



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS MOLECULAR DE UN FRAGMENTO CONSERVADO  
QUE CODIFICA BLEE TIPO SHV EN PLÁSMIDOS  
MULTIRRESISTENTES

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A:  
M. en C. **JESÚS ULISES**  
**GARZA RAMOS MARTÍNEZ**

CUERNAVACA, MORELOS

ABRIL, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

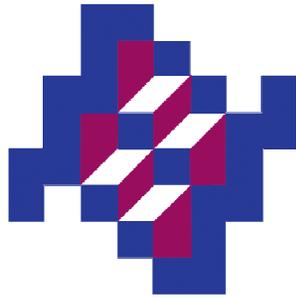


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**INSTITUTO NACIONAL  
DE SALUD PÚBLICA**

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO LA ASESORIA DEL Dr. JESÚS SILVA SÁNCHEZ, EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS (CISEI) DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA (INSP). SECRETARÍA DE SALUD, MÉXICO.

DURANTE LOS ESTUDIO DE DOCTORADO FUI BECADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT).

**ESTE PROYECTO CONTO CON EL APOYO FINANCIERO DE DGAPA, UNAM Y EL CONACyT.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. **Jesús Silva** por apoyarme en la realización de este proyecto de tesis, así como sus consejos y asesoría para consolidarme como un investigador nacional.

A mis compañeros de laboratorio **Fernando, Alejandro, Teresa y Bertha** por el apoyo brindado durante esta tesis. A **Humberto**, por brindar su apoyo, en beneficio de la investigación en resistencia bacteriana. A **José Luis, Rosa María y Patricia** por su apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Dávila del Centro de Ciencias Genómicas.

A Drs. Guillermo **Dávila** y Victor **González** por su apoyo brindado durante la estancia en su laboratorio y su tutoría durante el desarrollo de esta tesis.

## DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a **Faty**, quien me ha acompañado siempre en todo este proceso y que gracias a ella y su apoyo, siempre logro mis metas.

A **Katy** y **Corine**, a quienes quiero mostrarles el camino a seguir en la vida y demostrarles que sus fuerzas me impulsan para seguir adelante.

A mis padres **Pepín** y **Nohemí**, que gracias a su esfuerzo incansable son un ejemplo a seguir para todos sus hijos; a mis hermanos **Adriana**, **Panco**, **Silvia**, **Lulú**, **Manuel**, **Pepín**, **Maru**, **Lupita**, **Rafael** y **Yeya** por brindarme su apoyo en lo personal y en lo profesional. A todos mis pequeños y grandes sobrinos, en especial a **Claudia** por ser leal a sus ideales y esta tesis es también tuya donde quiera que estés.

A mis suegros **Memo** y **Gloria**, a mis cuñadas **Alma** y **Vanesa** por recibirme en su familia y apoyarme todos estos años.

## RESUMEN

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es el grupo de antimicrobianos más usados en el ambiente clínico y su principal mecanismo de resistencia es la producción de  $\beta$ -lactamasas, las cuales han sido ampliamente descritas en aislamientos clínicos de todo el mundo. En México se ha descrito ampliamente  $\beta$ -lactamasas de la familia SHV, la cual pertenece a una familia de más de 100 miembros. La mayoría de estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, por lo que se denominan  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs). En este estudio se describe la  $\beta$ -lactamasa SHV-5 formando parte de un transposón compuesto (TC) el cual se encuentra duplicado en tándem. Este transposón compuesto duplicado en tándem (TCDT) fue localizado en el plásmido pHNM1 en *Enterobacter cloacae*, el cual es muy parecido a los plásmidos pCTX-M3 y pEL60. La estructura de este TC está formado por dos IS26 bordeando un segmento de DNA conformado por ocho ORFs, cuyo origen corresponde al genoma de *Klebsiella pneumoniae* y ha sido identificado en otros plásmidos. También se describe un análisis del contexto genético del TC en varios genomas de *K. pneumoniae*, plásmidos, así como el contenido de IS26 en diversos plásmidos. Se describen también los posibles mecanismos involucrados en la duplicación en tándem así como su papel en la naturaleza.

## ABSTRACT

$\beta$ -lactams antibiotics are antimicrobials used in hospital setting and the  $\beta$ -lactamase production is the main mechanism of bacterial resistance. These enzymes have been worldwide described and SHV-5 and SHV-2  $\beta$ -lactamasas have been described in Mexico, which family contains more 100 alleles. These enzymes hydrolyze third generation of cephalosporin, which are called extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLs). In this work, the SHV-5 ESBL was located on a compound transposon duplicate in tandem (CTDT), which was located on pHNM1 plasmid in *Enterobacter cloacae*. This plasmid is high similar to pCTX-M3 and pEL60 plasmids. The compound transposon structure corresponds to two IS26 flanking eight ORFs, its origin is *Klebsiella pneumoniae* chromosome. This compound transposon has been identified in several plasmids. This work describes the genetic context of TC in several genomes of *K. pneumoniae* and plasmids as well as the IS26 contained in plasmids. The mechanisms involved in tandem duplication and role in nature are described.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>01</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>02</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>01</b>
<b>Infecciones nosocomiale</b>	<b>01</b>
<b>Antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos</b>	<b>02</b>
<b>Pared Celular: Blanco de Acción de los Antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos</b>	<b>06</b>
<b><math>\beta</math>-lactamasas como principal mecanismo de resistencia a</b>	
<b>antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos</b>	<b>08</b>
<b><math>\beta</math>-lactamasas de clase A</b>	<b>09</b>
<b><math>\beta</math>-lactamasas de clase C</b>	<b>11</b>
<b><math>\beta</math>-lactamasas de clase D</b>	<b>13</b>
<b><math>\beta</math>-lactamasas de clase B</b>	<b>14</b>
<b>Residuos conservados en las enzimas que reconocen penicilina</b>	<b>15</b>
<b>Hidrólisis de los Antibióticos <math>\beta</math>-Lactámicos por las <math>\beta</math>-lactamasas</b>	<b>17</b>
<b>Evolución de las <math>\beta</math>-lactamasas</b>	<b>18</b>
<b>Definiendo una <math>\beta</math>-lactamasas de espectro extendido (BLEEs)</b>	<b>20</b>
<b>Estructuras moleculares involucradas en la multirresistencia</b>	<b>21</b>
<b>Enterobacterias productoras de BLEEs</b>	<b>25</b>
<b>Elementos genéticos que contienen BLEES</b>	<b>26</b>
<b>Estructura y elementos genéticos relacionados con los genes</b>	
<b>de las <math>\beta</math>-lactamasas tipo SHV</b>	<b>28</b>

<b>Amplificación de genes e implicaciones clínicas</b>	<b>31</b>
<b>Un estudio retrospectivo como antecedente general del proyecto</b>	<b>36</b>
<b>Aislamiento clínico <i>E. cloacae</i> C1177-7 y su implicación en un brote intrahospitalario</b>	<b>37</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>39</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>39</b>
<b>Objetivos Particulares</b>	<b>39</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>Antecedentes del plásmido p1658/97</b>	<b>61</b>
<b>Mecanismo de duplicación del TC en tándem</b>	<b>65</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>74</b>

# INTRODUCCION

## Infecciones nosocomiales

Las infecciones contraídas en un paciente después de 48 horas de haber sido hospitalizado en un nosocomio se les conoce como infecciones nosocomiales, con la característica que no se habían manifestado ni estaban en período de incubación <sup>1</sup>. Las infecciones nosocomiales ocurren en todo el mundo y afectan principalmente a países en desarrollo. Las infecciones contraídas en los establecimientos de atención de salud están entre las principales causas de defunción y de aumento de la morbilidad en pacientes hospitalizados. Son una pesada carga para el paciente y el sistema de salud pública de cada país. Una encuesta de prevalencia realizada bajo los auspicios de la OMS en 55 hospitales de 14 países representativos de 4 Regiones de la OMS (Europa, el Mediterráneo Oriental, el Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental) mostró que un promedio del 8.7% de los pacientes hospitalizados adquieren una infección nosocomial. En un momento dado, más de 1.4 millones de personas alrededor del mundo sufren complicaciones por infecciones contraídas en los hospitales. La máxima frecuencia de infecciones nosocomiales fue notificada por hospitales de las Regiones del Mediterráneo Oriental y de Asia Sudoriental (11.8 y 10.0%, respectivamente) con una prevalencia de 7.7 y de 9.0%, en las Regiones de Europa y del Pacífico Occidental respectivamente <sup>1</sup>. En México, se desconoce la frecuencia de infecciones nosocomiales, sin embargo se estima que entre 1997 y 2002, la tasa de infecciones nosocomiales se incrementó de 1 a 4.5 casos por cada 100 egresos hospitalarios <sup>2</sup>. Recientemente se ha determinado en algunos hospitales hasta un 16.0%. Cabe aclarar que la frecuencia depende mucho de las características del hospital, recursos económicos y especialidades que ofrece. En el caso del Instituto Nacional de Pediatría se determinó durante el periodo de 1999 a 2006 una tasa general de infecciones nosocomiales del 9.45%, variando entre los diferentes servicios del hospital <sup>3</sup>.

Las infecciones nosocomiales ocurren con mayor frecuencia en heridas quirúrgicas, en enfermedades de vías urinarias y en vías respiratorias, con una prevalencia en unidades de cuidados intensivos, en pabellones quirúrgicos, atención ortopédicas y en enfermedades agudas. En pacientes con edad avanzada, las tasas de prevalencia de infección son mayores debido a su grado de vulnerabilidad, además de padecer en muchos de los casos enfermedades subyacentes o tratamientos de quimioterapia. Las infecciones nosocomiales agravan la discapacidad funcional y la tensión emocional del paciente y

en algunos casos pueden ocasionar trastornos discapacitantes que reducen la calidad de vida. Son una de las principales causas de defunción y los costos económicos son enormes, que se ven reflejados en una estadía prolongada de los pacientes infectados <sup>4</sup>.

Las infecciones nosocomiales pueden ser causadas por microorganismos Gram-negativos multirresistentes, donde se aíslan diferentes géneros de Enterobacterias incluyendo cepas de *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *K. pneumoniae*, además de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Estas bacterias provocan un alto porcentaje de septicemias con un elevado índice de mortalidad. Por otro lado la falla terapéutica en el tratamiento de enfermedades infecciosas es debida a la resistencia a diversos grupos de antibióticos <sup>5,6</sup>. Una bacteria multirresistente es aquella que resiste el embate de diversos antibióticos o grupos de antimicrobianos, los cuales están conformados por los aminoglucósidos (kanamicina, gentamicina, amikacina, etc.), tetraciclinas, trimetoprim/sulfametoxazol, rifampicinas, cloranfenicol, sulfonamidas,  $\beta$ -lactámicos (ampicilina, penicilina, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos), quinolonas (que incluye a las fluoroquinolonas), macrolidos y además de antisépticos y desinfectante. Esta multirresistencia es un problema grave a nivel mundial, donde los hospitales se enfrentan a diario con organismos con un mayor número de resistencias a los antiguos y nuevos antibióticos. El uso inadecuado y consumo excesivo de antibióticos, ha propiciado la selección de bacterias resistentes a varios antibióticos, generando fallas terapéuticas, cuyas consecuencias representan un gran peligro para la salud de la población mundial <sup>5</sup>.

## **Antibióticos $\beta$ -lactámicos**

La era de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos dio inicio hace 62 años, en 1947 con el desarrollo de la penicilina. Una vez introducida al ambiente clínico, pasaron pocos años para identificar la proliferación de la bacteria *Streptococcus aureus* resistentes a penicilina en el ambiente hospitalario. En diez años se convirtieron las infecciones causadas por *staphylococcus* resistentes a penicilina en una pandemia. Debido a ésto la ciencia tuvo que desarrollar las penicilinas de amplio espectro y las cefalosporinas de primera generación las cuales no fueran hidrolizadas por la penicilinasas contenida en estas bacterias. Esta clase de antibióticos en poco tiempo fueron introducidos al ambiente clínico. Estos antibióticos

permanecieron como línea de defensa contra la mayoría de bacterias causantes de infecciones por más de 20 años, antes de que la resistencia a estos antibióticos debido a la producción de  $\beta$ -lactamasas por bacterias gran-negativas se convirtiera en un serio problema. La industria farmacéutica para contrarrestar esta amenaza comercializó otras seis clases de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como las cefamicinas, oximinocefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos, clavámicos e inhibidores del ácido penicilánico; dentro de un lapso relativamente corto de tiempo, de entre 7 o 8 años <sup>7</sup> (Tabla 1).

**Tabla 1. Clases de antibióticos  $\beta$ -lactámicos**

---

<u>Penicilinas:</u>	
Espectro moderado:	Penicilina, penicilina G, oxacilina, meticilina, dicloxacilina.
Espectro amplio:	Amoxicilina, ampicilina.
Espectro extendido:	Carbencilina, ticarcilina, peperacilina.
<u>Cefalosporinas:</u>	
1° generación:	Cefalexina, cefalothina, cefazolin.
2° generación:	Cefaclor, cefuroximea, cefamandole, cefotetan, cefoxitin.
3° generación:	Ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima.
4° generación:	Cefepime, cefpiroma
<u>Carbapenémicos:</u>	Imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem, doripenem.
<u>Monobactámicos:</u>	Aztreonam.
<u>Inhibidores de <math>\beta</math>-lactamasas:</u>	Ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

---

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Figura 1) son el grupo más célebre de antibióticos que inhiben el crecimiento bacteriano por bloquear uno de los pasos finales de la síntesis de la pared celular mediada por la transpeptidación, la cual le confiere fuerza mecánica al peptidoglicano a través de enlaces covalentes entre péptidos (Figura 2). Este grupo incluye a la penicilina, que contiene una cabeza química formada por un anillo  $\beta$ -lactámico de cuatro miembros, fusionada a un sistema de cinco anillos de azufre (S) (Figura 1A) y también incluye a las cefalosporinas, donde el  $\beta$ -lactámico está fusionado a un sistema de anillos expandido también formado por azufre (Figura 1B) <sup>7</sup>.

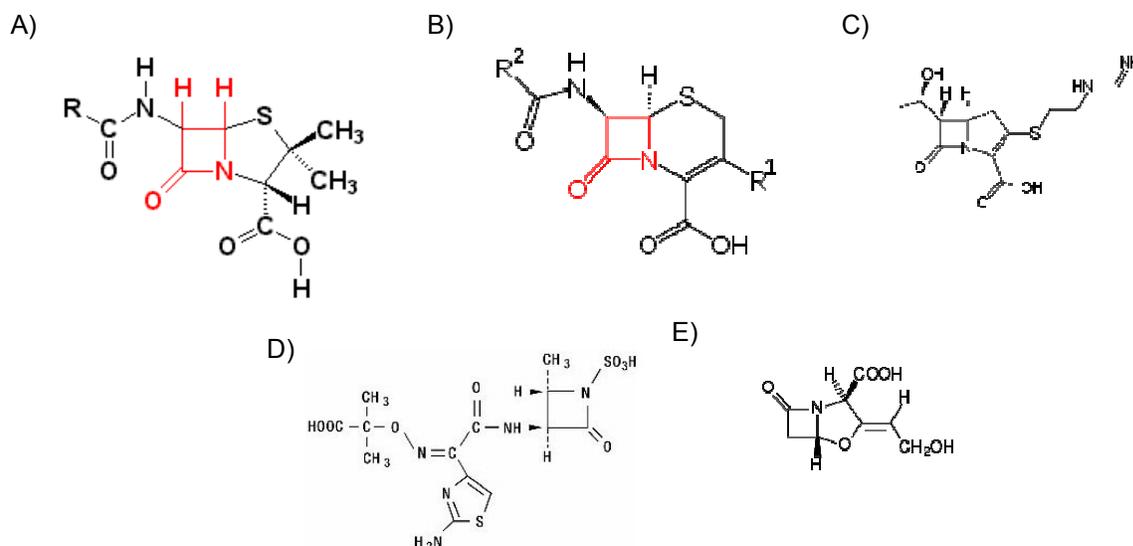


Figura 1. Estructura de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. A) Penicilinas, B) Cefalosporinas, C) Carbapenémicos, D) Monobactámicos e E) inhibidores de  $\beta$ -lactamasas.

Las cefalosporinas representan el grupo de antibióticos  $\beta$ -lactámicos más ampliamente prescritos en la clínica. Las modificaciones en las cadenas laterales han permitido una diferente penetración a través de las porinas y provee variabilidad en sus propiedades antibacterianas y farmacocinéticas<sup>7,8</sup>. Las cefalosporinas de primera generación son consideradas de estrecho espectro de actividad, que incluyen drogas tanto orales como intravenosas, como la cefalotina (Tabla 1). Esta generación tiene mejor espectro de actividad contra bacterias gram positivas, excepto *S. aureus* meticilino resistentes (MRSA) y son activos contra algunas bacterias Gram negativas como *E. coli* y *Klebsiella* spp. Las cefalosporinas de segunda generación están catalogadas como de espectro extendido, representadas por cefoxitin (intravenosa), cefamandol (oral) y cefaclor (oral) (Tabla 1), las cuales son menos efectivas contra bacterias Gram positivas pero tienen un más amplio espectro contra bacterias Gram negativas como *Bacteroides fragilis* y *Haemophilus influenzae*. Así las cadenas laterales de la 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> generación de cefalosporinas, fueron construidas en base a la experiencia con las penicilinas las cuales incluyen cadenas laterales de thiazolidil y fenilglicil. El incremento en actividad contra bacterias Gram negativas es derivado en la combinación de una mejor penetración, incremento en la afinidad contra su sitio blanco (PBPs) y disminución en la eficiencia catalítica de contra las  $\beta$ -lactamasas. Esta combinación se obtuvo en las cefalosporinas de 3<sup>ra</sup> generación como cefotaxima y ceftazidima, las cuales eran pobremente hidrolizadas por las  $\beta$ -lactamasas. Las cefalosporinas de cuarta generación como cefepime tienen propiedades semejantes a las cefalosporinas de 1<sup>ra</sup> generación, pero incrementó su resistencia a

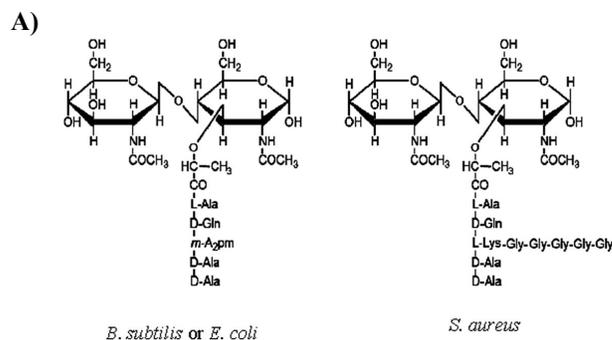
hidrólisis por varias  $\beta$ -lactamasas. En particular ceftazidima y cefixime, cefalosporinas de 3<sup>ra</sup> generación y las cefalosporinas de 4<sup>ta</sup> tienen buena penetración a través de las porinas y buena afinidad contra las PBPs. En general la manipulación semisintética de las cadenas laterales de las cefalosporinas muestra una gran actividad contra un gran número de patógenos, favoreciendo el tratamiento de muchas infecciones para las cuales los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son prescritos <sup>8</sup>.

Los carbapenémicos (Figura 1C) como el imipenem, meropenem y ertapenem fueron aprobados para su uso clínico con la característica de una dosis diaria. En el caso de imipenem y meropenem son solubles al agua, tienen baja biodisponibilidad de manera oral y son utilizados en el ambiente hospitalario contra bacterias resistentes a las cefalosporinas de espectro extendido (cefalosporinas de 3<sup>ra</sup> generación). Los carbapenémicos no son hidrolizados por las  $\beta$ -lactamasas de clase A (Tabla 2) que generalmente hidrolizan tanto penicilinas y cefalosporinas, sin embargo son degradados por las metallo- $\beta$ -lactamasas, así como por las  $\beta$ -lactamasas de clase A recientemente descritas en el ambiente clínico (carbapenemasas de clase A) (Tabla 2). En el caso del imipenem es suministrado junto con cilastatina sódica, un inhibidor enzimático específico que bloquea el metabolismo de imipenem en el riñón y aumenta considerablemente la concentración de imipenem intacto en el tracto urinario. A diferencia del meropenem que con el sustituyente C-metil es no susceptible a la enzima renal. Ertapenem tiene una vida media larga en comparación a los anteriores carbapenémicos <sup>9</sup>.

El grupo de los monobactámicos (Figura 1D) es representado por el aztreonam, presenta la misma cadena lateral acil que la ceftazidima, mientras el aztreonam tiene N-sulfonato en la otra posición. En el caso de los clavams (Figura 1E) el calvulanato no es considerado como un antibiótico (debido a su pobre actividad contra las PBPs), pero sí es un excelente inhibidor suicida contra las  $\beta$ -lactamasas y permite disminuir la susceptibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos <sup>8</sup>. Por décadas, el grupo de antibióticos  $\beta$ -lactámicos han sido ampliamente utilizados en el ambiente hospitalario, tanto para el tratamiento como para profilaxis de infecciones causadas por bacterias. Este grupo de antibióticos actúan inhibiendo la biosíntesis de la pared celular, formada por peptidoglicano tanto en bacterias Gram-negativas y positivas. Esta inhibición resulta en un peptidoglicano débil, causando un crecimiento bacteriano altamente susceptible a lisis y muerte celular <sup>10</sup>.

## Pared Celular: Blanco de Acción de los Antibióticos $\beta$ -lactámicos

La pared celular es la estructura principal que mantiene la forma de la bacteria y su integridad es crítica para la viabilidad de la célula. Tanto en bacterias gran-positivas y negativas el esqueleto de la pared celular consiste del entrecruzado de polímeros de peptidoglicano (PG). La síntesis de nuevo PG es necesario para el crecimiento y división celular, pero es necesario romper los enlaces covalentes del PG existentes que permita la inserción de nuevo PG. Es conocido que hidrolasas, junto con las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs, ver adelante figura 8) son esenciales para el crecimiento de la pared celular. El peptidoglicano es también llamado mureína, un polímero que consiste de cadenas largas de glicano que son unidos a través de puentes peptídicos flexibles que forman una estructura fuerte pero elástica que protege el protoplasma de lisis debido a la alta presión osmótica interna <sup>11</sup>. La química del las cadenas de glicano varía ligeramente solo entre diferentes bacterias. Los péptidos son sintetizados como cadenas pentapeptídicas, que contienen L y D aminoácidos y un aminoácido dibásico, el cual permite la formación del enlace entre los péptidos. El aminoácido dibásico es a menudo el ácido mesodiaminopimelico, el cual está presente en muchas bacterias Gram-negativas y en algunas bacterias Gram-positivas, como en especies de *Bacillus*. El enlace peptídico más común encontrado en *E. coli* y *B. subtilis* es L-Ala<sub>(1)</sub>-D-Glu<sub>(2)</sub>-*m*-A<sub>2</sub>pm<sub>(3)</sub>-D-Ala<sub>(4)</sub>-D-Ala<sub>(5)</sub>, con L-Ala<sub>(1)</sub> unido a MurNac (Figura 2A). El enlace peptídico está formado por la acción de una transpeptidasa que une D-Ala<sub>(4)</sub> al grupo amino de *m*-A<sub>2</sub>pm<sub>(3)</sub> al otro péptido (Figura 1B). En algunos organismos el enlace peptídico en el peptidoglicano es vía un aminoácido, como en el caso de *S. aureus* formado por cinco glicinas (Figura 1A). En bacterias Gram-negativas, el PG está covalentemente unido a la membrana vía lipoproteínas; en Gram-positivas las cuales carecen de membrana externa, tienen una delgada pared celular que contiene unidos covalentemente polímeros cargados, tales como el ácido teicoico y ácido teicuronico, así como también proteínas que están ancladas (unidas covalentemente y no covalentemente unidas) a la pared celular <sup>12</sup>.



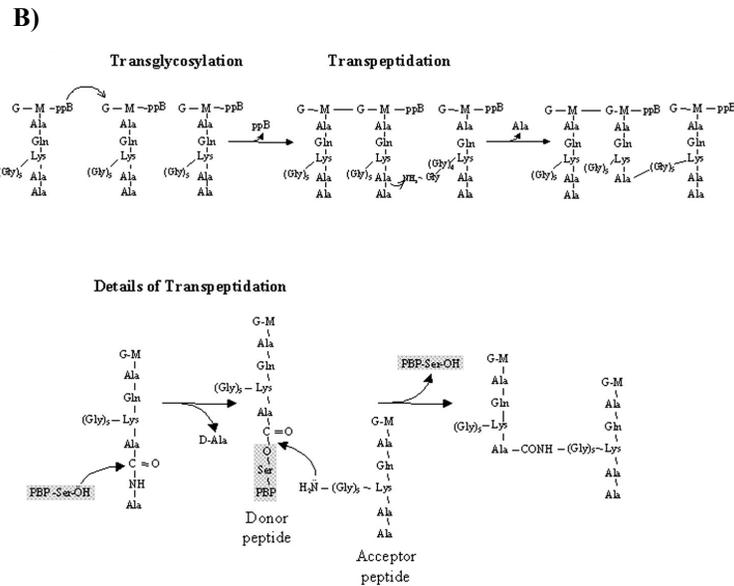


Figura 2. Molécula y reacción de síntesis del peptidoglicano. A) La unidad básica del peptidoglicano son pentapéptidos disacárido compuesto por *N*-acetilglucosamina y el ácido *N*-acetilmurámico, los cuales están unidos por el enlace glicosídico  $\beta$ -1,4. B) Las cadenas de peptidoglicano están sintetizadas por reacciones de transglicosilación y transpeptidación, las cuales permite la formación de cadenas largas de glicano unidas por puentes peptídicos.

La biosíntesis de PG puede ser dividida en diferentes etapas. La primera ocurre en el citoplasma y permite la síntesis de precursor UDP-*N*-acetilmuramil-pentapéptido (UDP-MurNAc-pentapéptido) y UDP-*N*-acetilmuramil-pentapéptido (UDP-GlcNAc). En la segunda etapa, la cual toma lugar en la membrana citoplasmática, los lípidos precursores son sintetizados. La fracción fosfo-MurNAc-pentapéptido de UDP-MurNAc-pentapéptido es transferida al aceptor membranal bactoprenol, generando el lípido I [MurNAc-(pentapeptido)-pirofosforil-undecaprenol]. Entonces el GlcNAc del UDP-GlcNAc es adicionado al lípido I, formando el lípido II [GlcNAc- $\beta$ -(1,4)-MurNAc-(pentapéptido)-pirofosforil-undecaprenol], el cual es sustrato de la reacción de polimerización en la bacterias que tienen el PG unido directamente. El uso de una molécula lipofílica tal como el bactoprenol permite a la célula transportar precursores hidrofílicos del medio acuoso del citoplasma, a través de la membrana hidrofóbica a los sitios externamente situados de la incorporación de PG creciente. Se ha sugerido que la translocación del precursor lipídico del lado del citoplasma al lado externo de la membrana, con acuerdo con la síntesis de PG, está translocación es catalizada por una translocasa. La tercera y última etapa de la biosíntesis de PG involucra la polimerización de nuevas unidades de péptido al PG creciente, esta polimerización es realizada por las PBPs, las cuales catalizan las reacciones de transglicosilación y

transpeptidación responsables para la formación de uniones glicosídicas y peptídicas del PG <sup>13</sup>, respectivamente (Figura 2 B).

Las PBPs pertenecen a la familia de serina acil-transferasas, las cuales incluyen PBPs de alto (HMW) y bajo (LMW) peso molecular y  $\beta$ -lactamasas (Figura 8). PBPs de HMW son enzimas que están compuestas de dos módulos (N y C-terminales) localizados en la superficie exterior de la membrana citoplasmática y ancladas a la membrana citoplasmática por el N-terminal (péptido señal no cortado). El C-terminal es el dominio de unión a penicilina, el cual cataliza el enlace peptídico en el PG. Dependiendo en la estructura primaria y en la actividad catalítica del dominio N-terminal, las PBPs HMW pueden ser divididas en dos clases A y B <sup>14</sup>. Las PBPs HMW de la clase A, como PBP1A y PBP1B de *E. coli* tienen actividad de transglicosilasas, esto permite participar en la elongación de cadenas de glicano (transglicosilación) y la formación de enlaces entre los péptidos (transpeptidación) de PG. La transglicosilación puede ser realizada por glicosil transferasas monofuncionales. Las PBPs HMW de clase B, representadas por las PBP2 y PBP3 de *E. coli*, no tienen dominio N-terminal de unión a penicilina, por tal motivo su función es desconocida con respecto al biosíntesis de PG. Al menos la PBP3 de *E. coli*, el dominio N-terminal es requerido para el plegamiento y estabilidad del sitio de unión a penicilina, funcionando como una chaperona intramolecular y puede también proveer sitios de reconocimiento para la interacción con otras proteínas de división celular. El alineamiento de aminoácidos de varias PBPs de clase A y B mostraron motivos conservados característicos de los dominios de no unión a penicilina de cada clase, los cuales están conservados <sup>15,16</sup>. Los motivos conservados de los dominios de las transpeptidasas están mejor estudiados y no solo son comunes a estos dominios, pero también constituyen la única firma de todas las proteínas que interactúan con penicilina: SXXXK (Serina corresponde al aminoácido del sitio activo), (S/Y)XN, y (K/H)(T/S)G (Figura 6). Estos motivos están siempre presentes en el mismo orden con espacio similar en la estructura primaria de la proteína formando el sitio activo en la estructura terciaria por el plegamiento de la cadena polipeptídica <sup>17</sup>.

## **$\beta$ -lactamasas como principal mecanismo de resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos**

La resistencia a penicilina fue identificada incluso antes que la molécula fuera desarrollada por la ciencia y la enzima capaz de hidrolizar este antibiótico fue denominada “ $\beta$ -lactamasa” <sup>31</sup>. Estas enzimas

se caracterizan por hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos causando su inactivación. Actualmente su clasificación está basada en sus propiedades bioquímicas, estructura molecular y secuencia de amino ácidos, agrupándolas en cuatro clases A, B, C y D <sup>18</sup> (Tabla 2). Las clases A, C y D poseen el aminoácido serina en su sitio activo y la clase B, denominadas metallo- $\beta$ -lactamasa (M $\beta$ Ls) requieren cationes divalentes, usualmente zinc, como un cofactor para la actividad enzimática <sup>19</sup>.

