



Universidad de Los Andes
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias Médicas Fundamentales

**DETERMINACIÓN DEL ENTORNO GENÉTICO DE LOS GENES
*bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} EN CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* DE
ORIGEN NOSOCOMIAL.**

Autor: Lic. David J. Castro

Tutora: Dra. María del Carmen Araque

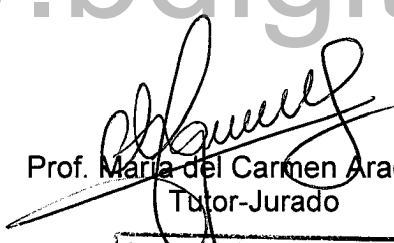
Mérida, diciembre de 2013.

VEREDICTO

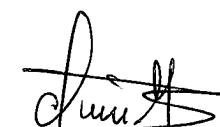
Las suscritas, Profesoras Beatriz Millán, Beatriz Quintero y María del Carmen Araque G., miembros del Jurado designado por el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad de Los Andes, para conocer el Trabajo de Grado titulado: "**DETERMINACIÓN DEL ENTORNO GENÉTICO DE LOS GENES *bla_{CTX-M-1}* Y *bla_{CTX-M-2}* EN CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* DE ORIGEN NOSOCOMIAL**", realizado por el Lic. David Jonathan Castro, como credencial para optar al Título de MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES, reunidos el día 03 de diciembre del 2013, a las 03:00 p.m., en la Sala de Conferencias del Centro de Microscopía Electrónica "*Dr. Ernesto Palacios Prü*" de la Universidad de Los Andes, previo estudio y análisis del trabajo en referencia y tomando en cuenta que es el resultado de una labor personal que refleja la experiencia del autor y además, que cumple con los requisitos exigidos por el Reglamento de Estudios de Postgrado vigente en la Universidad de Los Andes sobre la materia, nos permitimos **APROBAR** el trabajo, para los efectos que ha sido presentado y recomendar su publicación. En la ciudad de Mérida a los tres días del mes de diciembre del año dos mil trece.



Prof. Beatriz Millán
Jurado



Prof. María del Carmen Araque G.
Tutor-Jurado



Prof. Beatriz Quintero
Jurado

Calle 32, entre avenidas 4 y Tulio Febres Cordero, Bulevar de los Estudiantes. Telefax: (58-0271) 2403180.
e-mail: pemf@ula.ve. Mérida 5101, Venezuela

RESUMEN

Las beta-lactamasas de tipo CTX-M son actualmente las más diseminadas en todo el mundo, considerándose endémicas en Sudamérica, Europa mediterránea, Europa de Este y Asia. *Klebsiella pneumoniae* es un importante patógeno nosocomial que se ha encontrado asociado con este tipo de beta-lactamasas. El comportamiento epidemiológico de los fenotipos de resistencia está asociado a elementos genéticos que albergan, estabilizan y diseminan este tipo de enzimas. En este estudio, se describe el entorno genético de dos cepas de *K. pneumoniae* portadoras de genes *bla*_{CTX-M} aisladas de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA). Se determinó la presencia de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} para las cepas Kpn28 y Kpn29, respectivamente. Mediante el uso de la técnica “mapeo por PCR” se determinó la organización “corriente arriba y abajo” del ambiente genético que rodea estos genes. Para el entorno genético de *bla*_{CTX-M-1} se obtuvo dos fragmentos parciales no solapantes que asemejan la estructura de un integrón simple clase 1 mientras el entorno genético asociado a *bla*_{CTX-M-2} posee la estructura de un integrón compuesto clase 1. En las regiones variables los genes *aadA5* y *aadA1* estuvieron presentes y relacionados al entorno genético de *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} en las cepas Kpn28 y kpn29, respectivamente. La secuencia de inserción *ISCR1* fue detectada en los dos entornos genéticos estudiados y se relacionó con la movilización y expresión de los genes *bla*_{CTX-M-1} y de *bla*_{CTX-M-2}. Este estudio representa la primera descripción molecular de los elementos que conforman el entorno de genes *bla*_{CTX-M} en Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

A la Ilustre *Universidad de Los Andes* a través del Postgrado en Ciencias Médicas Fundamentales por brindarme la oportunidad de continuar formándome académicamente.

A la *Profesora María del Carmen Araque* por su confianza, motivación, paciencia, enseñanzas, orientaciones, ejemplo y dedicación durante el desarrollo de esta investigación, y por su valiosa amistad.

Al equipo del Laboratorio de Microbiología Molecular: *Beatriz, Indira, Carolina, Fanny*, por su amistad, cooperación, apoyo, por el trabajo en grupo y hacer agradable el tiempo compartido.

Al Laboratorio Bacteriología Clínica “Dr. Roberto Gabaldón” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, especialmente a la profesora Carolina González por facilitar el material biológico estudiado en este trabajo.

A mi familia, especialmente a mi *Madre*, por su apoyo y confianza durante todo este tiempo de estudios y durante toda la vida.

A *Soumi*, por su amor y su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

Agradezco al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) por el financiamiento parcial de este estudio bajo el proyecto N° 2012002321 y al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA) bajo el proyecto N° ADG-FA-02-97-07.

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Aspectos microbiológicos generales de <i>K. pneumoniae</i>	4
2.2. Características antigénicas de <i>K. pneumoniae</i>	5
2.3. Factores de virulencia	5
2.4. Importancia de <i>K. pneumoniae</i> como patógeno nosocomial	8
2.5. Mecanismos de resistencia intrínseco y extrínseco <i>Klebsiella pneumoniae</i> a los antibióticos beta-lactámicos de amplio espectro.	9
2.6. Beta-lactamasas de espectro expandido (BLEE)	10
o Concepto de beta-lactamasas, estructura y clasificación	10
o TEM, SHV, CTX-M, OXA	11
2.7. Importancia de las plataformas genéticas para la diseminación de los genes <i>bla</i> .	14
2.8. Mecanismos de diseminación de las BLEE: elementos de inserción, transposones, integrones y plásmidos.	15
2.9. Mapeo por PCR” técnica para la determinación de entornos genéticos.	26
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Cepas bacterianas	30
5.2. Transferencia por conjugación de genes que codifican para BLEE	30
5.3. Caracterización genética de cepas productoras de BLEE	31
5.3.1. Extracción y análisis de ADN plasmídico y detección del grupo de incompatibilidad	31
5.3.2. Extracción del ADN genómico de las cepas Kpn28 y Kpn29 y sus respectivas células obtenidas por transconjugación	31
5.3.3. Confirmación de la presencia de los genes <i>bla_{BLEE}</i> tipo CTX-M mediante amplificación por PCR	32

5.4. Análisis de la organización del entorno genético de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}. 33

5.5. Secuenciación y análisis de los productos amplificados 35

6. RESULTADOS 37

7. DISCUSIÓN 48

8. CONCLUSIONES 52

9. RECOMENDACIONES 53

10. REFERENCIAS 54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos de patogenicidad del género *Klebsiella*. 6

Tabla 2. Clasificación de las beta-lactamasas según su grupo funcional (Bush, Jacoby y Medeiros) y clase molecular (Ambler). 12

Tabla 3. Ejemplos de genes de resistencia en genes cassette en integrones de resistencia bacteriana clase 1. 23

Tabla 4. *K. pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de origen humano y animal. 25

Tabla 5. Iniciadores utilizados y condiciones de amplificación para la detección de genes *bla*_{BLEE} tipo CTX-M. 32

Tabla 6. Condiciones de amplificación para detección de genes *bla*_{BLEE} 33

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes *bla*_{BLEE} y detección de elementos genéticos asociados a los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}. 34

Tabla 8. Elementos genéticos investigados relacionados con el entorno de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}. 38

Tabla 9. Marcos abiertos de lectura encontrados en el entorno del gen *bla*_{CTX-M-1} para la cepa Kpn28. 41

Tabla 10. Marcos abiertos de lectura encontrados en el entorno del gen *bla*_{CTX-M-2} para la cepa Kpn29. 44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática de transposones clase I y clase II	20
Figura 2.	Representación esquemática de un integrón.	22
Figura 3.	Representación esquemática de la composición jerárquica y modular de los elementos genéticos móviles: genes cassette, integrones, transposones, plásmidos.	24
Figura 4.	Electroforesis de los amplificadores obtenidos para el gen <i>bla</i> _{CTX-M-1} de la cepa Kpn28 y TC-Kpn28 (1,2 kb).	37
Figura 5.	Electroforesis de los amplificadores obtenidos para los genes <i>bla</i> _{CTX-M-2} para la cepa Kpn29 y TC-Kpn29e IS26 para TC-Kpn28 y TC-Kpn29.	38
Figura 6.	Electroforesis de los amplificadores para <i>Int1</i> .	39
Figura 7.	Secuencias nucleotídicas obtenidas por solapamiento de los segmentos genéticos relacionados con el entorno del gen <i>bla</i> _{CTX-M-1} .	42
Figura 8.	Esquema (no en escala) presuntivo del entorno genético del gen <i>bla</i> _{CTX-M-1} detectado en la cepa TC-Kpn28.	43
Figura 9.	Secuencia nucleotídica obtenida por solapamiento de los segmentos genéticos relacionados con el entorno del gen <i>bla</i> _{CTX-M-2} .	45
Figura 10.	Esquema (no en escala) propuesto del entorno genético del gen <i>bla</i> _{CTX-M-2} detectado en la cepa TC-Kpn29.	46
Figura 11.	Árbol filogenético basado en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen <i>bla</i> _{CTX-M-2} y secuencias de referencia de los subgrupos CTX-M.	47

1. INTRODUCCIÓN

El incremento de la resistencia de las bacterias a los antimicrobianos es uno de los problemas más importantes en salud pública. En la actualidad, los beta-lactámicos siguen constituyendo una de las mejores opciones terapéuticas antimicrobianas. Sin embargo, la efectividad de los mismos, ha sido amenazada por la aparición de las beta-lactamasas. Los genes que codifican estas enzimas pueden residir en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. En el último caso, la relevancia es mayor, ya que las beta-lactamasas pueden ser transferidas a diversos géneros bacterianos y diseminarse en el ambiente hospitalario y en la comunidad (Torres y col., 2005).

Las beta-lactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida en el anillo beta-lactámico generando un compuesto inactivo para la bacteria. Desde el punto de vista clínico, las beta-lactamasas de espectro extenso (BLEE) son las más importantes, ya que estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar un espectro amplio de cefalosporinas de tercera y cuarta generación, además del aztreonam (Bonnet, 2004).

Las beta-lactamasas tipo CTX-M son las enzimas más diseminadas en el mundo. Están codificadas en plásmidos transferibles y tienen la capacidad hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro, son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam. Las CTX-M han sido encontradas predominantemente en enterobacterias tales como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella typhimurium*. A principios de los años 80 empezaron a reportarse los primeros aislamientos de *Klebsiella spp.* resistentes a las cefalosporinas de tercera generación mediante la producción de BLEE.

K. pneumoniae es un patógeno de importancia en el ámbito hospitalario, frecuentemente está relacionado con infecciones nosocomiales en unidades de cuidado intensivo y salas de pediatría. El aislamiento de cepas resistentes a

cefalosporinas de tercera generación con resistencia combinada a múltiples antibióticos y con la proliferación de cepas multirresistentes ha incrementado el problema de las infecciones intrahospitalarias causadas por *K. pneumoniae*. Estas cepas con fenotipos multirresistentes son difíciles de tratar, ocasionando el incremento de las tasas de mortalidad en las estancias hospitalarias, así como los costos de atención (Diestra, 2010).

Históricamente, la difusión de un fenotipo de resistencia característico en un área concreta y en un tiempo limitado se ha asociado a la expansión clonal de una cepa que ha adquirido un determinado mecanismo de resistencia. Sin embargo, en el caso de las enterobacterias resistentes a los beta-lactámicos por adquisición de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), la situación parece mucho más compleja, ya que la difusión se debe a la movilidad, propia o inducida, de algunos de los elementos genéticos presentes en su entorno, como los plásmidos, las secuencias de inserción (IS), los transposones (Tn) o los integrones (In), destacando su gran relevancia clínico-epidemiológica. Las IS, Tn e In, desempeñan un papel muy importante en la movilización génica intracelular. Son elementos ampliamente distribuidos, extremadamente diversos y en continua evolución. Las IS tienen la capacidad de moverse de un replicón a otro mediante una reacción de recombinación de material genético consecuencia de la translocación de un segmento de ADN, llamado elemento transposable o Tn, desde un lugar del genoma a otro.

La transposición es una recombinación no homóloga, pero sí especializada, no necesita una homología entre el elemento transponible o el sitio donde se encuentra y el nuevo lugar de inserción, pero se produce en sitios específicos, en dianas reconocidas por unas enzimas, las recombinasas, llamadas transposasas. Estas transposiciones pueden dar lugar a deleciones o inversiones, por lo que contribuyen sustancialmente a la diversidad genética. Tanto los Tn como las IS desempeñan un papel en la difusión de las BLEE. Por otra parte, los In ayudan a incrementar la diversidad, pues a pesar de que no pueden transponerse tienen la

capacidad de integrar genes codificadores de distintas clases de BLEE, con diferentes orígenes y asociados a otros genes, como los que confieren resistencia a aminoglucósidos, sulfamidas o cotrimoxazol. En aislados clínicos estas estructuras se han encontrado en un gran número de plásmidos de características variables en cuanto a su tamaño, grupo de incompatibilidad, así como al hecho de que sean o no conjugativos.

