

TETRACICLINES

ANNA RIBERA

Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biòmedic, Hospital Clínic, IDIBAPS.

Adreça per a la correspondència: Anna Ribera. Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biòmedic, Hospital Clínic, IDIBAPS. Villarroel, 170. 08036 Barcelona.
Adreça electrònica: ariberallovera@yahoo.es.

RESUM

Les tetraciclins són agents antimicrobians d'ampli espectre que exhibeixen activitat davant una gran varietat de bacteris grampositius i gramnegatius. Aquests antibiòtics actuen inhibint la síntesi proteica unint-se a la subunitat 30S del ribosoma. Els bacteris desenvolupen resistència a aquest tipus d'agents majoritàriament per dos mecanismes: *a)* bombes d'expulsió activa i *b)* protecció del ribosoma. Malgrat això, existeixen altres mecanismes de resistència que fan que aquests antibiòtics siguin incapaços de fer front a moltes infeccions causades per microorganismes multiresistents.

Paraules clau: tetraciclins, resistència, protecció ribosòmica, expulsió activa.

SUMMARY

Tetracyclines are expanded-spectrum antimicrobial agents active against a great variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria. These type of antibiotics act by binding to the 30S ribosomal subunit, resulting in the inhibition of protein synthesis. Bacteria develop resistance to this kind of antibiotics mainly by two different mechanisms: 1) active efflux or 2) ribosomal protection. However, there are other resistance mechanisms that make these antibiotics unable to act against multiple resistant microorganism infections.

Keywords: tetracyclins, resistance, ribosomal protection, active efflux.

BREU HISTÒRIA

Els primers membres d'aquesta família d'antibiòtics van ésser descoberts a finals dels anys quaranta (clorotetraciclina i oxitetraciclina). Aquestes molècules eren productes de *Streptomyces aureofaciens* i *Streptomyces*

rimosus, respectivament. Altres tetraciclins es van identificar posteriorment, tant com a molècules naturals (tetraciclina de *S. aureofaciens*, *S. rimosus* i *Streptomyces viridofaciens* i dimetilclorotetraciclina de *S. aureofaciens*) o com a productes semisintètics, com metaciclina, doxiciclina i minociclina.

clina. Malgrat el prematur èxit de les tetraciclins, es van sintetitzar anàlegs que permetien una millor solubilitat, una administració parenteral i una millor absorció oral. Aquests compostos semisintètics són la rolitetraciclina i la limeciclina. El grup de tetraciclins semisintètics més recent és el grup de les glicilciclins (9-(N,N-dimetilglicilamido)-6-dimetil-6-desoxitetraciclina, 9-(N,N-dimetilglicilamido)-minociclina, i 9-t-(butilglicilamido)-minociclina. Aquests compostos posseeixen un substituent 9-glicilamida. Els antibiòtics de 1a generació serien aquells que van des de 1948 (clorotetraciclina i oxitetraciclina) fins a 1963 (clomociclina) (vegeu la taula 1), els de 2a generació correspondrien a aquells que van de 1967 (doxiciclina) a 1972 (minociclina), i els de 3a generació serien les glicilciclins. Del 9-t-(butilglicilamido)-minociclina, anomenat formalment *tigilcycline* o *GAR-936*, van començar els estudis de fase I l'octubre de 1999, i actualment es troba en els estudis clínics de fase II. Alguns dels compostos més antics s'han retirat ja del mercat, tals com la clomociclina, i altres (rolitetraciclina, limeciclina i clorotetraciclina) no es troben disponibles en tots els països (Chopra i Roberts, 2001).

ESTRUCTURA

Les molècules de tetraciclina estan formades per un nucli tetracíclic (quatre anells benzènics), on s'uneixen diferents grups funcionals que donen lloc a les diferents molècules de tetraciclins. La tetraciclina més simple per a detectar la mínima activitat antibacteriana és la 6-desoxi-6-demetiltetraciclina (vegeu la figura 1); així doncs, aquesta estructura ha d'ésser considerada com el mínim farmacòfor (Chopra i Roberts, 2001).

Una de les característiques importants per a no perdre l'activitat antibacteriana entre les tetraciclins és la de mantenir la linealitat del nucli, que està relacionada amb la configura-

ció estereoquímica natural de les posicions 4a, 12a (en la junta de l'anell A-B) i del grup dimetilamina de la posició 4; també és important la conservació del sistema cetoenol (de les posicions 11, 12 i 12a) propera a l'anell fenòlic D (vegeu la figura 2). Les tetraciclins són agents quelants forts i, per tant, les seves propietats antimicrobianes i farmacocinètiques es veuen influenciades per la quelació dels ions metall. Els llocs de quelació estan situats en els grups de l'anell A i inclouen: el sistema β -dicetònic (posicions 11 i 12), l'enol (posicions 1 i 3) i la carboxamida (posició 2) (vegeu la figura 2). Les noves glicilciclins també formen complexos quelants amb cations divalents. La substitució de la carboxamida en posició 2 per altres grups generalment comporta una disminució de l'activitat antibacteriana, probablement perquè disminueix l'acumulació d'aquests anàlegs a l'interior bacterià. En canvi, l'addició de substituents en el nitrogen de l'amida comporta un augment de la solubilitat en aigua, com són el cas de la rolitetraciclina i la limeciclina. Les substitucions a les posicions 1, 3, 4a, 10, 11 o 12 invariablement produiran una disminució de l'activitat antimicrobiana. No obstant això, substitucions en diferents posicions dels anells B, C i D són tolerades, i les molècules que presenten aquestes substitucions han permès la introducció de les tetraciclins en la pràctica clínica, tal com les noves glicilciclins que es troben en procés d'assaig clínic actualment.