En el año 1995, fue propuesto un esquema de clasificación para las  $\beta$ -lactamasas, basado en las características bioquímicas (Tabla 2) <sup>18</sup>. Tres grupos mayores de enzimas son definidas por sus sustratos y perfiles de inhibición: grupo 1, cefalosporinasas que son pobremente inhibidas por ácido clavulánico; grupo 2, penicilinasas, cefalosporinasas y  $\beta$ -lactamasas de espectro amplio, que son generalmente inhibidas por ácido clavulánico; grupo 3, metallo- $\beta$ -lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos y que son pobremente inhibidas por los inhibidores clásicos de las clases A, C, y D, como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam <sup>18</sup>.

## **$\beta$ -lactamasas de clase A**

Las  $\beta$ -lactamasas de la clase A son susceptibles a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (como el ácido clavulánico). En esta clase de  $\beta$ -lactamasas se encuentran las familias TEM y SHV y tienen la capacidad de hidrolizar sólo penicilinas, sin embargo debido al uso de las cefalosporinas se han seleccionado  $\beta$ -lactamasas con mutaciones que van desde 1 a 5 residuos, algunos cercanos al sitio activo de la enzima con la capacidad de reconocer e hidrolizar las cefalosporinas. Estas enzimas se denominan  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) <sup>20</sup>. Actualmente el número de mutante en estas familias ha alcanzado hasta TEM-167 y SHV-117 (<http://www.lahey.org/Studies/>). Mientras la mayoría de las BLEEs pertenecen a estas familias, otras BLEEs no relacionadas han sido reportadas conformando las familias: CTX-M (CTX-M-1 a CTX-M-86); OXA (OXA-1 a OXA-142); PER (PER-1 a PER-4); VEB (VEB-1 a VEB-6); TLA (TLA-1); BEL (BEL-1); BES (BES-1) y SFO (SFO-1). Estas BLEEs no son derivadas por simples mutaciones puntuales a lo largo de la proteína. En el caso de las familias TEM, SHV, CTX-M, PER y VEB se caracterizan por tener una amplia distribución a nivel mundial y han sido identificadas principalmente en plásmidos en varios géneros bacterianos <sup>21</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas de clase A presentan serina en el sitio activo, este residuo corresponde a la Ser70. Esta clase de  $\beta$ -lactamasas está conformado por dos dominios estructurales, uno formado por  $\alpha$ -hélices y el otro dominio formado por  $\alpha$ -hélices y láminas  $\beta$ , con el sitio activo situado en un surco entre los dos dominios (Figura 4A).

**Tabla 2. Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas**

Grupo	Substrato Preferido	Inhibidas		Clase Molecular	Enzimas
		AC	EDTA		
1	Cefalosporinas	-	-	C	MIR-1,CMY,FOX,ACT MOX,ACC,DNA,LAT,CFE
2a	Penicilinas	+	-	A	Gram - bacterias
2b	Penicilinas, Cefalosporinas	+	-	A	TEM-1,TEM-2,SHV-1
2be	Penicilinas, Cefalosporinas Estrecho y espectro extendido	+	-	A	TEM-3 a TEM-174, SHV-2 a SHV-127.
2br	Penicilinas	+/-	-	A	TEM-30-41,TEM-45,TRC-1
2c	Penicilinas, carbenicilina	+	-	A	PSE-1, PSE3-3, PSE-4
2d	Penicilinas, cloxacilina	+/-	-	D	OXA-1 a OXA-150,
2e	Cefalosporinas	+	-	A	Cefalosporinasas <i>P. vulgaris</i>
2f	Penicilinas, Cefalosporinas carbapenémicos	+	-	A	NMC-A, SME-1, KPC, GES
3	Penicilinas, Cefalosporinas carbapenémicos	-	+	B	VIM, IMP, SPM, GIM, SIM, L1, CCRA

La incidencia de las  $\beta$ -lactamasas de clase A contenidas en plásmidos ha incrementado recientemente en aislamientos clínicos de bacterias Gram-negativas (Figura 3). Los grupos que tienen gran importancia son las BLEEs derivadas de TEM (TEM-1 y TEM-2) y SHV (SHV-1) y CTX-M, las cuales han adquirido mutaciones que les ha permitido expandir su especificidad por cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima<sup>22</sup>.

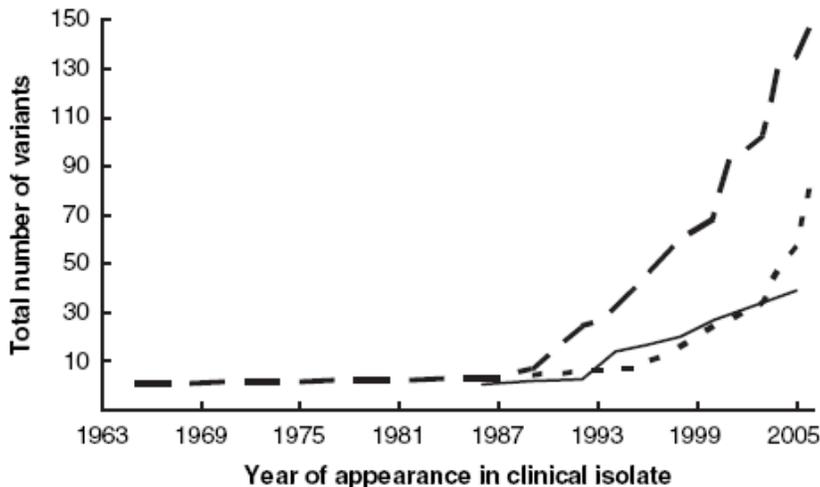


Figura 3. Incremento en la incidencia de BLEE de clase A. El incremento en el número total de variantes tipo TEM (línea discontinua), SHV (línea punteada) y CTX-M (línea sólida) de acuerdo al año en que el asilamiento fue reportado <sup>22</sup>.

### **$\beta$ -lactamasas de clase C**

La enzima que se reportó por primera vez que tenía la capacidad de hidrolizar penicilina fue una  $\beta$ -lactamasa de la clase C, denominadas AmpC y fue identificada de *E. coli* <sup>23</sup>. Esta clase de enzimas son activas contra penicilina pero aún más activa contra cefalosporinas y además pueden hidrolizar cefamicinas, como cefoxitin y cefoteten; oxyminocefalosporinas como ceftazidima, cefotaxima y monobactams como aztreonam. Los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas de la clase A como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam tienen menos efecto en las  $\beta$ -lactamasas ampC, no obstante algunas son inhibidas por sulbactam y tazobactam <sup>24</sup>. La estructura tridimensional conocida de varias enzimas AmpC son muy similares. Consiste de un dominio  $\alpha$  en un lado de la molécula y un dominio  $\alpha/\beta$  por el otro lado. El sitio activo está constituido por una serina la cual yace en el centro de la molécula <sup>25</sup>. En comparación con las  $\beta$ -lactamasas de clase A, esta clase de enzimas tienen un loop y una estructura adicional en la superficie del dominio de  $\alpha$ -hélices, a distancia del sitio catalítico. La serina activa está situada en un N-terminal largo, en la primer hélice hidrofóbica del dominio de  $\alpha$ -hélices <sup>26</sup> (Figura 4B).

La expresión de AmpC en enterobacterias es baja, pero es inducida en respuesta a la exposición a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. El mecanismo de inducción consiste en la interrupción de la biosíntesis de la mureína por el antibiótico  $\beta$ -lactámico, lo que permite la acumulación del oligopéptido ácido N-acetilglucosamina-1,6-anhidro-N-acetilmurámico. La fracción de N-acetilglucosamina es removida al producir una serie de tri, tetra y pentapéptidos de ácido 1,6-anhidro-N-acetilmurámico. Estos oligopéptidos compiten con el ácido UDP-N-acetilmurámico por la unión al sitio AmpR, un regulador transcripcional miembro de la familia LysR. El desplazamiento del péptido ácido UDP-N-acetilmurámico genera un cambio conformacional en AmpR, el cual activa la transcripción de *ampC*<sup>27</sup>.

En adición la célula tiene una amidasa N-acetil-muramil-L-alanina citoplasmática, (*ampD*) que remueve el enlace peptídico del ácido 1,6-anhidro-N-acetilmurámico y el oligopéptido ácido N-acetilglucosamina-1,6-anhidro-N-acetilmurámico, reduciendo así su expresión previniendo la sobreexpresión de AmpC. La causa más común de sobreexpresión de AmpC en aislamientos clínicos es la mutación en *ampD*, permitiendo una hiperinducibilidad o hiperproducción constitutiva de AmpC<sup>28</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas *ampC* contenidas en plásmidos fueron descritas por primera vez en 1989. Estas enzimas han sido identificadas en aislamientos clínicos involucrados tanto en infecciones nosocomiales como en comunitarias y han sido clasificadas en familias a pesar de las pocas diferencias en sus secuencias de aminoácidos. La familia CMY está constituida por 44 alelos, mientras que en las familias FOX, ACT Y MOX se ha identificado siete variantes, cinco para la familia MIR, cuatro de la familia ACC, dos de la familia DHA y una para cada una de las familias LAT y CFE (<http://www.lahey.org/Studies/>). Estas enzimas plásmidicas han sido identificadas mundialmente, pero son menos comunes que las BLEE de las clase A y D<sup>29</sup>.

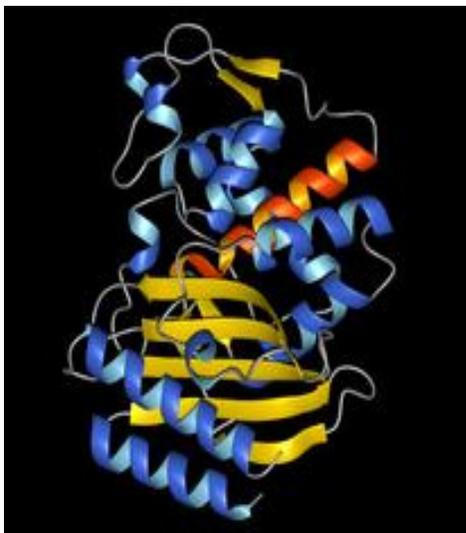
En *E. cloacae* y *E. aerogenes*, la sobreexpresión de AmpC confiere resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, incluyendo cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona, siendo un problema especialmente cuando una de estas bacterias se encuentra involucrada en infecciones hospitalarias. Inicialmente estas bacterias son susceptibles a estos antimicrobianos, pero adquieren la resistencia durante la terapia antimicrobiana. La resistencia debida a *ampC* contenida en plásmidos es menos común que la producción de BLEE en muchas partes del mundo, y pueden ser difíciles de detectar<sup>29</sup>.

## $\beta$ -lactamasas de clase D

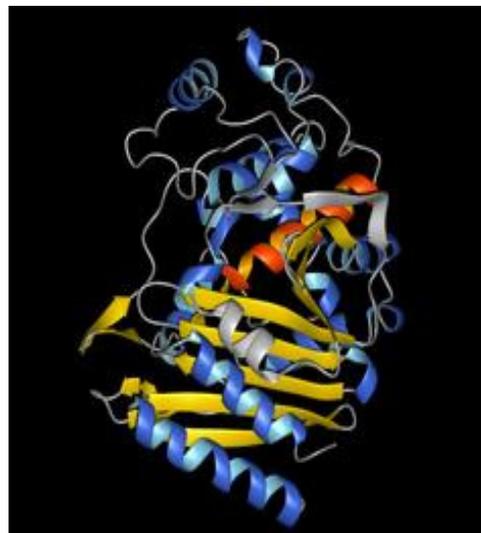
Las  $\beta$ -lactamasas de clase D, son también llamadas PSE (por ser enzimas específicas de Pseudomonas) y OXA, por su capacidad de hidrólisis de oxacilina. Estas enzimas carecen de identidad en su secuencia de aminoácidos contra las  $\beta$ -lactamasas de clase A y C <sup>18</sup> y son pobremente inhibidas por ácido clavulánico. Al igual que las clases A y C, las oxacilinasas contienen serina en el sitio activo <sup>30</sup> y se caracterizan por su perfil de hidrólisis contra penicilinas y cefalosporinas de espectro estrecho, pero son susceptibles a oximino cefalosporinas, aztreonam e carbapenémicos <sup>31</sup>.

Actualmente se han descrito 150 variantes de esta clase de  $\beta$ -lactamasas (<http://www.lahey.org/Studies/>). Dentro de las cuales encontramos varias BLEE derivadas de OXA-10, OXA-1 o OXA-2. Estas BLEEs se caracterizan por ser relativamente resistentes a la inhibición por ácido clavulánico, algunas confieren resistencia a ceftazidima, pero la OXA-17 confiere mayor resistencia a cefotaxima y cefepime en comparación con ceftazidima <sup>32</sup>. Los genes de muchas de estas enzimas han sido descritos formando parte de integrones y/o contenidas en plásmidos <sup>33</sup>. El análisis de la estructura de la OXA-10 (Figura 4C), la cual reveló una estructura dimérica de la enzima (Figura 4D), cada monómero de OXA-10, se pliega como una proteína de dos dominios, unidos por un ión calcio. El primer dominio incluye siete láminas  $\beta$ -antiparalelas junto con las  $\alpha$ -hélices del N- y C- terminales. El segundo dominio está formado por seis  $\alpha$ -hélices conectadas por un asa (loop). La topología de las  $\beta$ -lactamasas de clase D es claramente similar a las  $\beta$ -lactamasas de clase A, a pesar de su baja similitud de aminoácidos (8%) entre OXA-10 y TEM-1 <sup>34</sup>.

(A)



(B)



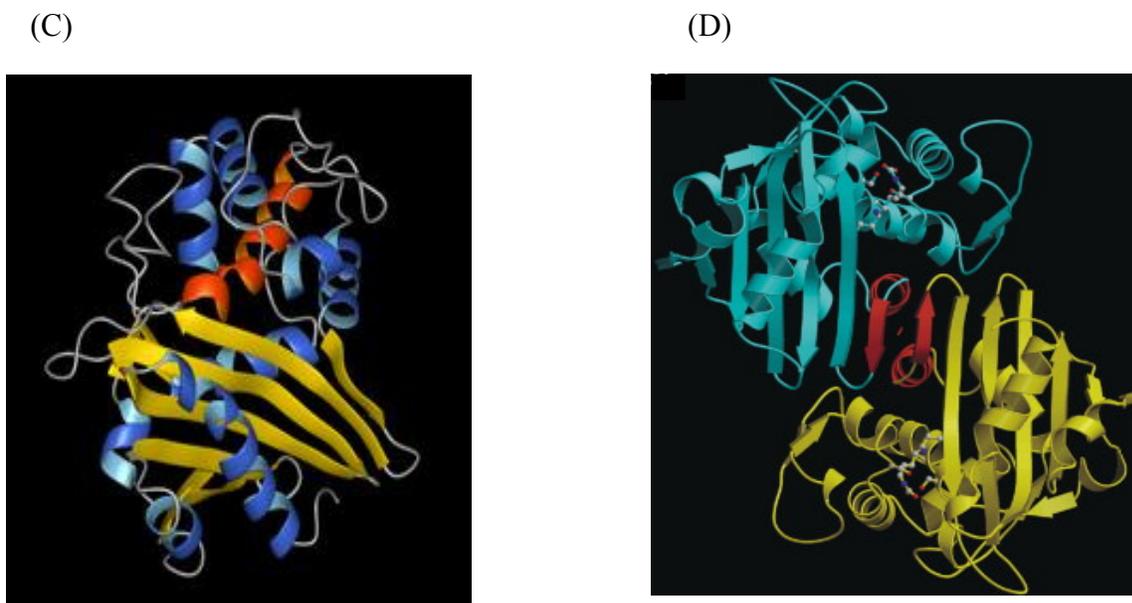


Figura 4. Estructura terciara de las  $\beta$ -lactamasas de clase A (A), clase C (B) y clase D (C). (D) Dimero de la  $\beta$ -lactamasa OXA-10 unida por un i3n calcio de clase D.

## $\beta$ -lactamasas de clase B

En 1980, Ambler categoriz3 a las metallo- $\beta$ -lactamasas como serina- $\beta$ -lactamasas, posteriormente Bush en 1989 las clasific3 como un grupo separado, de acuerdo a sus propiedades bioqu3micas, como la hidr3lisis a imipenem, su sensibilidad a EDTA y la ausencia de inhibici3n por inhibidores propios de las serina- $\beta$ -lactamasas como el 3cido clavul3nico<sup>30</sup>. Este esquema fue actualizado en los a3os 1995 y 1997, 3ste 3ltimo por el aumento en el n3mero de enzimas<sup>18,35</sup>. Todas las M $\beta$ Ls hidrolizan imipenem con diferente efectividad, lo que las clasifica en tres subgrupos (B1, B2, y B3); sin embargo estas enzimas poseen la caracter3stica de ser inhibidas por EDTA, as3 como por otros agentes cati3nicos divalentes<sup>35</sup>. A nivel molecular las M $\beta$ Ls son un grupo separado de prote3nas que hace dif3cil estandarizar su clasificaci3n. Las familias de M $\beta$ Ls IMP, VIM, GIM, SPM y SIM, pertenecen al grupo B1 y se caracteriza por que poseen tres residuos de histidina y una ciste3na, que coordinan al zinc en su sitio activo (Figura 5)<sup>36</sup>.

El mecanismo de hidrólisis de las  $\beta$ -lactamasas de clase B es totalmente distinto al de las otras clases (A, C y D). Estas enzimas contienen uno o dos iones zinc, los cuales son coordinados por iones hidroxilos (OH<sup>-</sup>), para que uno de los iones zinc realicen el ataque nucleofílico del anillo  $\beta$ -lactámico <sup>37</sup>. La estructura terciaria de las metallo- $\beta$ -lactamasas está dividida en dos dominios  $\alpha\beta$  y  $\beta\alpha$  ( $\beta 1\beta 2\beta 3\beta 4\beta 5\alpha 1\beta 6\alpha 2\beta 7\alpha 3$  y  $\beta 8\beta 9\beta 10\beta 11\alpha 4\beta 12\alpha 5$ ) que corresponden a los dominios N-terminal y C-terminal, respectivamente (Figura 5). El centro de la molécula está formado por dos capas  $\beta$  y rodeado por las 5  $\alpha$  hélices <sup>38</sup>.

La distribución de las familias IMP y VIM es mundial y en México fueron recientemente descritas <sup>39,40</sup>. La implicación clínica de bacterias que poseen una M $\beta$ Ls es por su habilidad de conferir resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos *in vivo*, causando falla terapéutica en los pacientes infectados particularmente por *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacteriaceae. Las M $\beta$ Ls representan una amenaza clínica debido a su incomparable espectro de actividad y su resistencia a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas que actúan sobre las serin- $\beta$ -lactamasas (clases A, C y D) <sup>41</sup>. Este tipo de enzimas han tomado una gran importancia en los últimos años y se han reportado diversas revisiones al respecto <sup>42-48</sup>.



Figura 5. Estructura terciaria de la metallo- $\beta$ -lactamasa de clase B, en el centro de la molécula se observan dos átomos de zinc.

## Residuos conservados en las enzimas que reconocen penicilina

Un conjunto de amino ácidos conservados son responsables a una red de uniones de hidrógeno en la cavidad del sitio activo (Figura 6) en las enzimas que hidrolizan penicilinas y las PBPs; este conjunto está distribuido en cuatro elementos. El primer elemento está formado por la secuencia de Ser<sup>70</sup>-Xaa-Xaa-Lis<sup>73</sup> (S-X-X-K), la cadena lateral de los residuos de serina y lisina apuntan hacia el sitio activo. El segundo elemento está situado en una asa corta en el dominio de  $\alpha$ -hélices, este consiste de la secuencia de Ser-Xaa-Asn en  $\beta$ -lactamasas de clase A (Thr-Xaa-Asn,  $\beta$ -lactamasas de clase C). Las cadenas laterales del primer y tercer residuo apuntan hacia el sitio activo. El motivo Ser<sup>130</sup>-Asp<sup>131</sup>-Asn<sup>132</sup> en las  $\beta$ -lactamasas de clase A, es también llamado asa SDN. El tercer elemento denominado KTG, se encuentra en el interior de la estructura de una lámina  $\beta$  (dominio  $\alpha/\beta$ ) y forma la pared opuesta en la cavidad catalítica. Este es generalmente la secuencia Lis-Thr-Gli, donde Lis es remplazada por His o Arg en pocas excepciones y Thr por Ser en varias  $\beta$ -lactamasas de clase A. El cambio en cualquiera de estas cadenas laterales perjudica la actividad por el substrato. La cadena lateral del residuo de Lis forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo del residuo de Ser/Tir del segundo elemento (Figura 6). Un cuarto elemento contiene un residuo cargado negativamente, el cual está situados en un asa (Arg<sup>161</sup>-Asn<sup>179</sup> en TEM-1), el cual es referido como el asa- $\Omega$ <sup>26</sup>. En muchos casos esta asa contiene los residuos Glu<sup>166</sup>-Xaa-Glu-Leu-Asn<sup>170</sup>, donde los residuos Glu<sup>166</sup> y Asn<sup>170</sup> parecen ser esenciales en posicionar una molécula de agua (W1), muy cercana al sitio activo<sup>49</sup>.

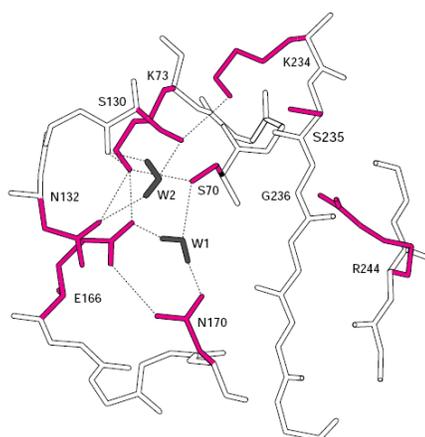


Figura 6. Residuos y red de enlaces de hidrogeno en el sitio activo de la  $\beta$ -lactamasas TEM-1. Los residuos que forman parte de los cuatro elementos son mostrados en color. Las dos moléculas de agua que forman parte en el proceso de catálisis son mostradas (W1 y W2)<sup>26</sup>.

## Hidrólisis de los Antibióticos $\beta$ -Lactámicos por las $\beta$ -lactamasas

Las  $\beta$ -lactamasas hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico tanto en penicilinas y cefalosporinas, por lo tanto destruyen la actividad antibacterial por la desactivación de la estructura química de la molécula. La hidrólisis es la reacción que ocurre en las primeras etapas de la reacción, que involucra la formación acil-enzima, posteriormente ocurre el ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del anillo  $\beta$ -lactámico, con la consiguiente formación de un intermediario tetraédrico, seguida de la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico y la transferencia de un hidrógeno al nitrógeno lactámico (Figura 7) <sup>26</sup>.

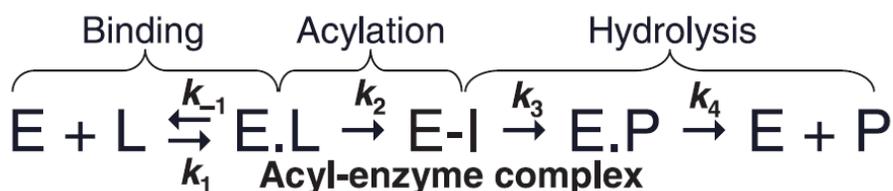


Figura 7. Mecanismo de hidrólisis de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos por las  $\beta$ -lactamasas.

El número de recambio (turnover)  $k_{\text{cat}}$ , depende en la velocidad de interconversión de los intermediarios, especialmente la velocidad de formación e hidrólisis de complejo acil-enzima. Por lo tanto este es el mejor parámetro para describir la actividad hidrolítica de las  $\beta$ -lactamasas. La constante aparente de afinidad o saturación  $K_M$  (es la constante de Michaelis), incluye todas las constantes de velocidad en la hidrólisis del antibiótico  $\beta$ -lactámico. La constante de velocidad de segundo orden  $k_{\text{cat}}/K_M$ , también conocida como eficiencia catalítica, depende solamente de la constante de velocidad involucrada en la formación del intermediario acil-enzima y no en los pasos involucrados que contribuyen a la hidrólisis <sup>26</sup>. El mecanismo de hidrólisis de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se esquematiza en la figura 9 y se manifiesta en; la velocidad de asociación ( $k_1$ ), velocidad de disociación ( $k_{-1}$ ), velocidad de acilación ( $k_2$ ) y la velocidad de hidrólisis ( $k_3$ ). Cambios significativos en  $k_{\text{cat}}$  puede ocurrir solamente si  $k_2$  y  $k_3$  son alterados; cambios significativos en la  $K_M$  podrían resultar de cambios en la velocidad de asociación y disociación o la velocidad de hidrólisis, mientras cambios grandes en  $k_{\text{cat}}/K_M$ , podrían ser esperados solo como resultado de un incremento en la velocidad de asociación (Figura 7).

La benilpenicilina es hidrolizada rápidamente prácticamente por todas las  $\beta$ -lactamasas de clase A, mostrando una cinética simple y lineal, donde la consecuencia es la abertura del anillo tiazolidina. En cuanto a cefalotina y cefaloridina, ambos antibióticos son cefalosporinas de primera generación y son también hidrolizados rápidamente por  $\beta$ -lactamasas de clase A, sin embargo presentan una cinética no lineal, debido a sus sustituyentes 3'. El sustituyente acetoxi en cefalotina y el piridinium de cefaloridina genera una vía con cinética transiente de inhibición (no lineal), esta característica puede ser observada con algunas enzimas. La cefotaxima fue una de las primeras cefalosporinas de tercera generación que se caracteriza por la cadena lateral oximino acil, largo y flexible, siendo más difícil de acomodarse en el sitio activo de la  $\beta$ -lactamasa de clase A. En cefatzidima la carga negativa del grupo oximino del antibiótico es repelido por las cadenas laterales de los aminoácidos que rodean el sitio activo de las  $\beta$ -lactamasas de clase A (Glu104, Glu240), por consiguiente la hidrólisis de este antibiótico por las BLEE ha sido resuelto por cambios de aminoácidos en alguna de estas posiciones en la proteína

22

## **Evolución de las $\beta$ -lactamasas**

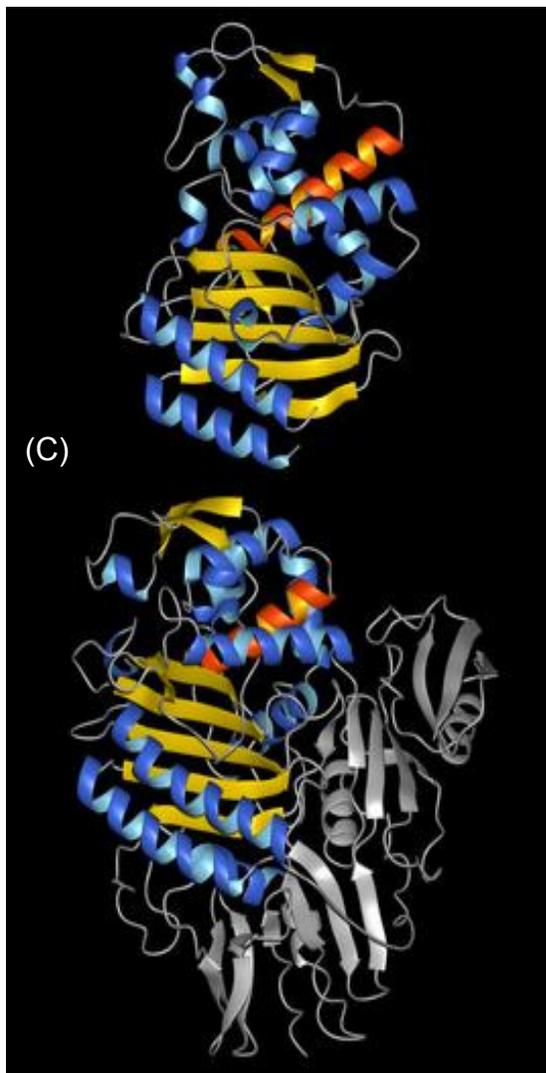
Las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs), son enzimas involucradas en la biosíntesis de la pared celular, estas enzimas son el blanco de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y las  $\beta$ -lactamasas son las enzimas que hidrolizan estos antibióticos. Ambas enzimas están relacionadas desde un punto de vista evolucionario<sup>50</sup>. Los primeros indicios que indicaron la relación entre la D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa/transpeptidasa (DD-peptidasa) como el ancestro de las  $\beta$ -lactamasas fueron la homología de las estructuras tridimensionales determinadas mediante cristalografía de rayos-X (Figura 8) y la similitud en sus vías catalíticas<sup>51,52</sup>. Ambas enzimas al interactuar con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos los parámetros cinéticos,  $k_{cat}/K_M$  (acilación) y  $k_3$  (deacilación) que corresponden al primer y segundo paso de catálisis en ambas enzimas difieren significativamente. En los años 90's se describió que las  $\beta$ -lactamasas son altamente eficientes en la hidrólisis de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, pero sin embargo las DD-peptidasas no tenían actividad contra estos antibióticos<sup>53</sup>. No obstante, posteriormente se identificó que algunas DD-peptidasas pueden hidrolizar los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y algunas  $\beta$ -lactamasas tienen actividad marginal de peptidasa<sup>54,55</sup>.

Como se describió anteriormente tanto las PBPs como las  $\beta$ -lactamasas (clases A, C y D) son

enzimas con serina en el sitio activo. Este residuo en ambas enzimas acilan el peptidoglicano en las PBPs y los antibióticos por las  $\beta$ -lactamasas. No obstante, los  $\beta$ -lactámicos inhiben a las PBPs ya que el antibiótico interviene en subsecuentes pasos de la catálisis del peptidoglicano al acilar el antibiótico  $\beta$ -lactámico. Para que una PBP haya evolucionado a una  $\beta$ -lactamasa, debió haber adquirido la habilidad de deacilar de alguna enzima con ésta habilidad. Ya que se requieren dos procesos (acilación seguido por deacilación) para completar la vía de hidrólisis que destruye los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Este proceso de adquisición de los dos procesos ha sido refinado por la substitución de aminoácidos, inserciones y/o deleciones durante una escala de tiempo de evolución. Esta perfección en la catálisis, al menos por las  $\beta$ -lactamasas de clase A está limitado por la difusión del sustrato al sitio activo para ser hidrolizado <sup>54</sup>.