La caracterización de los plásmidos, determinando el grupo de incompatibilidad al que pertenecen y estudiando el entorno genético de los genes de resistencia nos permite hacer un seguimiento de su movilidad, así como establecer una relación evolutiva de dichos genes (Navarro y Miró, 2007; Cullik y col., 2010; Cantón y col., 2012).

www.bdigital.ula.ve

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Aspectos microbiológicos generales de *K. pneumoniae*

K. pneumoniae pertenece al super reino bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Enterobacteriales, familia Enterobacteriaceae, género *Klebsiella*. Es la especie tipo del género llamado así por Trevisan (1885) en honor al microbiólogo Alemán Edwin Klebs de fines del siglo XIX (Brisse y col., 2006). Los bacilos ahora conocidos como *Klebsiella* también fueron descritos por Carl Friedlander, y por muchos años el “Bacilo de Friedland” fue bien conocido como la causa de neumonía severas y a veces fatales. Las especies de *Klebsiella* están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en el tracto gastrointestinal de humanos y animales (Koneman y col., 2004).

K. pneumoniae es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*, puede causar una forma clásica de neumonía primaria. Se aísla con más frecuencia en muestras clínicas: orina, secreciones respiratorias, sangre, entre otras. Es un bacilo Gram negativo, fermentador de glucosa que forma colonias rojas típicas en el agar MacConkey; Voges-Proskauer positivo, oxidasa negativa, no móvil, H₂S negativo, arginina negativo, indol negativo, ornitina descarboxilasa negativo, fenilalanina negativo y utiliza el citrato. Sin embargo, actualmente la identificación completa de todas las especies de *Klebsiella* es posible sólo a través de pruebas moleculares (Meurer y col., 2010)

2.2. Características antigénicas de *K. pneumoniae*

La serotipificación de *K. pneumoniae* está basada principalmente en los antígenos de la cápsula (López y Echeverri, 2010). Esta serotipificación (antígenos K) es altamente discriminatoria y es el único método de tipificación definitivo disponible sólo en centros de referencia. En 1926 se describieron los primeros 2 serotipos capsulares, posteriormente se llegaron a reportar 82 antígenos K. Hoy día, se utiliza un esquema internacional que incluye 77 serotipos luego de la eliminación de 5 antígenos (Brisse y col., 2006). Algunos tipos capsulares están asociados a cepas virulentas, como por ejemplo los K1, K2, K4 y K5 (López y Echeverri, 2010). También se han descrito 12 diferentes antígenos O de *Klebsiella*, sin embargo, esta clasificación es poco usada ya que su determinación es obstaculizada por la presencia de la cápsula (Podschun y Ullman, 1998). No obstante, el incremento de los niveles de resistencia antimicrobiana en cepas de *Klebsiella* ha renovado el interés en el estudio de los antígenos O como vacunas potenciales.

2.3. Factores de virulencia

Los principales factores de virulencia asociados con *K. pneumoniae* son los polisacáridos capsulares, las fimbrias o adhesinas, los sideróforos y el lipopolisacárido (Tabla 1). Todos ellos tienen una gran importancia y la patogenicidad de la bacteria es el resultado de la acción conjunta de varios de estos factores, que permitirán a la bacteria adherirse, colonizar y multiplicarse en el interior del hospedador, resistir su sistema inmune (o simplemente no estimularlo) y producirle un daño (Izquierdo, 2003).

Tabla 1. Mecanismos de patogenicidad del género *Klebsiella*.

Mecanismo	Tipos	Características	Modo de acción
Cápsula	77 tipos de antígenos capsulares	Está compuesta de complejos polisacáridos ácidos	Protege de la fagocitosis por los granulocitos, polimorfonucleares y de la acción bactericida del suero, además es capaz de inhibir la diferenciación y capacidad funcional de los macrófagos
Pili o fimbrias	-Tipo 1, hemaglutinina sensible a manosa (MSHA). -Tipo 3, hemaglutinina resistente a manosa (MR/K-H). -Adhesina agregativa no fimbrial. -Adhesina CF29K -Adhesina KPF-28	-Están formadas principalmente de proteínas. -La adhesina agregativa no fimbrial es idéntica a la adhesina CS31-A de <i>E. coli</i> . -La KPF-28 se ha encontrado en cepas de <i>K. pneumoniae</i> productoras de beta-lactamasas de espectro extenso tipo CAZ-5/SHV-4	Participan en la colonización del hospedero ya que se asocia a la adherencia de las bacterias a las células del tracto respiratorio y urinario. Sin embargo, muchas de ellas son de reciente descubrimiento por lo que se conoce poco de su modo de acción y expresión en las diferentes especies de <i>Klebsiella</i> .
Lipopolisacárido (LPS o antígeno somático O)	9 grupos	Se compone de: -Lípido A, le da propiedades tóxicas. -Núcleo central -Polisacárido O, es el responsable de la diversidad serológica.	Induce la producción de citotoxinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- α en monocitos. Evita las defensas del hospedero y facilita la estabilidad de la estructura de la membrana externa.
Resistencia al suero		Mediada por la activación de las proteínas del complemento.	Las bacterias activan el complemento y atrapan el fragmento C3b, evitando así la formación del complejo de ataque a la membrana C5b-9 y la subsecuente muerte bacteriana.

Continuación Tabla 1.

Mecanismo	Tipos	Características	Modo de acción
Sideróforos	-Aerobactina -Enterobactina	-Moléculas de bajo peso molecular capaces de formar complejos de hierro férrico. -Son una respuesta genética a la concentración de hierro en el medio.	Su papel en la patogenicidad no está claro.
		-Se han encontrado principalmente en especies de <i>K. oxytoca</i> y <i>K. pneumoniae</i> , aisladas de pacientes con colitis hemorrágicas.	
Exotoxinas	-Citotoxinas -Toxinas semejantes a la termolábil y termoestable de <i>E. coli</i> .		
Producción de ureasa		Ha sido recientemente señalada como un factor de virulencia, se piensa, juega un papel importante en la inducción de infección del tracto urinario (ITU) y producción de cálculos.	La ureasa hidroliza la urea en amonio y dióxido de carbono. La alcalinización de la orina por el amonio produciendo fosfato de magnesio y calcio hasta llegar a sobresaturar la orina y cristalizarse formando cálculos de estruvita y apatita. La bacteria dentro de los cálculos puede resistir la terapia antibiótica, además el amonio producido contribuye al deterioro epitelial del TU.

Fuente: Rivera, 2002.

2.4. Importancia de *K. pneumoniae* como patógeno nosocomial

Especies de *Klebsiella* son ubicuas en la naturaleza, probablemente tienen dos hábitat comunes, uno de ellos es el ambiente, donde pueden ser encontradas en las superficies acuosas como: aguas residuales, suelo y sobre las plantas y el otro es la superficie de las mucosas de mamíferos como los humanos, caballos o cerdos. Se ha estimado que *Klebsiella* spp. causa el 8% de todas las infecciones nosocomiales en los Estados Unidos y en Europa y dentro de este género *K. pneumoniae* es el principal agente etiológico. En humanos, *K. pneumoniae* está presente como un saprófito en la nasofaringe y en el tracto intestinal, puede causar sepsis de aparición temprana y tardía, conjuntivitis, neumonía, infecciones del tracto urinario e infecciones en la zona quirúrgica (Gupta y col., 2003).

La tasa de portadores difiere considerablemente de un estudio a otro. El porcentaje de detección en muestras de heces oscila entre 5 y 38%, mientras que en la nasofaringe es de 1 al 6%. Debido a que es una bacteria Gram negativa su crecimiento no es óptimo en la piel humana y es considerada flora transitoria (Podschun y Ullmann, 1998).

Las especies de *Klebsiella* se adaptan bien a los ambientes hospitalarios. Estos organismos pueden sobrevivir mucho más que otras bacterias entéricas en manos y en superficies del ambiente hospitalario facilitando las infecciones cruzadas. La inadecuada higiene de las manos del personal es probablemente el principal problema en la diseminación entre pacientes (Meurer y col., 2010).

El porcentaje de portadores cambian drásticamente en ambientes hospitalarios principalmente en unidades de cuidados intensivos y salas de pediatría donde las tasas de colonización se incrementan directamente proporcional a la longitud de la estadía (Espinal y col., 2004). Incluso el personal hospitalario tiene elevadas tasas de este microorganismo. El porcentaje de portadores reportados en pacientes hospitalizados son 77% en heces, 42% en las manos y 19% en faringe. Esta alta

colonización nosocomial de *Klebsiella* parece estar asociada más con el uso de antibióticos que con la prestación de atención en el hospital (Podschun y Ullmann, 1998). Esta situación ha favorecido el frecuente aislamiento de cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación y a otros antibióticos (Espinal y col., 2004).

En el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes, Mérida, Venezuela, se aislaron cepas de *K. pneumoniae* en neonatos hospitalizados entre abril y junio de 1998, cuyos estudios moleculares revelaron la presencia de genes que codificaban para las beta-lactamasas tipo SHV-5 y TEM-1 (Araque y col., 2000). Estudios posteriores en el año 2007 permitieron establecer una relación epidemiológica entre los aislados estudiados sugiriendo la probable permanencia de *K. pneumoniae* en el área hospitalaria (González y col., 2011).

2.5. Mecanismos de resistencia intrínseco y extrínseco *Klebsiella pneumoniae* a los antibióticos beta-lactámicos de amplio espectro.

K. pneumoniae es naturalmente resistente a aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y otras penicilinas, pero es susceptible a la mayoría de los otros beta-lactámicos. Esta resistencia natural es debida a la producción constitutiva de bajo nivel de una beta-lactamasa clase A cromosomal, la cual es inhibida por el ácido clavulánico. Los genes de beta-lactamasa cromosomal son conocidos como *bla_{SHV}* y *bla_{LEN}*. El gen *bla_{SHV}* se encuentra en cepas del grupo filogenético KpI, mientras que *bla_{LEN}* se localiza en cepas KpIII. Las cepas KpII, las cuales albergan una nueva variante del gen llamado *bla_{OKP}* (Haeggman y col, 2004).

Las cepas que producen beta-lactamasas tipo SHV-1 permanecen susceptibles a cefalosporinas de tercera generación (ej. cefotaxima). Desde 1983, se ha reportado un incremento en la frecuencia de aislados de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* resistentes a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftazidima) y aztreonam. La resistencia es mediada con mayor frecuencia por

plásmidos con varias alteraciones de las beta-lactamasas SHV-1, TEM-1, TEM-2. Se han descrito más de 180 variantes aminoacídicas de SHV y más de 200 variantes de TEM y están compiladas en internet en <http://www.lahey.org/Studies/>.

Las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) son más comúnmente encontradas en *K. pneumoniae*. Un estudio de vigilancia realizado en los Estados Unidos indicó un incremento en la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM: 2 µg/ml o más) para la ceftazidima en un 24% de los aislados de *K. pneumoniae* y 15% para aislados de *E. coli* (Jones, 2001).

Se han descrito nuevos fenotipos de resistencia a beta-lactámicos en *K. pneumoniae* que incluyen enzimas que hidrolizan carbapenemos entre ellas una variante codificada cromosomalmente del gen *bla_{SHV-1}* y beta-lactamasas *ampC* mediadas por plásmidos, las cuales son generalmente resistentes a inhibidores de beta-lactamasas. Sin embargo, en la actualidad los antibióticos tipo carbapenemos permanecen activos *in vitro* contra una gran mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE (Podschun y Ullman, 1998)

2.6. Beta-lactamasas de espectro expandido (BLEE)

○ Concepto de beta-lactamasas, estructura y clasificación

Las beta-lactamasas son enzimas codificadas en el cromosoma, plásmidos, transposones o integrones y pueden producirse de manera constitutiva o inducible. Las beta-lactamasas cromosómicas son universales en una determinada bacteria, mientras que la presencia de las codificadas por plásmidos es variable y transferible entre las diversas especies bacterianas. Estas enzimas hidrolizan el anillo beta-lactámico antes que el antibiótico llegue al punto de unión con las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP). Las beta-lactamasas se unen a los beta-lactámicos mediante un enlace no covalente, posteriormente tiene lugar una acilación entre el grupo éster del anillo beta-lactámico y el grupo hidroxilo libre del residuo de serina (en el caso de las beta-

lactamasas A, C y D) del centro activo de la enzima. Finalmente la enzima que se encuentra activa es liberada y el antibiótico es inactivado (Diestra, 2010).