Altres estudis han demostrat que en les molècules, per a mantenir l'activitat, el nucli tetracíclic ha d'ésser de sis membres i purament carbocíclic, amb una única excepció, les 6-tiatetraciclins, que posseeixen un àtom de sulfur a la posició 6 de l'anell C, en lloc d'un àtom de carboni, i mantenen propietats antimicrobianes molt elevades. S'ha trobat, però, que aquestes tetraciclins, juntament amb les anhidrotetraciclins, les 4-epi-anhidrotetraciclins i les xelocardines formen un grup de tetraciclins que actuen de manera diferent de la majoria de tetraciclins. Suposadament,

TAULA 1. Principals membres de la família de les tetraciclines

Nom químic	Nom genèric	Nom comercial	A. D. ^a
7-clorotetraciclina	Clorotetraciclina	Aureomicina	1948
5-hidroxitetraciclina	Oxitetraciclina	Terramicina	1948
Tetraciclina	Tetraciclina	Acromicina	1953
6-demetil-7-clorotetraciclina	Demetilclorotetraciclina	Declomicina	1957
2-N-pirrolidinometiltetraciclina	Rolitetraciclina	Reverin	1958
2-N-lisinometiltetraciclina	Limeciclina	Tetralisal	1961
N-metilol-7-clorotetraciclina	Clomociclina	Megaclor	1963
6-metilè-5-hidroxitetraciclina	Metaciclina	Rondomicina	1965
6-desoxi-5-hidroxitetraciclina	Doxiciclina	Vibramicina	1967
7-dimetilamino-6-demetil-6-Desoxitetraciclina	Minociclina	Minocina	1972
9-(t-butilglicilamido)-Minociclina	Terciari-butilglicilamidominociclina	Tigilciclina (En fase II)	1993

^a Any del descobriment:

— De 1948 a 1963: tetraciclins 1a generació.

— De 1965 a 1972: tetraciclins 2a generació.

— Glicilciclins: tetraciclins 3a generació.

pertorbarien la membrana citoplasmàtica dels microorganismes i provocarien una resposta bactericida, i actuarien així d'una manera totalment diferent de les tetraciclins típiques. Aquestes interaccionarien directament amb el ribosoma amb la inhibició de la síntesi proteica i la producció d'un efecte bacteriostàtic reversible (Chopra i Roberts, 2001). Aquestes tetraciclins atípiques no s'utilitzen en la pràctica clínica a causa dels seus efectes secundaris, ja que actuen tant davant cèl·lules procariotes com eucariotes.

Per tal de restablir el potencial de les tetraciclins com a agents antibacterians d'ampli espectre, ja que la resistència a les tetraciclins de primera i segona generació havia augmentat en excés, a començaments dels anys noranta es va realitzar una dura recerca per a descobrir nous anàlegs. Aquesta investigació va tenir com a resultat el descobriment de les glicilciclins (9-gliciniltetraciclins). Durant els anys noranta, un grup americà va veure que els derivats de minociclina i 9-acilamida mostaven l'activitat antibacteriana de les tetraciclins clàssiques, però no actuaven davant microorganismes resistents. Quan el grup acil

va ésser modificat per la N,N-dialquilamina (6-demetil-6-desoxitetraciclina) i derivats de la minociclina com el GAR-936, no solament es va mantenir l'activitat antibacteriana clàssica, sinó que també actuaven davant bacteris que contenen gens de resistència (gens *tet*) responsables tant de codificar bombes d'expulsió activa (de Tet (A) a Tet (D) i Tet (K)), com protecció del ribosoma (Tet (M)). Cal dir que s'haurien de sintetitzar noves molècules capaces de complementar les anteriors allà on no són actives, tenint en compte que haurien d'incorporar a la posició 9 un N-alquil glicilamida. La figura 2 presenta un resum de les característiques que ha de contenir la molècula de tetraciclina per a posseir una activitat antibacteriana òptima.

CLASSIFICACIÓ

Les dades referents a la classificació de les tetraciclins es troben resumides a la taula 1.

APLICACIONS CLÍNiques

Les tetraciclines són agents d'ampli espectre que exhibeixen activitat davant una gran varietat de bacteris grampositius i gramnegatius, bacteris atípics com *Chlamydia*, *Mycoplasma* i *Rickettsia*, i protozous paràsits. Les seves propietats antimicrobianes favorables i l'absència d'efectes secundaris importants n'han permès l'ús extens en la teràpia d'infeccions en humans i en animals. S'administren normalment per via oral, encara que algunes estan disponibles per via parenteral. Exceptuant les tetraciclines de 3a generació, que es troben actualment en assaigs clínics de fase II, les altres tetraciclines es van introduir fa trenta anys. Durant tot aquest temps han anat apareixent resistències i altres agents antimicrobians amb millor activitat antimicrobiana i amb una millor tolerància. Com a conseqüència d'aquest escenari, l'ús de les tetraciclines ha disminuït significativament en molts països, fins al punt de no ésser considerats com a antibiòtics de primera opció en determinades situacions (Chopra i Roberts, 2001). També, els han donat altres aplicacions, com, per exemple, com a part d'una teràpia triple per al tractament de gastritis o d'úlcera pèptica associada a *Helicobacter pylori*. Les tetraciclines també són actives davant la malària, i estan esdevenint importants com a profilaxi, a causa del ràpid augment de resistència a la mefloquina per part de *Plasmodium falciparum*.

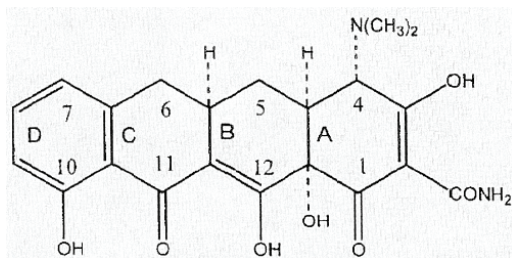


FIGURA 1. Estructura de la 6-desoxi-6-demetil-tetraciclina, el mínim farmacòfor de la tetraciclina.

Com a primera opció les tetraciclines s'utilitzen per a tractar una pneumònia atípica, produïda per *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* i *Chlamydia psittaci*, per còlera, com a profilaxi per a la diarrea del viatger, per a tractar la uretritis no gonocòccica, per a tractar cervicitis, limfogranuloma veneri, malaltia inflammatòria pèlvica, granuloma inguinal, per a la febre de les Muntanyes Rocalloses, per al tifus endèmic i epidèmic, per a la febre Q, per a tractar brucel·losis (en combinació amb rifampicina o estreptomycinina), malaltia de Lyme, infeccions periodontals (teràpia tòpica amb tetraciclina o minociclina) i per a tractar acne (tractament tòpic i sistèmic). També s'utilitzen com a alternativa a altres agents antimicrobians.

Com a resum podem dir que les tetraciclines en humans primordialment s'utilitzen com a profilaxi i tractament d'infeccions en la comunitat, i presenten un paper molt minoritari com a agent terapèutic hospitalari (Janknegt *et al.*, 2000). Cal esmentar, però, que la utilització d'aquests agents antimicrobians en la comunitat ha anat disminuint al llarg dels anys (es veu reflectit en la disminució de les prescripcions de les tetraciclines). Els països on s'ha vist més la reducció de prescripcions són Espanya, els EUA i el Regne Unit (Chopra i Roberts, 2001).