Se ha confirmado que las  $\beta$ -lactamasas de clase A y C, evolucionaron por vías independientes <sup>54</sup>, cada una de diferentes clases de PBPs (Figura 8). Estas diferencias en los mecanismos de acilación entre estas clases de enzimas ha sido confirmado <sup>55</sup>, cuya diferencia radica en el segundo paso del recambio (turnover). En adición las PBPs mostraron tener dos moléculas de agua, la primera enfocada hacia el antibiótico, ocupando exactamente el mismo espacio que ocupa la molécula de agua en todas las  $\beta$ -lactamasas de clase A, sin embargo las PBPs carecen del mecanismo para la activación de la hidrólisis. Así la evolución preveo el medio para la deacilación en las enzimas de clase A por la inserción de la estructura secundaria denominada omega-loop ( $\Omega$ -loop), el cual está altamente conservado con el aminoácido Glu-166 para la activación de una molécula de agua en el paso de hidrólisis. En el caso de las  $\beta$ -lactamasas de clase C, la molécula de agua enfocada en la cara  $\beta$  del antibiótico, el cual es inactivado por el ambiente electroestático creado por el nitrógeno del propio sustrato (antibiótico  $\beta$ -lactámico) y la Tir-150 facilita la reacción de hidrólisis de las enzimas de clase C. En general la inserción de segmentos, así como mutaciones y su posterior selección en las proteínas de ambas clases de  $\beta$ -lactamasas, generaron mecanismos de catálisis poderosos los cuales actualmente son vitales para la sobrevivencia de las bacterias <sup>54</sup>.

(A)



(B)

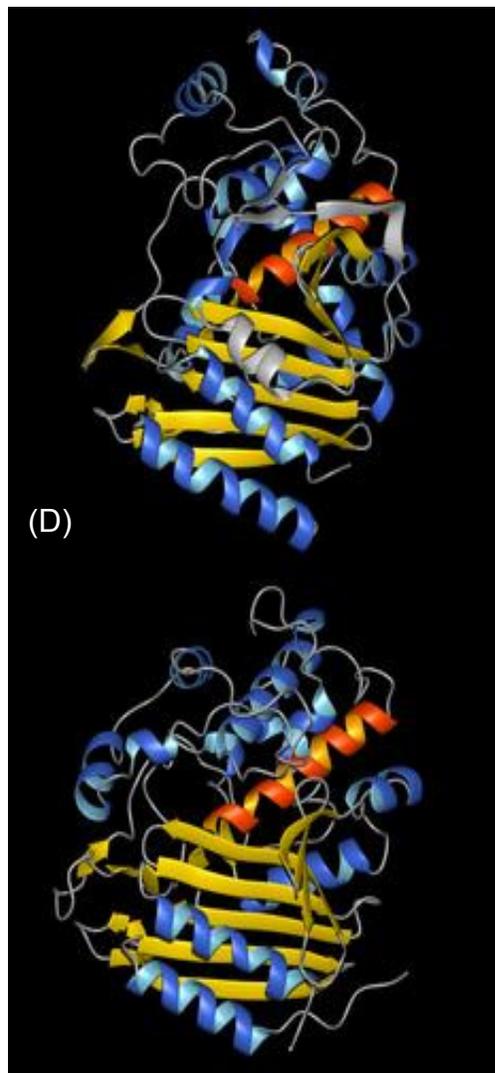


Figura 8. Estructura terciaria de las  $\beta$ -lactamasas de clase A (A) y C (B) y su comparación con las PBP alto (HMW [C]) y bajo (LMW [D]) peso molecular. La  $\alpha$ -hélice esquematizada en color naranja corresponde al motivo SXXX (S, serina catalítica); las láminas  $\beta$ -antiparalelas conservadas entre las diferentes proteínas son mostradas en azul.

### Definiendo una $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)

Las penicilinas de amplio espectro desarrolladas durante los años 60s (Tabla 1) y el surgimiento de la resistencia a estos antibióticos por la adquisición de  $\beta$ -lactamasas por las bacterias, las cuales crecieron en número rápidamente. Por consiguiente una clasificación fue propuesta por Richmond y

Sykes en 1973 <sup>56</sup>. Esta clasificación se propuso en base a perfiles de hidrólisis, susceptibilidad a inhibidores y si estas enzimas se encuentran codificadas en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. Posteriormente en 1987 el término de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro fue aplicado a las enzimas que hidrolizan las oximino cefalosporinas derivadas de TEM y SHV <sup>57</sup>. La palabra amplio espectro fue eliminada por Karen Bush en 1989, al nombrarlas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) a aquellas  $\beta$ -lactamasas inhibidas por ácido clavulánico con la capacidad de hidrolizar oximino cefalosporinas a una velocidad de por lo menos 10% más en comparación con bencilpenicilina <sup>58</sup>. En este sentido el término BLEE fue acuñado cuando pocas  $\beta$ -lactamasas eran conocidas y fue útil para los alelos de las familias TEM y SHV, porque tienen una velocidad alta ( $k_{cat}$ ) de hidrólisis de oximino cefalosporinas, además tienen un espectro de actividad mayor cuando se comparan con TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Como el número de  $\beta$ -lactamasas creció considerablemente, las enzimas han sido llamadas BLEEs en base a los criterios de las BLEEs tipo TEM y SHV o debido solamente por conferir resistencia, más que por la habilidad de hidrolizar oximino cefalosporinas. Para varias enzimas no consideradas como BLEE, en especial las variantes tipo OXA, hace falta evidencia de su actividad contra cefalosporinas en ensayos tradicionales. Las BLEEs son enzimas ampliamente aceptadas y debería seguir siendo así, por consiguiente la definición de BLEE debería ser aplicado a cualquier  $\beta$ -lactamasas con la capacidad de conferir resistencia a oximino cefalosporinas, pero no a carbapenémicos o que tiene un incremento en la habilidad de hidrolizarlos cuando se compara con miembros clásicos de su familia genética. Por lo que se propone que una BLEE se debe especificar como BLEE TEM, BLEE OXA o BLEE CTX-M, de acuerdo a su familia genética y esto podría resolver muchas confusiones al momento de describir estas enzimas <sup>59</sup>.

## **Estructura moleculares involucradas en la multirresistencia**

Los genes de resistencia a los antibióticos han permitido a los microorganismos expandir su nicho ecológico, permitiendo su proliferación en diferentes medios. Desde este punto de vista no es sorprendente que los genes de resistencia a antibióticos estén asociados con elementos genéticos móviles como plásmidos, los cuales generalmente contienen transposones y/o integrones <sup>60</sup>.

Los plásmidos son elementos extracromosomales de DNA que se replican autónomamente (replicón) que se encuentran comúnmente en bacterias, arqueas y levaduras. Los plásmidos regularmente contienen información genética útil solo bajo condiciones atípicas y son perdidos algunas veces por la célula en ambientes sin presión selectiva. Los plásmidos frecuentemente están asociados con genes que les confieren; 1) resistencia a antibióticos, metales pesados y luz ultravioleta; 2) virulencia; 3) producción de bacteriocinas (toxinas); 4) degradación de compuestos orgánicos tóxicos; y 5) genes que le confieren la habilidad de transferir material genético de una célula a otra <sup>61</sup>.

Los genes asociados con plásmidos están frecuentemente localizados en segmentos móviles de DNA conocidos como transposones y secuencias de inserción. Estos elementos incluyen determinantes que les permiten realizar una recombinación sitio específico o aún ilegítimo que facilita el movimiento de una molécula de DNA a otra. En algunos casos las estructuras intermediarias de transposición representan una fusión de dos replicones (cointegrado), entre dos plásmidos o un plásmido con un cromosoma. En otros casos el elemento movable se escinde de un replicón y se inserta en otro. Los genes comúnmente localizados en transposones incluyen genes que confieren resistencia a antibióticos <sup>62</sup>.

Los plásmidos pueden ser circulares o lineales y su rango en tamaño va desde muy pequeños (menores de 1 kb) y hasta una megabase (o más). Las bacterias pueden contener simultáneamente una variedad de diferentes plásmidos, como es el caso de algunas cepas de *Borrelia burgdorferi* en donde se han identificado hasta 20 plásmidos, tanto plásmidos lineales como circulares <sup>63</sup>. Los plásmidos circulares son estructuras cerradas covalentemente, a diferencia de los lineales, que están doblados en los extremos o tienen proteínas asociadas que están covalentemente unidas <sup>64</sup>.

El control de la replicación de los plásmidos es independiente de la maquinaria enzimática del hospedero, siendo determinado por secuencias en el propio plásmido. Los plásmidos regulan la frecuencia de iniciación de la replicación mediante la función de una o más proteínas “rep” en el sitio de replicación (oriV) <sup>65</sup>. Plásmidos relativamente grandes (>35 kb) están usualmente presentes en una a pocas copias por cromosoma bacteriano, mientras que los plásmidos pequeños (<10kb) pueden tener un número de copias mayor de 20 <sup>66</sup>.

Los plásmidos también controlan el mecanismo por el cual ellos son distribuidos a las células hijas durante la división celular (partición). Un mecanismo común involucra genes “par” contenidos en el plásmido que liga al DNA plasmídico a un componente del aparato de segregación de la célula hospedera <sup>67</sup>. Los plásmidos son clasificados dentro de grupos de incompatibilidad, donde miembros del mismo grupo o familia, comparten proteínas similares de control Rep y/o Par provocando incompatibilidad entre los plásmidos dentro de una célula bacteriana. Los grupos de incompatibilidad son designados “Inc” (IncA, IncB) <sup>68</sup>.

Una característica importante de muchos plásmidos es la habilidad de transferir una copia del plásmidos de una bacteria a otra, mediante contacto célula-célula, un fenómeno conocido como conjugación <sup>69</sup>. Estos plásmidos generalmente codifican la información necesaria para tener contacto entre la célula donadora y receptora. En el caso de numerosas bacterias Gram-negativas como *E. coli* involucra la síntesis de pilus que une a ambas células. En cuanto a Gram positivas como *Enterococcus faecalis*, secreta un péptido que funciona como una feromona sexual, permitiendo la unión de la célula donante y receptora <sup>70,71</sup>.

La inducción de pilus incluye la formación de proteínas codificadas en el plásmido que facilite el contacto entre la célula donadora y receptora, tan bien como un número de genes cuyos productos son necesarios para pasar el DNA a la célula receptora. La transferencia de DNA involucra el corte de una de las hebras del DNA en un sitio específico, denominado origen de transferencia (oriT). Este es seguido por la transferencia de una hebra de DNA, con la síntesis de la correspondiente hebra complementaria durante la transferencia tanto en la célula donadora y receptora <sup>72,73</sup>.

Existen plásmidos que son incapaces de transferirse autónomamente, sin embargo pueden transferirse en la presencia de otro plásmido. Aún otros plásmidos son incapaces de transferirse al menos que se integren dentro un plásmido mobilizable. En algunos casos, como el plásmido F de *E. coli*, la integración al cromosoma de *E. coli* puede proveer el potencial para transferir todo el cromosoma o parte de él. La cointegración de dos plásmidos o un plásmido al cromosoma pueden resultar de la recombinación de regiones de homología, como secuencias de inserción o como parte del mecanismo asociado con el movimiento de secuencias de inserción o transposones <sup>74,75</sup>.

La habilidad de los plásmidos de seleccionar genes asociados es una característica importante que contribuye en su evolución. Los plásmidos con alto número de copias proveen un medio por el cual los genes que se mueven del cromosoma al plásmido y pueden mostrar un incremento en la dosis génica, dando lugar a una expresión amplificada. La dispersión de plásmidos vía transferencia horizontal también corresponde a una forma de amplificación, así como el número total de moléculas de plásmido, junto con los genes que contiene en el incremento de poblaciones bacteriana. Tales plásmidos pueden liberar o tomar elementos transponibles que pasan a través de varias poblaciones. La colección de genes específicos por los plásmidos puede iniciar por medio de eventos de recombinación azarosos, sin embargo en el medio da lugar a la diseminación (incremento en el número de copias) y promueve la acumulación de ciertos determinantes. La extensa aparición de resistencia a múltiples antibióticos en las bacterias es de relevancia clínica, en muchos casos está relacionada con la recopilación de transposones en plásmidos conjugativos. Algunos plásmidos son capaces de transferirse a especies en las cuales ellos son no capaces de replicarse, sin embargo, la inserción dentro del cromosoma u otro plásmido en el nuevo hospedero puede ser posible. Los progresos recientes en la secuenciación completa de genomas de muchas especies bacterianas ha revelado el amplio grado de transferencia horizontal, la cual ha tenido impacto en la evolución bacteriana <sup>76</sup>.

Los fragmentos de DNA móviles que tienen tanto las propiedades de un transposón como de un plásmido, son los denominados transposones conjugativos, elementos que son incapaces de replicarse autónomamente pero son capaces de escindirse de un replicón (como el cromosoma bacteriano). Al hacer esto, asumen una estructura circular con funciones de conjugación (con un *oriT* y genes que permiten su transferencia) y son insertados en otro replicón en la célula o transferido e insertado en el genoma de un nuevo hospedero. La evolución de estos elementos está probablemente relacionada con los plásmidos. Un ejemplo bien estudiado es el transposón conjugativo *Tn916*, que confiere la resistencia a tetraciclina <sup>77</sup>.

Los integrones son un mecanismo de incorporación de genes de resistencia, que permite la expresión de genes carentes de un promotor, convirtiéndolos en funcionales. Así el integrón actúa como un cassette de expresión para los genes insertados; por lo general, más de un gen de resistencia es frecuentemente encontrado. Los integrones de clase 1 son los más ampliamente estudiados y se han identificado ampliamente en aislamientos clínicos <sup>60,78-80</sup>. Los integrones son elementos de DNA móvil

con la habilidad de capturar genes, particularmente aquellos que codifican resistencia a antibióticos, por recombinación sitio-específica. Los genes de resistencia que capturan los integrones están localizados entre el gen que se encarga de capturarlos (integrasa) y dos genes de resistencia que tienen todos los integrones; *qacE*, resistencia a antisépticos y desinfectantes y *sull*, resistencia a sulfonamidas (Figura 9). Este casete puede existir libremente como DNA circular, pero no puede replicarse o ser transcrito de esta forma por lo cual requiere ser incorporado al integrón. Así pueden incorporarse varios genes, los cuales se seleccionan mediante al uso de antibióticos en el ambiente. Esto le permite a las bacterias presentar resistencias elevadas a múltiples antibióticos que se están utilizando con mayor frecuencia <sup>81</sup>.

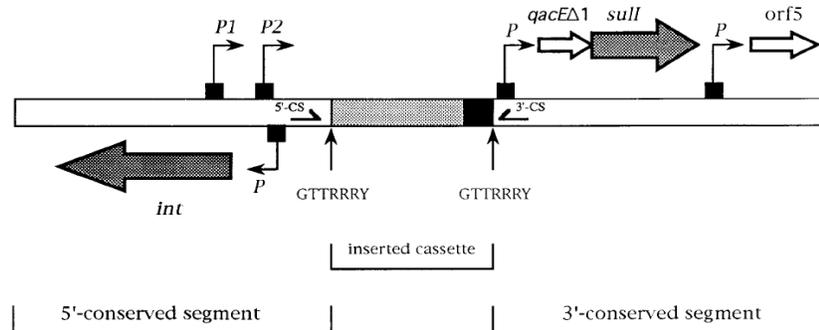


Figura 9. Estructura general de los integrones de clase 1. Las flechas muestran la dirección de los transcritos. La localización y orientación de los diferentes promotores son mostradas. La secuencia GYYRRRY es el punto de recombinación del gen casete integrado. Los oligonucleótidos 5' CS y 3'CS son específicos de los segmentos conservados respectivamente. Un gen casete integrado es mostrado con su asociación con su elemento de 59-pb indicado por la barra negra. *Int*, gen de la integrasa; *qacEΔ1* gen de resistencia a antisépticos y desinfectantes; *sull*, gen de resistencia a sulfonamidas y *orf5*, gen con función desconocida.

Esta incorporación de genes catalizados por la integrasa (que además puede eliminar también genes), resulta en una elevada diseminación de genes de resistencia. Esta flexibilidad genética ha generado numerosos arreglos de genes bajo la presión selectiva de antibióticos, generando por lo menos 50 arreglos en enterobacterias <sup>82</sup>. La plataforma de los integrones está asociada con transposones y a su vez, estos con plásmidos conjugativos de alto peso molecular, que sirven como vehículo para la transmisión intra e interespecífica del material genético entre diferentes géneros de bacterias <sup>83</sup>.

## Enterobacterias productoras de BLEEs

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) son enzimas con la capacidad de hidrolizar eficientemente una gran variedad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos incluyendo oxiamino-cefalosporinas y aztreonam <sup>84</sup>. Los genes que codifican BLEES generalmente se encuentran en plásmidos, junto con genes que codifican el mecanismo de resistencia a aminoglucósidos, trimetoprim con sulfametoxazol y más recientemente a quinolonas. Esto representa un problema creciente en instituciones de cuidados de la salud <sup>85</sup>. Las BLEES se detectan más comúnmente en *K. pneumoniae* y *E. coli*; este último microorganismo es una causa de infecciones considerables adquiridas en la comunidad y en el hospital. Las infecciones en el torrente sanguíneo con *K. pneumoniae* pueden surgir de los pulmones (neumonía adquirida en la comunidad y por el uso de ventiladores), vías urinarias, patologías intra-abdominales e infecciones relacionadas con las líneas venosas centrales.

El estudio SENTRY, concerniente a enterobacterias productoras de BLEE, señaló que Latinoamérica constituye una de las regiones en el mundo con una alta prevalencia (45%) <sup>86</sup>. En México, varios estudios incluyendo brotes causados por *K. pneumoniae* productora de BLEEs han mostrado un fenotipo resistente a múltiples fármacos con altas tasas de morbilidad y mortalidad <sup>87,88</sup>. La propagación de la resistencia se ha identificado por clones endémicos y/o por un plásmido que alberga los genes de *bla*<sub>SHV</sub>-derivada o *bla*<sub>TLA-1</sub> que son las principales enzimas BLEE propagadas en hospitales mexicanos <sup>89,90</sup>. Recientemente hemos reportado que estas BLEEs se encuentran también en *S. marcescens* <sup>91</sup> y un estudio respectivo mostró que desde los años 90's estas enzimas se encuentran circulando en aislamientos clínicos causantes de infecciones nosocomiales y que inclusive algunas cepas han formado parte de brotes intrahospitalarios <sup>92</sup>. En los últimos años se han reportado numerosos trabajos de la relación entre aislamientos clínicos productores de BLEE y la producción de determinantes *qnr* (genes que confieren resistencia a quinolonas) que generalmente se encuentra contenidos en el mismo plásmido el cual puede ser transferido por conjugación a otros géneros bacterianos <sup>93-95</sup>.

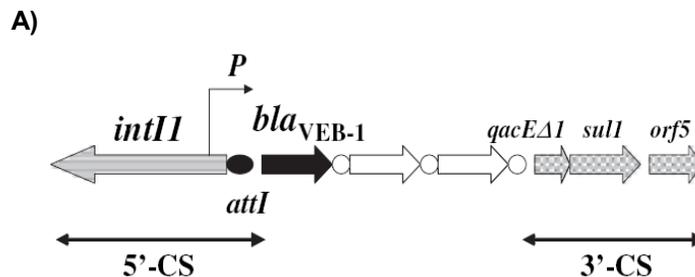
## Elementos genéticos que contienen BLEEs

Las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 y SHV-1 fueron las primeras penicilinasas descritas de ambas familias. Las tipo TEM son consideradas las más comunes, sin embargo las tipo SHV son también muy frecuentes. Las 177 variantes tipo TEM descritas de esta familia derivan de las penicilinasas TEM-1 y TEM-2 y fueron identificadas en los primeros transposones bacterianos denominados Tn1, Tn2 y Tn3 <sup>96</sup>. Los dos primeros, se caracterizan por contener una transposasa (*tnpA*) y una resolvasa (*tnpR*); por su parte el transposón Tn3 de clase II (contiene secuencias invertidas repetidas de 38pb), se ha descrito ser capaces de transponer eficientemente el marcador de resistencia a ampicilina *bla*<sub>TEM-1</sub> o en su caso a  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro cuando el determinante TEM codifica para una BLEE (Figura 10).



Figura 10. El transposón Tn3 contiene el gen de la  $\beta$ -lactamasa TEM-1. Los invertidos repetidos están representados por rectángulos negros.

La VEB-1 y GES-1 fueron identificadas formando parte de un integrón de clase 1, como el In53 y In52 respectivamente (Figura 11A) <sup>97,98</sup>. En el caso de las BLEEs CTX-M las secuencias de inserción *ISEcp1*, *ISCR1* (elementos CR1) y elementos relacionados a fagos han sido identificados al estar involucrados en la adquisición de estas BLEEs (Figura 11B) <sup>99</sup>. La BLEE cromosomal PER-1 reveló formar parte de un transposón compuesto (llamado Tn1213), formado por *ISPa12* se identificó río arriba del gen generando un promotor eficiente <sup>100</sup>.



B)

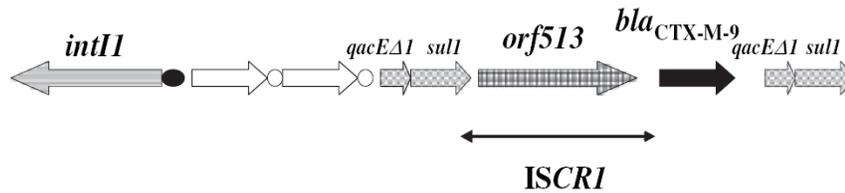


Figura 11. A) Integrón de clase 1 que contiene el gen de la BLEE VEB-1. Los genes *intI1*, gene de la integrasa; *attI*, sitio de recombinación (circulo negro). Las flechas indican los genes, mientras los círculos blancos representan a los elementos de 59-pb. La flecha delgada corresponde a la secuencia del promotor para la expresión de la región variable. B) Un integrón tipo *sul1*, que contiene el gene de la BLEE CTX-M9, comprende el integrón de clase 1 con sus genes asociados con el elemento *ISCR1* (ORF513 Transposasa) y una duplicación en tandem de los genes *qacEΔ1/sul1*.

## Estructura y elementos genéticos relacionados con los genes de las $\beta$ -lactamasas tipo SHV

La primera  $\beta$ -lactamasa SHV-1 (denominada PIT-2) fue descrita en 1988<sup>101</sup>. Cuyo ancestro de esta clase resulto estar codificado en el cromosoma de *K. pneumoniae*<sup>102</sup>, cuyo gen corresponde a la SHV-11. Esta variante se descubrió recientemente ser el gen ancestro de esta familia de  $\beta$ -lactamasas<sup>103</sup>. La  $\beta$ -lactamasa SHV-1 corresponde a una penicilinasas de 256 residuos que conserva los motivos de las  $\beta$ -lactamasas de clase A, involucrados en formar una red de enlaces de hidrogeno con el antibiótico  $\beta$ -lactámico dentro del sitio catalítico (Figura 6). El ataque nucleofílico del anillo  $\beta$ -lactámico es realizado por el grupo hidroxilo de la serina 70 de la proteína. La deacilación del antibiótico se lleva a cabo con ayuda del Glu-166, que actúa como un abstractor de protones con moléculas de agua posicionadas estratégicamente. Otros aminoácidos como Lis-73, Ser-130 y Lis-234 son requeridos para la hidrólisis eficiente de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos<sup>26</sup>. La estructura tridimensional de esta proteína (Figura 12) consiste en dos dominios, uno  $\alpha/\beta$ , que incluye cinco capas  $\beta$  antiparalelas, rodeado por  $\alpha$  hélices y el otro dominio completo de  $\alpha$  hélices<sup>104</sup>.

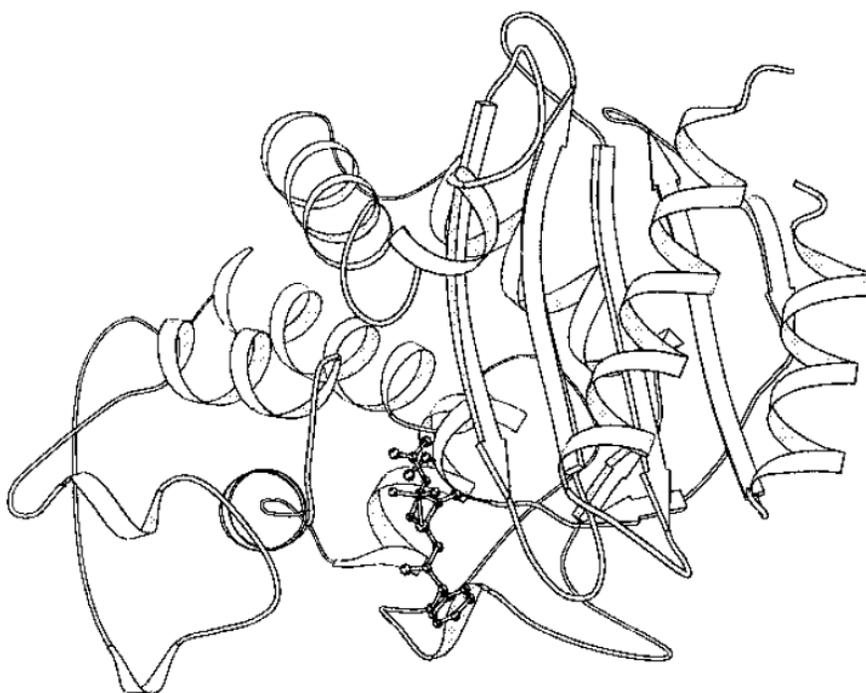


Figura 12. Estructura de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1, el antibiótico ampicilina ha sido acoplado en la posición cerca de la serina 70.

La primera BLEE de esta familia fue la SHV-2 que se diferencia con la SHV-1 con una sola mutación Ser-238-Gli, la cual le permite hidrolizar cefalosporinas de tercera generación (preferentemente cefotaxima) <sup>105</sup>, posteriormente la otra enzima que presenta una actividad más amplia contra cefalosporinas fue la SHV-5 que, además de presentar la mutación Ser-238-Gli, contiene Lis-240-Glu (Tabla 3) <sup>106</sup>. En ambas enzimas los cambios afectan la geometría y las propiedades fisicoquímicas del sitio activo de la proteína, causando principalmente un aumento o relajamiento del sitio activo, lo que permite a los antibióticos oximino- $\beta$ -lactámicos (cefalosporinas) acomodarse para una hidrólisis eficiente <sup>107</sup>. Al remontarnos al inicio de este proyecto (Febrero del 2002), sólo se habían descrito 12 variantes (SHV-1a SHV-12; Tabla 3) <sup>26</sup> y actualmente se han identificado 127 variantes (<http://www.lahey.org/Studies/>).

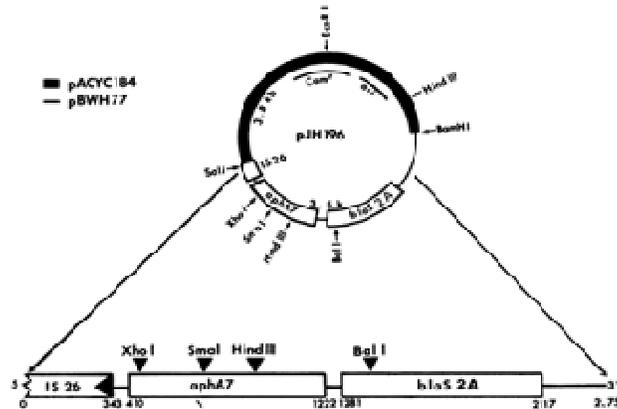
**Tabla 3. Variantes de las  $\beta$ -lactamasas de la familia SHV**

$\beta$ -lactamasa	Posición de los aminoácidos												pI
	8	35	43	54	130	140	179	192	193	205	238	240	
SHV-1	I	L	R	G	S	A	D	K	L	R	G	E	7.6
SHV-2											S		7.6
SHV-2a		Q									S		7.6
SHV-3										L	S		7.0
SHV-4										L	S	K	7.8
SHV-5											S	K	8.2
SHV-6							A						7.6
SHV-7	F		S								S	K	7.6
SHV-8							N						7.6
SHV-9				Del		R		N	V		S	K	8.2
SHV-10				Del	G	R		N	V		S	K	8.2
SHV-11		Q											7.6
SHV-12		Q									S	K	8.2

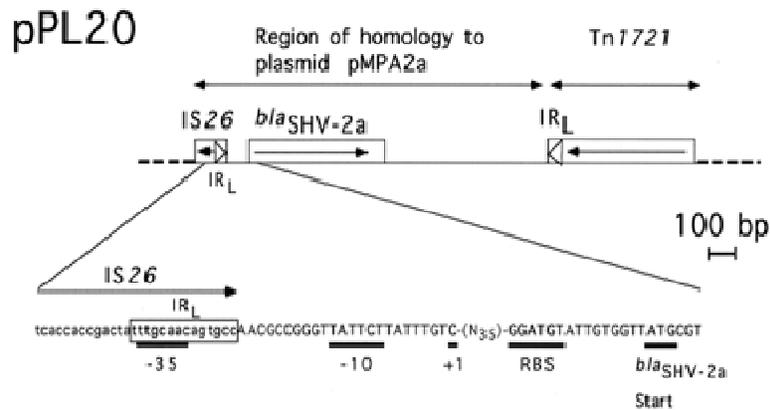
La BLEE SHV-5 fue identificada por primera vez en un plásmido de *K. pneumoniae*<sup>106</sup>. Durante varios años el contexto genético, es decir los genes que bordean este tipo de  $\beta$ -lactamasas tipo SHV había sido cuestionado<sup>107-109</sup>. No obstante, el primero ejemplo de BLEE tipo SHV-2a en *K. pneumoniae* fue encontrado en el plásmido pBWH77 (Figura 13A). Esta BLEE fue identificada formando parte de un operón que contiene el gen *aphA1* en la primera posición. Este operón tiene un promotor híbrido formado por la caja -10 de la  $\beta$ -lactamasa y la caja -35 del IRL de la IS26<sup>110</sup>. Nueve años después, nuevamente la BLEE SHV-2a fue identificada en *P. aeruginosa* en el plásmido pPL20 (Figura 13B), la cual es expresada por un promotor compuesto formado por la región -35 del invertido repetido izquierdo de una IS26 y la región-10 del mismo promotor de la SHV-2a. En el extremo 3' de la  $\beta$ -lactamasa se identificó el Tn1721<sup>111</sup>. Al año siguiente se identificó a la BLEE SHV-5 en el plásmido pSEM de *S. enterica* (serotipo Typhimurium), en un segmento de 13.5 kb (Figura 13C). Este segmento contenía a la SHV-5, y un integrón de clase 1 (*intl1*, *aacA4*, *aacC1*, *aadA1*, *qacEA* y *sul1*). Entre la SHV-5 y el

integrón se encontraba una IS26<sup>112</sup>. Ya en el año 2001, en el plásmido pSF-2 (Figura 13C) de *Shigella flexneri* se identificó la BLEE SHV-2, la cual está bordeado por tres ORFs que fueron reportados que tenían una alta similitud con proteínas de *E. coli*<sup>113</sup>.