Aunque todas las beta-lactamasas catalizan la misma reacción se han aislado y caracterizado numerosos tipos de enzimas que se clasifican en forma diversa de acuerdo, por ejemplo, a su secuencia aminoacídica, peso molecular o especificidad de sustrato. La clasificación molecular de Ambler, 1980 divide las beta-lactamasas clásicamente en 4 grandes grupos (A - D) basados en la similitud aminoacídica y no fenotípica. Las clases A, C y D se caracterizan por poseer una serina en su centro activo. El grupo B son metaloenzimas que utilizan un ión zinc como cofactor. En la clasificación de las beta-lactamasas descritas por Bush, Jacoby y Medeiros, 1995 se incluyen otras características como el espectro de sustrato y el comportamiento frente a inhibidores. Las principales BLEEs quedarían englobadas en los grupos 2be y 2de de esta clasificación (Paterson y Bonomo, 2005). Ambas clasificaciones están relacionadas (Tabla 2).

- **TEM, SHV, CTX-M, OXA**

Los cuatro tipos de enzimas BLEE más destacadas son: TEM, SHV, CTX-M y OXA. Las tres primeras pertenecen a la clase A de Ambler y los grupos 2b, 2be, 2br, 2ber de Bush-Jacoby-Medeiros (2010). Las enzimas del tipo OXA pertenecen a la clase D y los grupos 2d, 2de y 2df de Bush-Jacoby-Medeiros (2010).

Tabla 2. Clasificación de las beta-lactamasas según su grupo funcional (Bush, Jacoby y Medeiros) y clase molecular (Ambler).

Bush, Jacoby y Medeiros 2010	Bush, Jacoby y Medeiros 1995	Clase molecular	Sustrato preferencial	Inhibidos por		Beta-lactamasas representativas
				CLV ^a o TZ ^b	EDTA	
1	1	C	Cefalosporinas	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^c	C	Cefalosporinas	-	-	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	+	-	PC1
2b	2b	A	Penicilinas Cefalosporinas 1 ^a G	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a G Monobactámicos	+	-	TEM-3, SHV-2, CTXM- 15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	NI ^c	A	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a G	-	-	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3
2ce	NI ^c	A	Carbenicilina, Cefepime	+	-	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	-	OXA-1-10
2de	NI ^c	D	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a G	Variable	-	OXA-11, OXA-15
2df	NI ^c	D	Carbapenémicos	Variable	-	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas 1 ^a -4 ^a G	+	-	CepA
2f	2f	A	Carbapenémicos	Variable	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B(B3)	Carbapenémicos	-	+	IMP-1, VIM-1, Cer-A, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B B(2)	Carbapenémicos	-	+	CphA, sfh-1
NI	4	Desconocido				

CLV^a: ácido clavulánico;TZ^b: tazobactam; NI^c: No incluido; 1^a-4^aG: primera a cuarta generación.

Fuente: Diestra, 2010.

TEM: Estas beta-lactamasas han sido descritas en *K. pneumoniae* y *E. coli*, también se han observado en otros géneros de enterobacterias como *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Salmonella enterica* o *Providencia rettgeri*. Se han descrito desde TEM-3 a TEM-29, TEM-42, TEM-43, TEM-46, TEM-50, TEM-52-TEM-58, TEM-60-TEM-64, TEM-66-

TEM-72, TEM-75, TEM-80, TEM-85-TEM-167. Dentro de las cuales, existen enzimas que hidrolizan la cefotaxima y ceftazidima (TEM-4), sólo ceftazidima (TEM-5, TEM-7, TEM-12 y TEM-16), otras tienen como sustrato la cefotaxima (TEM-3, TEM-20 y TEM-25) y algunas inactivan particularmente el aztreonam, tal como: TEM-22 (Diestra, 2010).

SHV: Su designación deriva de la presencia de un grupo sulfidrilo (*sulphydryl variable*) y su afinidad por el compuesto para-cloromercuriobenzoato (PCMB). A diferencia de las beta-lactamasas tipo TEM hay relativamente pocos derivados de SHV. De la misma manera que en el caso anterior, hay enzimas tipo SHV que tienen actividad hidrolítica preferente por cefotaxima y ceftazidima (SHV-2, SHV-12), otras que hidrolizan más rápidamente la cefotaxima que la ceftazidima o el aztreonam, como la SHV-3 y algunas que muestran preferencia por la ceftazidima (SHV-4, SHV-6). La mayoría de las BLEE tipo SHV se han encontrado en cepas de *K. pneumoniae*, aunque estas enzimas se han descrito en *Citrobacter koserii*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. La enzima SHV-12 se ha descrito en todo el mundo y se ha encontrado en cepas aisladas de animales y humanos. Las enzimas de tipo SHV podrían haber tenido origen en LEN-1, una penicilinasa cromosómica de *K. pneumoniae*, con la cual SHV-1 presenta un 97,5% de homología. La movilización del gen correspondiente a plásmidos y/o elementos transponibles puede haber sido mediada por IS26 (Da Silva, 2010).

CTX-M: Se han descrito hasta la fecha 150 variantes (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) que se agrupan en 5 familias distintas en función de la homología de las respectivas secuencias aminoacídicas: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (Cantón y col., 2012). Actualmente constituyen las beta-lactamasas más diseminadas en todo el mundo, tanto en el medio intra como extra hospitalario, considerándose endémicas en Sudamérica, Europa mediterránea, Europa de Este y Asia. Las enzimas de tipo CTX-M poseen un mayor poder hidrolítico frente a cefotaxima,

razón por la cual fueron designadas cefotaximasas. Estas variantes parecen tener un origen en genes cromosómicos de bacterias medioambientales (*Kluyvera* sp.). La movilización de estos genes a bacterias de origen clínico parece haber ocurrido por la acción de unidades de captura génica, como *ISEcp1*, *ISCR1* o secuencias relacionadas con fagos (Da Silva, 2010). Estas unidades de captura han sido descritas principalmente en *E. coli* aunque, se han encontrado en otras enterobacterias. Actualmente, las enzimas CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTX-M-2 son las que tienen mayor dispersión geográfica localizándose, incluso en cepas aisladas de animales sanos, lo cual sugiere que estos podrían comportarse como reservorios de cepas productoras de estas beta-lactamasas (Diestra, 2010).

OXA: Las beta-lactamasas tipo OXA se caracterizan por tener una elevada afinidad por la oxacilina y la cloxacilina y por ser poco inhibidas por el ácido clavulánico. Según el grado de homología de las secuencias nucleotídicas se dividen en 9 grupos, dentro de los cuales algunas enzimas presentan actividad frente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación y/o aztreonam. Estas beta-lactamasas plasmídicas de espectro extendido raramente se han encontrado en enterobacterias y son predominantes en *P. aeruginosa*. Se caracterizan por hidrolizar preferentemente la cefotaxima y una menor actividad frente al aztreonam.

2.7. Importancia de las plataformas genéticas para la diseminación de los genes *bla*.

La dispersión tan efectiva de los genes *bla* a lo largo de estos años se ha producido por dos mecanismos, bien por diseminación de una determinada cepa (diseminación clonal) o por la presencia de estos genes en diferentes plataformas genéticas de transferencia horizontal como secuencias de inserción, transposones

y plásmidos (diseminación horizontal a través de elementos móviles) (Fernández-González, 2012).

La mayoría de las resistencias a antibióticos beta-lactámicos se han adquirido principalmente por transferencia horizontal desde otras bacterias (Rodríguez-Rojas y col., 2013). Sin embargo, en algunos hospitales, se han descrito cuadros epidemiológicos en el que aparecen combinados ambos mecanismos. Recientes artículos han descrito la presencia de diseminación clonal de al menos 5 cepas diferentes de *Klebsiella* productoras de BLEE en el mismo servicio y al mismo tiempo. Además, miembros de un mismo clon podrían portar diferentes plásmidos (que codifiquen diferentes genes de BLEE) y cepas no relacionadas epidemiológicamente podrían producir la misma BLEE debido a la transferencia del plásmido entre diferentes especies (Paterson y Bonomo, 2005). Ello pone de relieve que los plásmidos y otros elementos móviles tienen una gran relevancia clínico epidemiológica.

La estructura modular de los elementos de transferencia horizontal favorece el intercambio entre distintos elementos genéticos, dotando de una gran plasticidad a las poblaciones bacterianas. Recientemente se ha sugerido que la transferencia horizontal está más favorecida por la proximidad entre microorganismos que comparten características genéticas como el tamaño del genoma o su contenido en G+C que por su proximidad filogenética. Estos grupos bacterianos que intercambian material genético de forma preferencial son denominados "comunidades de intercambio genético" (Da Silva, 2010).

2.8. Mecanismos de diseminación de las BLEE: elementos de inserción, transposones, integrones y plásmidos.

Plásmidos: Son moléculas de ADN doble cadena, extracromosómico y autoreplicable. Están compuestos de una *región constante* que contiene los genes responsables de funciones esenciales como la replicación, el mantenimiento y la

transferencia; y una *región variable* donde se localizan los genes responsables de funciones adaptativas como: resistencia a antibióticos, factores de virulencia o producción de bacteriocinas (Diestra, 2010; Da Silva, 2010). Está ampliamente documentada la participación de los plásmidos en el soporte y movilización de genes de resistencia antibiótica, en la mayoría de especies bacterianas de interés clínico. Este hecho, sumado a la capacidad de ser transferidos o movilizables a través de un proceso llamado conjugación entre diferentes especies bacterianas, es de primordial importancia para el entendimiento de la evolución de las poblaciones bacterianas (Cantón, 2006; Fernández, 2010).

La clasificación de los plásmidos se ha realizado en base a diferentes criterios, como el número de copias, el rango de hospedador, el grupo de incompatibilidad (Inc) y su capacidad de transferencia entre células. Esta última característica permite diferenciar estos elementos en plásmidos conjugativos y plásmidos movilizables (Da Silva, 2010). La caracterización de los grupos Inc se realiza actualmente por sistemas de tipaje basados en la identificación de secuencias de la región del control de replicación por PCR o hibridación con sondas específicas: *ori* (origen de replicación), *cop/inc* (control de inicio de replicación) y *rep* (replicación y control) (Carattoli y col., 2005). Los plásmidos que pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad (Inc) no pueden coexistir en la misma célula al compartir los mismos mecanismos de replicación (excepto en caso de recombinación, en el que sólo actúa un mecanismo dominante) (Taylor y col., 2004).

Los **plásmidos conjugativos** se subdividen en dos grandes grupos según el mecanismo de control de replicación. Un grupo está formado por aquellos elementos en los cuales el reconocimiento del sitio *ori* se hace a través de la ligación de la proteína Rep a iterones (secuencias repetidas de ADN) e incluye pPS10 de *Pseudomonas*, pRK2 (prototipo del grupo IncP en *Enterobacteriaceae*) o R27 y R478 (prototipos de los grupos IncHI1 e IncHI2, respectivamente). Otro grupo está representado por los plásmidos cuyo control de replicación se realiza

negativamente “control antisense”, es decir, a partir de una molécula de ARN “antisense” (copA) que inhibe la síntesis de RepA. A este grupo pertenecen los plásmidos de la familia repFIIA a la que pertenecen los grupos IncFII (cuyo prototipo es el plásmido R100), IncFIC, IncZ y los plásmidos del complejo IncI (IncB/O, IncK, IncI1 e IncL/M) (Da Silva, 2010).

Los **plásmidos no conjugativos o movilizables** son plásmidos pequeños con un alto número de copias, cuya región constante está constituida por una región mob (necesaria para la movilización) y una región ori (origen de replicación). Su transmisibilidad depende de la presencia de un módulo de conjugación de otro elemento genético. Se ha propuesto un esquema de clasificación de estos plásmidos basado en las diferencias de sus relaxasas, proteínas esenciales para el inicio de la transferencia del ADN tanto en plásmidos conjugativos como en plásmidos movilizables (Francia y col., 2004). Los plásmidos movilizables han contribuido también a la diseminación de genes de resistencia y virulencia (Jeziorowski y Gordon, 2007). Los tipos más emblemáticos son los plásmidos Col y los IncQ. Los plásmidos Col se caracterizan por la producción de colicinas, exoproteínas tóxicas (bacteriocinas) producidas por algunos miembros de *Enterobacteriaceae*, principalmente *E. coli*. Su prototipo es el grupo ColE formado por plásmidos de espectro restringido con un sistema de control de replicación similar al de la familia repFIIA, paradigma de los plásmidos conjugativos de enterobacterias (Da Silva, 2010).

Algunos genes de beta-lactamasas de espectro extenso han sido localizados en plásmidos ColE como es el caso de *bla*_{CTX-M-17} (Cao y col., 2002). Los plásmidos IncQ, cuyo prototipo es el plásmido RSF1010, se caracterizan por su amplio espectro de hospedador, que incluye bacterias Gram positivas, Gram negativas y *Archaea*. Se transfieren eficientemente entre células con la ayuda de plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad como IncI, IncM, IncX y sobre todo IncP (Da Silva, 2010).

La distribución de las *bla*_{CTX-M} entre plásmidos, en función del grupo de incompatibilidad es diversa. De manera que, se ha encontrado *bla*_{CTX-M} entre plásmidos con amplio rango de hospedador: IncN o L/M (*bla*_{CTX-M-1}), Inc A/C (*bla*_{CTX-M-3}) e Inc P1α (*bla*_{CTX-M-9}); y entre los siguientes plásmidos de estrecho rango: IncF2 (*bla*_{CTX-M-15}), Inc HI2 (*bla*_{CTX-M-9}) e Inc F1 (*bla*_{CTX-M-9}) (Navarro, 2007).