També s'utilitzen en veterinària. Les tetraciclines s'afegeixen directament als aliments o a l'aigua o poden ésser administrades amb aerosols. S'administren tant en animals de granja com per al tractament d'infeccions d'animals domèstics. En aquest camp no solament s'han utilitzat per al tractament d'infeccions, sinó que també, a dosis subterapèutiques, com a promotors del creixement. El 1969, però, Swann (1969) va publicar al Regne Unit que dosis subterapèutiques de tetraciclines en animals podrien contribuir al desenvolupament de resistències en soques d'humans. Arran d'això es va prohibir la seva utilització com a promotors de creixement a Europa, a començaments dels anys setanta. Malgrat això,

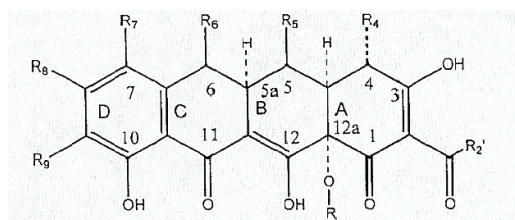


FIGURA 2. Estereoquímica i substituents requerits per a una òptima activitat antimicrobiana en la sèrie de les tetraciclins. Anells (A-B-C-D) = lineals i fusionats. Anells (D-C-B) C-10, C-11, C-12 = sistema cetoenol fendílic. Anell (A) C-1, C-2, C-3 = sistema cetoenol del tipus tricarbnil. $R_2' = NH_2$ o NHR , on R és un aminoalquil. $R_4 = (\alpha)$ dimetilamino grup superior. C-4a = (α) -protó. $R_5 = (H)$ (tetraciclins) o OH (oxitetraciclins). C-5a = (α) -protó. $R_6 =$ combinació de (β) -OH o (α) - CH_3 , sense substitució, o amb un grup metilè. $R_7 = H$ (tetraciclins), Cl (clorotetraciclins) o dialquilamino (tipus minociclina), o NO_2 . $R_8 = H$. $R_9 =$ glicilamido. $R_{12a} = H$.

estudis realitzats a mitjan dècada dels noranta demostren que les tetraciclins encara s'utilitzaven amb aquesta finalitat en molts altres països (EUA, Canadà, Austràlia, Nova Zelanda) (Grave *et al.*, 1999; JETACAR, 1999).

Altres aplicacions serien en cultius d'aigua, per a controlar infeccions en salmons i llagostes. També en agricultura s'utilitzen en esprais per a tractar infeccions per *Erwinia amylovora*, en arbres fruiters i altres plantes; també en palmeres per a tractar les infeccions per *Mycoplasma (lethal yellow)*, per a controlar la infecció per *Xanthomonas campestris* en llavors (*black rot*). També s'han utilitzat com a tractament d'insectes (Chopra i Roberts, 2001).

MECANISMES D'ACCIÓ

Les tetraciclins inhibeixen la síntesi proteica dels bacteris i eviten l'associació de l'aminoacil-tRNA amb el ribosoma bacterià. Per tant, per interaccionar amb les seves dianes, les tetraciclins han de travessar una o dues membranes (depenent si el bacteri és grampositiu o gramnegatiu). Aquests agents antimicrobians travessen la membrana externa dels bacteris gramnegatius a través dels canals

de les porines OmpF i OmpC, com a complexos de cations (probablement de magnesi). El complex de metall catiónic-antibiòtic és atret pel potencial de la membrana externa i fa que s'acumuli al periplasma, on es produeix la dissociació del complex i s'allibera la tetraciclina sense càrrega; actua com una molècula poc lipofílica però capaç de difondre's a través de les regions lipídiques de la membrana interna (citoplasmàtica). De la mateixa manera, la forma lipofílica electroneutral se suposa que és la forma que travessa la membrana citoplasmàtica dels bacteris grampositius. La captació de les tetraciclins a través de la membrana citoplasmàtica és un procés dependent d'energia. A l'interior citoplasmàtic és probable que les tetraciclins siguin quelades, ja que el pH intern i la concentració de metalls divalents és superior que a l'exterior celular. De fet, és probable que la forma activa del fàrmac que s'uneix al ribosoma sigui un complex de tetraciclina i magnesi. L'associació de les tetraciclins amb el ribosoma és totalment reversible, i això explica l'efecte bacteriostàtic d'aquest antibiòtic. Diversos estudis indiquen que existeix una única unió i amb una elevada afinitat de la tetraciclina amb la subunitat ribosòmica 30S, amb indicacions que la proteïna S7 i les bases G693, A892, U1052, C1054, G1300 i G1338 de l'rRNA 16S contribueixen al punt d'unió. També, altres autors declaren que aquests llocs d'interacció aparents no reflecteixen necessàriament els punts d'unió reals (Chopra i Roberts, 2001). De fet, la primera interpretació és complicada, atès que la unió de la tetraciclina (que mesura aproximadament de 8 a 12 Å) al ribosoma sembla que provoqueix una gran quantitat de canvis estructurals a l'rRNA 16S. No obstant això, mutants naturals de *Propionibacterium* resistent a les tetraciclins contenen un canvi de citosina a guanina a la posició 1058 de l'rRNA 16S, fet que suggerria que les bases U1052 i C1054 podrien tenir una funció significativa en el procés d'unió de la tetraciclina a la subunitat 30S del ribosoma (Chopra i Roberts, 2001).

TAULA 2. Mecanismes de resistència (gens *tet* i *otr*) agrupats segons McMurry i Levy^a

Bombes d'expulsió	Protecció de ribosoma	Desactivació enzimàtica	Altres
<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> (G), <i>tet</i> (H), <i>tet</i> (I), ^b <i>tet</i> (J), <i>tet</i> (Z), <i>tet</i> (30), <i>tet</i> (31), <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L) <i>otr</i> (B), <i>tcr3</i> ^d <i>tetA</i> (P) <i>tet</i> (V) <i>tet</i> (Y) ^c	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (S), <i>tet</i> (W) <i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (T) <i>otr</i> (A), <i>tetB</i> (P), <i>tet</i> ^d	<i>tet</i> (X)	<i>tet</i> (U) ^e <i>otr</i> (C) ^e

^a Agrupació segons McMurry i Levy (2000).

^b *tet*(I) no ha estat seqüenciat, però s'associa amb una proteïna d'expulsió activa.