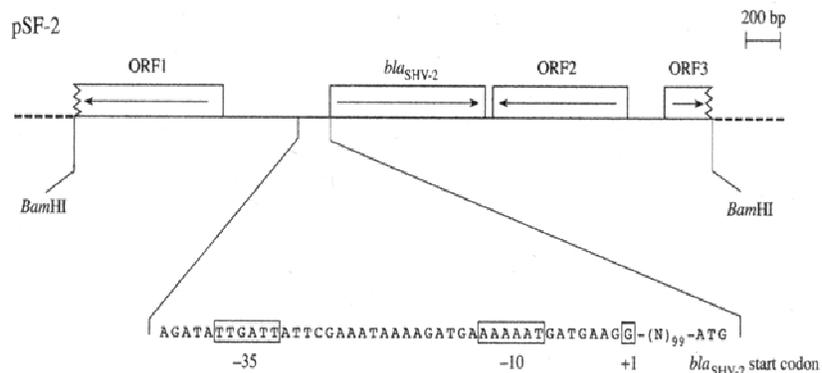
A)



B)



C)



D)

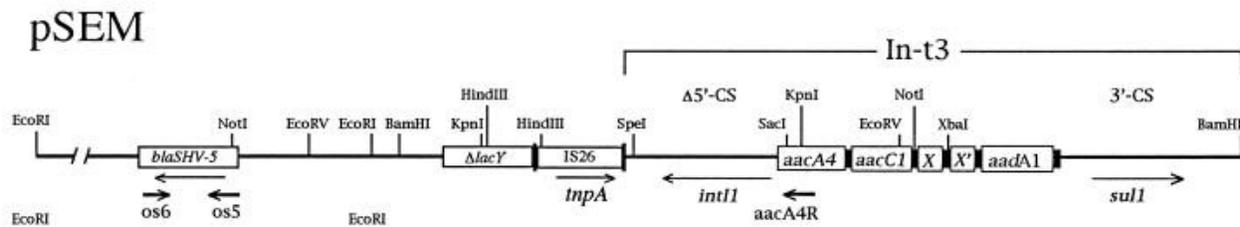


Figura 13. Contexto genético que contiene a las BLEE tipo SHV antes del 2002. A) Plásmido pBWH77 que contiene la BLEE SHV-2a en *K. pneumoniae*; B) plásmido pPL20 contiene la BLEE SHV-2a identificada en *P. aeruginosa*; C) plásmido pSEM que contiene la BLEE SHV-5 en *S. enterica*; D) plásmido pSF-2 que contiene la BLEE SHV-2 en *Shigella flexneri*.

## Amplificación de genes e implicaciones clínicas

La amplificación de genes permite a un organismo adaptarse a cambios en el ambiente. Este tipo de incremento en dosis génica confiere beneficios debido principalmente al aumento en la producción de una proteína. Este proceso no requiere un cambio genético permanente, si no que se caracteriza por ser transiente, teniendo un impacto médico significativo en cuanto al efecto en el aumento en la dosis génica. Como ejemplos están el aumento en la resistencia a antibióticos, metales pesados, crecimiento en diferentes fuentes de carbono e incremento en la virulencia en bacterias patógenas<sup>114</sup>. La amplificación de genes sucede usualmente en dos procesos; 1) duplicación en tandem e 2) incremento en el número de copias basada en la duplicación en tandem inicial (Figura 14)<sup>114,115</sup>.

El incremento en el número de copias de un segmento de DNA puede aumentar la expresión y dosis de proteínas, estas múltiples copias del gen, a menudo se encuentran en tándem. En procariontes, la amplificación puede ocurrir mediante duplicación en tándem seguido por amplificaciones adicionales (Figura 13). El proceso inicial de duplicación produce copias idénticas adicionales de un segmento de DNA, que puede sufrir recombinación homóloga (dependiente de RecA) incrementando así el número de copias. Las secuencias idénticas en tándem son inestables y pueden ser eliminadas por recombinación homóloga. Esto ocurre rápidamente después de remover la presión selectiva o después de la aparición de

una mutación en el gen *recA*, cuyo producto esta involucrado directamente en la amplificación. El número de copias de la amplificación varía dependiendo de las características de selección y de la región involucrada en la amplificación <sup>114</sup>.

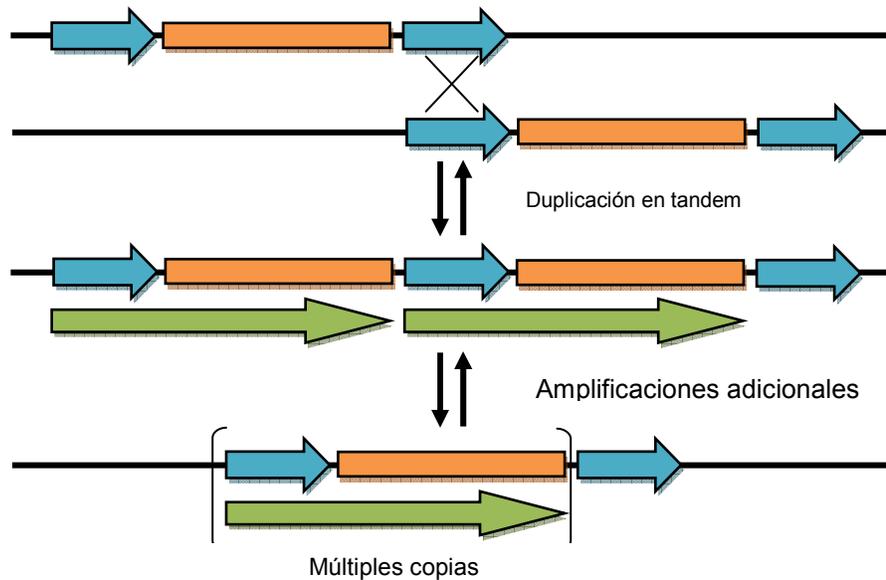


Figura 14. Duplicación en tandem, mediante recombinación homóloga que ocurre entre diferentes copias de una secuencia de DNA repetida directa (flecha azul). Esta duplicación genera una secuencia repetida directa larga (flecha verde), la cual puede estar involucrada en recombinaciones homólogas adicionales que generan múltiples copias del segmento, denominado amplión <sup>114,115</sup>.

Las bacterias frecuentemente se pueden adaptar a nuevos ambientes extremos a través de la amplificación de genes, involucrando regiones largas de DNA. Un antibiótico como una condición de selección puede aumentar el número de copias de un gene que confiere resistencia a este antibiótico. La frecuencia de amplificación de regiones genómicas largas le provee ventajas selectivas a la célula en poblaciones que se enfrentan condiciones ambientales cambiantes. Dada está a plasticidad en los genomas bacterianos, la evolución en la organización de los genomas es un tópico muy interesante aunque pobremente comprendido. No solo la amplificación ocurre frecuentemente y espontáneamente, sino también genera abundante materia prima para la creación de nuevos genes y funciones nuevas <sup>115</sup>.

La amplificación de genes visto desde un modelo denominado “canónico” se muestra en la figura 16. Las características básicas de la amplificación están representadas en la parte central de la figura. Una de las características que asombra de la duplicación en tándem, es que puede ocurrir en cualquier lugar de un cromosoma. Sin embargo la frecuencia de duplicación para regiones específicas de DNA varía ampliamente ( $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ ). Se han descrito hotspots en cada sistema analizado, ya sea cromosomal o plasmídico. Una característica común de los hotspots es la presencia de secuencias repetidas largas (mayores de 1 kb) en dirección directa, bordeando la región que sufre duplicación en tándem. Así el segmento de DNA bordeado por secuencias de DNA repetida presentes en orientación directa es denominado amplicón, esta estructura refleja el hecho de que no sólo son propensos a duplicación en tandem, sino también a una amplificación de múltiples copias <sup>115</sup>.

Un amplicón es esquematizado en la figura 14(a), así como las estructuras generadas durante un evento de amplificación. La recombinación homóloga entre secuencias repetidas puede conducir a una duplicación en tandem (b), o a la delección del amplicon (no mostrado). Por lo tanto, la recombinación homóloga entre secuencias duplicadas en tandem puede conducir a amplificaciones adicionales (c) o a delecciones, resultando a la estructura original antes de la duplicación en tandem (a), esta reversión ocurre a frecuencias altas (150 veces superiores a frecuencias de duplicación en tandem) <sup>116</sup>.

Las recombinaciones sucesivas entre estos miembros, permiten la contracción y expansión en la longitud del arreglo en tandem. Así, la formación de amplificaciones bajo el modelo canónico es un proceso secuencial, donde el paso limitante es la formación de la duplicación en tandem inicial (Figura 15b). Interesantemente, la naturaleza dinámica de la amplificación de DNA continuamente genera estructuras circulares que consisten de monómeros o multímeros de la unidad amplificada. Estas estructuras se pueden perder debido a la falta de un origen de replicación. Generalmente la duplicación en tandem no conduce a la pérdida de la función del gen <sup>117,118</sup>.

Los principales factores que influyen en la habilidad de duplicarse a una alta frecuencia son la longitud y la conservación de las secuencias repetidas presentes. La recombinación entre secuencias repetidas mayores de 300 pb (en *E. coli*), son dependientes de *recA*, especialmente si los repetidos están separados por un segmento de DNA proporcionalmente largo. En este respecto, mutaciones en *recA* provocan una disminución considerable en la habilidad a generar duplicaciones en tandem, donde las

mutantes que contienen una expresión de *recA* constitutiva muestran un aumento en la frecuencia de duplicación.

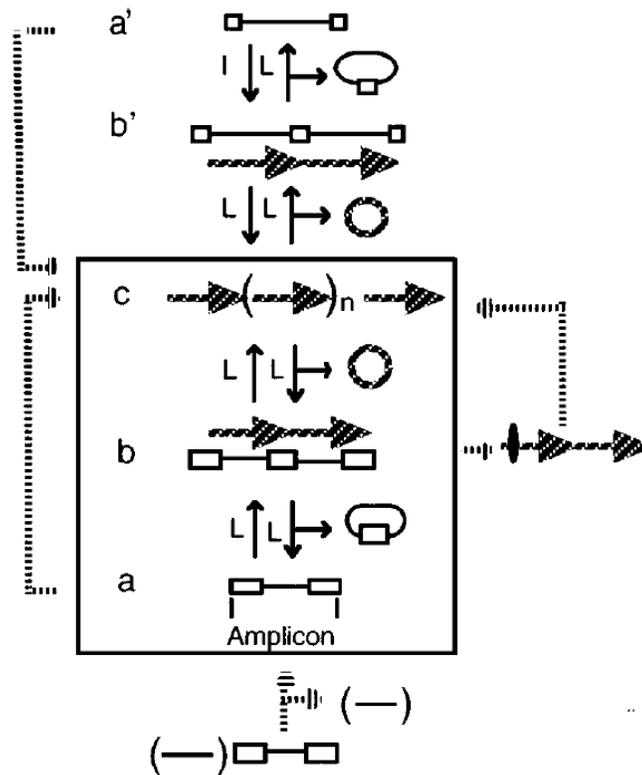


Figura 15. Modelo general de la amplificación en procariotas. La parte central ilustra el modelo canónico; rutas alternas son mostradas fuera del cuadro central. a y a' esquematiza e un amplicon; b y b' a una duplicación en tandem y c y c' amplificación en tandem generando múltiples copias. Secuencias repetidas largas son mostradas con triángulos y secuencias repetidas cortas con cuadrados. L e I son recombinaciones legítimas e ilegítimas, respectivamente. En la parte central, el amplicón es amplificado mediante un camino canónico o en la parte izquierda esquematiza una súbita amplificación del amplicón <sup>114</sup>.

Otro factor que influye es la disminución (10%) en la identidad entre las secuencias de DNA repetidas que puede reducir la frecuencia de recombinación en hasta 40 veces. La duplicación en tandem ocurre a una frecuencia mucho menor cuando la recombinación homóloga ocurre entre secuencias de DNA cortas (Figura 15a'). Al igual que la duplicación con fragmentos largos de DNA la duplicación en tandem (Figura 15b') genera la amplificación en tandem de múltiples copias del amplicón (Figura 15c).

En general los amplicones bordeados con repetidos directos largos con una alta similitud, amplificarán a una mayor frecuencia. Sin embargo hay amplicones que generan bajo número de repetidos en tandem con secuencias repetidas de DNA largas. Sin embargo, amplicones de menor tamaño pueden ser detectados cuando un número grande de copias son demandadas bajo una presión selectiva <sup>114</sup>.

Existen diferentes mecanismos propuestos que explican la formación de la amplificación de genes en procariotes. Dos de estos, la recombinación (crossover) y el mecanismo de escisión de círculos y re inserción (CER), pueden explicar la amplificación bajo este modelo canónico <sup>119</sup>. Los mecanismos de recombinación y CER involucran replicación normal de DNA; donde el mecanismo de recombinación está basado en la forma de la burbuja de replicación (Figura 16A) y el CER requiere la existencia de dos replicones en la misma célula. Alternativamente el mecanismo CER puede usar la burbuja de replicación como un intermediario circular de un brazo de la burbuja de replicación y reinsertarse en el otro brazo (Figura 16B). La operación de los mecanismos de recombinación o CER podría dar lugar a un incremento gradual en el número de copias, requiriendo varias generaciones para alcanzar altos niveles de amplificación.

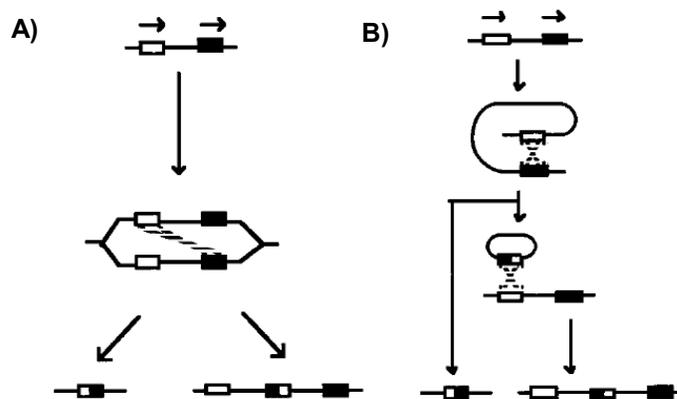


Figura 16. Mecanismos para la amplificación de genes en procariotas. a) amplificación por recombinación y b) CER.

El proceso inicial de duplicación produce copias adicionales idénticas al segmento de DNA e incrementa el número de copias. El mecanismo CER involucra la creación de moléculas de DNA circular y su subsecuente recombinación con otra molécula de DNA para formar duplicados.

Alternativamente, un mecanismo basado en replicación de círculo rodante podría explicar en los casos que la amplificación ocurriera muy rápidamente.

La amplificación de genes es un evento que provee varias oportunidades a las bacterias; primero, la amplificación en tandem dota a las poblaciones bacterianas con la capacidad para la sobreexpresión de una región genómica definida. Esta capacidad podría ser relevante en términos de una rápida adaptación. Segundo, la amplificación en tandem es una característica pasajera, la cual podría regresar a su estado original sin alterar la estructura del genoma u amplicón. Tercero, también provee no solo cambios cuantitativos inmediatos, pero también nuevos substratos para la evolución. Estos genes amplificados pueden recibir mutaciones diferentes, permitiendo así la evolución de nuevas funciones, dejando copias del original intactas. Si la amplificación de un gene en particular hace a la bacteria estar mejor equipada para un ambiente en particular, este gene podría ser seleccionado, si no hay dos posibilidades: cualquiera de las regiones amplificables pueden volver al estado original o las copias amplificadas pueden divergir por mutación. Estas oportunidades podrían ser particularmente relevantes para organismos procariotas, cuyo modo de reproducción es clonal <sup>114,115</sup>.

## **Un estudio retrospectivo como antecedente general del proyecto**

Durante un estudio retrospectivo se identificaron las BLEEs, SHV-2 y SHV-5 contenidas en catorce aislamientos clínicos de diferentes géneros de Enterobacterias; nueve de *K. pneumoniae*, dos de *K. varicola*, dos de *E. coli* y una de *E. cloacae* (Tabla 4). Por medio de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), se determinó la ausencia de relaciones clonales entre los aislamientos del estudio. Los aislamientos clínicos provinieron de siete hospitales distintos, de tres ciudades diferentes (Cd. de México, Villa Hermosa y Cuernavaca), aislados en un periodo de ocho años (1990-1998). El perfil de plásmidos de los aislamientos clínicos fue de 1 a 4, con un rango de tamaño de 70 a 300 kb. Las conjugaciones bacterianas fueron obtenidas en 9/14 cepas, transfiriendo en su mayoría un plásmido grande (>150 kb) con excepción del aislamiento de *E. cloacae* C1177-7 transfiriendo uno de aproximadamente 70 kb (Tabla 4). La caracterización de los plásmidos mediante restricción enzimática con la enzima DraI mostró múltiples bandas que se comparten entre los plásmidos; resaltando en particular, por lo menos tres bandas compartidas, entre todos los plásmidos (Figura 17A) <sup>92</sup>.

Adicionalmente se identificó, mediante hibridación tipo Southern con la sonda de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5 (271 pb), que la banda compartida de mayor peso molecular (9 kb) entre los diferentes plásmidos contiene la BLEE SHV-5 (datos no incluidos en la referencia 14) (Figura 17B).

**Tabla 4. Características moleculares de los aislamientos clínicos.**

Strain	Species	Hospital <sup>§</sup>	Year of isolation	MIC* ( $\mu$ g/ml)		Plasmid profile <sup>‡</sup> (Kb)	Plasmid Pattern <sup>#</sup>	$\beta$ -lactamase(s)			Reference
				CTX	CAZ			pl value <sup>&amp;</sup>	bla <sub>TEM</sub> PCR	blagene content <sup>¶</sup>	
K55-1	<i>K. pneumoniae</i>	1	1990	16	32	235, 150	IV	(7.6)	-	SHV-2	This work
K65-1	<i>K. pneumoniae</i>	1	1990	128	64	280, 80	III	5.4, (7.6), 8.1	+	SHV-2	This work
E86-2	<i>E. coli</i>	2	1990	32	64	260, 120	III	5.4, 7.4, (8.2)	+	SHV-5	This work
K96-1	<i>K. pneumoniae</i>	1	1990	8	2	270, 250, 215, 195	I	5.4, (7.6)	+	SHV-2	This work
K97-2	<i>K. pneumoniae</i>	2	1991	2	4	270, 250, 215, 195	I	(8.2)	-	SHV-5	This work
K102-2	<i>K. pneumoniae</i>	2	1991	4	32	275, 240	II	5.4, (8.2)	+	SHV-5	This work
E128-3	<i>E. coli</i>	3	1992	8	8	290, 240, 150	II	5.4, (7.6)	+	SHV-2	This work
K806-4 <sup>™</sup>	<i>K. variicola</i>	4	1996	8	1	275, 185	ND	5.4, (7.6)	+	SHV-2	This work
K910-5 <sup>™</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	5	1996	32	256	159, 40	ND	5.4, 7.6, (8.2)	+	SHV-1/SHV-5	12
K1333-2	<i>K. pneumoniae</i>	2	1996	8	64	255, 135	ND	5.4, 7.6, (8.2)	+	SHV-1/SHV-5	13
K1335-2 <sup>™</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	2	1996	64	256	255	ND	5.4, 7.6, (8.2)	+	SHV-1/SHV-5	13
K1319-2	<i>K. variicola</i>	2	1997	8	256	255, 135	ND	5.4, 7.6, (8.2)	+	SHV-1/SHV-5	This work
K1509-6 <sup>™</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	6	1997	2	16	305	ND	5.4, (8.2)	+	SHV-5	9
CI177-7 <sup>™</sup>	<i>E. cloacae</i>	7	1998	16	256	255, 206, 70	V	5.4, 7.6, (8.2)	+	SHV-5	This work

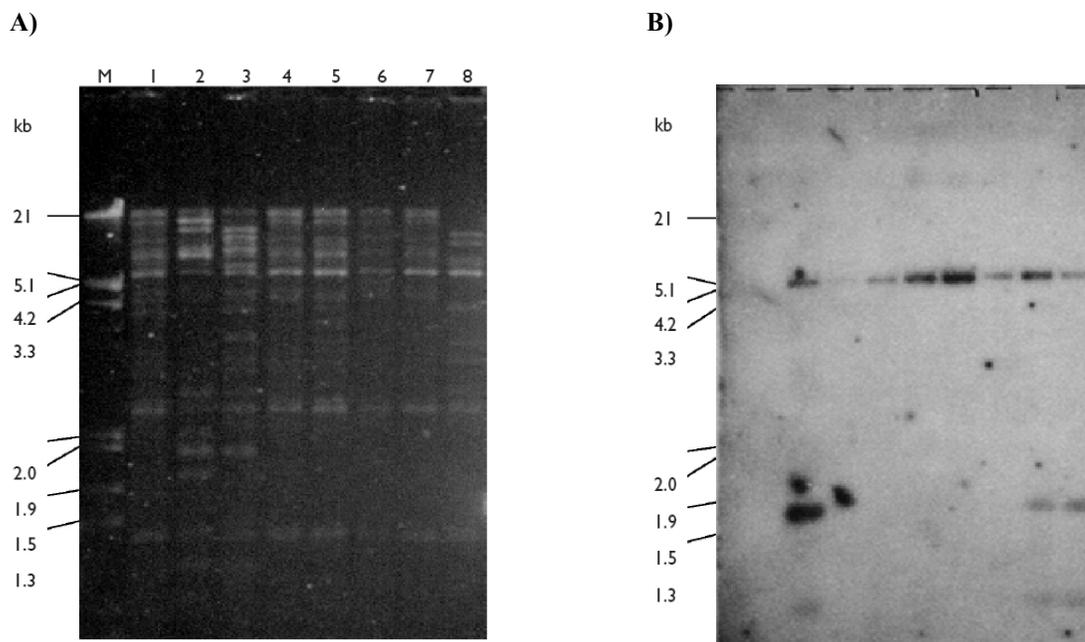


Figura 17. A) Análisis de restricción con la enzima DraI de los plásmidos conjugativos de los diferentes aislamientos clínicos; B) identificación de banda que contiene la BLEE tipo SHV.

## **Aislamiento clínico *E. cloacae* C1177-7 y su implicación en un brote intrahospitalario**

El aislamiento clínico de *E. cloacae* C117-7 (Tabla 4) fue el único aislamiento clínico incluido en el estudio retrospectivo descrito anteriormente. Este aislamiento clínico de *E. cloacae* C117-7 formó parte de un total de 16 aislamientos clínicos de *E. cloacae* obtenidos durante un brote intrahospitalario que duró cuatro meses (febrero a mayo del 1998), en la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatos en el hospital Niño Morelense, en Cuernavaca, Morelos. Estos aislamientos fueron obtenidos de pacientes que tenían menos de dos meses de edad con un cuadro clínico de bacteremia. El análisis de genotipificación de los 16 aislamientos mediante PFGE mostró dos grupos clonales denominados A y B. Los grupos clonales incluyeron a 12 aislamientos (75%) y cuatro aislamientos (25%), respectivamente. Ambos grupos clonales presentaron susceptibilidad a ciprofloxacina, ofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol e imipenem y fueron resistentes a cefalosporinas como cefotaxima, ceftazidima y aztreonam así como a varios aminoglucósidos. El grupo A se caracterizó por contener una BLEE identificada inicialmente mediante la técnica de sinergismo de doble disco (DDST). Esta técnica consiste en la combinación de discos impregnados; uno cefotaxima y otros con un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico, los cuales se encuentran cercanos de manera que el inhibidor deforme el halo generado por la acción de la cefotaxima sobre la bacteria. En contraste, el grupo B no presentó una susceptibilidad en combinación con cefotaxima/ácido clavulánico, por lo que se consideró que no fue productora de BLEE. El contenido de plásmidos de la clona A presentó tres de 250, 200, y 70 kb, con la excepción del aislamiento *E. cloacae* C1156-7, el cual contenía dos plásmidos adicionales de 200 y 140 kb. Para la conjugación bacteriana se seleccionó el aislamiento *E. cloacae* C1177-7, de la cual se transfirió el plásmido de 70 kb denominado pHNM1 a una frecuencia de  $10^{-3}$  transconjugantes por célula donadora en cefotaxima y ampicilina. En el grupo clonal B, las bacterias contenían de 2 a 5 plásmidos de 270, 145, 120, 70 y 60 kb. La conjugación se realizó con la cepa *E. cloacae* C1132-7, transfiriendo también un plásmido de 70 kb (pHNM2) a una frecuencia de  $10^{-1}$  sólo en ampicilina. En este grupo clonal se identificaron dos aislamientos que transferían un plásmido adicional de 270 kb. Al comparar ambos plásmidos conjugativos (clona A, pHNM1, y clona B, pHNM2) mediante digestión con la enzima EcoRI, mostraron ser idénticos con la excepción de una banda de 8 kb ausente en el plásmido pHNM2 (datos no mostrados).

Con base en lo anterior surgió la pregunta ¿Qué estructura molecular que contiene la BLEE SHV-5 ha permitido mantener o diseminar la BLEE SHV-5 en los plásmidos contenidos de las bacterias de estudio? Resaltando que las bacterias pertenecen a tres géneros bacterianos distintos aislados durante un largo periodo en hospitales y ciudades distintas. Con base a lo anterior se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis.

## **HIPÓTESIS:**

La BLEE SHV-5 se ha descrito en múltiples géneros bacterianos resistentes a cefalosporinas en los cinco continentes, los cuales han estado involucrados en brotes intrahospitalarios e infecciones nosocomiales, como ha sido descrito también en México. Esta BLEEs SHV-5 está localizada en una región de DNA altamente conservado entre diferentes plásmidos caracterizados en nuestro laboratorio. Este fragmento contiene características moleculares que han permitido mantener o diseminar la BLEE SHV-5 entre diferentes géneros bacterianos.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Establecer la estructura molecular que contiene el gen que codifica para la BLEE SHV-5 en el plásmido conjugativo pHNM1 obtenido de un aislamiento clínico de *E. cloacae*.

### **Objetivos Particulares:**

- Generar dos librerías de DNA plasmídico de 2-4 y 4-7 kb.
- Obtener plásmidos recombinantes de ambas librerías.
- Obtener la secuencia de nucleótidos de los insertos de los plásmidos recombinantes.
- Determinar la estructura molecular que contiene la BLEE mediante ensamble y análisis de secuencias.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Extracción y cuantificación del plásmido pHNM1

El análisis del plásmido pHNM1 se realizó por medio de la técnica de Eckhardt <sup>120</sup> y el peso molecular se determinó mediante regresión lineal utilizando como plásmidos marcadores con pesos moleculares conocidos de 50, 120 y 167 kb. Se tomó una colonia de la cepa y se incubó en 5 ml de medio LB a 37 °C por 12 hrs, posteriormente se tomó 1 ml y se inoculó en 500 mL de LB con cefotaxima a 1µg/ml y se incubó a 37 °C por 16 hrs con agitación (200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0 a 1.5. A partir de 2.5 L de medio de cultivo LB se extrajo el plásmido mediante columnas de intercambio iónico (QUIAGEN), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se corrió un gel de agarosa al 0.8% con TBE 1X para determinar la calidad de la extracción del plásmido y posteriormente el DNA se cuantificó por fluorometría.

## Análisis de restricción y comparación del plásmido pHNM1 con el pHIM1

Los plásmidos se digirieron con las enzimas *PvuI*, *PstI*, *NotI*, *SmaI*, *KpnI* y *StyI* y se analizaron en gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente fueron transferidos a una membrana de nylon por un sistema de vacío. La membrana se hibridó usando como sonda un producto de PCR de 861 pb mediante ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dCTP.

## Fragmentación por nebulización para la preparación del banco de DNA plasmídico

Se tomaron 30 µg del DNA plasmídico y se aforó a 500µl con glicerol al 2.5%, para ser nebulizados a 18 psi en nitrógeno gaseoso por 20seg, posteriormente se centrifugó el nebulizado a 4,000 rpm a 10°C por 1min. Se recuperó el nebulizado en un tubo eppendorf y se determinó el volumen recuperado. Se cargaron 10µl del nebulizado en un gel de agarosa al 1% y se corrió a 100 volts por 30 min para observar el grado de fraccionamiento del plásmido. Se precipitaron los nebulizados con acetato de sodio 2.5M 0.3% v/v y etanol 100% 1.5 v/v y se mantuvo a -70°C por 12 horas como mínimo. Se centrifugó a 14,000rpm por 10min, se lavó el pellet con 1ml de etanol al 70%, este lavado se realizó 2

veces. El DNA se secó en savant por 10min y se resuspendió en 25µl de H<sub>2</sub>O y se calentó a 42°C por 20min para que se resuspendiera bien el DNA.

### **Reparación del DNA nebulizado**

Se realizó utilizando la polimerasa Klenow y la T4 DNA ligasa. Se colocaron 25µl de DNA, en un tubo de 0.2 ml más 2.5µl de dNTP's (1mM cada uno), 2µl de T4 DNA ligasa (3U/µl), 2µl de Klenow (5U/µl), 5µl de Buffer 10X y 13.5µl de H<sub>2</sub>O. El programa de reparación consistió en: 30min a 12°C, 30min a 25°C, 10min a 70°C y 5min a 4°C. Se concentraron las muestras en savant a temperatura media por 15 min. El DNA total obtenido se cargó a un gel de agarosa al 1% y se dejó correr 1hr a 50volts (Figura 2a). El DNA se purificó de gel de agarosa recuperando los fragmentos de 2-4 y 4-7 kb. Estos fragmentos se purificaron mediante el kit de QUIAGEN según las especificaciones del fabricante. El DNA obtenido y el vector de clonación se observaron en un gel de agarosa y se cuantificaron por fluorometría.