La secuenciación completa de plásmidos ha llevado al conocimiento de otras piezas fundamentales en la movilización genética, como son los transposones e integrones presentes en los mismos, y de cómo estos participan en la transmisión de la resistencia a los agentes antimicrobianos.

Transposones: Son fragmentos de ADN móviles, capaces de insertarse en distintos lugares dentro del cromosoma bacteriano y “saltar” a otras localizaciones, incluyendo plásmidos o ADN de bacteriófagos. Dependen de la replicación de su hospedero ya que son incapaces de replicarse autónomamente (Diestra, 2010).

Se han definido cuatro clases de transposones en enterobacterias con base a sus diferencias estructurales y su mecanismo de transposición: transposones compuestos o transposones de clase I, transposones de clase II, transposones de la familia Tn5090-Tn7 y transposones conjugativos, siendo las tres primeras clases las que se encuentran con mayor frecuencia en *Enterobacteriaceae*.

- **Transposones de clase I o los transposones compuestos (figura 1):** consisten en dos copias de una secuencia de inserción (IS) con la misma o distinta orientación, que flanquean un número variable de genes con diferentes funciones, principalmente resistencia a antibióticos o funciones catabólicas que contribuyen a la transposición (Da Silva, 2010).

Los ejemplos más representativos de transposones de clase I en *Enterobacteriaceae* son Tn5 (IS50, kan) y Tn1525 (IS15, kan) que confieren resistencia a kanamicina y Tn10 (IS10, tet) que confiere resistencia a tetraciclina

(Sherburne y col., 2000). Recientemente, los transposones clase I han sido también asociados con la diseminación de los genes *bla_{PER-1}* (IS1387) y *bla_{OXA-48}* (IS1999). Estos transposones compuestos se encuentran frecuentemente formando parte de estructuras más complejas que contienen transposones de clase II como Tn21 (Tn1525) o Tn5393 (IS1387-*bla_{PER-1}*-IS1387) en diferentes especies de bacterias gram negativas (Da Silva, 2010).

- **Transposones de clase II:** los más prevalentes en *Enterobacteriaceae*, se caracterizan por la presencia de genes que codifican una transposasa y una resolvasa, y un segmento de ADN variable, todo ello flanqueado por dos secuencias repetidas invertidas "IR" (inverted repeat) (Figura 1). Dentro de este grupo, se han definido dos sub-grupos dependiendo de la orientación de la transposasa (*tnpA*) y resolvasa (*tnpR*): los derivados de Tn3 (en los cuales transposasa y resolvasa se transcriben en dirección opuesta) y los derivados de Tn21 (en los cuales esos genes se transcriben en la misma dirección). Los transposones tipo Tn3 constituyen un grupo heterogéneo ampliamente diseminado en bacterias gram negativas y gram positivas de origen humano, animal y medioambiental, cuyo máximo representante es Tn3 (Grindley y col., 2001). Los transposones de este grupo son responsables de la diseminación de diferentes variantes de tipo *bla_{TEM}* como *bla_{TEM-1}*, *bla_{TEM-2}*, *bla_{TEM-3}*, *bla_{TEM-52}* y *bla_{TEM-135}* (Da Silva, 2010). La secuencia de inserción *ISEcp1* está frecuentemente asociada con genes *bla_{CTX-M}* del grupo 1 (*bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-3}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{CTX-M-32}*) dentro de Tn3 (Lartigue, 2004).

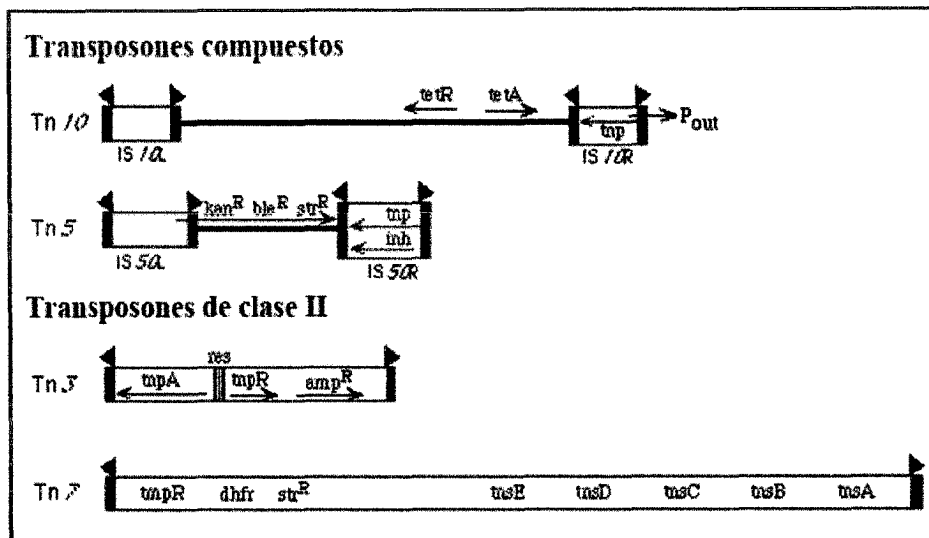


Figura 1: Representación esquemática de transposones clase I y clase II

- **Transposones de la familia Tn5090-Tn7:** Esta familia engloba el transposón mercurial Tn5090, los transposones asociados a integrones de clase 1 (Tn402), y de clase 2 (Tn7) descritos en bacterias Gram negativas, Tn552 de *Staphylococcus aureus* y el fago Mu. Su módulo de transposición está formado por cuatro proteínas (TniABQR en Tn402 y Tn5053 o TniABCD en Tn7). Se caracterizan por un mecanismo de transposición replicativa en dos pasos que incluye la formación de cointegrados y su resolución en un sitio *res*. Se diferencian de los transposones Tn3 en que la formación de cointegrados que requiere la acción de varios genes en lugar de uno (Da Silva, 2010).

- **Transposones conjugativos (CTn):** Engloban elementos genéticos muy diversos que también se conocen como “elementos integrativos-conjugativos” (integrative and conjugative elements, ICEs) (Da Silva, 2010). Estos transposones son capaces de transferirse desde un cromosoma bacteriano al de otra célula diferente. Contienen las recombinasas sitio-específicas que promueven la escisión y posterior integración cromosómica. No son considerados plásmidos, ya que aunque durante el proceso de conjugación sí se da un ciclo de replicación RC

sobre una de las hebras, el mantenimiento de este tipo de elementos en la progenie bacteriana sólo necesita de la integración en el cromosoma y no de la replicación de la molécula de doble cadena. El transposón conjugativo mejor descrito es el Tn916 en *Enterococcus faecalis* y su homólogo Tn1545. Se trata de un elemento cromosómico conjugativo, que al contrario de lo que ocurre en los plásmidos no se halla aislado como replicón independiente. Tn916 proporciona resistencia a tetraciclinas y minociclina, y Tn1545 a eritromicina y kanamicina (Burrus, 2002).

Integrones: Son estructuras sin capacidad de transposición “per se”. Son sistemas de recombinación sitio-específica, a través del cual ocurre el reconocimiento, la captura, y la expresión de casetes o genes cassettes. Los genes cassette son moléculas de ADN no replicativas que se encuentran como ADN circular libre, integrados en plásmidos o en el cromosoma. Aunque los genes estructurales presentes en integrones son mayoritariamente de resistencia, también es posible la integración de otro tipo de genes que probablemente no se observan con tanta frecuencia, porque no existe la presión selectiva necesaria para que se manifieste fenotípicamente (Sabaté, 2002; Diestra, 2010).

Los integrones se componen de tres elementos esenciales localizados en una región conservada denominada “5'-conserved región” (5'-CS): el gen *int* que codifica para una integrasa de la familia de las tirosina-recombinasas, un sitio primario de recombinación (*attI*) y un promotor (*Pc*), que asegura la expresión de los genes cassettes. Algunos tipos de integrones presentan una región conservada 3'CS (3'-conserved región), constituida por un gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔ1*), un gen de resistencia a sulfamidas (*sul1*) y una secuencia de función desconocida (*orf5*) (Mazel, 2006).

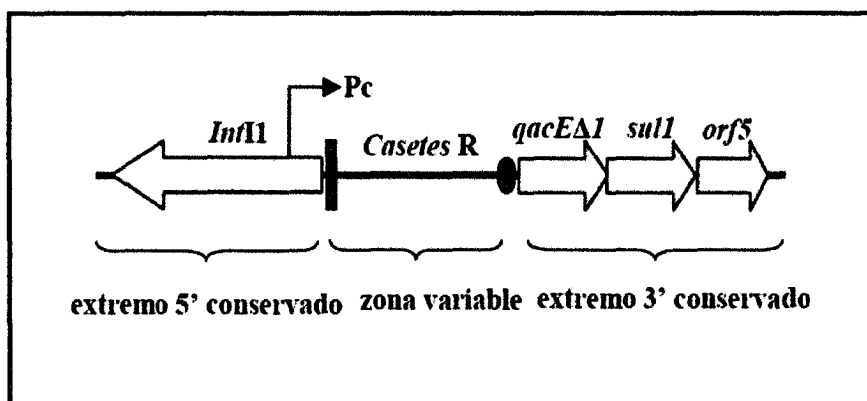


Figura 2: Representación esquemática de un integrón. Regiones conservadas: extremos 5'CS y 3'CS. *IntI1*, integrasa; *qacEΔ1* y *sul1*, resistencia a amonios cuaternarios y sulfamidas; *orf5*, función desconocida; Región variable con genes cassettes; *Pc*, promotor que dirige expresión de estos genes.

Los integrones no están dotados de movilidad, sino que se asocian a secuencias de inserción, transposones y/o plásmidos conjugativos, que permiten su transmisión intra e intercelularmente (Mazel, 2006). Se han identificado cinco clases de integrones asociadas a la diseminación de genes de resistencia en *Enterobacteriaceae*, que difieren entre sí en las secuencias de sus integrasas (Rowe-Magnus y Mazel, 2002) estos son:

- **Integrones de clase 1**, son los más frecuentemente encontrados en bacterias resistentes a antibióticos en el ámbito intra y extra-hospitalario, son derivados defectivos de Tn402 que están asociados comúnmente a distintos transposones de la familia Tn3 (Tn21, Tn1, Tn3).
- **Integrones de clase 2**, están relacionados exclusivamente con la familia Tn7.
- **Integrones de clase 3**, son similares a los de clase 2 y están asociados a transposones en plásmidos conjugativos.
- **Integrones de clase 4**, son componentes del elemento SXT encontrado en *Vibrio cholerae*, que contiene genes que confieren resistencia a sulfametoxazol, trimetoprim y estreptomicina.

- Integrones de clase 5, se han identificado en un transposon compuesto localizado en un plásmido de *Vibrio salmonicida* (Da Silva, 2010).

Los mecanismos de resistencia relacionados con genes localizados en integrones son variados e incluyen la síntesis de enzimas como las EMA21, cloranfenicol acetil transferasas (CAT) modificantes de rifampicina, beta-lactamasas, especialmente aquellas de más reciente descripción como las carbapenemasas, además de las enzimas dihidrofolato reductasas (Tabla 3). También se han descrito proteínas protectoras de la ADN girasa y bombas de eflujo codificadas en integrones (González y col., 2004; Bennett, 2008).

Tabla 3: Ejemplos de genes de resistencia en genes cassette en integrones de resistencia bacteriana clase 1.

Resistencia a beta-lactamasas
Beta-lactamasas clase A: familia <i>bla</i> P (P1,2,3)
Beta-lactamasas clase B: familia IMP (1-8); familia <i>bla</i> VIM (1,2,3,4)
Beta-lactamasas clase D; familia <i>bla</i> OXA (1,2,3,5,7,9,10)
Resistencia a aminoglucósidos
Aminoglucósido adeniltransferasa: <i>aadA1a</i> , <i>aadA1b</i> , <i>aadA2</i> , <i>aadB</i>
Aminoglucósido acetiltransferasa: <i>aacA1</i> , <i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacC1</i> , <i>aacC</i>
Resistencia a cloranfenicol
Cloranfenicol acetiltransferasa : <i>catB2</i> , <i>catB3</i> , <i>catB5</i>
Exportador de cloranfenicol: <i>cmlA</i>
Resistencia a trimetropim
Dihidrofolato reductasa clase A: <i>dfrA1</i> , <i>dfrA5</i> , <i>dfrA7</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA14</i>
Dihidrofolato reductasa clase B: <i>dfrB1</i> , <i>dfrB2</i> , <i>dfrB3</i>
Resistencia a antisépticos/desinfectantes
Exportador de compuestos de amonio cuaternario: <i>qacE</i> , <i>qacG</i>

Fuente: Bennett, 2008.