^c La relació entre el grup 1 i 6 (punt següent) no és totalment clara, ja que el gen no ha estat gaire estudiat.

^d Aquests gens encara no han estat designats (Levy *et al.*, 1999).

^e *tet*(U) ha estat seqüenciat, però sembla no estar relacionat ni amb bombes d'expulsió ni amb protecció del ribosoma. *otr*(C) no ha estat encara seqüenciat (Chopra i Roberts, 2001).

Una absència d'activitat contra les cèl·lules eucariotes a causa d'una dèbil inhibició de la síntesi proteica que té lloc a les subunitats ribosòmiques 80S i d'una pobra acumulació d'aquest antibiòtic en les cèl·lules de mamífers explicaria les propietats antimicrobianes selectives de les tetraciclins. No obstant això, aquests agents antimicrobians tenen l'habilitat d'inhibir la síntesi proteica al mitocondri, a causa de la presència de subunitats 70S del ribosoma en aquests orgànuls (per això, s'ha relacionat la presència de mitocondris en *P. falciparum* amb l'activitat antiparasitària de les tetraciclins) (Chopra i Roberts, 2001).

MECANISMES DE RESISTÈNCIA

A mitjan dècada dels cinquanta, la majoria dels bacteris tant comensals com patògens eren sensibles a les tetraciclins. Així, l'augment de resistència ha estat relativament recent, i ha anat associat amb la introducció d'aquests antibiòtics en clínica, en veterinària i en agricultura. L'increment de resistències ha desencadenat la necessitat d'establir els mecanismes a través dels quals els diferents microorganismes es transfereixen els determinants

genètics responsables de resistència per via horitzontal. La causa principal de resistència a les tetraciclins és deguda a l'adquisició, per part dels bacteris, dels gens *tet* (vegeu la taula 2). Fins avui, han estat caracteritzats vint-i-nou gens de resistència a tetraciclina (*tet*) i tres gens de resistència a oxitetraciclina (*otr*). Divuit dels gens *tet* i un dels gens *otr* codifiquen bombes d'expulsió activa, i set dels gens *tet* i *otr*(A) codifiquen proteïnes de protecció del ribosoma. Així, els principals mecanismes de resistència són:

a) Bombes d'expulsió activa específiques per a tetraciclins.

b) Protecció de ribosoma.

A part d'aquests més importants també tenim:

c) Desactivació enzimàtica.

d) Altres gens *tet*.

e) Disminució de l'acumulació de les tetraciclins a l'interior bacterià.

1. Alteracions en la permeabilitat de la membrana externa.

2. Sistemes d'expulsió activa no específics per a tetraciclins.

f) Alteracions en la diana de les tetraciclins.

No existeixen diferències importants entre

els gens de resistència *tet* i *otr*; el fet que s'anomenin de manera diferent és perquè els gens d'oxatetraciclina van ésser primerament identificats en organismes productors d'oxitetraciclines.

Així doncs, els gens *tet* es troben en una gran varietat de bacteris aïllats en humans, en animals i en el medi ambient, i la majoria d'aquests gens estan associats amb plasmidis mòbils, transposons, transposons conjugatius, i integrons. Aquests elements mòbils han permès que els gens de resistència a tetraciclina hagin passat d'espècie a espècie i de gènere a gènere mitjançant conjugació (Chopra i Roberts, 2001).

BOMBES D'EXPULSIÓ ACTIVA ESPECÍFIQUES PER A TETRACICLINES

Aquestes proteïnes són les més ben estudiades. Els gens que codifiquen aquestes bombes pertanyen a la superfamília de facilitació major (MFS), que inclou més de tres-centes proteïnes. Tots els gens *tet* relacionats amb bombes d'expulsió codifiquen proteïnes aproximadament d'uns 46 kDa associades a membrana, les quals exporten la tetraciclina de l'interior celular. L'exportació redueix la concentració de droga del citoplasma.

Les proteïnes de bombes d'expulsió intercanvien un protó per un complex de tetraciclina-catí en contra d'un gradient de concentració, i posseeixen estructures i aminoàcids similars a altres bombes d'expulsió activa involucrades en la resistència a múltiples antibiòtics, en la resistència a l'amoni quaternari, al cloramfenicol i a les quinolones. La majoria de proteïnes confereixen resistència a la tetraciclina i doxiciclina però no a la minociclina ni a les glicilciclines, exceptuant Tet (B) que confereix resistència a la tetraciclina, doxiciclina i minociclina, però no a les glicilciclines. Cal tenir en compte que mutacions en *tet(A)* i *tet(B)* produïdes en el laboratori aportarien resistència a aquestes tetraciclines de 3a ge-

neració, cosa que suggeriria que un augment en terapèutica de les glicilciclines comportaria a la llarga un augment de resistències envers aquest grup.

Aquestes proteïnes s'han dividit en sis grups segons la identitat de la seqüència d'aminoàcids (vegeu la taula 2):

— Grup 1: Tet (A), Tet (B), Tet (C), Tet (D), Tet (E), Tet (G), Tet (H), Tet (Z) i probablement Tet (I), Tet (J) i Tet (30). D'aquest grup, l'únic que s'ha trobat en grampositius ha estat Tet (Z); els altres només s'han descrit en gramnegatius.

— Grup 2: inclou Tet (K) i Tet (L). Aquestes proteïnes s'han trobat majoritàriament en grampositius.

— Grup 3: inclou Otr (B) i Tcr3, ambdues trobades en *Streptomyces* sp. Similars topològicament al grup 2.

— Grup 4: inclou TetA (P) de *Clostridium* sp. El gen *tet(P)* és bastant inusual, perquè consisteix en un gen que codifica una bomba d'expulsió funcional *tetA(P)*, unit a un gen que codifica una proteïna de protecció de ribosoma, *tetB(P)*. *tetA(P)* ha estat trobat sol, però *tetB(P)* sempre s'ha trobat unit al gen *tetA(P)*.

— Grup 5: inclou Tet (V) de *Mycobacterium smegmatis*.

— Grup 6: inclouen determinants encara sense cap nom concret, de *Corynebacterium striatum* (no presents a la taula 2) i inclou una proteïna que es creu que utilitza ATP en lloc d'un gradient de protons com a font d'energia.