### **Ligación y electroporación del DNA a células competentes**

El banco plasmídico se construyó utilizando el vector de clonación pZErO, el cual se digirió con la enzima EcoRV. Utilizando una relación de 10ng de vector por 120ng de DNA, la mezcla se realizó de la siguiente manera 10µl de DNA, 3µl de vector, 10µl de Buffer 10X, 1µl de Enzima T4 DNA ligasa y 2µl de H<sub>2</sub>O. Las ligaciones se precipitaron pasando los 20µl a un tubo eppendorf limpio de 500µl, se le adicionó 400µl de Butanol al 100% y se centrifugó 10min a 14,000rpm. Se eliminó el sobrenadante con cuidado y se adicionó 400µl de etanol absoluto y se centrifugó nuevamente 10min a 14,000rpm. El sobrenadante se eliminó y se dejó secar a temperatura ambiente, el DNA se hidrató con 10µl de H<sub>2</sub>O.

Se prepararon cajas de LB con kanamicina 50 mg/ml, IPTG (200 mg/ml) y XGal (20mg/ml), en las cuales se plaquearon las células recombinantes que se obtienen de la siguiente manera: se tomó 1µl de la ligación y se mezcló con células electrocompetentes *E. coli* OneShot, esta mezcla se colocó en una celda de electroporación. Una vez electroporado se le adicionó a la celda 1 ml de medio SOB y se dejó crecer a 37°C con agitación por 5 min. Se tomaron 100 µl y agregaron a cada caja petri con 100mg/ml de kanamicina, se espátularon e incubaron a 37 °C O.N.

## **Crecimiento de las clonas recombinantes y extracción de templados**

Se prepararon placas de 96 pozos (de 2 ml), con 1 ml de de medio Circle Crow con 100 mg/ml de kanamicina. Se tomaron colonias con un palillo estéril hasta completar 6 placas de 96 pozos. Las placas de 96 pozos se taparon con tapas adhesivas de microporo y se dejaron crecer por 22 hrs a 37°C con agitación a 300rpm. Ya crecidas las células se colectaron por centrifugación 6min a 4,000 rpm y 10°C, se decantó el sobrenadante invirtiendo la placa en una toalla absorbente y se dejó reposar 5min, a cada pozo se le adicionó 240µl de Solución I (Glucosa 2M (5ml), Tris 2M (2.5ml), EDTA 0.5M (4ml), aforado a 200ml y RNAsa 10mg/ml), se centrifugó 6min a 4,000rpm y 10°C para sedimentar las células y se decantó el sobrenadante y se dejó invertida en papel absorbente por 2min y se le adicionó 160µl de Solución I, se resuspendieron las células por vortex y se adicionó 160µl de Solución II (NaOH 5M (1.6ml), SDS 10% (4ml) y se afora a 40ml) y se mezcló por inversión 3 veces suavemente, se incubó 10min a temperatura ambiente y se centrifugó 9seg hasta llegar a 4,000rpm, se le adicionó 160µl de Solución III (Acetato de Potasio 5M (60ml), Ácido Acético Glacial (11.56) y se afora a 200ml), se mezcló por inversión suavemente 3 veces y se centrifugó durante 20min a 4000rpm y 10°C, se pasó a otra placa 150µl del sobrenadante y se precipitó con 150µl de isopropanol filtrado mezclándolo por inverción 10 veces, se centrifugó 30min a 4,000rpm y 10 °C, se decantó el sobrenadante y se le adicionó etanol al 70 % frío 300µl, se centrifugó a 400 rpm por 15min a 10 °C, se removió el sobrenadante por inversión, se repitió este paso, pero ahora se centrifugó sólo 1min, la placa se secó en savant por 5min, y se resuspendió en 35µl de H<sub>2</sub>O y se dejó hidratar O.N. a 4 °C. Los templados se analizaron en un gel de agarosa al 1% y se determinaron los templados religados, dobles templados y el tamaño de los insertos en los diferentes plásmidos. Se prepararon placas de 96 pozos con 2 µl de DNA para ser secuenciados.

## **Secuenciación de DNA y análisis de la secuencia**

Los insertos se secuenciaron en los equipos MEGABASE 1000 y ABIPRIMA 3100 mediante el método de Sanger <sup>121</sup> en los equipos, del Centro de Ciencias Genómicas y del Instituto Nacional de Salud Pública, respectivamente. Los insertos se secuenciaron empleando los oligonucleótidos universales t7 y sp6. El ensamble de las secuencias obtenidas se realizó con el programa CONSED <sup>122</sup>. La secuencia de nucléotidos del transposón compuesto se comparo contra la base de datos Gen Bank mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y ambas copias de TC se comparo mediante

clustalW (<http://align.genome.jp/>). Los contigs obtenidos se analizaron por BLAST en la página de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) [blastn] y BLAST con genomas microbianos. Así mismo se obtuvieron las secuencias de los plásmidos contenidos en la base de datos de GenBank, posteriormente se analizaron por BLAST en línea de comando Linux, con la instrucción `-m8` para que nos generara una tabla de los análisis. Los esquemas de las estructuras se realizaron mediante el programa VECTOR NTI. Las imágenes de comparación de plásmidos se elaboraron mediante el programa Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>).

### Determinación de la estructura y caracterización de la estabilidad

Se amplificó un producto de PCR de 7,250 pb, empleando los oligonucleótidos OT-1 para TEM-1<sup>123</sup> y P1 para SHV-5 (ORF7 del TC) que permitió completar la estructura del transposón compuesto duplicado en tandem (TCDT) (Tabla 5). Para confirmar la estructura del transposón compuesto (TC), se emplearon diferentes combinaciones de oligonucleótidos (*mucBF-ygbMR*, *mucBF-P1*, *P2-P1*, *lacYF-ygbMR*, *P2-TnpAR* y *lacYF-TnpAR*) y para determinar la estabilidad del TC (*lacYF-ygbMR*) (Tabla 5). La estabilidad se realizó en por lo menos 10 generaciones bacterianas del asilamiento clínico y en la correspondiente transconjugante crecida en medio líquido sin antibiótico. Las pastillas de bacterias se colectaron en cada generación y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Las amplificaciones se realizaron bajo las condiciones que describen los productores (rTth DNA Polymerase, XL; Applied Biosystems).

**Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en la conformación de la estructura del TCDT**

Gene	oligonucleotido <sup>a</sup>	Secuencia (5' a 3')	Referencia
<i>mucB</i>	<i>mucBF</i> (1)	CCCGTGTACGCCTTAATC	Este trabajo
<i>lacY</i>	<i>lacYF</i> (2)	TGACGCGTTCGATATAAGC	Este trabajo
<i>ygbM</i>	<i>ygbMR</i> (3)	CGGGCTATCTCTACCACAG	Este trabajo
SHV-5	P1 (4)	ACTGAATGAGGCGCTTCC	<sup>124</sup>
SHV-5	P2 (5)	TCCCGCAGATAAATCACC	<sup>124</sup>
<i>tnpA</i>	<i>tnpAR</i> (6)	GAGAAGCTTCAGCTGGCGGC	Este trabajo

<sup>a</sup> El número entre paréntesis corresponde a los oligonucleótidos empleados para confirmar la estructura del TCDT mediante amplificación por PCR y secuenciación nucleótido de los productos amplificados.

## Análisis de plásmidos de bacterias crecidas a altas concentraciones de cefalosporinas

Se tomó una colonia de la transconjugante X1177-7 y se creció en 5 ml de medio LB con 1  $\mu\text{g/ml}$  de cefotaxima (CTX), la cual se incubó a 37 °C por 16 horas con agitación. Posteriormente se cosecharon las células y se extrajeron los plásmidos por la técnica de Kieser <sup>125</sup>. Los plásmidos se analizaron en un gel de agarosa al 0.8 %. Se tomó una colonia de las crecidas a 1  $\mu\text{g/ml}$  de CTX y se creció en una caja de LB con 2  $\mu\text{g/ml}$  de CTX, después de 16 horas de incubación a 37 °C con agitación se cultivaron las bacterias y se extrajeron los plásmidos por la técnica de Kieser. De esta misma manera se fueron obteniendo colonias crecidas en 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 y 1,024  $\mu\text{g/ml}$  de CTX.

## RESULTADOS

### Construcción de banco y secuenciación de DNA

El peso molecular del plásmido determinado mediante la técnica de Eckhardt, fue de 60 kb aproximadamente (Figura 18). La cantidad del plásmido extraído de 500 ml de cultivo fue de 550 mg totales de DNA. Se usaron para nebulizar 30 mg del plásmido obteniéndose un barrido (Figura 19A), posteriormente el DNA fue reparado y se cuantificó nuevamente obteniendo una concentración de 50ng/ml. La extracción de los fragmentos de 2-4 y 4-7 kb (Figura 19B) fueron cuantificados obteniendo una concentración de 13.5ng/ $\mu\text{l}$  y 4.6ng/ $\mu\text{l}$ , respectivamente. Además se cuantificó el vector de clonación digerido, obteniendo una concentración de 9.3 ng/ $\mu\text{l}$ . Con base en estas concentraciones los diferentes fragmentos se ligaron en una relación de 12:1 (insertos/vector).

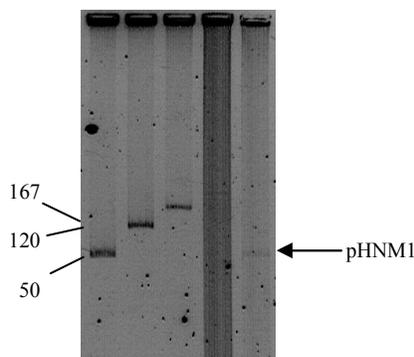


Figura 18. Peso molecular del plásmido

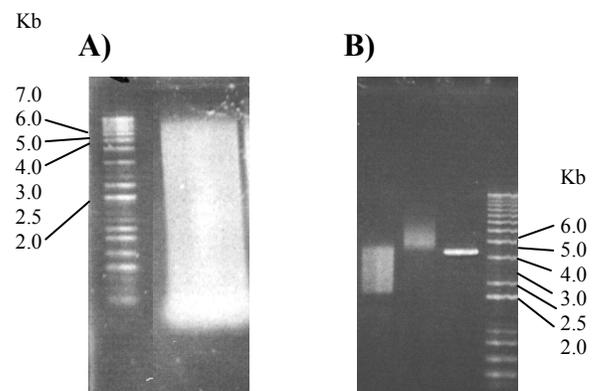


Figura 19. A) Nebulizado del plásmido pHNM1; B) Fragmentos obtenidos de 2-4 y 4-7 kb.

Una vez realizadas las ligaciones se electroporaron en células competentes, posteriormente se sembraron por picadura en placas de 96 pozos. Los plásmidos recombinantes extraídos mostraron pocos plásmidos religados y con los tamaños esperados de acuerdo al banco (Figura 20). El análisis de los templados permitió seleccionar los templados y preparar diferentes placas de 96 pozos para ser secuenciados por uno o ambos extremos del inserto.

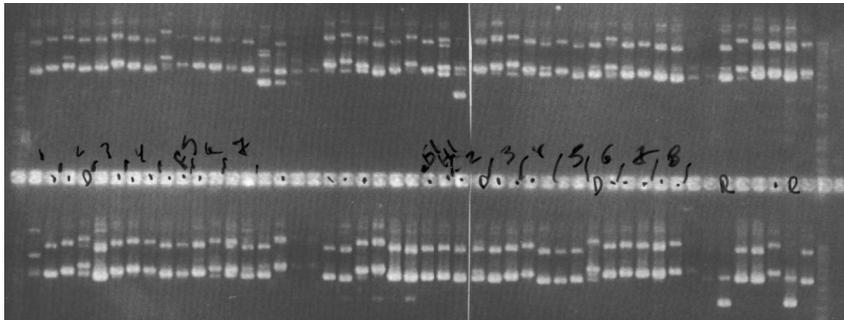


Figura 20. Placa 1, plasmidos extraidos de las clonas recombinantes.

## Ensamble y análisis de las secuencias del TC

Inicialmente se utilizaron para el ensamble de las secuencias un total de 388 reacciones (placas 1 a 4) (Tabla 6), las cuales fueron ensambladas mediante el programa CONSED. Se identificaron 18 contigs de diferentes tamaños, que van de 871 pb hasta 10,108 pb (contig 18). El análisis de la secuencia del contig 18 mediante BLASTn permitió identificar 12 ORFs, 10 de los cuales se encuentran formando parte de un fragmento de DNA de 9,520 pb que presentó las características de un transposón compuesto (TC) (Figura 21), con una alta identidad al descrito en el plásmido p1658/97 en *E. coli*<sup>126</sup> y a un segmento de DNA del cromosoma de *K. pneumoniae*. Este TC está formado por 10 ORFs, dos de los cuales codifican para secuencias de inserción tipo IS26, las cuales truncaron dos ORFs (*ygbM* y *lacY*) (Figura 21). Cabe señalar que en esas fechas el genoma de *K. pneumoniae*, solo se encontraban en forma de contigs.

Los ORFs que forman el TC son, dos IS26 (ORF01 y ORF10) con sus respectivos invertidos repetidos (IR) en sus extremos de 14 pb (GGCACTGTTGCAA), que se encuentran bordeando a ocho

ORFs (ORF02 al ORF09). ORF02, *ygbMΔ*; ORF03, *fucA*; ORF04, *ygbK*; ORF05, *ygbI*; ORF06, *deoR*; ORF07, *bla<sub>SHV-5</sub>*; ORF08, *recF* y ORF09 *lacYΔ* (Figura 21).

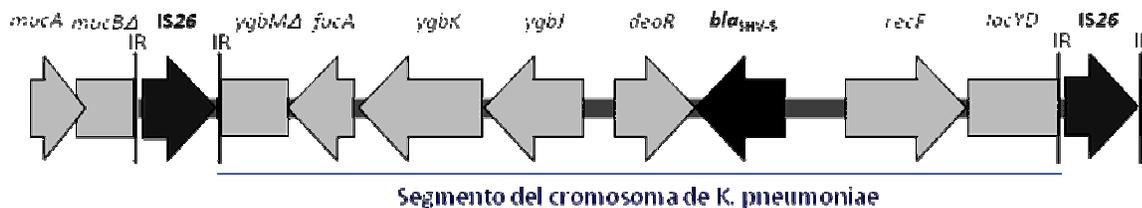


Figura 21. Representación esquemática de los genes identificados en el contig 18 que contiene el transposón compuesto conformado por ocho ORFs bordeados por dos IS26 en la misma dirección. Los ocho ORFs del TC se encuentran en el genoma de *K. pneumoniae*. Se muestran en el extremo 5' el operon *mucA-mucB*, sin embargo el gen *mucB* esta deletado.

**Tabla 6. Número de secuencias obtenidas, identidad de clonas con el plásmido pCTX-M3 y redundancia de las secuencias obtenidas.**

Placa de 96 pozos	No. de secuencias obtenidas	% y número de clonas		
		pCTX-M3	TC	<i>E. coli</i>
Placas 1 (T7)	94/96	37.2 (35)	35.1 (33)	22.3 (21)
Placa 2 (sp6)	84/96	40.4 (34)	46.4 (39)	4.7 (4)
Placa 3 (T7)	72/72	27.7 (20)	47.2 (34)	25 (18)
Placa 4 (sp6)	126/192	32.5 (41)	26.9 (34)	40.4 (51)
Placa 5 (T7 y sp6)	188/192	18.0 (34)	42.5 (80)	4.2 (8)
<b>TOTAL</b>	<b>564/578</b>	<b>29.0 (164)</b>	<b>39.0 (220)</b>	<b>18.0 (102)</b>

Mediante análisis de BLAST de la secuencia de nucleótidos del TC (9,520 pb) se identificaron varios plásmidos con identidad parcial, como pSEM<sup>112</sup>, pZMP1 (X53817; *K. pneumoniae*), pPa-1 (AF074954; *P. aeruginosa*), pSF-1 (AF282921; *Shigella flexneri*)<sup>113</sup> y pPAG-KE (AF096930; *P. aeruginosa*). Esencialmente los segmentos parcialmente secuenciados de los plásmidos anteriores

mostraban los ORFs que bordeaban a la BLEE tipo SHV. Adicionalmente se identificaron los plásmidos Rp-1 y pZMP1 que tienen una estructura diferente al TC, que corresponde a una estructura más corta de un posible TC bordeados también por secuencias de inserción tipo IS26.

La secuencia obtenida del TC y el análisis de BLAST descrito anteriormente, fue sometida a publicación el 16 de diciembre del 2003 a la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC) y fue sometida a Genbank el 23 de enero del 2004. Sin embargo en enero del 2004 salió publicado el artículo que describió un TC en el plásmido pACM1 en la revista Plasmid <sup>127</sup>. Así mismo reportaron la similitud del TC con secuencias reportadas en GenBank (Figura 22). Por lo tanto tres meses después el editor de la revista AAC rechazó el artículo, debido a que la estructura ya había sido publicada en enero de ese mismo año.

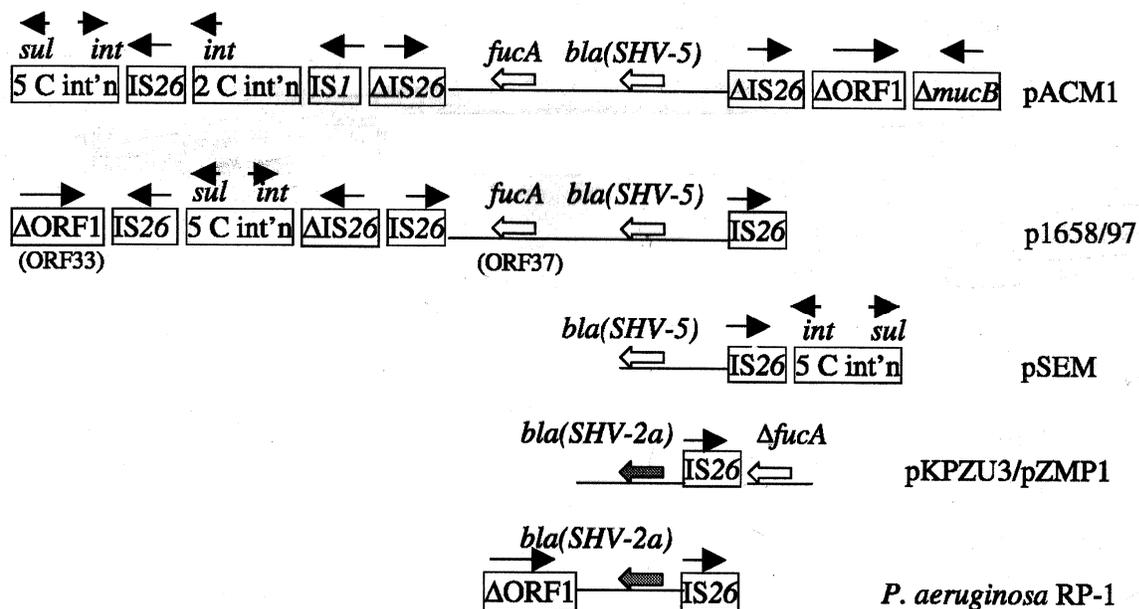


Figura 22. Representación esquemática del TC contenido en los plásmidos pACM1, p1658/979, pSEM (la estructura completa del TC fue publicado posteriormente). Se muestra también las estructuras de un posible TC en los plásmidos PZMP1 y RP-1 <sup>127</sup>.

## Estructura y análisis de transposón compuesto duplicado en tandem (TCDT)

Bajo estas circunstancias nos dimos a la tarea de tratar de secuenciar el plásmido pHNM1 que contenía el TC, con el objetivo de tener mayor información y poder publicarlo en otra revista. Se secuenció otra placa de 96 templados por ambos extremos (Tabla 6; placa 5). Las secuencias obtenidas se incluyeron al ensamble con las anteriores, sin embargo el TC no aumentó prácticamente de tamaño. Sin embargo, durante el análisis con el programa CONSED se encontró que que 26 clonas presentaban inconsistencias (Figura 23). Estas inconsistencias se debían a insertos secuenciados en ambos extremos en esta última placa, el programa mostraba ambas secuencias del mismo inserto en forward o reverso. Esto nos indicó que un extremo del inserto correspondía a un ORF del TC y el otro extremo a un ORF repetido de otro TC. Una vez corregidas estas inconsistencias se identificaron cuatro ORFs (4,222 pb) que correspondiendo a los siguientes ORFs: ORF06, *deoR* (solo 171 pb); ORF07, *bla<sub>SHV-5</sub>*; ORF08, *recF* y ORF09, *lacYΔ* (Figura 24). Esta información nos indicó fuertemente que el TC podría estar duplicado en tándem.

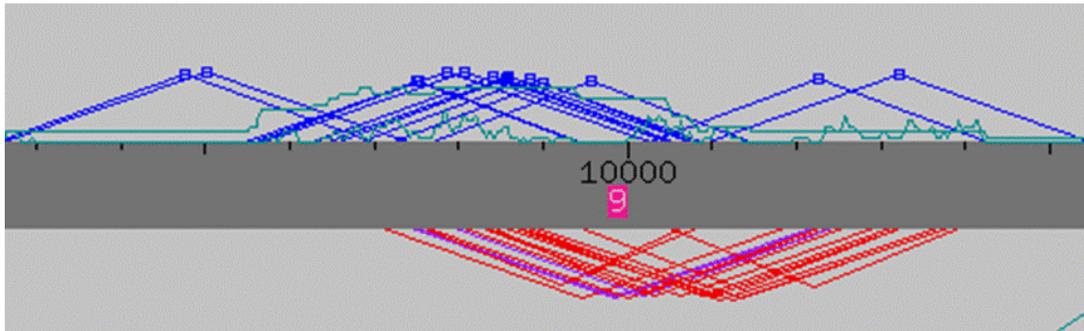


Figura 23. Identificación de clonas que mostraron inconsistencia. En la parte inferior de la figura se muestran en rojo las inconsistencias identificadas en el contig 18.

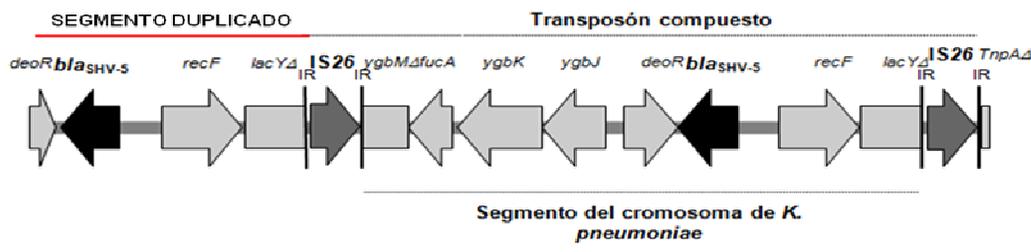
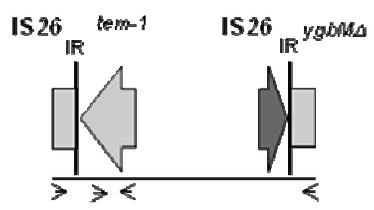


Figura 24. Estructura del TC y ORFs duplicados.

Por otra parte se habían seleccionado algunas clonas del banco de DNA que presentaban resistencia a ampicilina (AMP), una de ellas tenía un inserto de 3.5 kb. Esta clona, al ser secuenciada por ambos extremos con oligos universales y con oligonucleótidos específicos para la β-lactamasas tipo TEM (gen que confiere resistencia a ampicilina) se observó que en el extremo 5' estaba contenida una IS26 en asociación con la β-lactamasa TEM-1 y en el extremo 3' parte del ORF02 *ygbM* y parte de la IS26, estos dos últimos ORFs corresponden al TC (Figura 25). Esto sugirió que se encontraba hacia el extremo 5' de TC la β-lactamasa TEM-1 en asociación con otra IS26. Para completar el TC duplicado en tandem, se realizó un PCR con los oligonucleótidos OT-2 específico para el gen de la β-lactamasa TEM-1<sup>123</sup> y P1 específico para el gen de la β-lactamasa SHV-5 (ORF07 del TC) (ver materiales y métodos), obteniendo un fragmento de 7,250 pb (Figura 26).



5' -1,312 pb (IS26 140 pb y 861 pb TEM-1)

3' -855 pb (IS26 655 pb y 159 pb *ygbM*)

Figura 25. Identificación de los ORFs en el inserto de una clona resistente a ampicilina.

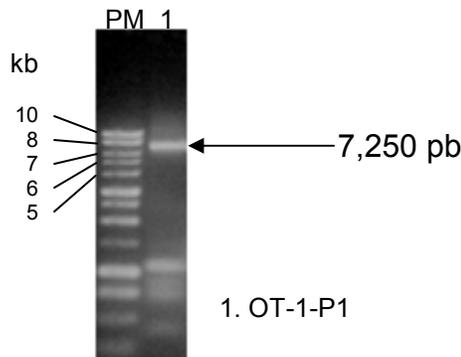


Figura 26. Amplificación por PCR mediante los oligonucleótidos OT-1 (TEM) y P1 (SHV).

Una vez obtenido el producto de PCR, se realizó un banco de DNA, generando una placa de 96 templados y se secuenció por ambos extremos. El ensamble de las secuencias se analizó por separado y permitió identificar los siguientes ORFs: *tem*, *tir*, *pemI*, *pemK*, *mucA*, *mucBΔ*, *IS26*, *ygbM*, *fucA*, *ygbK*, *ygbJ*, *deor* y SHV-5. Los genes *bla<sub>tem</sub>* y *bla<sub>SHV</sub>* fueron secuenciados parcialmente debido a la ubicación de los oligonucleótidos. Al ser analizadas estas secuencias en conjunto con las del TC, se obtuvo la estructura de un transposón compuesto duplicado en tandem (TCDT) (Figura 27).

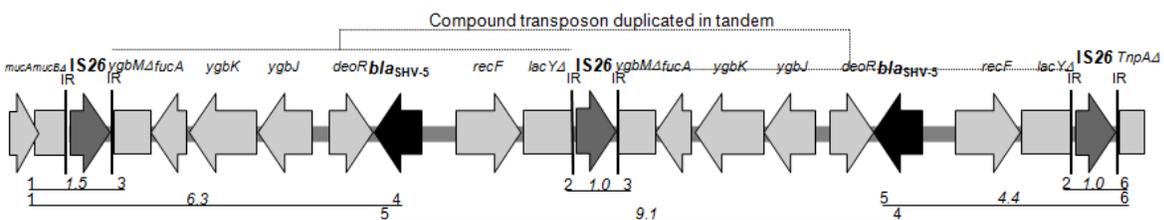


Figura 27. Representación esquemática del transposón compuesto duplicado en tandem. No se muestran los genes *tem*, *tir*, *pemI* y *pemK* que se encuentran en el extremo 5' de *mucA*. Las líneas indican la amplificación por PCR de los diferentes fragmentos, los números indican el oligonucleótido (ver Tabla 5). Los números en *italicas* corresponde al tamaño molecular del fragmento amplificado.

Con respecto al extremo 3' del TCDT se identificó parte de un ORF que correspondió a una transposasa (TnpA; 693 pb). Una vez que se habían identificado los ORFs que bordean en ambos extremos del TCDT, se diseñaron múltiples oligonucleótidos (Tabla 5), la que permitieron confirmar la estructura del TCDT. En la figura 28 se observan las diferentes combinaciones y los productos amplificados. Las combinaciones 1-3 y 6-2 amplificaron los ORFs que rodean al TCDT en cada extremo (5' y 3') y los ORFs *ygbM* y *lacY* respectivamente. Las combinaciones 1-4 y 5-6 confirmaron la distancia que existe entre los ORFs que rodean el TCDT con respecto a la BLEE SHV-5. La combinación 5-4, confirmó la distancia que existe entre las dos ORFs de las  $\beta$ -lactamasas SHV-5 contenidas en cada TC. Por último la combinación 2-3 amplificó un segmento de DNA que contiene el ORF09 (último ORF del TC) y el ORF02 (primer ORF del TC) de los TC (Tabla 5).

Las amplificaciones obtenidas de las diferentes combinaciones de oligonucleótidos y la secuencia de nucleótidos correspondieron a las esperadas de acuerdo a cada combinación respectiva. Los oligonucleótidos 2-3 también permitieron confirmar que la estructura del TCDT no se pierde al paso de las generaciones sin presión selectiva del antibiótico (Figura 28).

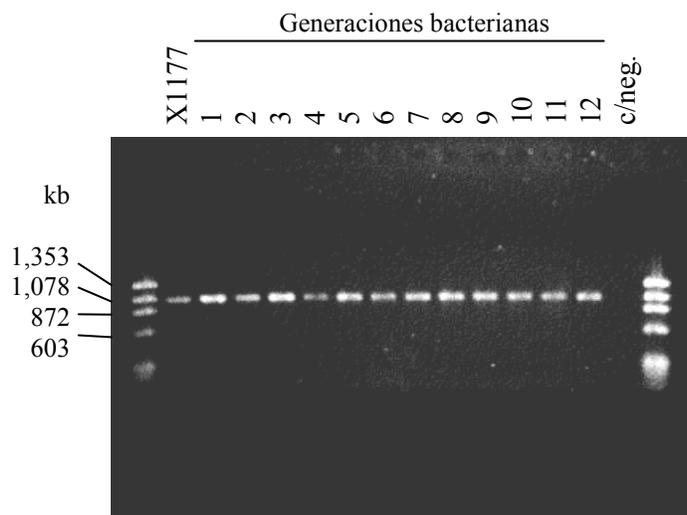


Figura 28. Amplificación mediante PCR de la región de los ORFs *lacY*-IS26-*ygbM* en más de 10 generaciones de bacterias lo permite identificar la duplicación en Tandem del TC. X1177, transconjugante; 1 a 12, generaciones bacterianas; c/neg, control de la amplificación sin DNA.