La movilidad genética entre los microorganismos involucra diversos mecanismos que conllevan a manipular y translocar fragmentos de ADN a través de enzimas como recombinasas, transposasas, integrasas, resolvasas. Estas enzimas están codificadas por la maquinaria genética del hospedero o por elementos genéticos móviles, tales como: secuencias de inserción, transposones e integrones (Figura 3). Recientemente, Millán y col., (2013) describieron el elemento de inserción ISCR1 asociado a genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} en plásmidos conjugativos IncN e IncFIIA aislados en *Klebsiella pneumoniae* de origen hospitalario en Mérida, Venezuela. Esta particular estructura genética ha demostrado estar involucrada en la facilitación de la pérdida o captura de genes, así como la organización de estos en el ADN genómico o en plásmidos conjugativos.

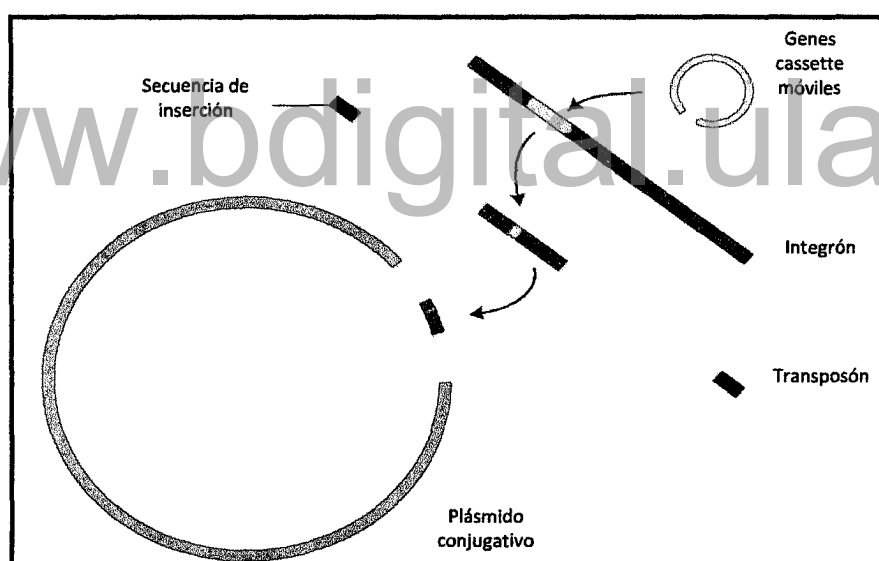


Figura 3: Representación esquemática de la composición jerárquica y modular de los elementos genéticos móviles: genes cassette, integrones, transposones, plásmidos.

La prevalencia de aislados que producen BLEE se ha incrementado alrededor del mundo debido a la diseminación de los elementos móviles y a la dispersión de

clones epidémicos. Las cepas productoras de BLEE son frecuentemente resistentes a aminoglucósidos, sulfonamidas y fluoroquinolonas. La fuga de cepas de *K. pneumoniae* desde los hospitales a la comunidad plantea un serio desafío para el tratamiento de infecciones adquiridas en la comunidad. La frecuencia de producción de BLEE por aislados de *K. pneumoniae* adquiridos en la comunidad varía en diferentes países. Sin embargo, estas cepas, han surgido en Europa, Asia, Sur y Norte América. Con el incremento del número de infecciones resistentes, la mortalidad por *K. pneumoniae* se ha incrementado y el tratamiento se ha hecho más complicado (Meurer y col., 2010). La tabla 4 muestra algunas de las beta-lactamasas reportadas para *K. pneumoniae* codificadas en plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad.

Tabla 4: *K. pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de origen humano y animal.

Genes de beta-lactamasas	Inc
<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-1-2-3-9-14-15-24-27} , <i>bla</i> _{DHA-1} , <i>bla</i> _{SHV-2-5-12} , <i>bla</i> _{TEM-1}	F
<i>bla</i> _{CMY-2-4} , <i>bla</i> _{CTX-M-2-3-14-15-56} , <i>bla</i> _{SHV-2-5-12} , <i>bla</i> _{TEM-3-21-24} , <i>bla</i> _{IMP-4-8-13} , <i>bla</i> _{VIM-4} , <i>bla</i> _{VEB-1}	A/C
<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-1-3-15-42} , <i>bla</i> _{TEM-3-10} , <i>bla</i> _{SHV-5} , <i>bla</i> _{IMP-4-8}	L/M
<i>bla</i> _{CMY-2-7-21} , <i>bla</i> _{CTX-M-1-2-3-9-14-15-24} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{TEM-1-3-52} , <i>bla</i> _{VIM-1}	I1
<i>bla</i> _{CTX-M-2-3-9-14} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{IMP-4} , <i>bla</i> _{VIM-1}	HI2
<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-1-3-15-32-40} , <i>bla</i> _{VIM-1}	N

Fuente: Carattoli, 2009.

2.9. “Mapeo por PCR” técnica para la determinación de entornos genéticos.

El “mapeo por PCR” es una técnica de descripción física, que permiten analizar directamente moléculas de ADN con el fin de construir mapas que indiquen la posición y las características de una secuencia determinada, incluyendo genes completos. Esta metodología es una variación de la técnica STS (*Sequence Tagged Site*) o mapeo de la “secuencia del sitio marcado”. Una STS es una secuencia corta de ADN, generalmente entre 100 y 500 pb de longitud, que es fácilmente reconocible y se encuentra sólo una vez en el cromosoma o genoma estudiado. A diferencia de la técnica STS, el mapeo por PCR utiliza iniciadores específicos como marcadores para regiones genéticas de interés, lo que presupone el conocimiento de la secuencia y de la organización de los genes, limitando su empleo para secuencias desconocidas (Pierce, 2009; Brown, 2002).

En el mapeo por PCR se obtiene un conjunto de fragmentos que se superponen, que una vez secuenciados y alineados mediante el uso de programas bioinformáticos, permiten organizar el orden y sentido correcto de las secuencias adyacentes que finalmente darán origen a la construcción de un mapa físico genético. Esta técnica es ampliamente utilizada en la identificación de entornos genéticos asociados a integrones, estructuras genéticas que constan de regiones constantes espaciadas por regiones variables, donde se encuentran genes de relevancia clínica y epidemiológica como los de resistencia a antibióticos. Dicha característica, supone una ventaja para el empleo de esta técnica (Levesque y col., 1995; Power y col., 2005).

En la actualidad el mapeo por PCR es una técnica útil y muy empleada en la generación rápida de estructuras detalladas de genomas, sin ser técnicamente exigente. Sin embargo, por su diseño, su aplicación está estrechamente relacionada con los límites de la enzima polimerasa (Weissensteiner y col., 2004).

En este sentido, el análisis del ambiente genético de los genes que codifican para las BLEE revela detalles importantes relacionados con la adquisición, movilización y diseminación de estas beta-lactamasas. En Venezuela, no se conocen estudios sobre el contexto genético de los genes codificantes para BLEE, especialmente los relacionados a CTX-M. Es por ello, que con el presente trabajo, se propone los modelos de organización del ambiente genético de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} localizados en plásmidos conjugativos de cepas de *K. pneumoniae*, circulantes en la Unidad de Neonatología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes en el estado Mérida.

www.bdigital.ula.ve

3. HIPÓTESIS

Los determinantes que codifican para las beta-lactamasas CTX-M-1 y CTX-M-2 se encuentran en plataformas genéticas cuya organización estabilizan, reordenan y promueven la diseminación de estos genes en la población bacteriana.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la organización del entorno genético de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes recluidos en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Confirmar mediante amplificación por PCR los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes recluidos en la UARN del IAHULA.
2. Transferir por conjugación los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} a células receptoras *E. coli* J53
3. Aislar mediante lisis alcalina el ADN plasmídico de las cepas estudiadas y transconjugantes.
4. Detectar mediante amplificación por PCR los siguientes elementos genéticos: integrones clase 1, secuencias de inserción (*ISEcp1*, *IS26*, *ISCR1* e *IS903*) y otros genes de resistencia (*qacEΔ*, *sull* y *bla*_{OXA}).

5. Analizar la organización del ambiente genético “aguas arriba y abajo” mediante la técnica de “mapeo por PCR”, utilizando la combinación de los iniciadores directos o reversos de los elementos genéticos previamente detectados y los correspondientes a los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}.
6. Purificar y secuenciar los diferentes elementos génicos detectados relacionados con los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}.
7. Proponer una estructura genética para la descripción del entorno genético de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} mediante el análisis bioinformático.

www.bdigital.ula.ve

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas bacterianas

Se analizaron dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Kpn28 y Kpn29) con sensibilidad disminuida a las cefalosporinas de amplio espectro, pertenecientes a la colección del Laboratorio Bacteriología Clínica “Dr. Roberto Gabaldón” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Estas cepas fueron aisladas en el año 2010, a partir de hemocultivos provenientes de neonatos con diagnóstico de septicemia nosocomial, recluidos UARN del IAHULA. En un estudio previo realizado por Millán y cols. (2013) se determinó la presencia de los genes *bla*_{CTXM-1} y *bla*_{CTXM-2} en las cepas Kpn28 y Kpn29, respectivamente.

5.2. Transferencia por conjugación de genes que codifican para BLEE

La transferencia de los determinantes de resistencia BLEE se realizó mediante ensayos de conjugación en medio sólido Agar Muller-Hinton (MH), utilizando la cepa *E. coli* J53 resistente al ácido nalidíxico como receptora. Las cepas donadoras (Kpn28 y Kpn29) y la receptora se cultivaron por separado en 10 ml de caldo MH sin antibiótico a 37 °C en agitación constante, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 - 0,7 a 600 nm. En una proporción de 1:10 a favor de la cepa receptora, se colocaron 100 µL de la cepa donadora y 900 µL del cultivo bacteriano de la cepa receptora; a partir de esta suspensión se inocularon 100 µL en una placa de agar MH, la cual se incubó por 6 horas a 37 °C. Luego de la formación de una película bacteriana sobre la superficie del agar, ésta fue resuspendida en 2 ml de caldo MH para posteriormente realizar diluciones seriadas 1:10 en caldo MH. Una alícuota de 100 µL de cada dilución se inoculó en placas de agar MH suplementadas con ácido nalidíxico (100 µg/mL) y cefotaxima (2 µg/mL). Las placas fueron incubadas a 37 °C por 14-18 horas. Las células

transconjugantes obtenidas se les verificó su fenotipo por pruebas de susceptibilidad y por amplificación PCR.

5.3. Caracterización genética de cepas productoras de BLEE

5.3.1. Extracción y análisis de ADN plasmídico y detección del grupo de incompatibilidad

A partir de las células transconjugantes se obtuvo el ADN plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina descrita por Sambrook y col., (1989) con algunas modificaciones. Los plásmidos se visualizaron en geles de agarosa al 0,8%, se tiñeron con 50 µg/ml bromuro de etidio (Sigma) y se fotografiaron con el *UVP Biodoc-It System*. El tamaño de los plásmidos se estimó mediante comparación visual con otros plásmidos de peso molecular conocidos: pLM07/20 (150kb) y pKAM542 (87kb) (Millán y col., 2011; Araque y Rivera, 2004).

Los plásmidos se clasificaron preliminarmente de acuerdo con sus grupos de incompatibilidad y según el esquema de tipificación del replicón por PCR descrito por Carattoli y col., (2005).

5.3.2. Extracción del ADN genómico de las cepas Kpn28 y Kpn29 y sus respectivas células obtenidas por transconjugación

A partir de cultivos frescos en agar MH varias colonias de las cepas estudiadas se suspendieron en 200 µL de agua bidestilada estéril ajustándose a una turbidez equivalente al patrón N° 2 del McFarland. Esta suspensión fue colocada a ebullición por 10 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos. Seguidamente se transfirió el sobrenadante conteniendo el ADN a un tubo Eppendorf® estéril, el cual fue mantenido a - 20°C hasta el momento de realizar las mezclas de reacción para las diferentes amplificaciones por PCR.

5.3.3. Confirmación de la presencia de los genes *bla_{BLEE}* tipo CTX-M mediante amplificación por PCR

La detección de genes codificantes *bla_{BLEE}* tipo CTX-M en las cepas estudiadas, células obtenidas por transconjugación y plásmidos, se hizo utilizando los iniciadores y condiciones de amplificación descritas en la Tabla 5. Las amplificaciones se llevaron a cabo en volumen final de 25 µL y la mezcla estuvo compuesta por 2,5 µL del buffer de reacción (10X), 1,25 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,5 µL de dNTPs (10 mM; Fudaim, Venezuela), 2,5 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 0,3 µL de la Taq polimerasa (5 U/µL; Fudaim, Venezuela), 11,45 µL de agua bidestilada ultrapura y 3 µL del ADN extraído. Las PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer (PCR System 2400) bajo las condiciones descritas en la Tabla 6. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (50µg/mL). Como tampón de carga se utilizó el tampón 5X ADN *Loading Buffer Blue* de Sigma® y como marcador de peso molecular BIONEER de 1Kb. Los geles se sometieron a un campo eléctrico de 80 V durante 30 minutos en buffer TAE 1X y se visualizaron con el sistema UVP Biodoc-It System.

Tabla 5: Iniciadores utilizados y condiciones de amplificación para la detección de genes *bla_{BLEE}* tipo CTX-M.

