. F. W., Frère, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R. C., Tiraby, G., and Waley, S. G. 1991. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem. J.* **276**:269-272.
13. Heritage, J., M'Zali, F. H., Gascoyne-Binzi, D., and Hawkey, P. M. 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:309-318.
14. Jacoby, G. A. 1994. Genetics of extended-spectrum β -lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:2-11.
15. Bush, K., Jacoby, G. A., and Medeiros, A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1211-1233.
16. Du-Bois, S. K., Marriott, M. S., and Amyes, S. G. 1995. TEM- and SHV- derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**:7-22.
17. Philippon, A., Labia, R., and Jacoby, G. A. 1989. Extended spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1131-1136.
18. Jacoby, G. A. and Medeiros, A. A. 1991. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1697-1704.
19. Jacoby, G. A. 1994. Extrachromosomal resistance in Gram-negative organisms: the evolution of β -lactamase. *Trends in Microbiology.* **2**:357-360.
20. Collatz, E., Labia, R., and Gutmann, L. 1990. Molecular evolution of ubiquitous β -lactamases towards extended-spectrum enzymes active against newer β -lactam antibiotics. *Mol. Microbiol.* **4**:1615-1620.
21. Chaibi, E. B., Sirot, D., Paul, G., and Labia, R. 1999. Inhibitor-resistant TEM β -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:447-458.
22. Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Mangold, P., Amann, S., Akalin, E., Ang, Ö., Bal, C., and Casellas, J. M. 1996. Characterization of β -lactamase gene *bla*_{PER-2} which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:616-620.
23. Naas, T. and Nordmann, P. 1999. OXA-type β -lactamases. *Current Pharmaceutical Design.* **5**:865-879.
24. Verdet, C., Arlet, G., Barnaud, G., Lagrange, P. H., and Philippon, A. 2000. A novel integron in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis, carrying the *bla*_{DHA-1} gene and its regulator gene *ampR* originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:222-225.
25. Tzouveleki, L. S., Tzelepi, E., Tassios, P. T., and Legakis, N. J. 2000. CTX-M-type β -lactamases: an emergin group of extended-spectrum enzymes. *Int. J. Antimicrob. Agents* **14**:137-142.
26. Bauernfeind, A., Casellas, J. M., Goldberg, M., Holley, M., Jungwirth, R., Mangold, P., Röhnisch, T., Schweighart, S., and Wilhelm, R. 1992. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection.* **20**:158-163.
27. Bauernfeind, A., Stemplinger, Y., Jungwirth, R., Ernst, S., and Casellas, J. M. 1996. Sequences of β -lactamase genes

- encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:509-513.
28. Oliver, A., Pérez-Díaz, J. C., Coque, T. M., Baquero, F., and Cantón, R. 2001. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:616-620.
29. Poirel, L., Naas, T., Thomas, I. L., Karim, A., Bingen, E., and Nordmann, P. 2001. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3355-3361.
30. Decousser, J. W., Poirel, L., and Nordmann, P. 2001. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3595-3598.
31. Tzouvelekis, L. S., Gazouli, M., Markogiannakis, A., Paraskaki, E., Legakis, N. J., and Tzelepi, E. 1998. Emergence of resistance to third-generation cephalosporins amongst *Salmonella typhimurium* isolates in Greece: report of the first three cases. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:273-275.
32. Kariuki, S., Corkill, J. E., Revathi, G., Musoke, R., and Hart, C. A. 2001. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2141-2143.
33. Sabaté, M., Tarragó, R., Navarro, F., Miró, E., Vergés, C., Barbé, J., and Prats, G. 2000. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1970-1973.
34. Simarro, E., Navarro, F., Ruiz, J., Miró, E., Gómez, J., and Mirelis, B. 2000. *Salmonella enterica* Serovar Virchow with CTX-M-like β -lactamase in Spain. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4676-4678.
35. Rossi, A., Lopardo, H., Woloj, M., Picandet, A. M., Mariño, M., Galas, M., Radice, M., and Gutkind, G. 1995. Non-typhoid *Salmonella* spp. resistant to cefotaxime. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**:697-702.
36. Petroni, A., Corso, A., Melano, R., Cacace, M., Bru, A., Rossi, A., and Galas, M. 2002. Plasmidic extended spectrum β -lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1462-1468.
37. Rossi, A., M. Galas, A. Corso, M. Radice, M. Rivas, M. Caffer, N. Binztein, and G. Gutkind. 1993. Unusual multiresistant *Vibrio cholerae* O1 var. El Tor in Argentina. *The Lancet* **342**:1172-1173.
38. Radice, M., Gonzalez, C., Power, P., Vidal, M. C., and Gutkind, G. 2001. Third-generation cephalosporin resistance in *Shigella sonnei*, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:442-443.
39. Quinteros, M., Radice, M., Gardella, N., Rodríguez, M. M., Costa, N., Korbenfeld, D., Couto, E., Gutkind, G., and Group, T. M. S. 2003. Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 2864-2869.
40. Power, P., Radice, M., Barberis, C., Mier, C. d., Mollerach, M., Maltagliatti, M., Vay, C., Famiglietti, A., and Gutkind, G. 1999. Cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase in *Morganella morganii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:743-747.
41. Di Conza, J., Ayala, J., Power, P., Mollerach, M., and Gutkind, G. 2002. Novel class 1 integron (InS21) carrying the *bla*_{CTX-M-2} gene in *Salmonella enterica* Serovar Infantis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2257-2261.
42. Arduino, S. M., Roy, P. H., Jacoby, G. A., Orman, B. E., Pineiro, S. A., and Centrón, D. 2002. *bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes *orf513*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2303-2306.
43. Radice, M., Power, P., Di Conza, J., Gutkind, G., Bonnet, R., Siro, D., Siro, J., and Labia, R. 2002. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:602-604.
44. Centrón, D., Orman, B., and Piñeiro, S. 2001. Epidemiología molecular de los genes de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas por la técnica de PCR. *Anales de la fundación Alberto J. Roemmers.* **XIV**:101-116.
45. Melano, R., Corso, A., Petroni, A., Centrón, D., Orman, B., Pereira, A., Moreno, N., and Galas, M. 2003. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:36-42.