## Características de los ORFs contenidos en el TC

Los primeros cuatro ORF contenidos dentro del TC forman parte de un operón incompleto (*ygbMΔ*, *fucA*, *ygbK* y *ygbJ*) involucrado en el metabolismo del azúcar y *ygbI* su gen regulador; la enzima SHV-5 contenido en la hebra de DNA complementaria confiere la resistencia a penicilina, cefalosporinas de 1<sup>ra</sup>, 2<sup>da</sup> y 3<sup>ra</sup> generación y monobactams (aztreonam); RecF, una proteína putativa y otro gen truncado *lacY*, el cual codifica una proteína de transporte de lactosa. Con respecto a las IS26 que bordean a los ORFs del TC forman parte de la familia IS6 que se caracteriza por la fusión de ambas ID durante la replicación, donde el replicon donador y blanco son separados por copias de IS directas repetidas<sup>62,97</sup>. Los dos genes en el extremo 5' de TC corresponden al operón *mucA-mucB* (1,263 bp). Este operón confiere resistencia a luz ultravioleta y ha sido identificado en varios plásmidos<sup>97,128,129</sup>, sin embargo el gen *mucB* está truncado por la inserción de la IS26 izquierda en este plásmido (Figura 27), sin embargo se identificó una secuencia que no fue incorporada a un contig que corresponde a otra posible copia del gen *mucB* completa (datos no mostrados).

## Similitud del pHNM1 con los plásmidos pCTX-M3 y pEL60

El ensamble del total de las secuencias (564) permitió identificar 37 contigs obtenidos, uno le corresponde al TC, nueve contigs correspondieron a genes cromosomales de *E. coli* K12 con tamaños de 624 a 1,056 pb, todos formados por dos clonas solamente. Los restantes 27 contigs con tamaños de 826 pb a 2,723 pb al ser analizados por BLAST mostraron una similitud a nivel de nucleótidos del 99% con los plásmidos pCTX-M3 de *Citrobacter freundii*<sup>97,130</sup> (Figura 29) y pEL60 de *Erwinia amylovora* (Figura 30)<sup>131</sup>. En la figura 29 se muestra la estructura del plásmido pCTX-M3 y la ubicación de los contigs (marcados en el centro de la figura), con similitud con el plásmido pCTX-M3. Los ORFs correspondieron a genes de conjugación (genes *tra* y *trb*), replicación (*repABC*), transposasas (Tn1) y múltiples ORFs sin función conocida. En la figura se observa una región libre de secuencias (contigs) que tengan similitud con el plásmido pCTX-M3. Esta región en el plásmido pCTX-M3 corresponde a un integrón de clase 1, el cual contiene genes de resistencia a aminoglucósidos y tampoco se encuentra en el plásmido pEL60. En la figura 30 se muestra una comparación de los plásmidos pCTX-M3 y pEL60, cuya diferencia radica principalmente en los genes de resistencia a antibióticos y los elementos genéticos que los contienen. Las diferencias entre ambos plásmidos radican principalmente en la ausencia de

genes de resistencia a antibióticos como cefalosporinas, ampicilina, trimetoprima, aminoglucósidos y macrólidos, los cuales se encuentran en asociación con TnpA, IS26, Tn10 e integrones de clase 1.

## **Análisis comparativo entre las copias TC y en en diferentes plásmidos y cromosomas**

La comparación de los TC que se encuentran duplicados en tandem (TC izquierdo contra TC derecho), muestra una similitud de nucleótidos del 100%. No obstante al comparar el TC identificado en este estudio contra los descritos en Genbank identificamos que comparten un 99% de identidad (Tabla 7). El análisis de BLAST de la secuencia de nucleótidos del TC se muestra en la tabla 7. En esta tabla se muestran las secuencias que contienen el TC o parte del TC identificado en este estudio. Esta tabla incluye el número de acceso a Genbank de cada uno de los plásmidos y además están incluidos los tres genomas de *Klebsiella* depositados en Genbank. Como se muestra en la columna de la longitud del alineamientos (Alignment length), los plásmidos p1658/97, pSEM y pIP1202 son los únicos que contiene el TC completo con una similitud de 99% en los tres plásmidos. Con lo que respecta a los tres genomas de *K. pneumoniae* secuenciados hasta el momento (*K. pneumoniae* MGH78578 [NC\_009648], *K. pneumoniae* 342 y *K. pneumoniae* NTUH-K2044); los genomas de *K. pneumoniae* MGH78578 y *K. pneumoniae* NTUH-K2044 contienen un segmento de 8,011 pb que corresponde al segmento que se encuentra bordeado por las IS26. En cuanto al *K. pneumoniae* 342 contiene dos segmentos de 8,026 y 6,457 pb muy cercanos en el cromosoma. Las secuencias parciales sometidas a Genbank corresponden a aquellas que muestran un alineamientos parcial de las secuencias de DNA.

En particular en la tabla 8 podemos encontrar los plásmidos y genomas que contienen el TC y su similitud con el TC descrito en este estudio, así como sus posiciones de los cambios de nucleótido. Se observa un mayor número de sustituciones en el genomas de *K. pneumoniae* MGH en comparación con los TC de los plásmidos. El árbol filogenético derivado del alineamiento de secuencias de bases, indica una mayor relación entre los TC de los plásmido, con una mayor relación con el segmento de DNA contenido en el genoma de *K. pneumoniae* MGH. El segmento de DNA del genomas de la *K. pneumoniae* 342 es más divergente (Figura 31).

**Tabla 7. Análisis de BLAST de la secuencia de nucleótidos del TC.**

Query	Subject	% identity	Alignment length	Number mismatches position	Number gaps position	Query sequence start	Query sequence end	Subject sequence start	Subject sequence end	Score
pHNM1	<b>pIP1202</b> (CP000603.1)	99.63	9649	23	13	1	9648	136266	145902	1.76E+04
pHNM1	<b>p1658/97</b> (AF550679.1)	99.63	9649	23	13	1	9648	85735	95371	1.76E+04
pHNM1	<b>pSEM</b> (AJ245670.3)	99.37	9649	43	17	1	9648	1	9446	1.71E+04
pHNM1	<b><i>K. pneumoniae</i></b> <b>NTUH-K2044</b> (AP006725.1)	98.95	8011	67	17	821	8828	2520124	2528120	1.43E+04
pHNM1	<b><i>K. pneumoniae</i></b> <b>MGH78578</b> (CP000647.1)	98.83	8011	77	17	821	8828	1779650	1787646	1.43E+04
pHNM1	<b>pK245</b> (DQ449578.1)	99.52	7535	23	13	1	7534	75673	83195	1.37E+04
pHNM1	<b><i>K. pneumoniae</i></b> <b>342</b> (CP000964.1)	93.62	8026	457	53	821	8828	2840485	2832497	1.19E+04
pHNM1	<b><i>K. pneumoniae</i></b> <b>342</b> (CP000964.1)	93.76	6457	356	45	821	7262	2857413	2850989	9648
pHNM1	<b>pE71</b> (DQ247972.1)	98.66	4479	50	10	1776	6252	6680	2210	7930
pHNM1	<b>pEC-IMPQ</b> (EU855788.1)	98.5	4479	47	8	1776	6252	251879	256339	7882
pHNM1	<b>pEC-IMP</b> (EU855787.1)	98.5	4479	47	8	1776	6252	246158	250618	7882
pHNM1	<b>pKPN4</b> (CP000649.1)	98.5	4479	47	8	1776	6252	14504	10044	7882
pHNM1	<b>pUMB9</b> (EF370423.1)	98.5	4479	45	10	1776	6252	4991	533	7880
pHNM1	<b>pNSF-1</b> (AF282921.1)	99	3590	22	14	4039	7626	3578	1	6418
pHNM1	<b>pPAG-KE</b> (AF096930.1)	98.86	3345	23	15	4280	7622	3332	1	5952
pHNM1	<b>pKP53</b> (AY518560.1)	99.67	2399	1	7	5005	7403	2392	1	4379
pHNM1	<b>pBP60-1-2</b> (X53433.1)	98.63	2337	19	13	4754	7088	2354	29	4126
pHNM1	<b>EaN146</b> (EU534207.1)	98.47	2215	28	6	4040	6252	5656	3446	3897
pHNM1	<b>pMPA2a</b> (X84314.1)	98.38	2216	30	6	4039	6252	3660	1449	3888
pHNM1	<b>pZMP1</b> (X53817.1)	98.15	2217	31	10	4039	6252	3663	1454	3858

**Tabla 8. Mutaciones contenidas a lo largo varios TC contenidos en los plásmidos pHNM1, pSEM, p1658/97 y pIP1202 y el segmento de *K. pneumoniae*.**

Plásmido	Mutaciones																			
Posición	956	1573	1609	1690	1775	1861	1888	1895	1912	1944	2007	2050	2068	2311	2341	2547	2573	2610	2664	2838
pHNM1	A	G	A	G	A	T	C	G	T	G	G	T	C	C	G	C	C	A	A	G
pSEM	C	T								A							T			T
P1658/97	C																			T
pIP1202	C																			
K_pn MGH	C		G	C	G	C	T	A	C		A	C	T	T	A	A		G	C	

Plásmido	Mutaciones																			
Posición	3206	3231	3181	3187	3269	3329	3394	3614	3658	3661	3707	3754	3830	3967	4126	4254	4290	4336	4341	4342
pHNM1	A	T	G	G	C	G	G	T	T	G	A	C	A	A	A	G	C	G	T	T
pSEM		C	A		A	A					G		G					A	A	A
P1658/97																				
pIP1202																				
K_pn MGH	G			T			A	G	C	C		T		G	T	A	T			

Plásmido	Mutaciones																			
Posición	4373	4435	4437	4560	4594	4619	4652	4885	5075	5183	5196	5234	5390	5414	5471	5473	5476	5774	5819	6084
pHNM1	G	C	A	A	G	C	C	A	A	T	T	T	G	A	C	T	T	T	G	A
pSEM	A		T	G	T			G												
P1658/97																				
pIP1202																C	C			
K_pn MGH		G				A	T		T	C	C	C	C	G	T	C	C	C	A	T

Plásmido	Mutaciones																			
Posición	6286	6733	6594	6739	7098	7375	7335	7362	7413	7533	7561	7692	8545	8605	8677	8681	8603	8954		
pHNM1	T	A	T	G	A	C	T	C	A	C	G	G	C	G	C	A	C	G		
pSEM						-				T	-				A	G	T	C		
P1658/97										T										
pIP1202										T										
K_pn MGH	G	G	C	T	G		C	T	G	T			A	T	A					



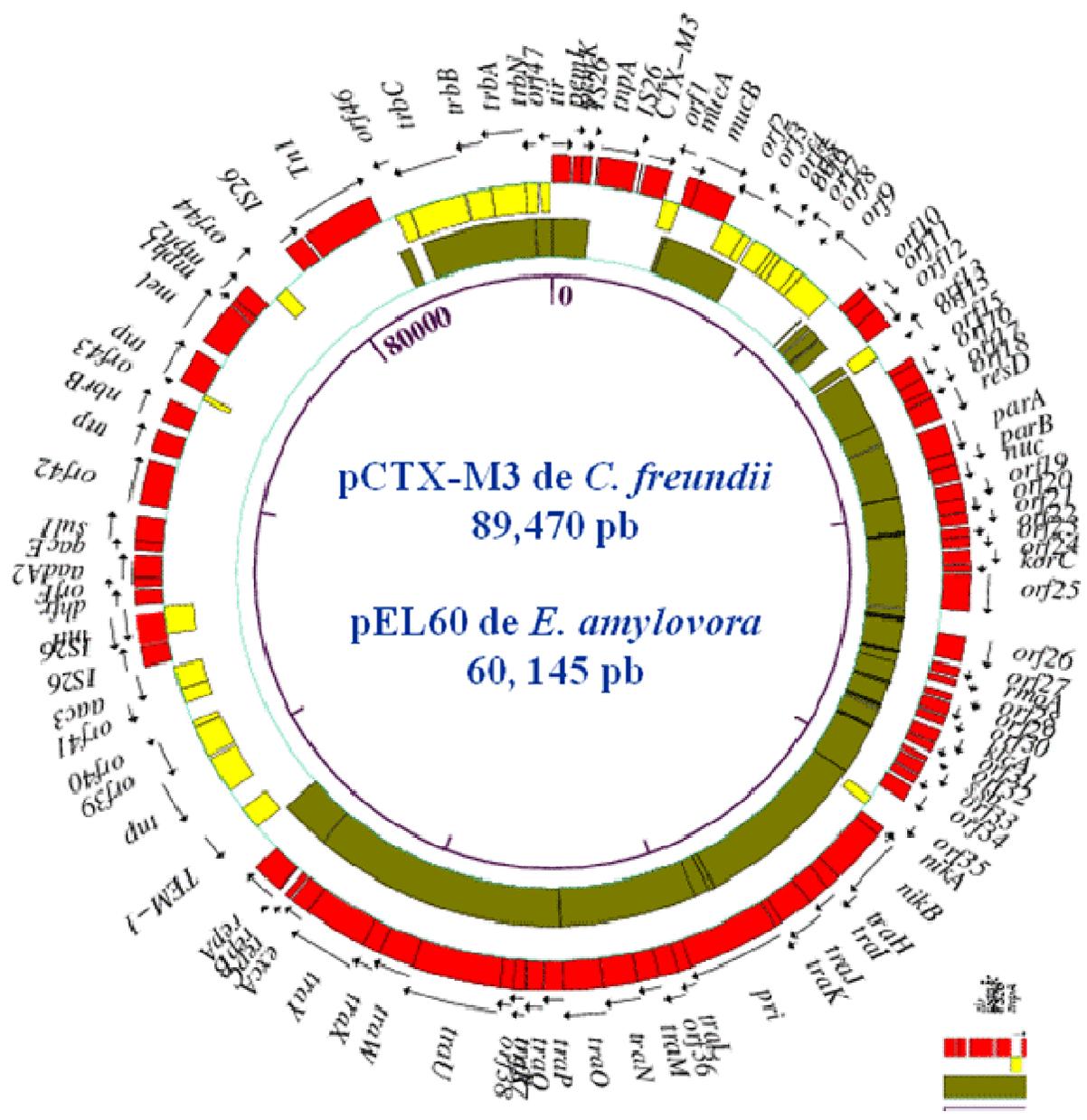


Figura 30. Esquema del plásmido pCTX-M3 de *C. freundii* y su similitud con el plásmido pEL60 de *E. amylovora*.

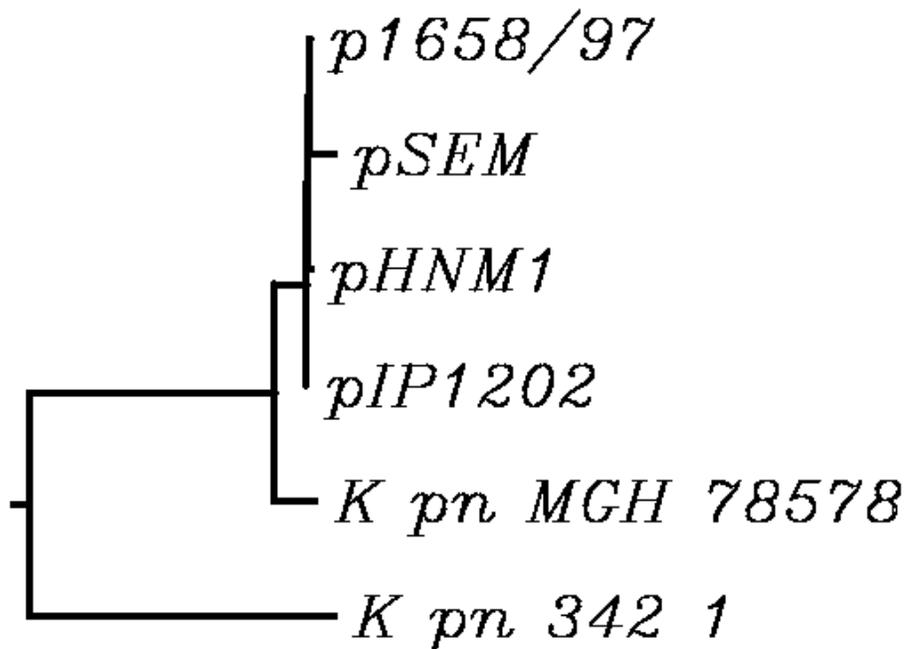


Figura 31. Arbol filogenético de los TC (comprende 7,989 pb, sin la secuencia de las IS26 de ambos extremos) contenidos en los plásmidos pHNM1 (este estudio), p1658/97, pIP1202 y los genomas de *K. pneumoniae* MGH78578 y *K. pneumoniae* 342-1<sup>a</sup>. El análisis se realizó utilizando clustalW (<http://align.genome.jp/>), usando el método de Neighbor-joining para generar el árbol filogenéticos de los TC.

<sup>a</sup> El genoma de *K. pneumoniae* 342 contiene una duplicación parcial del segmento del TC de 6,425 pb, el cual no fue incluido en el análisis.

## DISCUSIÓN

La BLEE SHV-2a fue identificada en el año 1990 formando parte de un operón que contiene el gen *aphA1* en la primera posición <sup>97,110</sup>, nueve años después (1999), se identificó que este gen es expresado por un promotor híbrido formado entre una IS26 y el mismo promotor de la SHV-2<sup>a</sup> <sup>111</sup>. Al año siguiente (2000) se identificó a la BLEE SHV-5 en un extremo de un integrón de clase 1 <sup>112</sup>. En el año 2001 se identificó la BLEE SHV-2 sin algún contexto genético relevante <sup>113</sup>. La identificación de la β-lactamasas SHV-1 fue en el año de 1972 y tuvieron que pasar 32 años para que surgieran los primeros indicios que relacionara a las β-lactamasas de la familia SHV con un elemento genético móvil. Este elemento correspondió a un transposón compuesto (TC), descrito en el 2004, el cual contiene la BLEE SHV-5 en el plásmido pACM1. No obstante, este TC está bordeado por dos IS26 truncadas (Figura 32). La BLEE SHV-5 está formando parte del TC en conjunto con otros siete genes, correspondieron a segmento del genoma de *K. pneumoniae* <sup>132</sup>. Posteriormente en el año 2005 describen la estructura del TC en el plásmido pSEM, (Figura 33) <sup>133</sup> y en su extremo 3' se encuentra un integrón de clase 1, previamente identificado en el año 2000 (Figura 14C) <sup>112</sup>. El primer plásmido secuenciado completamente, denominado p1658/97, contiene el TC el cual fue descrito en el 2007. Este plásmido contiene la BLEE SHV-5 y fue identificado en un aislamiento clínico de *E. coli* (Figura 34) <sup>126</sup>. La historia de la identificación y análisis de este será presentado posteriormente.

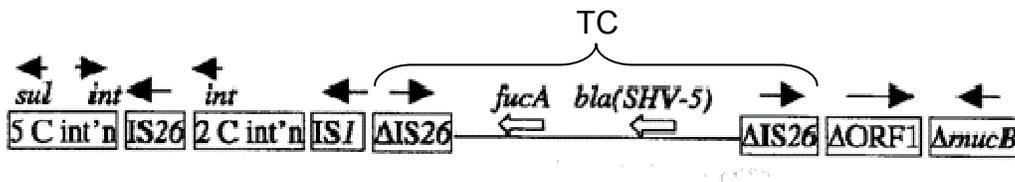


Figura 32. Esquema del transposón compuesto. Este TC contiene a la BLEE SHV-5 junto con los siete ORFs adicionales que forman parte de los genomas de *K. pneumoniae*.

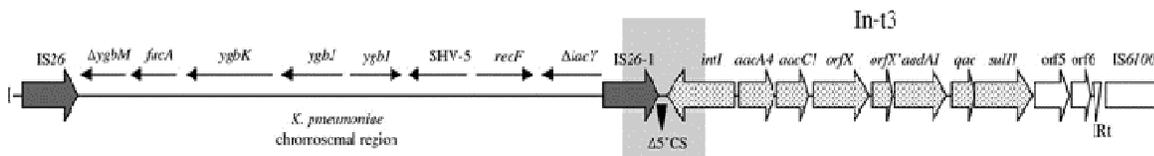


Figura 33. Esquema del TC identificado en el plásmido pSEM que contiene un integrón de clase 1.

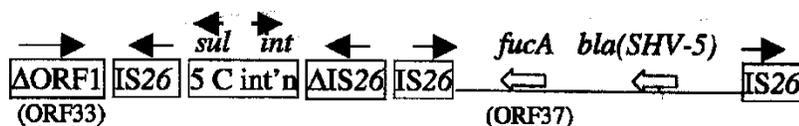


Figura 34. Esquema del TC identificado en el plásmido p1658/97.

Los reportes anteriores describen solo a BLEEs tipo SHV en diferentes plásmidos, en el año 2001 fue descrita la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 contenida en el genoma de *K. pneumoniae*<sup>102</sup>. En resumen, los reportes descritos anteriormente describen que a las BLEEs SHV-2a y SHV-5 están involucradas con una IS26, ya sea generando un promotor híbrido o formando parte de un transposón compuesto.

Los aislamientos clínicos que contienen el TC fueron obtenidos de varias especies bacterianas, desde 1993 con el plásmido pACM1, hasta el 2009 con el plásmido pEC-IMPQ. Vale la pena señalar las ubicaciones geográficas (EE.UU, pACM1; Taiwán, pEC-IMPQ y pSEM, Albania) porque es interesante el hecho de que este elemento genético está distribuido en varias regiones geográficas. Ahora este transposón compuesto ha sido identificado que está duplicado en tandem en el plásmido pHNM1 (70 kb) en la bacteria *E. cloacae* asociada con un brote intrahospitalario que se produjo en México<sup>92</sup> un país con varios reportes de SHV-5 en enterobacterias causante de brotes intrahospitalarios<sup>87,89,134</sup>. No se puede descartar la posibilidad de que esté TC esté relacionado con los brotes de diferentes especies bacterianas. En base a lo anterior se realizó un análisis de BLAST de la secuencia de nucleótidos del TC descrito en este estudio. Los resultados fueron mostrados en la tabla 7. Preston y col<sup>127</sup> al igual que Ford y Avison<sup>135</sup> (Figura 35), mostraron algunas secuencias que identificaron durante los análisis de secuencias obtenidas de GenBank.

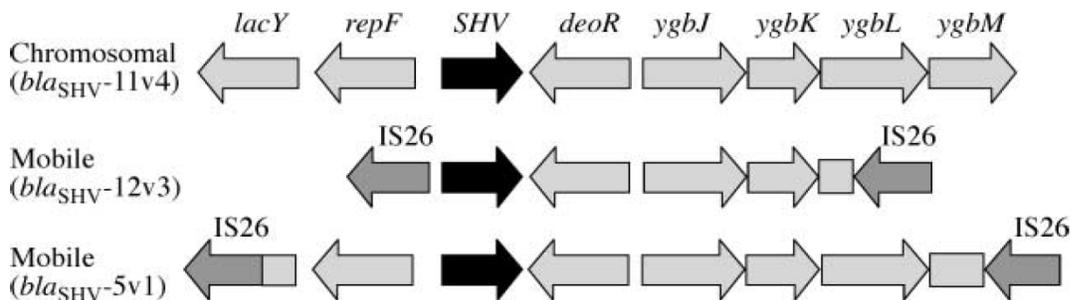


Figura 35. Contexto genético de variantes SHV tanto en el cromosoma de *K. pneumoniae* como en plásmidos. La orientación de los genes está representado por la flechas. La variante SHV están representadas por las flechas negras y las secuencias de inserción están indicadas<sup>135</sup>.

En la figura 36 se muestra la comparación del TC contenido en los plásmidos pIP1202, p1568/97, pSEM y pK245, los cuales contienen la estructura completa del TC (Tabla 7). Por otro lado en la figura 37 se muestran variaciones de la estructura del TC, donde los plásmidos pE71, pEM-IMP y pEC-IMPQ, tienen una estructura similar al identificado anteriormente por Ford and Avison. Esta estructura es de menor tamaño (pb), cuyas IS26 se encuentran más próximas a la BLEE SHV-5 en ambos extremos. En el caso del plásmido pKPN4, en el extremo 3' es idéntico a los descritos anteriormente, sin embargo en el extremo 5' la IS se encuentra deletada por la inserción de una transposas. Los plásmidos pmK105 y pK7746, descritos en esta misma figura, es el ejemplo de las secuencias parciales que se encuentran en GenBank, cuya estructura es muy similar a la del TC de menor tamaño. Estas estructuras parcialmente secuenciadas podrían corresponder a TC que se encuentran en un gran número de plásmidos que contienen BLEE tipo SHV. Esto indica que el TC podría ser el mecanismo molecular que ha estado involucrado en la diseminación de este tipo de BLEE.

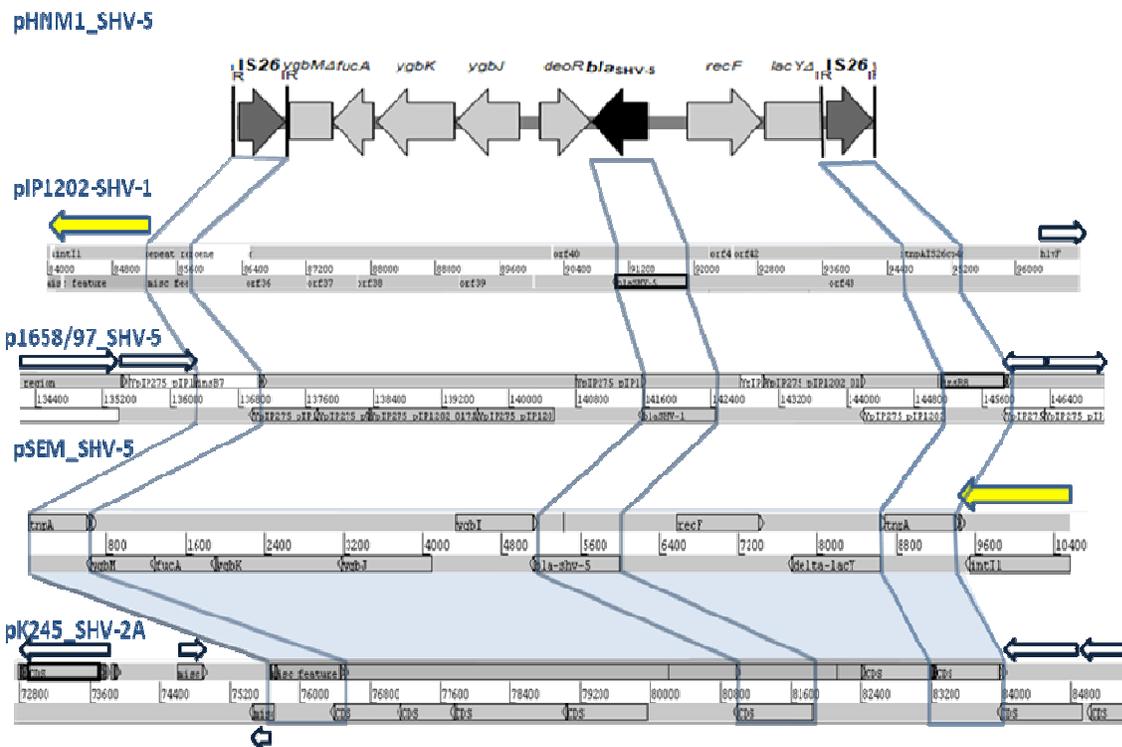


Figura 36. Comparación del TC identificado en este estudio con TC contenidos en diferentes variantes de las  $\beta$ -lactamasas tipo SHV. La parte superior de la figura se encuentra el TC identificado en este estudio. Los siguientes esquemas representan a TCs identificados en varios plásmidos, cuyo nombre está descrito en la parte izquierda de la figura. Las flechas amarilla corresponde a un integrón de clase 1 y las flechas en blanco corresponden a ORFs no relacionados.

La BLEE SHV-5 bordeada por ORFs que correspondían al genoma de *K. pneumoniae*, fue publicado en el año 2000 <sup>132</sup>. Este trabajo fue el pionero en describir que el origen de la  $\beta$ -lactamasas tipo SHV correspondía al cromosomal de *K. pneumoniae*. Esto ha sido confirmado por diversas publicaciones adicionales <sup>127,133,135,136</sup>. En esas fechas el genoma de *K. pneumoniae* MGH 78578 (NC\_009648) se encontraba sin ensamblar y aun en forma de contigs. Actualmente aún no ha sido publicado, no obstante ya esta secuenciado completamente y se encuentra anotado. Recientemente se han reportado dos genomas adicionales de *K. pneumoniae* 342 (NC\_011283) y *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (NC\_012731). El contexto genético que bordea a las  $\beta$ -lactamasas es el mismo en los tres genomas, sin embargo los genomas de *K. pneumoniae* MGH78578 y *K. pneumoniae* NTUH-K2044 contiene la  $\beta$ -lactamasas SHV-11 y el genoma de la bacteria *K. pneumoniae* 342 contiene a LEN-1 (Figura 38). La similitud entre SHV-1 y LEN-1 es del 89% (777/864 nucleótidos) y desde 1997 que fueron reportados como dos alelos las han considerado como a SHV-1 como una enzimas codificada en plásmidos y a LEN-1 en el cromosoma de *K. pneumoniae* <sup>137</sup>. Ambos genes de confieren resistencia a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina y ticarcilina pero no a antibióticos  $\beta$ -láctamicos de espectro extendido. Hasta la fecha LEN-1 se han identificado 24 variantes (<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-00002u-03q/beta-lactamase-enzyme-variants>), las cuales no se han identificado en plásmidos y ninguna con actividad de espectro extendido <sup>138</sup>.