Cal dir que la regulació de l'expressió dels gens de resistència *tet* és lleugerament diferent en bacteris gramnegatius i grampositius. Els determinants d'expulsió activa en gramnegatius estan formats per dos gens, orientats divergentment i amb els operadors i promotors sobreposats. Un gen codifica un repressor i l'altre codifica la bomba d'expulsió pròpiament dita, i ambdós gens són regulats per la presència de tetraciclina. En absència de tetraciclina, la proteïna repressora actua com un homodímer que uneix les seves dues subunitats α -hèlix als dos operadors de *tet*, i blo-

TAULA 3. Distribució dels gens de resistència *tet* relacionats amb bombes d'expulsió activa en bacteris gramnegatius

Un gen		Dos o més gens	
Gènere	Gen	Gènere	Gen
<i>Actinobacillus</i>	<i>tet</i> (B)	<i>Edwardsiella</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (D)
<i>Erwinia</i>	<i>tet</i> (B)	<i>Acinetobacter</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B)
<i>Moraxella</i>	<i>tet</i> (B)	<i>Providencia</i>	<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> (I)
<i>Pantoea</i>	<i>tet</i> (B)	<i>Plesiomonas</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (D)
<i>Treponema</i> ^a	<i>tet</i> (B)	<i>Enterobacter</i>	<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D)
<i>Yersinia</i>	<i>tet</i> (D)	<i>Mannheimia</i>	<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (G), <i>tet</i> (H)
<i>Alcaligenes</i>	<i>tet</i> (E)	<i>Proteus</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (J)
<i>Eubacterium</i> ^b	<i>tet</i> (K)	<i>Pseudomonas</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> (G)
<i>Agrobacterium</i>	<i>tet</i> (30) ^c	<i>Serratia</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (E)
		<i>Citrobacter</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D)
		<i>Klebsiella</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D)
		<i>Shigella</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D)
		<i>Salmonella</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (G)
		<i>Aeromonas</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> (31) ^c
		<i>Vibrio</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> (G)
		<i>Escherichia</i>	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B), <i>tet</i> (C), <i>tet</i> (D), <i>tet</i> (E), <i>tet</i> (I), <i>tet</i> (Y)

^a *Treponema denticola* és una espècie anaeròbia, però no totes les espècies d'aquest gènere són anaeròbies.

^b Espècies anaeròbies.

^c És el començament de la designació amb nombres dels gens *tet*.

queja així la transcripció dels gens estructurals tant de la proteïna repressora com de la responsable de l'expulsió. A més, quan apareix el complex tetraciclina-Mg²⁺ i s'uneix a la proteïna repressora, canvia la seva conformació, evita així la unió amb la regió de DNA dels operadors i indueix el sistema d'expulsió. Aquest sistema és un dels sistemes descrits de regulació transcriptor induïbles més sensible, ja que només calen concentracions nanomolars de tetraciclina perquè s'indueixi la transcripció dels gens estructurals i del repressor (Chopra i Roberts, 2001). Aquest tipus de regulació succeeix en la majoria de gens d'expulsió descrits en gramnegatius: *tet*(A), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G), *tet*(H) i probablement també *tet*(I), exceptuant el gen *tet*(B), ja que la proteïna repressora se sintetitza abans de l'expressió de la bomba d'expulsió (vegeu la taula 3).

En el cas dels grampositius, no s'ha trobat cap proteïna repressora, ni en *tet*(K), ni en *tet*(L), però sí en *tet*(Z) (vegeu la taula 4).

La majoria dels gens *tet* presents en bacteris gramnegatius que codifiquen bombes d'expulsió activa es troben localitzats en plasmidis i es poden transferir mitjançant conjugació. Normalment els gens estan inserits en transposons que es transporten en diferents grups de plasmidis que procedeixen de diversos grups d'incompatibilitat (Chopra i Roberts, 2001, Ribera *et al.*, 2003a). Aquests plasmidis sovint transporten altres gens de resistència a antibiòtics, gens de resistència a metalls pesants i factors de patogenicitat com toxines. Així, la selecció d'algun d'aquests factors selecciona el plasmidi i, per tant, comporta una selecció creuada que ha contribuït a l'increment espectacular en el nombre de bacteris multiresistents en els darrers quaranta anys (Chopra i Roberts, 2001). A més, els gens responsables d'expulsió activa de tetraciclins en bacteris grampositius estan associats amb plasmidis petits.

S'ha especulat sobre la possibilitat que gens com *tet*(E), que presenten limitacions en el

TAULA 4. Distribució dels gens de resistència tet relacionats amb bombes d'expulsió activa en bacteris grampositius

Un gen	Gen	Dos o més gens	Gen
Gènere		Gènere	
<i>Nocardia</i>	<i>tet(K)</i>	<i>Bacillus</i>	<i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i>
<i>Actinomyces</i> ^a	<i>tet(L)</i>	<i>Listeria</i>	<i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>tet(Z)</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i>
		<i>Clostridium</i> ^a	<i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i>
		<i>Peptostreptococcus</i> ^a	<i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i>
		<i>Enterococcus</i>	<i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i>
		<i>Streptococcus</i>	<i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i>
		<i>Mycobacterium</i>	<i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(V)</i>
		<i>Streptomyces</i> ^b	<i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>otr(B)</i> , <i>tcr3</i>

^a Espècies anaeròbies.^b Microorganisme multicel·lular.

nombre d'espècies que actuarien com a hostes seus, estiguin localitzats en plasmidis immòbils, fet que reduiria les oportunitats de transferència a altres gèneres i espècies (Chopra i Roberts, 2001).

PROTECCIÓ DEL RIBOSOMA

Aquest mecanisme de resistència a tetraciclins és degut a la presència en els bacteris de gens *tet* que codifiquen la síntesi d'unes proteïnes citoplasmàtiques que presenten la funció de protegir el ribosoma davant l'acció d'aquests agents antimicrobians. A diferència de les bombes d'expulsió, aquestes proteïnes confereixen resistència a tetraciclina, minociclina i doxiciclina; per tant, confereixen un major espectre de resistències que les bombes d'expulsió específiques per a tetraciclins.