Localización	Secuencia 5'- 3'	Tamaño (pb)	Referencia
<i>bla_{CTX-M}</i> grupo	F: ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	1000	Ma y col., 2005
	R: CCGCTGCCGGTYTTATCVCCBAC		
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	F: GGTAAAAAATCACTGCGTC	860	Eckert y col., 2006
	R: TTGGTGACGATTTTAGCCGC		
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	F: TTAATGATGACTCAGAGCATT	900	Di Conza y col., 2002
	R: GATACCTCGCTCCATTTATTGC		

Tabla 6. Condiciones de amplificación para detección de genes *bla*_{BLEE}

Localización	Condiciones de amplificación
<i>bla</i> _{CTX-M}	1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min; 1 ciclo de 10 min a 72°C.
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min; 1 ciclo de 10 min a 72°C.
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min; 1 ciclo de 10 min a 72°C.

5.4. Análisis de la organización del entorno genético de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}.

En la Tabla 7, se señalan los iniciadores de elementos genéticos que normalmente se encuentran asociados a los genes que codifican para las BLEE tipo CTX-M, del mismo modo se presentan la combinación de iniciadores de los diferentes elementos genéticos que fueron establecidas en este estudio como estrategia de “mapeo por PCR”. Todos los segmentos fueron detectados por PCR en las células transconjugantes y plásmidos aislados, siguiendo lo descrito en las referencias señaladas.

El programa de amplificación para las reacciones fue el siguiente: 1 ciclo de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 46-65°C durante 1 min (dependiendo del par de iniciadores utilizados), 72°C durante 1 min; 1 ciclo de 10 min a 72°C.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes *bla*_{BLEE} y detección de elementos genéticos asociados a los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}.

Segmento	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Elemento genético	Tamaño (pb)	Referencia
1	I5	ACCGCCAACTTTCAGCACAT	<i>Int1</i>	928	Di Conza y col., 2002
	I3	GCGTTCGGTCAAGGTTCTGG			
2	5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC	Variable	variable	Di Conza y col., 2002
	3'-CS	AAGCAGACTTGACCTGAT			
3	<i>qacE</i> Δ1F	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	<i>qacE</i> Δ- <i>Sul1</i>	759	Hall y Vockler, 1987; Sundstroem y col., 1988
	<i>Sul1</i> B	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC			
4	<i>Sul1</i> F	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC	<i>Sul1</i>	398	Sundstroem y col., 1988
	<i>Sul1</i> B	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC			
5	F12D	GTATTGCGCCGCTCTTAGAC	<i>Sul1</i> - <i>ISCR1</i>	1935	Power y col., 2005
	F12R	AAACCAGCATGGTTGGCTAC			
6	ORFend	CCGTTAAGCTCTTTATGTGGG	<i>ISCR1</i> - <i>bla</i> _{CTX-M-2}	2300	Cameron y col., 1986; Di Conza y col., 2002
	<i>bla</i> Up	GGCTTCCAGCTGCTGTTGCAC			
7	341 F	CGCCCACTCAAACAAACG	<i>ISCR1</i> - <i>bla</i> _{CTX-M-2}	2408	Sabaté y col., 2002; Di Conza y col., 2002
	<i>bla</i> Up	GGCTTCCAGCTGCTGTTGCAC			
8	<i>bla</i> I	TTAATGATGACTCAGAGCATT	<i>bla</i> _{CTX-M-2} - <i>qacE</i> Δ	2200	Bauernfeind y col., 1996; Hall y Vockler, 1987
	<i>qacE</i> Δ1B	CAAGCTTTTGCCCATGAAGC			
9	<i>bla</i> I	TTAATGATGACTCAGAGCATT	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	860	Bauernfeind y col., 1996
	<i>bla</i> II	GATACCTCGCTCCATTATGTC			
10	<i>bla</i> Dn	TTGACTGTGACCCCAAATCC	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	1363	Power y col., 2005; Bauernfeind y col., 1996
	<i>bla</i> II	GATACCTCGCTCCATTATGTC			
11	<i>bla</i> I V	TACCCAACCGGAGCAGAAGG	<i>bla</i> _{CTX-M-2} - <i>qacE</i> Δ	1300	Bauernfeind y col., 1996; Hall y Vockler, 1987
	<i>qacE</i> Δ1B	CAAGCTTTTGCCCATGAAGC			
12	341 F	CGCCCACTCAAACAAACG	<i>ISCR1</i>	434	Sabaté y col., 2002
	341 R	GAGGCTTTGGTGTAACCG			
13	341F	CGCCCACTCAAACAAACG	<i>ISCR1</i> - <i>bla</i> _{CTX-M-1}	2700	Sabaté y col., 2002; Eckert y col., 2006
	CTX-M-1R	GGTGACGATTTTAGCCGC			
14	<i>ISEcp1</i> F	TTCAAAAAGCATAATCAAAGC	<i>ISEcp1</i>	1546	Poirel y col., 2003
	<i>ISEcp1</i> R	CAACCACCTTTCAATCATTTTT			
15	IS26 F	TCACTCCACGATTTACCGCT	IS26	500	Saladin y col., 2002
	IS26 R	CTTACCAGGCGCATTTTCGCC			
16	IS903 F	CATATGAAATCATCTGCGC	IS903	473	Poirel y col., 2003
	IS903 R	CCGTAGCGGGTTGTGTTTTTC			
17	5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC	Región variable/3'CS	1845	Di Conza y col., 2002; Sundstroem y col., 1988
	<i>Sul1</i> B	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC			
18	<i>Int1</i> F	ACATGCGTGTAATCATCGTC	<i>Int1</i>	490	Vignoli y col., 2006
	<i>Int1</i> R	GGTCAAGGATCTGGATTTTCG			

5.5. Secuenciación y análisis de los productos amplificados

Todos los productos obtenidos a partir de las amplificaciones fueron purificados utilizando el kit PCR Accuprep® (BIONEER). La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automatizada MacroGen Inc. (Seoul, Korea) utilizando los mismos iniciadores para la PCR.

Los cromatogramas de las secuencias fueron revisados y editados con el programa *BioEdit* (Hall, 1999). Seguidamente, las secuencias fueron analizadas y comparadas con las disponibles en las bases de datos EMBL y *GenBank* mediante el programa *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en el servidor de internet del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/). La estructura genética producto del solapamiento de las secuencias de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} y los segmentos génicos adyacentes fue obtenida a través del empleo de la herramienta informática *BioEdit* (Hall, 1999). Los segmentos obtenidos fueron sometidos al análisis en el programa ORF Finder (disponible en el servidor remoto <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), con el objeto de obtener los marcos abiertos de lectura e identificar las proteínas hipotéticas producto de su expresión. Estos análisis se hicieron utilizando la herramienta *blastp* comparando con las bases de datos del Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) y UniProtKB/Swiss-Prot (<http://web.expasy.org/>). Para confirmar la relación filogenética y la posición sistemática dentro del grupo CTX-M, se elaboró un árbol filogenético a partir de secuencias de referencia de los subgrupos *bla*_{CTX-M} empleadas por Bonnet (2004) y la secuencia obtenida para el gen *bla*_{CTX-M-2}. Las secuencias fueron alineadas empleando el programa *ClustalW* version 2 (Larkin y col., 2007) disponible en el servidor de internet del EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute) (<http://www.ebi.ac.uk>). El análisis filogenético de las secuencias fue realizado empleando el programa *MEGA* (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 5.0 (Tamura y col, 2011). Las distancias evolutivas incluyendo un factor de corrección según el modelo de Poisson

(Zuckerkindl y Pauling, 1965) se calcularon en función del número de aminoácidos en que difieren o asemejan dos proteínas mediante el Método Neighbor Joining (Saitou y Nei, 1987); así mismo, se determinaron los valores de remuestreo o Bootstrap basado en 1000 repeticiones. La consistencia de una determinada relación filogenética se evaluó por un lado, por su permanencia en un cluster independientemente del algoritmo usado y por otro, por el valor de remuestreo o bootstrap de la agrupación, mediante el cual se comprobó estadística y aleatoriamente si el orden en que se habían introducido las secuencias afectaba a las características del modelo empleado.

www.bdigital.ula.ve

6. RESULTADOS

El ADN de las células transconjugantes fue analizado para la detección de genes codificantes de BLEE tipo CTX-M e investigar los elementos genéticos asociados a estos genes.

Los iniciadores específicos para los diferentes subgrupos de CTX-M confirmaron la presencia del gen *bla*_{CTX-M-1} en la cepa TC-Kpn28 y en la cepa TC-Kpn29 el gen *bla*_{CTX-M-2} (Figuras 4 y 5). Estos genes se localizaron en plásmidos de tamaño aproximado a 85 kb, relacionados con los grupos IncN e IncFIIA, respectivamente (datos no mostrados).

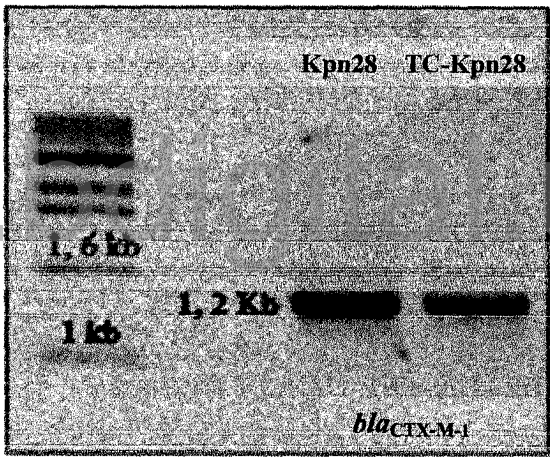


Figura 4. Electroforesis de los amplificados obtenidos para el gen *bla*_{CTX-M-1} de la cepa Kpn28 y TC-Kpn28 (1,2 kb).

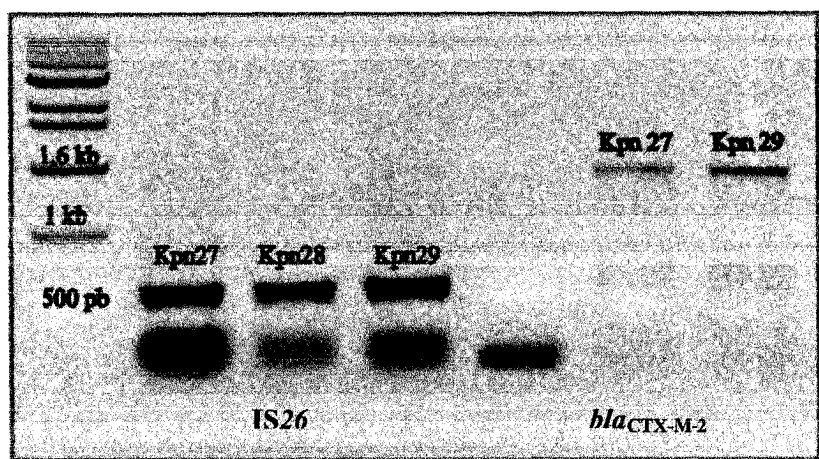


Figura 5. Electroforesis de los amplificadores obtenidos para los genes *bla*_{CTX-M-2} para la cepa Kpn29 y TC-Kpn29 e IS26 para TC-Kpn28 y TC-Kpn29.

La tabla 8 muestra los elementos genéticos relacionados con el entorno de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}. El integrón clase 1 (*Int1*) sólo fue demostrado para el entorno genético de *bla*_{CTX-M-2} (Figura 6), mientras las secuencias de inserción ISCR1 e IS26, así como el gen *qacEΔ1* se detectaron en ambas cepas. En las regiones variables, el gen *aadA5* y *aadA1* estuvieron presentes y relacionados al entorno genético de *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} en las cepas TC-Kpn28 y TC-kpn29, respectivamente.

Tabla 8. Elementos genéticos investigados relacionados con el entorno de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}.

Elemento genético	TC-Kpn28	TC-Kpn29
<i>Int1</i>	-	+
ISCR1	+	+
ISEcp1	-	-
IS903	-	-
IS26	+	+
<i>qacEΔ1</i>	+	+
Región variable	+ <i>aadA5</i>	+ <i>aadA1</i>

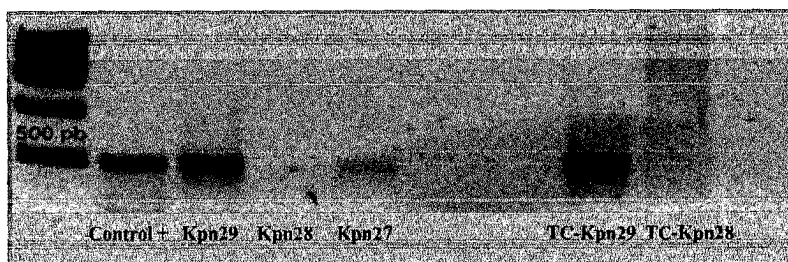


Figura 6. Electroforesis de los amplificados para *Int1*. El elemento genético *Int1* resultó positivo para Kpn29 y TC-Kpn29 con un tamaño aproximado de 500pb (*Int1F/ Int1R*), control positivo: Mmpp16.