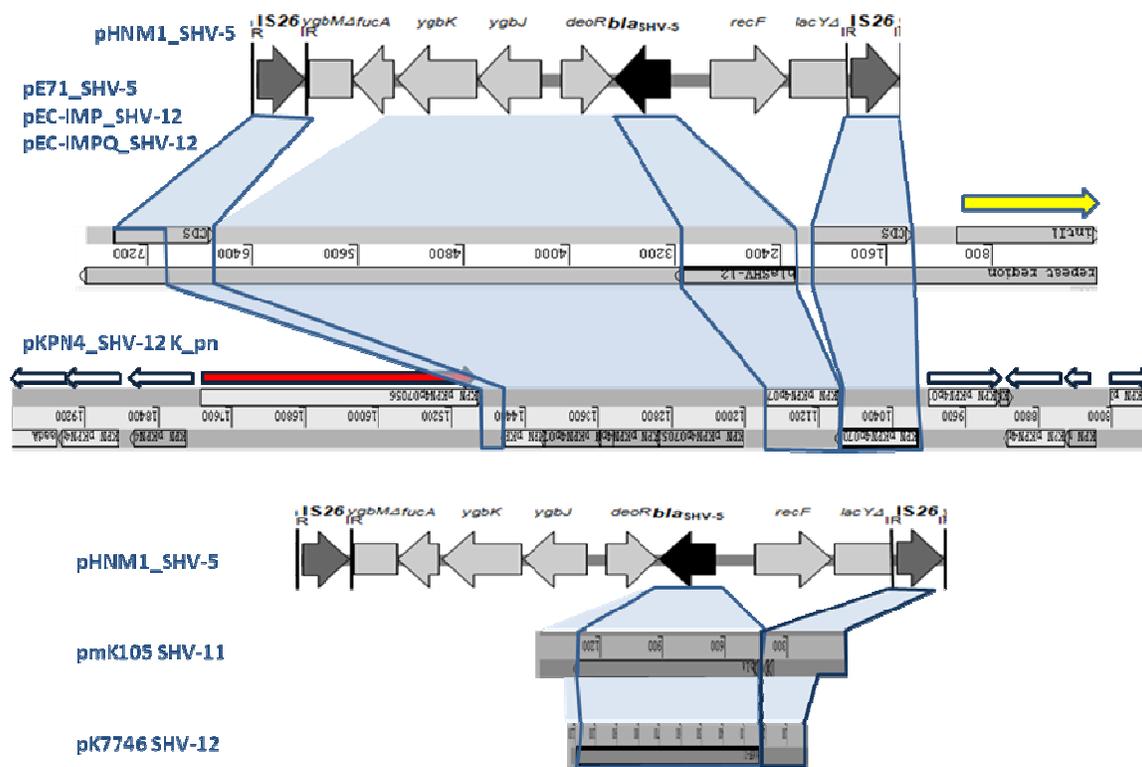


Figura 37. Comparación del TC identificado en este estudio con un TC de menor tamaño que contiene diferentes variantes de las  $\beta$ -lactamasas tipo SHV. La parte superior de la figura se encuentra el TC identificado en este estudio. Los siguientes esquemas representan a TCs identificados en varios plásmidos, cuyo nombre está descrito en la parte izquierda de la figura. Las flechas amarilla corresponde a un integron de clase 1 y las flechas en blanco corresponden a ORFs no relacionados. Los plásmidos pmK105 (*S. dysenteriae*) y pK7746 (*K. pneumoniae*) son secuencias parciales del TC.

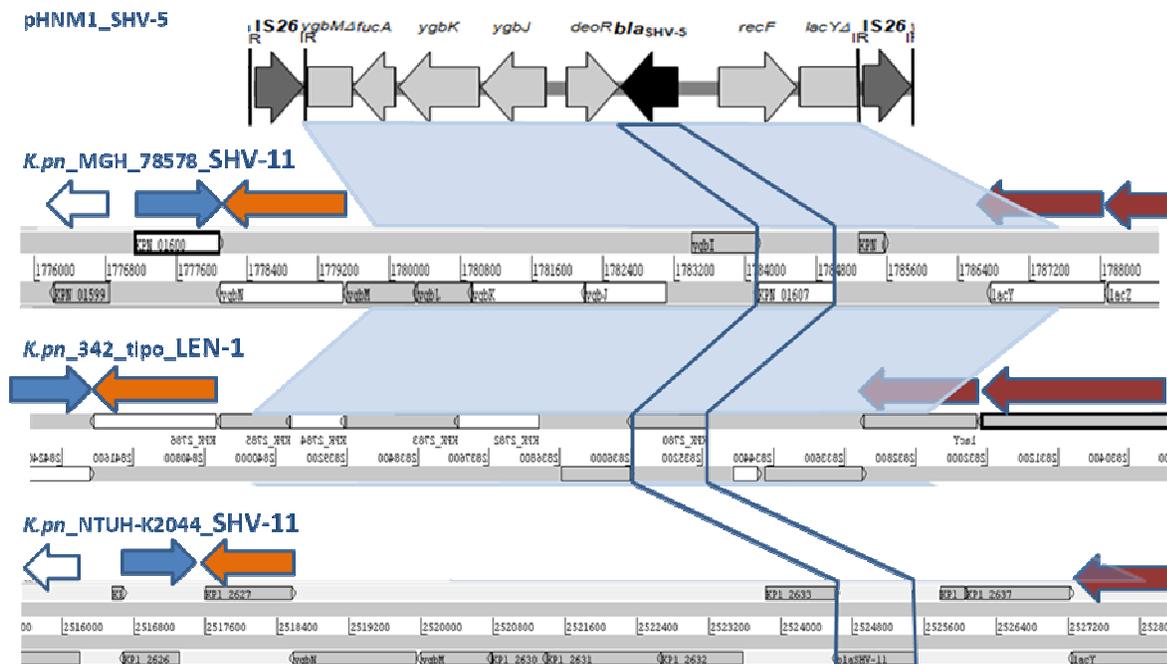


Figura. 38. Regiones que comparten los diferentes genomas secuenciados de *K. pneumoniae* con el TC y la  $\beta$ -lactamasa que contiene.

## Antecedentes del plásmido p1658/97

El plásmido p1658/97 fue obtenido de un aislamiento clínico de *E. coli* en el año 1997 en Polonia, de un niño con cinco días de nacido que presentaba choque séptico. En el estudio se identificaron dos grupos de aislamientos; el primer grupo formado por cinco cepas resistentes a múltiples antibióticos, incluyendo cefalosporinas de tercera generación y el segundo grupo constituido por siete cepas resistentes a múltiples antibióticos, excepto cefalosporinas de tercera generación. Es decir que las cepas compartían las mismas resistencias excepto a antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Tabla 9). Cuando se compararon estos dos grupos de cepas mediante PFGE, se identificó que compartían el

mismo origen clonal. Posteriormente al analizar los plásmidos de ambas grupos de aislamientos (denominándolos p1657/97 al plásmido de los aislamientos resistentes a  $\beta$ -lactámicos y p1658/97 a las susceptibles), se identificaron fragmentos no equimolares en la región que contenía a la BLEE SHV-5 identificada mediante hibridación tipo Southern (Figura 39). Los autores concluyeron que la región que contenía a las BLEE SHV-5 está amplificada, generando más copias de la BLEE, lo que le provocaba ser resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos <sup>139</sup>.

**Tabla 9. Se muestran los CMI del grupo de cepas resistentes y susceptibles a múltiples antibióticos, donde se observa la diferencia en MIC (de sus siglas en ingles Minimal Inhibitory Concentration) en el grupo de antibióticos  $\beta$ -lactámicos.**

TABLE 1. MICs for the outbreak isolates and the *E. coli* 173/97 strain evaluated by the agar dilution method<sup>a</sup>

Antibiotic(s)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) for bacterial strain(s):			
	Resistant group (n = 5)	Susceptible group (n = 7)	<i>E. coli</i> 173/97 <sup>b</sup> (n = 1)	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Ampicillin	>512	256	256	4
Piperacillin	256	16	32	2
Piperacillin + tazobactam <sup>c</sup>	2	1	1	2
Ceftazidime	128	4	4	0.25
Ceftazidime + clavulanate <sup>d</sup>	0.125	0.06	0.06	0.125
Cefotaxime	32	1	1	0.06
Cefotaxime + clavulanate	$\leq 0.03$	$\leq 0.03$	$\leq 0.03$	$\leq 0.03$
Cefepime	16	1	0.5	0.06
Cefepime + clavulanate	0.06	0.06	0.06	0.06
Ceftibuten	8	0.5	0.5	0.25
Ceftibuten + clavulanate	0.125	0.125	0.125	0.25
Aztreonam	256	8	8	0.125
Aztreonam + clavulanate	$\leq 0.03$	$\leq 0.03$	$\leq 0.03$	0.06
Cefoxitin	8	4	2	2
Imipenem	0.06	0.06	0.125	0.06
Gentamicin	8	8	8	1
Amikacin	16	16	16	1

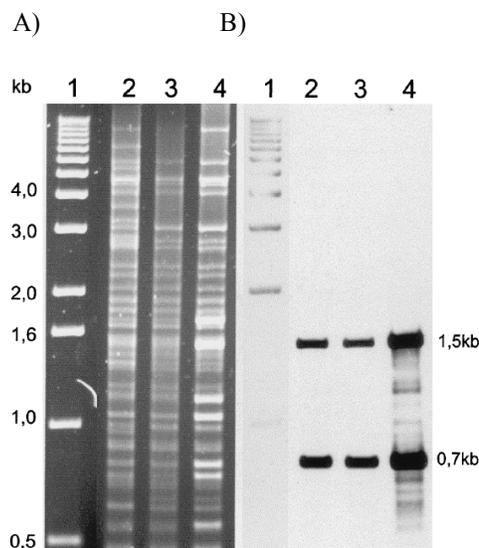


Figura 39. Análisis de plásmidos; A) Resultado del análisis de restricción con la enzima PstI; B) resultado de la hibridación de los plásmidos con la sonda SHV. Líneas: 1, 1 kb DNA ladder; 2, aislamiento 174/97 de *E. coli* no relacionado; 3, aislamiento susceptible 1658/97; 4, aislamiento resistente 1657/97.

Posteriormente determinaron la secuencia del plásmido p1658/97 que provenía del grupo de las cepas susceptibles a cefalosporinas de tercera generación. El tamaño fue 125,491 pb (Figura 44), el cual mostró tener una estructura de mosaico al contener diferentes módulos con similitud a otros plásmidos como F y R100, cuyos segmentos son separados por módulos de otros plásmidos como R64, R391, un transposón tipo SXT de *V. cholerae* y segmentos del cromosoma de *K. pneumoniae* y *E. coli*. El segmento que corresponde al cromosoma de *K. pneumoniae* correspondió al TC que contiene el gen de la BLEE SHV-5. Interesantemente en este trabajo se determinó que hay una hiperproducción de la enzima SHV-5 que correlaciona con la amplificación en tandem del TC, generando varias copias de la BLEE SHV-5 en el mismo plásmido. Este aumento en el número de copias correspondió a la amplificación del segmento de 9 kb que contiene el TC (9,637 bp) (Figura 40). Las dos IS26 (cada una de 820 pb) que forman el TC probablemente juegan un rol en la amplificación mediante recombinación homóloga mediante la recombinación de los IR<sup>126</sup>. Adicionalmente, Hammond y col relacionaron la presencia de IS26 en *K. pneumoniae* con el aumento en el número de copias de los genes tipo SHV<sup>136</sup>. Así mismo, estas IS26 han sido identificadas formando parte de otros TC, los cuales contienen las BLEEs VEB-1<sup>97,140</sup>.

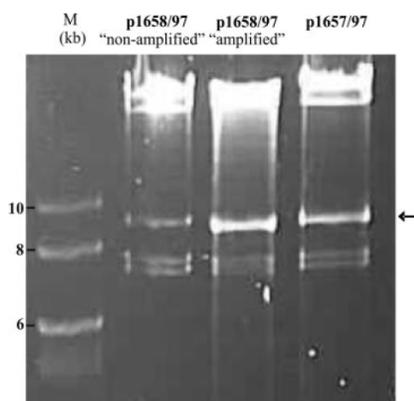


Figura 40. Digestión con la enzima SmaI del plásmido p1658/97 de la cepa sin amplificar y amplificada y comparado con el plásmido p1657/97. Estos resultados de la digestión del plásmido p1658/977 con la regiones no amplificadas y amplificadas corresponden a colonias de *E. coli* colectadas dentro y fuera del área de inhibición, respectivamente.



Figura 41. Esquema del plásmido p1658/97. Los ORF son mostrados con flechas. La orientación de los elementos genéticos móviles son mostrados por flechas negras. Las regiones con una similitud mayor al 90% (a nivel de nucleótidos) al segmento de DNA siguiente son mostrados por las siguientes leyendas: 1, plásmido F; 2, plásmido R100; 3, tanto el plásmido F y plásmido 100; 4, Los cromosomas de *E. coli* y *S. enterica* serotipo Typhimurium; 5, una región identificada en el cromosoma de *K. pneumoniae* y en los plásmidos pHNM1, pSEM y pACM1; 6, isla genómica de R391 de *P. rettgeri* y del transposón STX de *Vibrio cholerae*; 7, plásmido R64; 8, regiones específicas del plásmido p1658/97; región compartida con pSEM, pACM1 y algunos otros plásmidos que contienen un integrón de clase 1. Los módulos funcionales del plásmido son indicados: PAR, partición; PSK, postsegregational killing; REP, replicación. El contenido de G+C de las secuencias se muestra en círculos internos en la figura.

## Mecanismo de duplicación del TC en tándem

Como fue descrito anteriormente la amplificación de genes sucede usualmente en dos procesos; duplicación en tándem que conyeva a un incremento en el número de copias de la duplicación, donde la amplificación en tándem es el paso inicial. Este proceso inicial de duplicación en tándem ocurre mediante recombinación homóloga, generando una amplificación en tándem y puede conducir a un incremento en el número de copias de la duplicación. De acuerdo a los dos mecanismos propuestos que explican la formación de la amplificación de genes, la recombinación (crossover) y el mecanismo CER, ambos involucran la replicación normal de DNA. El mecanismo de recombinación está basado en la forma de la burbuja de replicación (Figura 42A) y el CER requiere la existencia de dos replicones en la misma célula. Alternativamente el mecanismo CER puese usar la burbuja de replicación como un intermediario circular de un brazo de la burbuja de replicación y reinsertarse en el otro brazo (Figura 42B).

En la figura basada en la recombinación, se observa que la duplicación produce copias adicionales idénticas al segmento de DNA e incrementa el número de copias o la eliminación de un TC. En la figura, basado en el mecanismo CER, involucra la creación de moléculas de DNA circular y su subsecuente recombinación con otra molécula de DNA para formar duplicados.

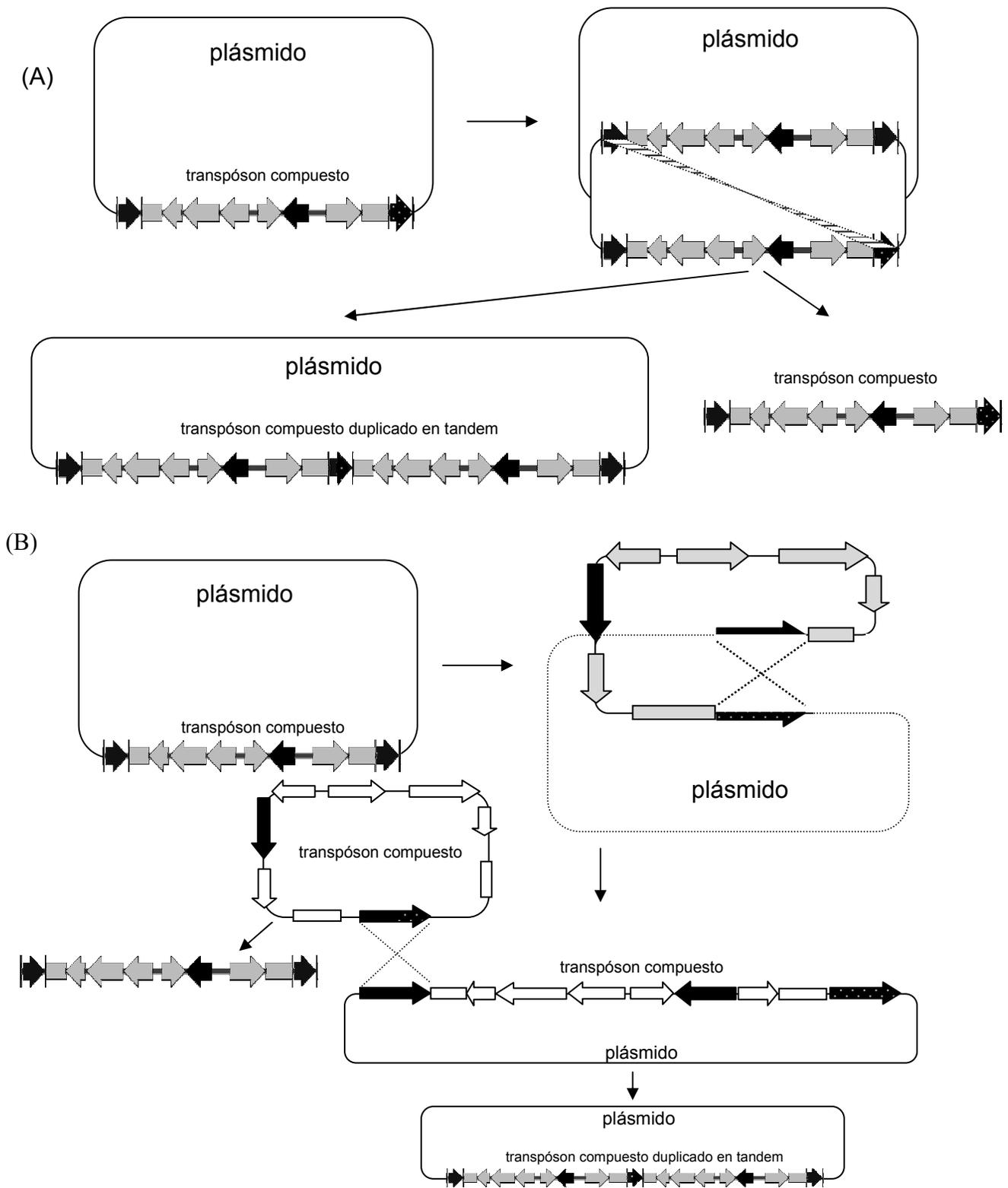


Figura 42. Duplicación en tandem del transposón compuesto. (A) Duplicación mediante el mecanismo de recombinación; (B) Duplicación mediante el mecanismo de escisión de círculos y reinserción (CER).

El mecanismo de la adquisición de TCDT en el plásmido pHNM1 sugiere una recombinación homóloga debido por una parte, a la falta de secuencias repetidas directas (DRs) y a la presencia de secuencias repetidas directas largas conformadas por las IS26. La duplicación en tándem puede ser característica de secuencias de inserción, lo que da lugar exclusivamente a fusión de replicones en las que el replicón donador y blanco son separados por dos copias de IS directas, lo que sugiere que este rearrreglo se produjo por recombinación homóloga entre las secuencias que bordean las IS26 en la misma orientación <sup>62,141</sup>. Estos arreglos pueden ser un mecanismo alternativo para generar varias copias de genes tipo SHV en el mismo plásmido, el cual se puede mantener duplicado en tándem por varias generaciones de bacterias sin presión de antibiótico como en el caso de pHNM1. La identificación de la estructura del TCDT ofrece nuevas ideas sobre la estructura implicada en el incremento del número de copias de BLEE tipo SHV.

En los genomas procariotas, las evidencias apoyan el concepto que la amplificación es una característica común en las bacterias, este fenómeno probablemente es omnipresente en los genomas de procariotas. Por ende una implicación se refleja sobre la expresión del gen o genes y por consiguiente un aumento en la dosis de proteína, que está reflejada por un aumento en el número de copias de un segmento de DNA, lo que ocurre a menudo en tándem. La resistencia a antibióticos se ha asociado a la amplificación, así como también a metales pesados, crecimiento a diferentes fuentes de carbono e incremento en la virulencia <sup>114,115</sup>. Sin embargo no se había descrito la estructura de un TCDT que relacionara a una  $\beta$ -lactamasa, enzimas que hidrolizan eficientemente los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, los cuales son ampliamente usados en la clínica

El paso inicial en la amplificación genética, es la duplicación en tandem mediante recombinaciones homologas <sup>114</sup>. La estructura del TCDT identificado en el pHNM1, indica que en este plásmido se mantiene de manera estable en tandem. En base a estos antecedentes pueden ocurrir amplificaciones genéticas del TC, generando más copias de la BLEE SHV-5, seleccionándose bajo presión selectiva de antibióticos. Datos preliminares enfocados en este sentido, se realizó el análisis del plásmido pHNM1, aislado de bacterias obtenidas a diferentes concentraciones del antibiótico cefotaxima (CTX). En la Figura 42 se pueden observar el aumento en el tamaño molecular del plásmido cuando se aísla de bacterias crecidas a 1, 64, 256, 512, 1,024 y 2,048  $\mu\text{g/ml}$  de CTX. La bacteria crecida a 2,048  $\mu\text{g/ml}$  posteriormente se creció sin antibiótico (Figura 43A), observándose una disminución en el

tamaño molecular del plásmido. No obstante, en este gel no contiene controles de peso molecular mayores de 90 kb (R1), ya que al parecer los plásmidos seleccionados de bacterias crecidas a altas concentraciones son mayores a los 90 kb, considerando que cada copia del TC corresponde a casi 10 kb, en uno de 90 kb podría corresponder a la amplificación de tres copias adicionales. Por tal motivo se colocaron otras muestras en otro gel con un mayor número de marcadores de peso molecular (Figura 43B).

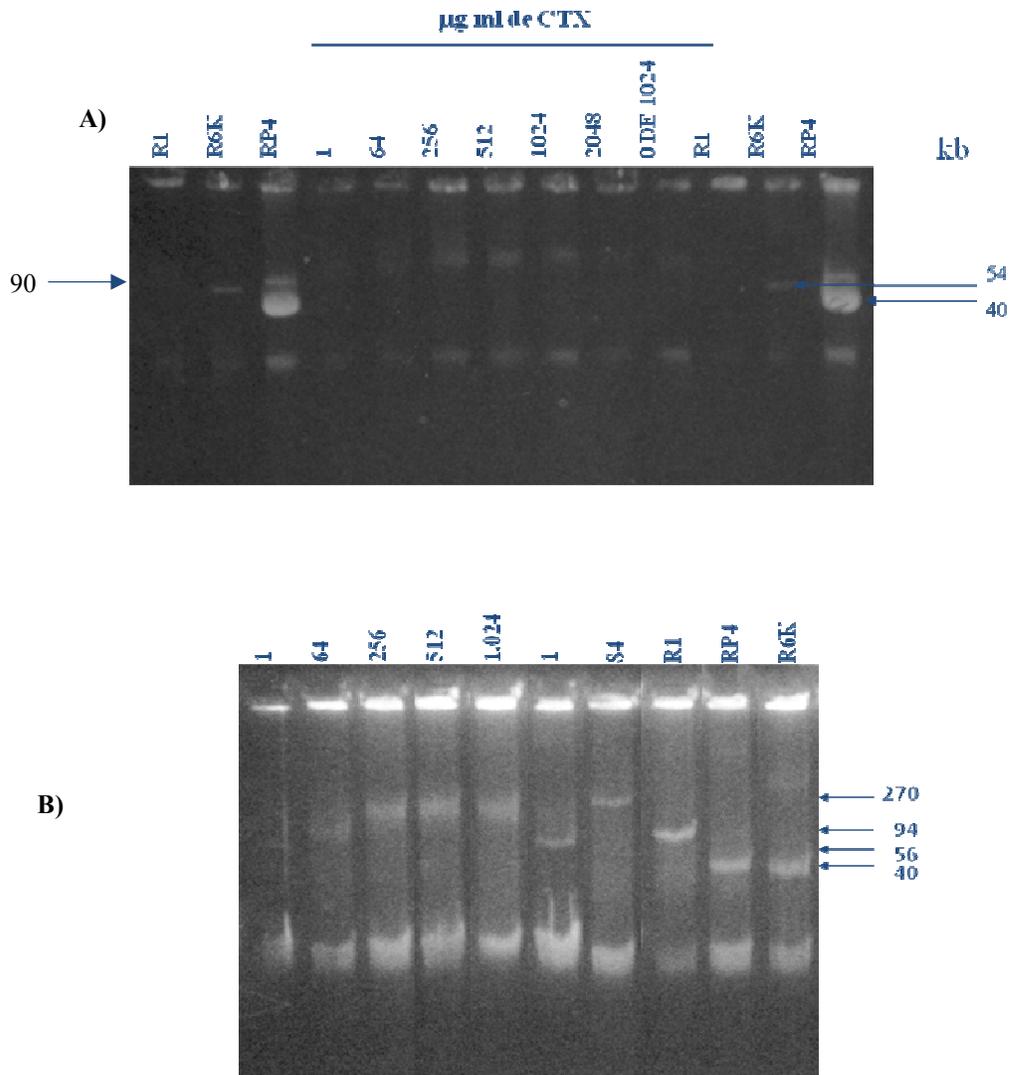


Figura 42. Análisis de los plásmidos obtenidos de las transconjugantes crecidas a diferentes concentraciones de antibióticos. Marcadores de peso molecular, S4, 170 kb; R1, 90 kb; Rp4, 54 kb y R6K, 40 kb.

Como se ha descrito las amplificaciones en tándem son inestables y pueden ser deletadas por recombinación homóloga, cuando se remueve la presión selectiva. Esta característica se puede observar en la figura 43A (carril 0 de 1024  $\mu\text{g/ml}$ ). El número de copias de la amplificación varía dependiendo de las características de selección y de la región involucrada en la amplificación <sup>114,115</sup>. Las secuencias de inserción IS26, que forman el TC podrían ser las secuencias involucradas en la recombinación para generar la duplicación en tandem y posterior amplificación, las cuales son 100% idénticas a nivel de secuencia de nucleótidos.

Sucesivas recombinaciones entre estas secuencias repetidas, permiten la contracción y expansión en la longitud del arreglo en tandem, que podría ser lo que se observa en los plásmidos aislados de bacterias crecidas a varias concentraciones de antibiótico. La duplicación en tandem no conduce a la pérdida de la función del gen, así mismo amplificaciones sucesivas o independientes puede generar duplicaciones más cortas que la original <sup>114</sup>. El análisis de BLAST de este estudio mostró al igual que Hammond y Davis (2004) a la BLEE SHV-12 contienda en un TC de menor tamaño (6,217 pb) al descrito en este trabajo y a los identificados en otros plásmidos (pACM1, pSEM).

Si consideramos que la BLEE SHV-12 es una cefalosporinasa más eficiente que SHV-2 y SHV-5 <sup>107</sup>, la diseminación de la enzima SHV-12 tiene su implicación directa sobre la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en especial a cefalosporinas de tercera generación. Esta modificación del TC podría favorecer la diseminación y selección de una mejor cefalosporinasa que así mismo este TC más corto podrían favorecer la duplicación en tandem.

En general los amplicones bordeados con repetidos directos largos con una alta similitud, amplifican a una mayor frecuencia, en el caso del tamaño de estos dos TC no afecta la similitud de las secuencias repetidas (IS26), si no la distancia entre ellas. Un bajo número de repetidos en tandem han sido descritos en amplicones usualmente largos y bajo una presión selectiva adecuada pueden ser detectados un número grande de copias en amplicones de menor tamaño. Los TC de diferentes tamaños mantienen la similitud de las secuencias repetidas (IS) en sus extremos, solo variando la distancia entre ellas. Su implicación sobre la eficiencia de duplicación y amplificación en tandem tiene que ser determinado experimentalmente. Ya que sí, un TC de menor tamaño permite a la bacteria una sobre expresión de está región en términos de una adaptación rapida favorece a la población que la contenga, permitiendo su selección y posterior diseminación mediante plásmidos <sup>115</sup>.

Independientemente del tamaño del TC, éste regresa a su estado original sin alterar la estructura del plásmido debido a que la amplificación en tandem es una característica transiente, sin embargo podría estar involucrada en la generación de nuevas  $\beta$ -lactamasas con la capacidad de hidrolizar nuevos sustratos y ser seleccionadas por el uso de los antibióticos de reciente formulación en el ambiente clínico o en la agricultura. En relación con lo anterior las BLEE tipo SHV formando parte de un TC que se amplifica en tandem, podrían generar nuevas variantes de esta familia de  $\beta$ -lactamasas y de igual manera ser seleccionadas aquellas que permiten la hidrólisis de penicilinas y cefalosporinas. Así la amplificación genética regresa a su estado original o una de las copias diverge por mutación generando variantes de este gen <sup>114</sup>.

Con respecto a la  $\beta$ -lactamasa LEN-1 que se encuentra en el genoma de *K. pneumoniae* 342, tiene un 95% de identidad a nivel de aminoácidos a la  $\beta$ -lactamasas SHV-1, no obstante no se han descrito enzimas con actividad contra cefalosporinas y no se ha identificado en plásmidos, solo se ha identificado en el genoma de *K. pneumoniae* en un porcentaje del 3.5% en las cepas analizadas <sup>142</sup>.

El TC duplicado en tandem identificado en el plásmido pHNM1 aislado de *E. cloacae*, es muy similar a los plásmidos pCTX-M-3 (89,468 pb) y pEL60 (60,145 pb). En el caso del plásmido pCTX-M-3 fue identificado en un aislamiento clínico de *Citrobacter freundii* en Polonia, que se caracteriza por contener las  $\beta$ -lactamasas CTX-M-3, TEM-1, un integrón de clase 1 con los genes de resistencia a aminoglucósidos *aadA2*, *dfrA12*, y *sulI*. Estos genes confieren resistencia a la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y trimethoprim-sulfamethoxazol, respectivamente. Los aspectos más notables del plásmido pEL60 aislado de *Erwinia amylovora* (un parásito de plantas) es su alta similitud con el plásmido pCTX-M3 de *C. freundii*, con la gran diferencia que no contiene genes de resistencia a antibióticos. La inserción del TC en el plásmido pHNM1 deletó *mucB* que forma un operón con *mucA*, la inserción de un transposón en el plásmido pCTX-M3, que está formado por una transposasa (TnpA) y el gen de la BLEE CTX-M3, se encuentra muy cercano (3,055 pb) también del operón *mucA-mucB*, pero no corresponde a la misma inserción.

En la tabla 10 han se muestra el análisis del contenido de IS26 en todos los plásmidos descritos en GenBank, donde se indica el número de IS26 identificadas en los diferentes plásmidos y la BLEE que contiene. Este análisis indica una gran distribución en diversos plásmidos, que contienen desde 1 hasta

11 secuencias de inserción IS26. En esta tabla se muestran los plásmidos, pK245, pIP1202, p1658/97 y pKPN4 que contienen una BLEE tipo SHV contenida en el TC, mostrando que la SHV-12 prevalece en estos TC, los cuales corresponden a TC de menor tamaño. El TC podría estar implicado en la diseminación de estas BLEE como el mecanismo implicado en la incorporación del TC a diversos plásmidos, que actualmente se han encontrado con asociación con nuevos genes de resistencia, como los determinantes *qnr*, genes de resistencia a quinolonas descritos por primera vez en el año 1998<sup>143</sup>. Como es el caso de los plásmidos pEC-IMP y pEC-IMPQ, que contienen la SHV-12 formando parte del TC, en asociación con diversos genes de resistencia, que sobresalen los determinante *qnrB2* y *aac(6')-Ib-cr*, genes que confieren resistencia a quinolonas, una metallo- $\beta$ -lactamasa, IMP-18 (Tabla 2) y la  $\beta$ -lactamasas TEM-1<sup>144</sup>. Cabe mencionar que este plásmido contiene 10 IS26 a lo largo del plásmido (Tabla 10). Por otro lado el análisis del contenido de la IS26 en los genomas de *K. pneumoniae* MGH 78578, *K. pneumoniae* 342 y *K. pneumoniae* NTUH-K2044, indicó que no contiene ninguna secuencia de inserción IS26 en sus genomas, lo que indicaría que las IS26 que participaron en la formación del TC, posiblemente provinieron de un plásmido que adquirió la bacteria y que fue un evento fortuito. La implicación de las IS26 en la formación del TC es evidente, sin embargo la razón el porqué este tipo de IS estén relacionadas con las  $\beta$ -lactamasas tipo SHV no ha sido resuelto.