Són proteïnes que presenten certa homologia amb els factors d'elongació EF-Tu i EF-G, i tenen la màxima homologia amb l'àrea N-terminal, la qual conté el domini d'unió del GTP. En aquest grup, nou proteïnes han estat determinades: Tet (M), Tet (O), TetB (P), Tet (Q), Tet (S), Tet (T), Tet (W), Otr (A) i una altra present a la taula 2, a la qual encara no s'ha assignat cap nom específic. Entre aquestes, les més ben caracteritzades han estat Tet (M) i Tet

(O) (Chopra i Roberts, 2001). Aquestes dues proteïnes presenten una activitat en el ribosoma que és dependent de GTPasa. L'acció de Tet (M) no és afectada per la presència de tetraciclina, però s'inhibeix amb tiostrepton, el qual també inhibeix la unió de la proteïna EF-G. Aquesta, juntament amb el Tet (M), competeix per la unió als ribosomes, encara que és Tet (M) el que presenta una major afinitat. Segons Burdett (1996) Tet (M) permet la unió de l'aminoacil-tRNA al ribosoma en presència de concentracions de tetraciclina que normalment inhibirien aquesta unió. En presència tant de Tet (M) com de Tet (O), la unió de la tetraciclina al ribosoma es veu reduïda quan GTP i no GDP és present. Burdett va afirmar que l'energia alliberada de la hidròlisi del GTP permetia l'alliberament de la tetraciclina del ribosoma. També, Trieber *et al.* (1998) van trobar que la hidròlisi del GTP permetia la dissociació del Tet (O) dels ribosomes. Cal dir, però, que aquestes diferències entre ambdues proteïnes no estan del tot demostrades. Encara que només s'hagi aprofundit en aquestes dues proteïnes, s'ha assumit que les altres proteïnes relacionades amb la protecció del ribosoma actuen de manera similar (presentarien també activitat GTPasa), atesa la similitud que presenten a la seqüència d'aminoàcids.

TAULA 5. Distribució dels gens de resistència *tet* relacionats amb la protecció del ribosoma en bacteris gramnegatius

Un gen		Dos o més gens	
Gènere	Gen	Gènere	Gen
<i>Acinetobacter</i>	<i>tet</i> (M) ^b	<i>Butyrivibrio</i> ^a	<i>tet</i> (O), <i>tet</i> (W)
<i>Eikenella</i>	<i>tet</i> (M)	<i>Mitsuokella</i> ^a	<i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (W)
<i>Kingella</i>	<i>tet</i> (M)	<i>Selenomonas</i> ^a	<i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (W)
<i>Neisseria</i>	<i>tet</i> (M)	<i>Porphyromonas</i> ^a	<i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (W)
<i>Haemophilus</i>	<i>tet</i> (M)	<i>Bacteroides</i> ^a	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (Q)
<i>Pasteurella</i>	<i>tet</i> (M)	<i>Fusobacterium</i> ^a	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (W)
<i>Prevotella</i> ^a	<i>tet</i> (Q)	<i>Veillonella</i> ^a	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (Q)
<i>Campylobacter</i>	<i>tet</i> (O)		
<i>Capnocytophaga</i>	<i>tet</i> (Q)		

^a Espècies anaeròbies.^b Ribera *et al.*, 2003b.

El mecanisme d'acció d'aquestes proteïnes seria el següent: primer s'unirien al ribosoma, i causarien una alteració de la seva conformació (aquest canvi en la conformació del ribosoma es produiria amb l'energia alliberada de la hidròlisi del GTP), i s'evitaria així la unió de la tetraciclina però sense alterar ni parar la síntesi proteica; posteriorment la proteïna protectora s'ha d'alliberar del ribosoma per tal de permetre la unió d'EF-G, ja que els seus llocs d'unió al ribosoma estan sobreposats.

L'expressió de Tet (M), de Tet (O) i de Tet (S), aparentment, sembla que estigui regulada. S'ha descrit, tant en *Streptococcus* com en *S. aureus*, que una preexposició a concentracions subinhibitòries de tetraciclina en soques que presentarien *tet*(M) donaria com a resultat tant un increment de la resistència a aquest antibiòtic com un augment en el nivell de transcripcions de mRNA de *tet*(M) (Chopra i Roberts, 2001). No obstant això, hi ha moltes controvèrsies i aquesta inducibilitat no està del tot confirmada.

Les proteïnes de protecció de ribosoma es divideixen en tres grups, igual que les proteïnes d'expulsió activa, segons la identitat de la seqüència d'aminoàcids (vegeu la taula 2):

Grup 1: inclou Tet (M), Tet (O), Tet (S) i Tet (W).

Grup 2: inclou Otr (A) i TetB (P).

Grup 3: Tet (Q) i Tet (T).

S'han descrit també quatre gens en estreptococs relacionats amb la protecció del ribosoma, però cap hibrida amb els gens ja descrits; per tant, la seva relació amb els gens *tet* ja descrits és del tot desconeguda (Clermont *et al.*, 1997).

Existeix una hipòtesi que diu que els gens *tet*(M) procedeixen de bacteris grampositius. Altres gens inclosos dins el grup de gens *tet* pertanyents als grampositius serien *tet*(O) i *tet*(S), entre d'altres, ja que gens *tet* responsables de bombes d'expulsió de tetraciclins, com *tet*(K) i *tet*(L), també hi estan considerats. Aquests gens, però, cada vegada es troben més en espècies gramnegatives, sobretot *tet*(M), *tet*(O), *tet*(K) i *tet*(L) (Ribera *et al.*, 2003b). A més, el gen *tet*(Q) va ésser primer trobat en gramnegatius, concretament en *Bacteroides*, s'ha trobat també en grampositius i està normalment associat amb transposons conjugatius que codifiquen la seva pròpia transferència, i també *tet*(M) (família del transposó Tn916). Aquests transposons es poden integrar en plasmidis i també al cromosoma bacterià i presenten al seu interior, a més de la resistència a tetraciclins, altres gens de resistència, com per exemple a eritromicina, kanamicina i cloramfenicol. Altres gens com

tet(O) i *tet*(S) es troben en plasmidis conjugatius o al cromosoma, immòbils.

A les taules 5 i 6 es troben els gens *tet* relacionats amb la protecció del ribosoma que s'han descrit en bacteris gramnegatius i grampositius, respectivament.

S'han descrit mutacions als gens *miaA* i *rpsL* que interfereixen en la funció de les proteïnes encarregades de la protecció del ribosoma, de manera que redueixen la resistència a tetraciclina (Trieber *et al.*, 1998). Així, les mutacions en *miaA* en presència de Tet (M) redueixen el nivell de resistència a tetraciclina en *E. coli*. No s'ha trobat que modifiqui la resistència en presència de Tet (O). En canvi, mutacions en *rpsL*, que codifica la proteïna ribosòmica S12, disminueixen la resistència a tetraciclina tant en presència de Tet (M) com de Tet (O) (McMurry i Levy, 2000).