Con base a las determinaciones de los elementos genéticos antes descritos y mediante el uso de la técnica “mapeo por PCR” se determinó la organización “corriente arriba y abajo” del ambiente genético que rodea los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}. (Tablas 9 y 10, respectivamente). Las secuencias de ADN de los amplificados de los segmentos investigados se utilizaron para confirmar dicha organización y construir por solapamiento de bases el mapa físico del entorno genético.

Con respecto a la estructura base del entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-1}, se generaron dos segmentos no relacionados estrechamente con marcos abierto de lectura y con identidades entre 99 a 100% al compararse con las secuencias reportadas en el GenBank. El primero conformado por un total de 1740 pb y probablemente similar a un integrón tipo 1 simple, contenía las secuencias que codificaban para las proteínas AadA5 (122 a 424 pb), QacEΔ (1141 a 1488) y Sul1 (1395 a 1739). El segundo segmento, con una extensión total de 1790 pb incluyó las secuencias de las proteínas /SCR1 (24 a 788 pb) y CTX-M-1 (953 a 1789 pb). (Tabla 9, Figuras 7 y 8).

El ambiente genético para el gen *bla*_{CTX-M-2} fue definido sobre la estructura clásica de un integrón compuesto de clase 1 con marcos abierto de lectura que presentaron identidades no menores al 97%, al compararse con las secuencias

descritas en el GenBank. Esta estructura se conforma de la siguiente manera: 1) un segmento conservado 5' a 4731 pb corriente arriba y en dirección opuesta al gen *bla*_{CTX-M-2}, que incluye el gen codificante de la integrasa de clase 1 (*int1*); 2) un segmento conservado 3' compuesto por una copia truncada de *qacEΔ1* junto al gen *sul1* a 3625 pb y en el mismo sentido de *bla*_{CTX-M-2}; 3) una región variable ubicada entre 5'-CS y 3'-CS en donde se localizó el gen *aadA1* (aminoglucósido-adeniltransferasa) en dirección opuesta al gen *int1*; 4) corriente abajo de la región 3'-CS y en la misma orientación del gen *sul1* se encuentra la secuencia de inserción *ISCR1*. Seguida a esta secuencia y con la misma orientación, encontramos a una distancia de 2040 pb, el gen de resistencia *bla*_{CTX-M-2} y 5) una duplicación de la región 3'-CS conformada por la proteína de fusión *ORF3/QacEΔ1* (Tabla 10, Figuras 9 y 10).

En la Figura 11, se muestra la construcción del árbol filogenético de las beta-lactamasas tipo CTX-M, donde se puede observar la inclusión de la secuencia aminoacídica obtenida en este estudio para el gen *bla*_{CTX-M-2}, en el parentesco filogenético correspondiente al subgrupo CTX-M-2.

Tabla 9. Marcos abiertos de lectura encontrados en el entorno del gen *bla*_{CTX-M-1} para la cepa Kpn28.

	Gen	Marco de lectura	Tamaño pb	Tamaño a.a.	Identidad		%	
Segmento 1	<i>aadA5</i>	+2	122-424	303	100	Aminoglucósido adenil-transferasa <i>S. entérica</i> subsp. enterica	AEV45771.1	100
	<i>qacEΔ</i>	+1	1141-1488	348	115	Exportador multidroga <i>Citrobacter freundii</i>	AGE11240.1	100
	<i>sul1</i>	+3	1395-1739	346	115	Sul1 proteína de fusión <i>Acinetobacter Baumannii</i>	CAJ77031.1	99
Segmento 2	<i>ISCR1</i>	+3	24-788	765	254	ISCR1 parcial <i>E. coli</i> .	ACL81505.1	99
	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	+2	953-1789	837	278	Betalactamasa CTX-M-1 <i>E. coli</i>	YP 003717483	100

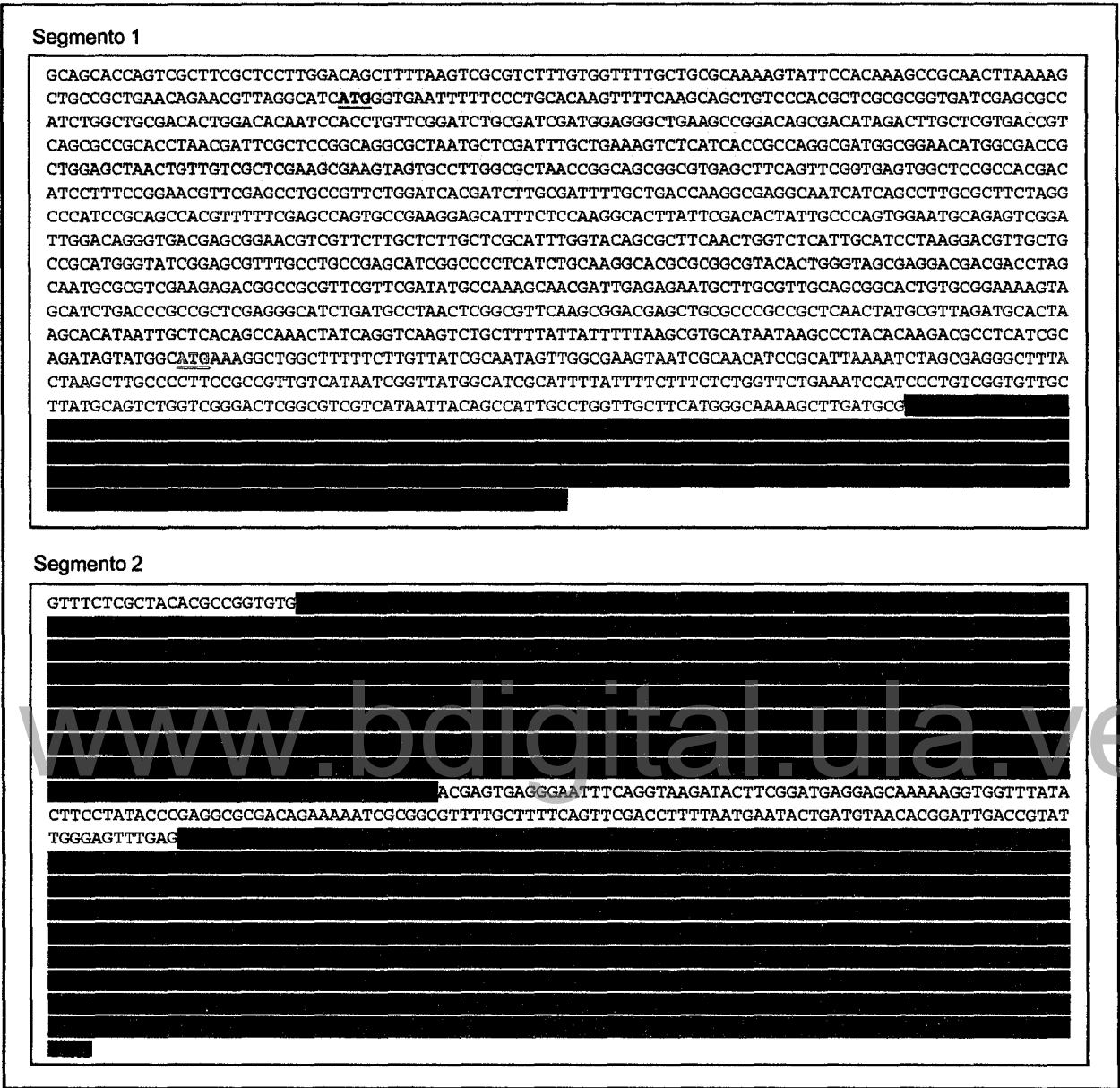


Figura 7: Secuencias nucleotídicas obtenidas por solapamiento de los segmentos genéticos relacionados con el entorno del gen *bla_{CTX-M-1}*.

Segmento 1: *aadA1* *qacEΔ* 
Segmento 2:   ATG: codón de iniciación.

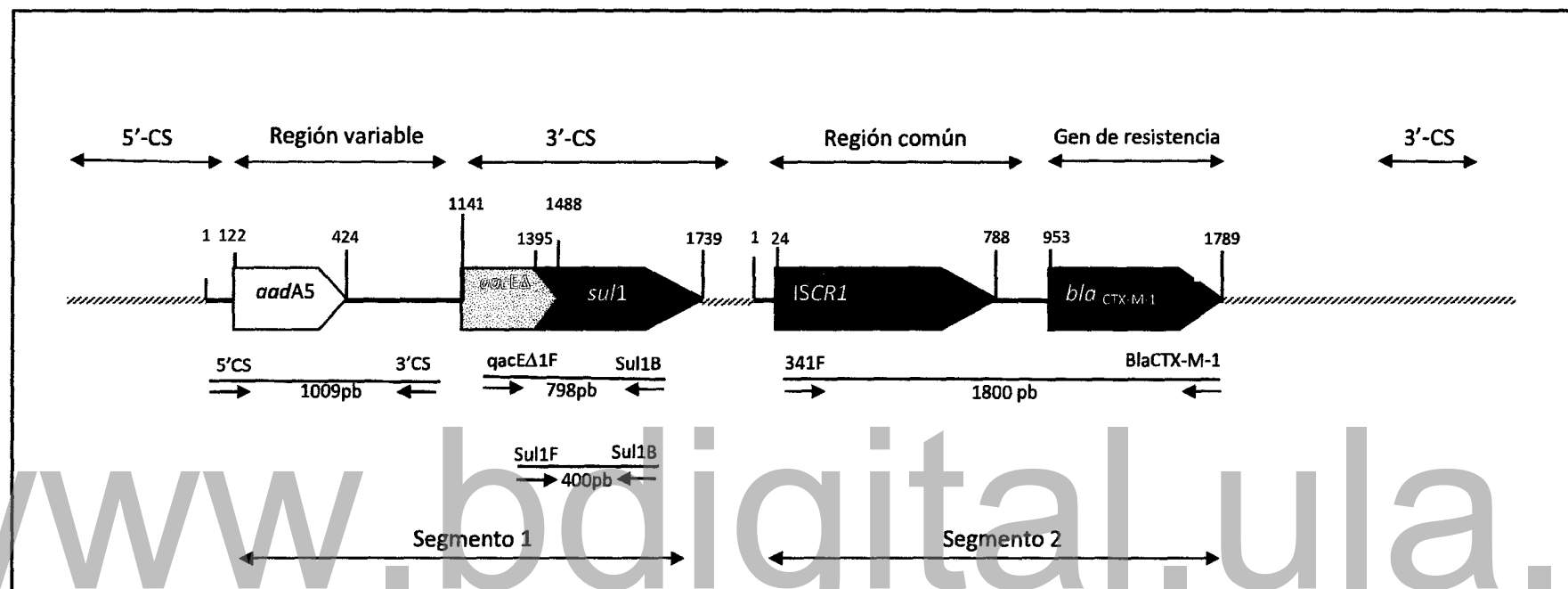


Figura 8: Esquema (no en escala) presuntivo del entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-1} detectado en la cepa TC-Kpn28. Se indican algunos oligonucleótidos utilizados para el mapeo por PCR y el tamaño de los amplicones en pb. En el segmento 1 se encontraron tres marcos abiertos de lectura correspondientes a los genes: *aadA5*, *qacEΔ1* y *sul1*. En el segmento 2, dos marcos abiertos de lectura para la secuencia de inserción *ISCR1* (ORF513) y el gen *bla*_{CTX-M-1}.

Tabla 10. Marcos abiertos de lectura encontrados en el entorno del gen *bla*_{CTX-M-2} para la cepa Kpn29.