**Tabla 10. Plásmidos que contienen secuencias de inserción IS26 y la BLEE en relación con el TC.**

Número de Acceso en Genbank	Plásmido	Especie	kb	No. de IS26	BLEE
NC_006856.1	pSC138	<i>Salmonella enterica</i>	138742	11	ampC
NC_010119.1	pOU7519	<i>Salmonella enterica</i>	127212	11	
NC_009651.1	pKPN5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	88582	10	
NC_010886.1	pK245	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98264	10	SHV-2 (TC)
NC_012555.1	pEC-IMP	<i>Enterobacter cloacae</i>	318782	10	SHV-12 (TC)
NC_012556.1	pEC-IMPQ	<i>Enterobacter cloacae</i>	324503	10	SHV-12 (TC)
NC_009141.1	pIP1202	<i>Yersinia pestis</i>	182913	9	SHV-12 (TC)
NC_010488.1	pSMS35_130	<i>Escherichia coli</i>	130440	9	
NC_011092.1	pCVM19633_110	<i>Salmonella enterica</i>	110227	9	
NC_010558.1	pIP1206	<i>Escherichia coli</i>	168113	6	
NC_005211.1	R478	<i>Serratia marcescens</i>	274762	5	
NC_005327.1	pC15-1a	<i>Escherichia coli</i>	92353	5	CTX-M-15
NC_006816.1	pU302L	<i>Salmonella enterica</i>	84514	5	
NC_007682.3	pMUR050	<i>Escherichia coli</i>	56634	5	
NC_008612.1	pP99-018	<i>Photobacterium damsela</i>	150157	5	
NC_012690.1	peH4H	<i>Escherichia coli</i>	148105	5	blaCMY-2 (2)
NC_003384.1	pHCM1	<i>Salmonella enterica</i>	218160	4	
NC_004998.1	p1658/97	<i>Escherichia coli</i>	125491	4	SHV-5 (TC)
NC_009140.1	pSN254	<i>Salmonella enterica</i>	176473	4	ampC
NC_009838.1	pAPEC-O1-R	<i>Escherichia coli</i> APEC O1	241387	4	
NC_009981.1	pMAK1	<i>Salmonella enterica</i>	208409	4	
NC_012692.1	pAR060302	<i>Escherichia coli</i>	166530	4	blaCMY-2
NC_012693.1	pAM04528	<i>Salmonella enterica</i>	158213	4	blaCMY-2 (2)
NC_008613.1	pP91278	<i>Photobacterium damsela</i>	131520	3	
NC_010378.1	pOLA52	<i>Escherichia coli</i>	51602	3	
NC_010870.1	pK29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	269674	3	CMY-8
NC_002090.1	NTP16	No cultivable	8255	2	

NC_003292.1	R46	<i>Salmonella typhimurium</i>	50969	2	OXA-2
NC_003905.1	Rts1	<i>Proteus vulgaris</i>	217182	2	
NC_004464.2	pCTX-M3	<i>Citrobacter freundii</i>	89468	2	CTX-M-3
NC_004939.1	pTP10	<i>Corynebacterium striatum</i>	51409	2	
NC_006388.1	pB3	<i>Escherichia coli</i>	56167	2	LCR-1
NC_009649.1	pKPN3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	175879	2	
NC_010605.1	pACICU1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	28279	2	
NC_011385.1	pKlebpneu12_p01	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	75617	2	OXA-9
NC_011419.1	pSE11-1	<i>Escherichia coli SE11</i>	100021	2	
NC_011754.1	pECOED	<i>Escherichia coli</i>	119594	2	
NC_011964.1	pAPEC-O103-ColBM	<i>Escherichia coli</i>	124705	2	blaCMY-2 (2)
NC_006385.1	pRSB101	<i>uncultured bacterium</i>	47829	1	TLA-2
NC_006671.1	pAPEC-O2-R	<i>Escherichia coli</i>	101375	1	
NC_007800.1	pCCK13698	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	14969	1	
NC_007941.1	pUTI89	<i>Escherichia coli</i>	114230	1	
NC_008690.1	pTC68	<i>Vibrio sp. TC68</i>	7847	1	
NC_009131.1	pLEW517	<i>Escherichia coli</i>	65288	1	
NC_009132.1	pLEW517	<i>Escherichia coli</i>	63946	1	
NC_009650.1	pKPN4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	107576	1	SHV-12 (TCA)
NC_010409.1	pVM01	<i>Escherichia coli</i>	151002	1	
NC_010481.1	pABIR	<i>Acinetobacter baumannii</i>	29823	1	OXA-58
NC_011281.1	pKP91	<i>Klebsiella pneumoniae 342</i>	91096	1	

---

## CONCLUSIONES

La estructura del transposón compuesto (TC) está formada por dos IS26, donde los genes entre ambas IS provienen del genoma de *K. pneumoniae* incluyendo la BLEE SHV-5. De acuerdo a las diferentes familias de ISs, la IS26 pertenece a aquellas que no dejan repetidos directos en sus extremos durante la transposición, como fue determinado para el transposón compuesto duplicado en tandem (TCDT) en este estudio y en otros. De acuerdo a la literatura la duplicación en tándem de TC se genera por la recombinación homóloga entre ambas IS26, dependiente de RecA. Esta duplicación en tandem es estable aún en la ausencia de presión selectiva de algún antibiótico  $\beta$ -lactámico al paso de varias generaciones. Esto le permite a la bacteria tener más de una copia del gen que codifica a la enzima que hidroliza eficientemente los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, en especial a cefotaxima y ceftazidima ampliamente utilizados en el ambiente hospitalario. El TC identificado en varios plásmidos indica su amplia diseminación y el TC en el plásmido p1658/97 se determinó que es un amplicón activo, lo que quiere decir es que la bacteria que contenga esta estructura puede ser resistente al embate de las cefalosporinas de tercera generación, mediante la amplificación en tandem del TC. El plásmido pHNM1 que contiene el TCDT pudo haberse derivado del plásmido pEL60, al igual que el plásmido pCTX-M3 cuyas diferencias entre los tres plásmidos (pHNM1, pCTX-M3 y pEL60) radica principalmente en los genes de resistencia a antibióticos y los elementos genéticos que los contienen.

El contenido de IS26 en los diferentes plásmidos es variable, sin embargo esta ausente en los genomas de *K. pneumoniae* descritos hasta la fecha. Así mismo los plásmidos que contienen un TC son aquellos que contiene un número alto de IS26, sin embargo también hay plásmidos con un número bajo de IS26 que contienen el TC. La relación del TC con algún mecanismo de resistencia a grupos de antibióticos recientemente descritos señala que el TC se ha mantenido en los plásmidos, los cuales están incorporando nuevos determinantes de resistencia recientemente descritos. Al parecer la identificación del TC va en aumento, poniendo de manifiesto que el cual podría duplicarse en tandem y posteriormente amplificarse para generar más copias del TC debido a la presión selectiva del uso de las cefalosporinas. El transposón compuesto de menor tamaño que contiene la BLEE SHV-12 se ha identificado recientemente en diversos plásmidos, el cual podría ser la huella de duplicaciones en tandem que generó un TC de menor tamaño, sin embargo no se sabe si sería más eficiente que el tamaño original del TC que contiene la BLEE SHV-5. Así mismo la amplificación en tandem podría estar frecuentemente

implicada en las poblaciones de bacterias que podrían ser clasificadas como resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, exclusivamente por esta amplificación en tandem.

### **Perspectivas:**

Debido a la alta inestabilidad de la amplificación y duplicación de fragmentos de DNA, su estado en la naturaleza es transiente y consecuentemente sus implicaciones en la evolución y en medicina son subestimadas. Por tal motivo las perspectivas del estudio están enfocadas a realizar estudios al respecto que nos permita conocer más de este fenómeno, que en lo particular tiene mayores implicaciones en la resistencia a antibióticos. Por lo cual considero importante determinar la secuencia completa del plásmido pHNM1, para ser usado como modelo de estudio; determinar el número de copias del TC a concentraciones altas de antibiótico, ya que al parecer por lo descrito pueden ser al menos ocho copias; determinar el efecto en el plásmido con la amplificación en tandem del TC; esta es una característica importante que observamos en este trabajo y determinar la presencia del TC en aislamientos clínicos de varios géneros bacterianos de recientes años, contemplando que la familia SHV de  $\beta$ -lactamasas han sido y están ampliamente distribuidas en aislamientos clínicos de la Republica Mexicana.

## REFERENCIAS

1. OMS. Prevención de las Infecciones Nosocomiales. Segunda Edición, 1-65. 2003. Organización Mundial de la Salud.
2. Aguilar Eloy Margarita. Las infecciones nosocomiales: registrar para prevenir. eds. García-López Beatriz, Hernández-Tezoquipa Isabel, & Rosas-Reséndiz Ma.Teresa. 12, 89-92. 2004. Rev Enferm IMSS.
3. Napoleón González-Saldaña. Retrospectiva de infecciones nosocomiales en el Instituto Nacional de Pediatría 1999-2006. ed. Hilda G.Hernández-Orozco, J. L. C.-N. P. A.-B. N. N. C. S. M. A. M.-D. E. L.-R. 28, 253-257. 2007. Acta Pediatr Mex.
4. Fagon, J. Y. *et al.* Nosocomial pneumonia and mortality among patients in intensive care units. *JAMA* **275**, 866-869 (1996).
5. Livermore, D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin.Microbiol.Rev.* **8**, 557-584 (1995).
6. Medeiros, A. A. Beta-lactamases. *Br.Med.Bull.* **40**, 18-27 (1984).
7. Walsh Christopher. Antibiotics, action, origins, resistance. 2003. ASM PRESS.
8. Scholar, E. M. & Pratt W, B. The Antimicrobial Dugs. 2000. New York, Oxford University Press.
9. Livermore, D. M. & Woodford, N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr.Opin.Microbiol.* **3**, 489-495 (2000).
10. Wilke, M. S., Lovering, A. L., & Strynadka, N. C. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr.Opin.Microbiol.* **8**, 525-533 (2005).
11. Popham, D. L. & Young, K. D. Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. *Curr.Opin.Microbiol.* **6**, 594-599 (2003).
12. Holtje, J. V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of Escherichia coli. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 181-203 (1998).
13. van Heijenoort, J. Assembly of the monomer unit of bacterial peptidoglycan. *Cell Mol.Life Sci.* **54**, 300-304 (1998).
14. Ghuysen, J. M. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu.Rev.Microbiol.* **45**, 37-67 (1991).
15. Goffin, C. *et al.* The non-penicillin-binding module of the tripartite penicillin-binding protein 3 of Escherichia coli is required for folding and/or stability of the penicillin-binding module and the membrane-anchoring module confers cell septation activity on the folded structure. *J.Bacteriol.* **178**, 5402-5409 (1996).
16. Goffin, C. & Ghuysen, J. M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 1079-1093 (1998).
17. Massova, I. & Mobashery, S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**, 1-17 (1998).
18. Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob.Agents Chemother.* **39**, 1211-1233 (1995).
19. Bush, K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin.Infect.Dis.* **27 Suppl 1**, S48-S53 (1998).
20. Livermore, D. M. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin.Microbiol.Infect.* **14 Suppl 1**, 3-10 (2008).
21. Naas, T., Poirel, L., & Nordmann, P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Infect.* **14 Suppl 1**, 42-52 (2008).
22. Page, M. G. Extended-spectrum beta-lactamases: structure and kinetic mechanism. *Clin.Microbiol.Infect.* **14 Suppl 1**, 63-74 (2008).
23. Abraham, E. & E.Chain. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 146[837]. 1940. Nature.
24. Kim, J. Y. *et al.* Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C beta-lactamase. *Mol.Microbiol.* **60**, 907-916 (2006).
25. Lobkovsky, E. *et al.* Evolution of an enzyme activity: crystallographic structure at 2-A resolution of cephalosporinase from the ampC gene of Enterobacter cloacae P99 and comparison with a class A penicillinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 11257-11261 (1993).
26. Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., & Frere, J. M. Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem.J.* **330 ( Pt 2)**, 581-598 (1998).
27. Hanson, N. D. & Sanders, C. C. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Curr.Pharm.Des* **5**, 881-894 (1999).

28. Schmidtke, A. J. & Hanson, N. D. Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **50**, 2030-2037 (2006).
29. Jacoby, G. A. AmpC beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Rev.* **22**, 161-82, Table (2009).
30. Ambler, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **289**, 321-331 (1980).
31. Leonard, D. A. *et al.* The role of OXA-1 beta-lactamase Asp(66) in the stabilization of the active-site carbamate group and in substrate turnover. *Biochem.J.* **410**, 455-462 (2008).
32. Danel, F., Hall, L. M., Duke, B., Gur, D., & Livermore, D. M. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**, 1362-1366 (1999).
33. Mugnier, P., Podglajen, I., Goldstein, F. W., & Collatz, E. Carbapenems as inhibitors of OXA-13, a novel, integron-encoded beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **144 ( Pt 4)**, 1021-1031 (1998).
34. Tranier, S. *et al.* The high resolution crystal structure for class A beta-lactamase PER-1 reveals the bases for its increase in breadth of activity. *J.Biol.Chem.* **275**, 28075-28082 (2000).
35. Rasmussen, B. A. & Bush, K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**, 223-232 (1997).
36. Quiroga, M. I. *et al.* Interaction of cefotetan and the metallo-beta-lactamases produced in *Aeromonas* spp. and in vitro activity. *Chemotherapy* **46**, 177-183 (2000).
37. Wang, Z., Fast, W., & Benkovic, S. J. On the mechanism of the metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry* **38**, 10013-10023 (1999).
38. Carfi, A. *et al.* The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO J.* **14**, 4914-4921 (1995).
39. Garza-Ramos, U. *et al.* Metallo-beta-lactamase gene bla(IMP-15) in a class 1 integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**, 2943-2946 (2008).
40. Garza-Ramos, U. *et al.* Metallo-beta-lactamase IMP-18 is located in a class 1 integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. *Int.J.Antimicrob.Agents* **31**, 78-80 (2008).
41. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin.Microbiol.Rev.* **18**, 306-325 (2005).
42. Cornaglia, G. & Rossolini, G. M. The emerging threat of acquired carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Clin.Microbiol.Infect.* **16**, 99-101 (2010).
43. Walsh, T. R. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr.Opin.Infect.Dis.* **21**, 367-371 (2008).
44. Queenan, A. M. & Bush, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin.Microbiol.Rev.* **20**, 440-58, table (2007).
45. Nordmann, P. & Poirel, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin.Microbiol.Infect.* **8**, 321-331 (2002).
46. Livermore, D. M. & Woodford, N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr.Opin.Microbiol.* **3**, 489-495 (2000).
47. Livermore, D. M. Acquired carbapenemases. *J.Antimicrob.Chemother.* **39**, 673-676 (1997).
48. Livermore, D. M. Carbapenemases. *J.Antimicrob.Chemother.* **29**, 609-613 (1992).
49. Lamotte-Brasseur, J. *et al.* Mechanism of acyl transfer by the class A serine beta-lactamase of *Streptomyces albus* G. *Biochem.J.* **279 ( Pt 1)**, 213-221 (1991).
50. Massova, I. & Mobashery, S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**, 1-17 (1998).
51. Kelly, J. A. *et al.* On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a penicillin target. *Science* **231**, 1429-1431 (1986).
52. Samraoui, B. *et al.* Tertiary structural similarity between a class A beta-lactamase and a penicillin-sensitive D-alanyl carboxypeptidase-transpeptidase. *Nature* **320**, 378-380 (1986).
53. Knox, J. R., Moews, P. C., & Frere, J. M. Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance. *Chem.Biol.* **3**, 937-947 (1996).
54. Meroueh, S. O., Minasov, G., Lee, W., Shoichet, B. K., & Mobashery, S. Structural aspects for evolution of beta-lactamases from penicillin-binding proteins. *J.Am.Chem.Soc.* **125**, 9612-9618 (2003).
55. Lee, M. *et al.* A mechanism-based inhibitor targeting the DD-transpeptidase activity of bacterial penicillin-binding proteins. *J.Am.Chem.Soc.* **125**, 16322-16326 (2003).
56. Richmond, M. H. & Sykes, R. B. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv.Microb.Physiol* **9**, 31-88 (1973).

57. Matthew, M. Plasmid-mediated beta-lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. *J.Antimicrob.Chemother.* **5**, 349-358 (1979).
58. Livermore, D. M. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin.Microbiol.Infect.* **14 Suppl 1**, 3-10 (2008).
59. Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M., & Bonomo, R. A. The continuing challenge of ESBLs. *Curr.Opin.Pharmacol.* **7**, 459-469 (2007).
60. Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**, 299-304 (2000).
61. Caspi, R. *et al.* A broad host range replicon with different requirements for replication initiation in three bacterial species. *EMBO J.* **20**, 3262-3271 (2001).
62. Mahillon, J. & Chandler, M. Insertion sequences. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 725-774 (1998).
63. Stewart, P. E., Byram, R., Grimm, D., Tilly, K., & Rosa, P. A. The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid* **53**, 1-13 (2005).
64. Emond, E., Lavallee, R., Drolet, G., Moineau, S., & LaPointe, G. Molecular characterization of a theta replication plasmid and its use for development of a two-component food-grade cloning system for *Lactococcus lactis*. *Appl.EnvIRON.Microbiol.* **67**, 1700-1709 (2001).
65. del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M. J., Espinosa, M., & Diaz-Orejas, R. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 434-464 (1998).
66. Clewell, D. B. & Helinski, D. R. Effect of growth conditions on the formation of the relaxation complex of supercoiled ColE1 deoxyribonucleic acid and protein in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **110**, 1135-1146 (1972).
67. Austin, S. J. Plasmid partition. *Plasmid* **20**, 1-9 (1988).
68. Hayes, F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* **301**, 1496-1499 (2003).
69. Clewell, D. B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* **73**, 9-12 (1993).
70. Datta, N. & Hedges, R. W. An I pilus-determining R factor with anomalous compatibility properties, mobilizing a gentamicin-resistance plasmid. *J.Gen.Microbiol.* **77**, 11-17 (1973).
71. Srimanote, P., Paton, A. W., & Paton, J. C. Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect.Immun.* **70**, 3094-3100 (2002).
72. Cascales, E. & Christie, P. J. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**, 1170-1173 (2004).
73. Atmakuri, K., Cascales, E., & Christie, P. J. Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol.Microbiol.* **54**, 1199-1211 (2004).
74. Di Lorenzo, L., Frost, L. S., & Paranchych, W. The TraM protein of the conjugative plasmid F binds to the origin of transfer of the F and ColE1 plasmids. *Mol.Microbiol.* **6**, 2951-2959 (1992).
75. Loh, S., Cram, D., & Skurray, R. Nucleotide sequence of the leading region adjacent to the origin of transfer on plasmid F and its conservation among conjugative plasmids. *Mol.Gen.Genet.* **219**, 177-186 (1989).
76. Gogarten, J. P. & Townsend, J. P. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat.Rev.Microbiol.* **3**, 679-687 (2005).
77. Francia, M. V., Fujimoto, S., Tille, P., Weaver, K. E., & Clewell, D. B. Replication of *Enterococcus faecalis* pheromone-responding plasmid pAD1: location of the minimal replicon and oriV site and RepA involvement in initiation of replication. *J.Bacteriol.* **186**, 5003-5016 (2004).
78. Hall, R. M., Brookes, D. E., & Stokes, H. W. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol.Microbiol.* **5**, 1941-1959 (1991).
79. Davies, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**, 375-382 (1994).
80. Recchia, G. D. & Hall, R. M. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* **141 ( Pt 12)**, 3015-3027 (1995).
81. Stokes, H. W., O'Gorman, D. B., Recchia, G. D., Parsekhian, M., & Hall, R. M. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol.Microbiol.* **26**, 731-745 (1997).
82. Ploy, M. C., Denis, F., Courvalin, P., & Lambert, T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**, 2684-2688 (2000).
83. Partridge, S. R., Recchia, G. D., Stokes, H. W., & Hall, R. M. Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**, 3014-3020 (2001).

84. Jacoby, G. A. Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. *Infect.Dis.Clin.North Am.* **11**, 875-887 (1997).
85. Paterson, D. L. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin.Microbiol.Infect.* **6**, 460-463 (2000).
86. Winokur, P. L., Canton, R., Casellas, J. M., & Legakis, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin.Infect.Dis.* **32 Suppl 2**, S94-103 (2001).
87. Alcantar-Curiel, D. *et al.* Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes. *Clin.Infect.Dis.* **38**, 1067-1074 (2004).
88. Silva, J. *et al.* Outbreak of infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J.Clin.Microbiol.* **39**, 3193-3196 (2001).
89. Miranda, G. *et al.* Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J.Clin.Microbiol.* **42**, 30-35 (2004).
90. Andrade, V. & Silva, J. Characterization of SHV-5 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit. *Salud Publica Mex.* **46**, 524-528 (2004).
91. Espinosa de los Monteros LE *et al.* Outbreak of infection by extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Serratia marcescens* in a Mexican hospital. *J.Chemother.* **20**, 586-592 (2008).
92. Garza-Ramos, U., Martinez-Romero, E., & Silva-Sanchez, J. SHV-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. *Salud Publica Mex.* **49**, 415-421 (2007).
93. Jeong, J. Y. *et al.* Detection of qnr in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**, 2522-2524 (2005).
94. Oktem, I. M., Gulay, Z., Bicmen, M., & Gur, D. qnrA prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive Enterobacteriaceae isolates from Turkey. *Jpn.J.Infect.Dis.* **61**, 13-17 (2008).
95. Shen, P. *et al.* Complete nucleotide sequence of pKP96, a 67 850 bp multiresistance plasmid encoding qnrA1, aac(6)-Ib-cr and blaCTX-M-24 from *Klebsiella pneumoniae*. *J.Antimicrob.Chemother.* **62**, 1252-1256 (2008).
96. Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin.Microbiol.Rev.* **18**, 657-686 (2005).
97. Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., & Nordmann, P. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J.Bacteriol.* **183**, 235-249 (2001).
98. Dubois, V. *et al.* Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**, 638-645 (2002).
99. Poirel, L., Decousser, J. W., & Nordmann, P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**, 2938-2945 (2003).
100. Poirel, L., Cabanne, L., Vahaboglu, H., & Nordmann, P. Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase blaPER-1 gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**, 1708-1713 (2005).
101. Barthelemy, M., Peduzzi, J., & Labia, R. Complete amino acid sequence of p453-plasmid-mediated PIT-2 beta-lactamase (SHV-1). *Biochem.J.* **251**, 73-79 (1988).
102. Chaves, J. *et al.* SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**, 2856-2861 (2001).
103. Barlow, M., Fatollahi, J., & Salverda, M. Evidence for recombination among the alleles encoding TEM and SHV beta-lactamases. *J.Antimicrob.Chemother.* **63**, 256-259 (2009).
104. Kuzin, A. P. *et al.* Structure of the SHV-1 beta-lactamase. *Biochemistry* **38**, 5720-5727 (1999).
105. Podbielski, A., Schonling, J., Melzer, B., Warnatz, K., & Leusch, H. G. Molecular characterization of a new plasmid-encoded SHV-type beta-lactamase (SHV-2 variant) conferring high-level cefotaxime resistance upon *Klebsiella pneumoniae*. *J.Gen.Microbiol.* **137**, 569-578 (1991).
106. Billot-Klein, D., Gutmann, L., & Collatz, E. Nucleotide sequence of the SHV-5 beta-lactamase gene of a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. *Antimicrob.Agents Chemother.* **34**, 2439-2441 (1990).
107. Tzouveleakis L & Bonomo R. SHV-type beta-lactamases. 5[Current Farmaceutical Desing], 847-864. 1999.

108. Nugent, M. E. & Hedges, R. W. The nature of the genetic determinant for the SHV-1 beta-lactamase. *Mol.Gen.Genet.* **175**, 239-243 (1979).
109. Levesque, R. C. & Jacoby, G. A. Molecular structure and interrelationships of multiresistance beta-lactamase transposons. *Plasmid* **19**, 21-29 (1988).
110. Lee, K. Y., Hopkins, J. D., & Syvanen, M. Direct involvement of IS26 in an antibiotic resistance operon. *J.Bacteriol.* **172**, 3229-3236 (1990).
111. Naas, T., Philippon, L., Poirrel, L., Ronco, E., & Nordmann, P. An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**, 1281-1284 (1999).
112. Villa, L. *et al.* Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum beta-lactamase gene and a class 1 integron. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**, 2911-2914 (2000).
113. Fortineau, N., Naas, T., Gaillot, O., & Nordmann, P. SHV-type extended-spectrum beta-lactamase in a *Shigella flexneri* clinical isolate. *J.Antimicrob.Chemother.* **47**, 685-688 (2001).
114. Romero, D. & Palacios, R. Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu.Rev.Genet.* **31**, 91-111 (1997).
115. Craven, S. H. & Neidle, E. L. Double trouble: medical implications of genetic duplication and amplification in bacteria. *Future.Microbiol.* **2**, 309-321 (2007).
116. Goldberg, I. & Mekalanos, J. J. Effect of a *recA* mutation on cholera toxin gene amplification and deletion events. *J.Bacteriol.* **165**, 723-731 (1986).
117. Spies, T. & Laufs, R. Circularized copies of amplifiable resistance genes from *Haemophilus influenzae* plasmids. *J.Bacteriol.* **156**, 1263-1267 (1983).
118. Anderson, R. P. & Roth, J. R. Tandem genetic duplications in phage and bacteria. *Annu.Rev.Microbiol.* **31**, 473-505 (1977).
119. Petes, T. D. & Hill, C. W. Recombination between repeated genes in microorganisms. *Annu.Rev.Genet.* **22**, 147-168 (1988).
120. Hynes, M. F. & McGregor, N. F. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol.Microbiol.* **4**, 567-574 (1990).
121. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**, 5463-5467 (1977).
122. Gordon, D., Abajian, C., & Green, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* **8**, 195-202 (1998).
123. Arlet, G. & Philippon, A. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB) [corrected]. *FEMS Microbiol.Lett.* **66**, 19-25 (1991).
124. Proding, W. M. *et al.* Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. *J.Clin.Microbiol.* **34**, 564-568 (1996).
125. Kieser, T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**, 19-36 (1984).
126. Zienkiewicz, M. *et al.* Mosaic structure of p1658/97, a 125-kilobase plasmid harboring an active amplicon with the extended-spectrum beta-lactamase gene *blaSHV-5*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **51**, 1164-1171 (2007).
127. Preston, K. E., Venezia, R. A., & Stellrecht, K. A. The SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase gene of pACM1 is located on the remnant of a compound transposon. *Plasmid* **51**, 48-53 (2004).
128. Balganes, M. & Setlow, J. K. Genes from plasmid pKM101 in *Haemophilus influenzae*: separation of functions of *mucA* and *mucB*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 7753-7756 (1985).
129. Koch, W. H., Fernandez de Henestrosa, A. R., & Woodgate, R. Identification of *mucAB*-like homologs on two IncT plasmids, R394 and Rts-1. *Mutat.Res.* **457**, 1-13 (2000).
130. Golebiewski, M. *et al.* Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene *blaCTX-M-3*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **51**, 3789-3795 (2007).
131. Foster, G. C., McGhee, G. C., Jones, A. L., & Sundin, G. W. Nucleotide sequences, genetic organization, and distribution of pEU30 and pEL60 from *Erwinia amylovora*. *Appl.Enviro.Microbiol.* **70**, 7539-7544 (2004).
132. Preston, K. E. & Venezia, R. A. Chromosomal sequences from *Klebsiella pneumoniae* flank the SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase gene in pACM1. *Plasmid* **48**, 73-76 (2002).
133. Miriagou, V., Carattoli, A., Tzelepi, E., Villa, L., & Tzouveleki, L. S. IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**, 3541-3543 (2005).

134. Martinez-Aguilar, G. *et al.* Outbreak of nosocomial sepsis and pneumonia in a newborn intensive care unit by multiresistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: high impact on mortality. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* **22**, 725-728 (2001).
135. Ford, P. J. & Avison, M. B. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J.Antimicrob.Chemother.* **54**, 69-75 (2004).
136. Hammond, D. S., Schooneveldt, J. M., Nimmo, G. R., Huygens, F., & Giffard, P. M. bla(SHV) Genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**, 256-263 (2005).
137. Haeggman, S., Lofdahl, S., & Burman, L. G. An allelic variant of the chromosomal gene for class A beta-lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**, 2705-2709 (1997).
138. Mendonca, N., Ferreira, E., & Canica, M. Genetic diversity of genes encoding OKP and LEN beta-lactamases produced by clinical *Klebsiella pneumoniae* strains in Portugal. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **63**, 334-338 (2009).
139. Palucha, A., Mikiewicz, B., & Gniadkowski, M. Diversification of *Escherichia coli* expressing an SHV-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) during a hospital outbreak: emergence of an ESBL-hyperproducing strain resistant to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**, 393-396 (1999).
140. Miriagou, V. *et al.* CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**, 3172-3174 (2004).
141. Andersson, D. I. & Hughes, D. Gene amplification and adaptive evolution in bacteria. *Annu.Rev.Genet.* **43**, 167-195 (2009).
142. Mendonca, N., Ferreira, E., & Canica, M. Genetic diversity of genes encoding OKP and LEN beta-lactamases produced by clinical *Klebsiella pneumoniae* strains in Portugal. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **63**, 334-338 (2009).
143. Martinez-Martinez, L., Pascual, A., & Jacoby, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**, 797-799 (1998).
144. Chen, Y. T. *et al.* Mobilization of qnrB2 and ISCR1 in plasmids. *Antimicrob.Agents Chemother.* **53**, 1235-1237 (2009).