DESACTIVACIÓ ENZIMÀTICA

El gen *tet*(X) és l'únic exemple de resistència a tetraciclina a causa d'una alteració enzimàtica de l'antibiòtic. Aquest gen s'ha trobat en dos transposons molt relacionats de *Bacteroides*, i va ésser trobat perquè està lligat al gen *erm*(F), que codifica un gen de metilació de l'rRNA. Aquest gen *tet* produeix una proteïna citoplasmàtica, d'aproximadament uns 44 kDa, que modifica químicament les tetraciclins en presència d'O₂ i NADPH; per tant, no és actiu d'una manera natural en *Bacteroides* (anaerobi), ja que necessita l'O₂ per a actuar. No obstant això, aquest gen *tet* no té gaire importància clínica, ja que no s'ha trobat en altres bacteris i, per tant, la seva activitat només s'ha demostrat *in vitro* (Chopra i Roberts, 2001).

ALTRES GENS *tet*, MECANISMES DE RESISTÈNCIA DESCONEGUTS

El gen *tet*(U) que confereix baixa resistèn-

cia a tetraciclins codifica una proteïna d'aproximadament uns 11,8 kDa que conté cent cinc aminoàcids; per tant, és molt més petita que les proteïnes d'expulsió (45 kDa) i que les relacionades amb la protecció del ribosoma (72 kDa). Existeix un 21 % de similitud entre els aminoàcids propers a l'extrem carboxiterminal d'aquesta proteïna i Tet (M), encara que no s'inclou el lloc d'unió a GTP (factor important relacionat amb l'activitat de les proteïnes de protecció del ribosoma). Cal dir, però, que la proteïna sencera no s'assimila ni a les proteïnes d'expulsió ni a les de protecció.

A més, els mecanismes de resistència del gen de *Streptomyces otr*(C) no s'han determinat perquè encara no ha estat seqüenciat. Existeix, però, una hipòtesi que no relaciona aquest gen ni amb proteïnes d'expulsió ni de protecció (Chopra i Roberts, 2001).

DISMINUCIÓ DE L'ACUMULACIÓ DE LES TETRACICLINES A L'INTERIOR BACTERIÀ (A I B)

Els bacteris posseeixen, de manera innata, una sèrie de proteïnes codificades pel cromosoma que transporten molècules dins i fora la cèl·lula. Aquestes proteïnes s'han dividit en diferents grups, en els quals s'inclou l'MFS, la família RND (*resistance nodulation cell division*), la petita família de resistència a múltiples antibiòtics (SMR), que codifica bombes d'expulsió activa que depenen del flux de protons, amb un mecanisme d'antiport de protons, i la família de transportadors d'unió a ATP (ABC). Algunes (no totes) d'aquestes bombes d'expulsió activa confereixen resistència a les tetraciclins.

Un gran nombre de bombes d'expulsió de la família RND tenen la tetraciclina com a substrat. Aquestes són bombes totalment diferents de les bombes d'expulsió específiques de tetraciclins, que són de la família MFS, ja que principalment es troben en bacteris gramnegatius i estan involucrades a expulsar molts

TAULA 6. Distribució dels gens de resistència *tet* relacionats amb la protecció del ribosoma en bacteris grampositius

Un gen	Gen	Dos o més gens	Gen
Gènere		Gènere	
<i>Abiotrophia</i>	<i>tet</i> (M)	<i>Aerococcus</i>	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O)
<i>Bacterionema</i>	<i>tet</i> (M)	<i>Bifidobacterium</i> ^b	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (W)
<i>Gemella</i>	<i>tet</i> (M)	<i>Gardnerella</i>	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (Q)
<i>Mycoplasma</i> ^a	<i>tet</i> (M)	<i>Lactobacillus</i>	<i>tet</i> (O), <i>tet</i> (Q)
<i>Ureaplasma</i> ^a	<i>tet</i> (M)	<i>Mobiluncus</i> ^b	<i>tet</i> (O), <i>tet</i> (Q)
<i>Actinomyces</i>	<i>tet</i> (M)	<i>Eubacterium</i> ^b	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (Q)
<i>Corynebacterium</i>	<i>tet</i> (M)	<i>Listeria</i>	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (S)
<i>Bacillus</i>	<i>tet</i> (M)	<i>Staphylococcus</i>	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O)
<i>Mycobacterium</i>	<i>otr</i> (A)	<i>Clostridium</i> ^b	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> B(P), <i>tet</i> (Q)
		<i>Peptostreptococcus</i> ^b	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (Q)
		<i>Enterococcus</i>	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (S)
		<i>Streptococcus</i>	<i>tet</i> (M), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (T)
		<i>Streptomyces</i> ^c	<i>otr</i> (A), <i>tet</i> ^d

^a Bacteris sense paret cel·lular i amb un metabolisme de grampositiu.

^b Espècies anaeròbies.

^c Microorganisme multicel·lular.

^d Encara no li han donat cap número d'assignació.

tipus de lligands (tant antibiòtics, com ions metall tòxics) fora de la cèl·lula. A més, s'associen a una proteïna que actua com a lligand i a un canal de membrana externa. Així, de tipus de bombes RND que transportarien tetraciclina trobem més o menys les mateixes que també transportarien quinolones (esmentades anteriorment) (Chopra i Roberts, 2001):

- Sistema Acr trobat en *E. coli*.
- El sistema múltiple de Mex, trobat en *Pseudomonas aeruginosa*.
- Sistema Mtr trobat en *Neisseria gonorrhoeae*.
- Sistema SmeDEF descrit en *Stenotrophomonas maltophilia*.
- Sistema AdeABC descrit en *Acinetobacter baumannii*.
- Un sistema relacionat amb l'operó MexA-MexB-OprM ha estat trobat en soques multi-resistents de *Burkholderia cepacia*.
- En *Haemophilus influenzae* també s'ha descrit una bomba d'expulsió homòloga a AcrAB.

Altres tipus de bombes que no pertanyen a

la família RND i que també tenen tetraciclina com a substrat són (Putman *et al.*, 2000):

- El sistema trobat en *Campylobacter jejuni* (Cmr) (família MFS).
- LmrP i LmrA de *Lactococcus lactis* (MFS i ABC, respectivament).
- MdfA i EmrE d'*E. coli* (MFS i SMR, respectivament).

El locus *mar* té un paper important en aquesta resistència. Les mutacions en la regió de *marR* augmenten la resistència a un gran nombre d'antimicrobians, inclosa la tetraciclina. També, mutants que expressen elevats nivells de MarA mostren una disminució en l'acumulació de tetraciclina i, per tant, una major resistència. Una elevada expressió de MarA també provoca una disminució de l'expressió de la porina OmpF i un augment de l'expressió de la bomba d'expulsió AcrAB (tal com succeeix en les quinolones). Aquests tipus d'operons que confereixen resistència a tetraciclina també s'han descrit en *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp. i *Campylobacter* sp. (Chopra i Roberts, 2001).

A més, la presència de mutacions que alterin la permeabilitat de les porines o dels lipopolisacàrids de la membrana externa pot també afectar la sensibilitat a la tetraciclina i a altres antibiòtics. Un exemple seria *N. gonorrhoeae*, que posseeix *mtrCDe*, que codifica una bomba d'expulsió activa. Quan hi ha una deleció d'una A o una inserció de doble TT dins els 13 pb de l'IR (*inverted repeat*) de la regió del promotor de l'*mtrR*, la cèl·lula hoste augmenta aproximadament quatre vegades la seva resistència a la tetraciclina, penicil·lina i eritromicina (Zarantonelli *et al.*, 1999). En aquest microorganisme, la resistència mitjançada cromosòmicament és molt més freqüent que la resistència a antibiòtics mitjançada per plasmidis, i aquest fet és de gran importància clínica.

Altres mutacions en bombes d'expulsió activa s'han descrit en: *B. cepacia*, *C. jejuni*, *E. coli*, *Enterobacter* sp., *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* i *S. maltophilia* (Roberts, 2003).

ALTERACIONS EN LA DIANA DE LES TETRACICLINES

Recentment, en quinze soques clíniques resistents a tetraciclina (CMI a tetraciclina de 2 a 64 µg/ml i CMI a doxiciclina d'1 a 32 µg/ml) de *Propionibacterium cutania*, es va trobar que en lloc d'una guanina a la posició 1058 del gen de l'rRNA 16S hi havia una citosina (ja citat anteriorment). Aquest canvi s'associa amb l'augment de resistència a aquest antibiòtic, encara que no és del tot clara la seva repercussió clínica (Ross *et al.*, 1998). El que sí que és del tot conegut és que aquesta regió de l'rRNA 16S, coneguda com a hèlix 34, és important per a l'acabament de la cadena peptídica i per a garantir un bon resultat de traducció. En aquest punt s'han descrit mutacions en *Helicobacter pylori* (Trieber i Taylor, 2002).

BIBLIOGRAFIA

- BURDETT, V. (1996). «Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes in GTP dependent». *J. Bacteriol.*, vol. 178, pàg. 3246-3251.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. (2001). «Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance». *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 65, pàg. 232-260.
- CLERMONT, D.; CHESNEAU, O.; CÉSPEDES, G. DE; HORAUD, T. (1997). «New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in *streptococci* and nucleotide sequence of *tet(T)* isolated from *Streptococcus pyogenes* A498». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, pàg. 112-116.
- DÁMASO, D. (1990). «Tetraciclins». A: *Antimicrobianos*. Marketing Pharm, pàg. 331-357.
- GRAVE, K.; LINGAAS, E.; BANGEN, M.; RONNING, M. (1999). «Surveillance of the overall consumption of antibacterial drugs in humans, domestic animals and farmed fish in Norway in 1992 and 1996». *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 43, pàg. 243-252.
- JANKNEGT, R.; LASHOF, A. O.; GOULD, I. M.; MEER, J. W. M. VAN DER (2000). «Antibiotic use in Dutch hospitals 1991-1996». *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 45, pàg. 251-256.
- JOINT EXPERT ADVISORY COMMITTEE ON ANTIBIOTIC RESISTANCE (JETACAR) (1999). *The use of antibiotics in food-producing animals: antibiotic-resistant bacteria in animals and humans*. Canberra, Austràlia: Commonwealth Department of Health and Aged Care and Commonwealth Department of Agriculture, Fisheries and Forestry.
- LEVY, S. B.; BUU-HOI, A.; MARSHALL, B. (1984). «Transposon Tn10-like tetracycline resistance determinants in *Haemophilus parainfluenzae*». *J. Bacteriol.*, vol. 160, pàg. 87-94.
- LEVY, S. B.; McMURRY, L. M.; BARBOSA, T. M.; BURDETT, V.; COURVALIN, P.; HILLEN, W.; ROBERTS, M. C.; ROOD, J. I.; TAYLOR, D. E. (1999). «Nomenclature for new tetracycline resistance determinants». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, pàg. 1523-1524.
- McMURRY, L. M.; LEVY, S. B. (2000). «Tetracycline resistance in gram-positive bacteria». A: FISCHETTI, V. A.; NOVICK, R. P.; FERRETTI, J. J.; PORTNOY, D. A.; ROOD, J. I. [ed.] *Gram-positive pathogens*. Washington, DC: American Society for Microbiology, pàg. 660-677.
- PUTMAN, M.; VEEN, H. W. VAN; KONINGS, W. N. (2000). «Molecular properties of bacterial multidrug transporters». *Microbiol. Molec. Rev.*, vol. 64, pàg. 672-693.
- RIBERA, A.; ROCA, I.; RUIZ, J.; GIBERT, I.; VILA, J. (2003a). «Partial characterization of a transposon carrying the Tet A determinant in one clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*». *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 52, pàg. 477-480.
- RIBERA, A.; RUIZ, J.; VILA, J. (2003b). «Presence of the Tet M determinant in one clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, pàg. 2310-2312.

- ROBERTS, M. C. (2003). «Tetracycline therapy». *Up. Antimicrob. Resist.*, vol. 36, pàg. 462-467.
- ROSS, J. I.; EADY, E. A.; COVE, J. H.; CUNLIFFE W. J. (1998). «16SrRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, pàg. 1702-1705.
- SWANN, M. M. (1969). *Report of joint committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Cmnd. 4190.* Londres: Her Majesty's Stationery Office.
- TRIEBER, C. A.; BURKHARDT, N.; NIEHAUS, K. H.; TAYLOR, D. E. (1998). «Ribosomal protection from tetracycline mediated by Tet (O): Tet (O) interaction with ribosomes is GTP-dependent». *Biol. Chem.*, vol. 379, pàg. 847-855.
- TRIEBER, C. A.; TAYLOR, D. E. (2002). «Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline». *J. Bacteriol.*, vol. 184, pàg. 2131-2140.
- ZARANTONELLI, L.; BORTHAGARAY, G.; LEE, E. H.; SHAFER, W. M. (1999). «Decreased azithromycin susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* due to *mtrR* mutations». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, pàg. 2468-2472.