Gen	Marco de lectura		Tamaño pb	Tamaño a.a.	Identidad		%
<i>Int1</i>	-1	1-900	900	299	Integrasa <i>K. pneumoniae</i>	ABV25530.1	100
<i>aadA1</i>	+2	830-1840	1011	336	Aminoglucósido adenil-transferasa <i>S. flexneri</i>	NP 052897.3	100
<i>qacEΔ</i>	+2	2006-2353	348	115	Transportador multidroga <i>C. freundii</i>	AGE11240.1	97
<i>sul1</i>	+1	2347-3186	840	279	Dihidropteroato sintetasa <i>S. flexneri</i>	NP 052897.3	99
<i>ISCR1</i>	+3	3591-5132	1542	513	Recombinasa <i>C. freundii</i>	NP 775048.1	100
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	+3	5631-6506	876	291	Betalactamasa CTX-M-2 <i>S. entérica</i> subsp. enterica	P74841.1	100
<i>orf3/qacEΔ1</i>	+3	6930-7795	867	288	Proteína de fusión Orf3/QacEΔ1	ACF06163.1	100

CAGATCCTGCACGGTTCGAATGTCGTAACCGCTGCGGAGCAAGGCCGTGCGGAACGAGTGGCGGAGGGTGTGCGGTGTGGCGGGCTTCGTGATGCCTGCTTGTCTACGG
CACGTTTGAAGGCGCGCTGAAAGGTCTGGTCATACATGTGATGGCGACGCACGACCCGCTCCGTGGATCGGTGCAATGCGTGTGCTGCGCAAAAACCCAGAACCACGGC
CAGGAATGCCCGGCGCGCGGATACTTCCGCTCAAGGGCGTCGGGAAGCGCAACGCGCTGCGGCCCTCGGCCCTGGTCCTTCAGCCACCATGCCCGTGACGCGACAGCTG
CTCGCGCAGGCTGGGTGCCAAGCTCTCGGGTAACATCAAGGCCCGATCCTTGGAGCCCTTGCCCTCCCGCACGATGATCGTGCCGTGATCGAAATCCAGATCCTTGACCC
GCAGTTGCAAAACCTCACTGATCCGCAATGCCGTTCCATACAGAAGCTGGGCGAAACAAACGATGCTCGCTTCCAGAAAACCGAGGATGCGAACCACTTCATCCGGGGT
AGCACCCCGCAAGCGCGCGAGGCTTCCGATCTCCTGAAGCCAGGCGAGATCCGTGCACAGCACCTTGCCGTAGAAGAACAGCAAGGCCGCAATGCCGT
ACGATGCGTGGAGACCGAAACCTTGCGCTCGTTCCGCGAGCAGGACAGAAATGCCCTCGACTTCTGCTGCTGCCCCAAGGTGCGGGGTGACGCACACCGTGGAAACCGGATGA
AGGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCTGTTTCGTTTCGTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCGCGGTGGTAAC
GGCGCAGTGGCGGTTTTCATGGCTTGTATGACTGTTTTTTGGGGTACAGTCTATGCTCGGCCATCCAAGCAGCAAGCGGTTACGCCGTGGGTGATGTTTTGATGTT
ATGGAGCAGCAACGATGTTACGCGAGCAGGCGAGTCGCCCTAAACAAAGTTAAACATCATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTG
GCGTCATCGAGCGCCATCTCGAACCGAGCTGTGCGCGGTACATTTGTACGGCTCCGCGAGTGGATGGCGGCCGTAAGCCACACAGTGATATTGATTGTGTTTACGGTG
ACCGTAAGGCTTGATGAAACAAACGCGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGGAACTTCGGCTTCCCTGAGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATGT
TGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAAGTGAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTTCTTCAGGTATCTTCGAGCCAGCCAGGATCG
ACATTTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCTTGGTAGGTCAGCGCGGAGGAACTCTTTGATCCGCTTCTGGAACAGGATCTATTGAG
GCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACTCGCGCGCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGCGAG
AATCGCGCGAAGGATGTGCTGCGGACTGGGCAATGGAGCGCTGCGCGCCAGTATCAGCCGCTCATCTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGGACAAGAAGAAGATC
GCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTTCACTACGTAAGGCGAGATCACCAGGTAGTCGGCAAAATAATGTCTAACAAATTCGTTCAAGCCGACGCGCG
TTCGCGCGCGGCTTAACCAAGCGTTAGATGCACTAAGCACATAATGCTCACGCGCAACTATCAGGTCAAGTCTGTGCTTTTATTATTTTAAAGCGTGCAATAAAG
CCCTACACAAATTTGGAGATATATCATGAAAGGCTGGCTTTTCTGTATCGCAATAGTTGGCGAAGTAATCGCAACATCCGATTAATCTAGCGAGGGCTTTACTA
AGCTTGGCCCTTCCGCGCTTGTGATATCGGTTATGGCATCGCATTTTATTTCTTCTCTGGTTCTGAAATCCATCCCTGTCGGTGTGCTTATGCACTCTGGTCGGGA
CTCGGCGTCTGATTAATTACCAACATTGCCAGGTTGCTTCAATGGGCAAAAGCTTGATGCGTGGGGCTTTGTAAGTATGGGGCTCATAAATGCTGCTTTTGTCTCGACCG
ATCCCCATCTGGAAGTCGATGAGGAGGCCGACGCC

CATT

CACCTTCCGGCCGCGCTAAATATCTCCTTTGGGTTGTTAATAAAACATCCAATAAGTTGACTGTGCGTGAAAAAGAAAGTTTTGTGTGATGGCGTTGAAGATCGCAC
CGTTAAGCTCTTATGTGGATGGTGACAGAGCTCGACGACTACCGATAAAACGCAACCGCCGCAACAGACAAGAAAAAGCCCAACTGATAACAGTTGGGGCTTCAGTAT
TGTGATTGGTGGAGCAATAGCACCTGAACCAAAACCTTCTCGCTCAACCGGTAGTGGCTGATAACACTCGTGAGGGCTATTGCGGGTTAAGCATTAGCGATGTCTA
GGGCCAGACTGGACGCTGAAACGAAGCCGCTGATACTGTACATAAACACAGTATCAGCGGAGGATACCC

www.bdigital.ula.ve

GACGACCCCAATCCAACACTGCTCAACACTGCCAATTT

TAAACGGGGCGGTGGGCGAGTTTGTATCTCTCGAGCTATCAGGCTAGAGATTTTACCGCCAAATCGAACCTTATTAGAGCGGTTTAGGCTGGACCGGCGAGTTAAATTTGG
GGCTTAGAGCGGTAAACGAGTGAGGGAATTTAGGTAAGATATCTCGGATGAGGAGCAAAAGGTGGTTTTATCTTCTATACCCCTCGCCCTTTAAACCCCTATTGATTTT
ATGGCTAATTTTGCACAGAGCTCAAAAAATTTGCGGTACCTGCGTACCCCTCATCTTTTTCGCTGCTGCAAAATGTGCTGCTCCTTTCTGAGCGATCTCTGACT
TTTGCTTTTTCGCGCGATGTAACATGGACAGGCTCAATTGTTGGAGATATTGGCAGGTTTGTGTTTTTACTTTTTTGTGTTTTTCAATGTATACTTGAAGGCCGAGGGATA
ATACTAATAGAGGATTTTAA

TGCAATAAATGGAGCGAGGTATCGCTCCATTTACGTTAAAAATGTGCTCCTGAACTTCAGTCTTGTCTTGCAACGAACCCCTCATCTCTTTCTAT
CATTCGCTCTTTTTCTGGACCAAAATATCTTAGCTTCAGGAAGGTAAAGATAACAATTTCTTATGTAAACTATTTTATTTTAAATAATGTTTAAAGGCATTTAATTATT
AGGTTGTTTGTGTTTTTATTTAATTTATCTGATTTACACTTGCAGTATTCCTATTTTTTTTACACTGGAATAATTTGCGCCTTCGCTATCTCCTTTCTGCTCTGCATGGTTGTA
TTCTAATGGTTTTTTATGCTTTAAGAAATTTATTTATTTTAAATAGTTGAACTAAGAGCCATCTTAAAGCTTATTGACAAATAAATTACCTCAATGAAATTTATCTAATA
TGATAAGGAGGGGCAATGAAGTCGCTCAATAATAATTTTGAAGAGTTACCTGTATGAGCTGCCCTTCTCATTTGTGAAGTTAAGCCAAATGCCCTCTACGGGTTTCA
TTTTGTGAGGAATACGTTTTTTGTACCTGGCCTGAAGCCAGTCTGCTATTTCTCACTCGGTATCATGGAGGGTCTCCTTAAACAGCAATATCACTACCTGTATCTTGGGTG
TGTTTTTGTGATTTCTCTATTAGCTATCTGCGTTTTTTTACTGACAAAAAATGGTTGGACTATTTATACGAAACAAACTTAAAGATAGTTCTCGTTTGCATAGGCCACC
TCAGACCATTTGGCTAATTACTGGTATAAGCATCACAAAGATATTTTTTTGATTTATTTATCAACAGGATAATTTAAAGTCTGCTGGTGATAAATTAAGAAAAGATTATC
TATCAGAGAGATGCGTTTTTTTCTGACTATCTCTGTCAACGCTCGAGTTTCTGATGCTTGGGGGCACTGATTGCGGGTGAAGATTGTAACCATCTGGCCAGGGGGCGCCA
TCTTGATATCCGTGCGGTGTATGCCGCAAGCGACGGCGGAGAGAAATGGGTGCTGATATCAATACGCCGTGCATAATAAGCCCTACACAAATTTGGGAGATATATCA
TGAAAGGCTGGCTTTTTCTTGTATCGCAATAGTTGGCGAAGTAATCGCAACATCCGATTAATACTAGCGAGGGCTTACTAAGCTTGCCCTTCCGCGCTTGTCTATA
ATCGGTTATGCGATCGCATTTTATTTCTTCTCTGTTTCTGAAATCCATCCCTGTGCGGTGTGCTTATGCACTCTGGTGGGACTAGGCGTCTGCT

Figura 9: Secuencia nucleotídica obtenida por solapamiento de los segmentos genéticos relacionados con el entorno del gen *bla*_{CTX-M-2}.
Leyenda: *Int1* *aadA1* *qacEΔ* *orf3/qacEΔ1* ATG: codón de iniciación.

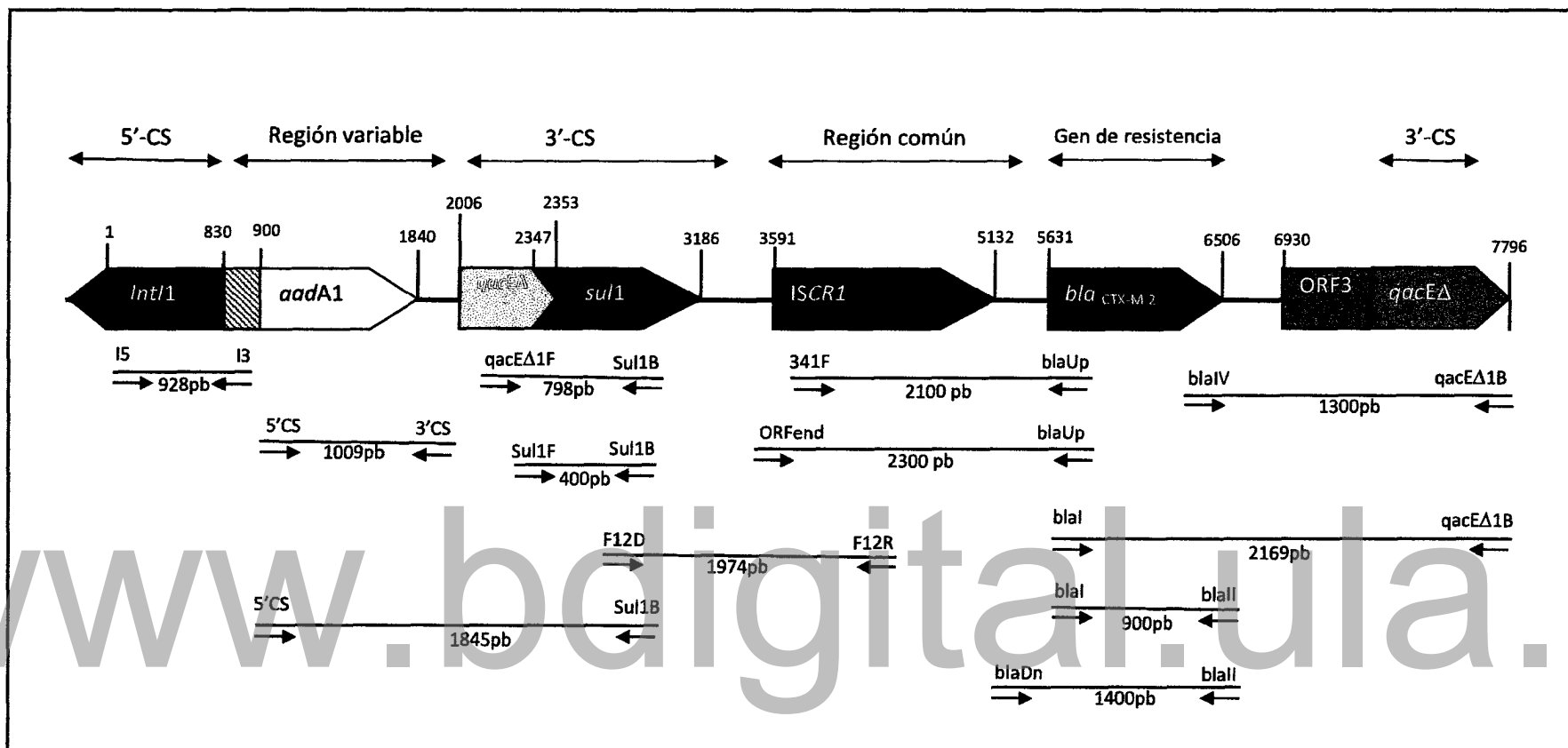


Figura 10: Esquema (no en escala) propuesto del entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-2} detectado en la cepa TC-Kpn29. Se indican los oligonucleótidos utilizados para el mapeo por PCR y el tamaño de los amplicones en pb. En el módulo 5'CS se determinó la presencia de un integrón tipo 1. En la región variable se determinó la presencia del gen *aadA1* que codifica para una aminoglucósido-adeniltransferasa. El módulo 3'CS contiene los genes *qacEΔ1* y *sul1*. En la región común se determinó la presencia del ORF513 (*ISCR1*) que codifica para una hipotética recombinasa. La región del gen de resistencia contiene el gen de la cefotaximasa CTX-M-2. La segunda región 3'CS contiene el ORF3 y el gen *qacEΔ*.

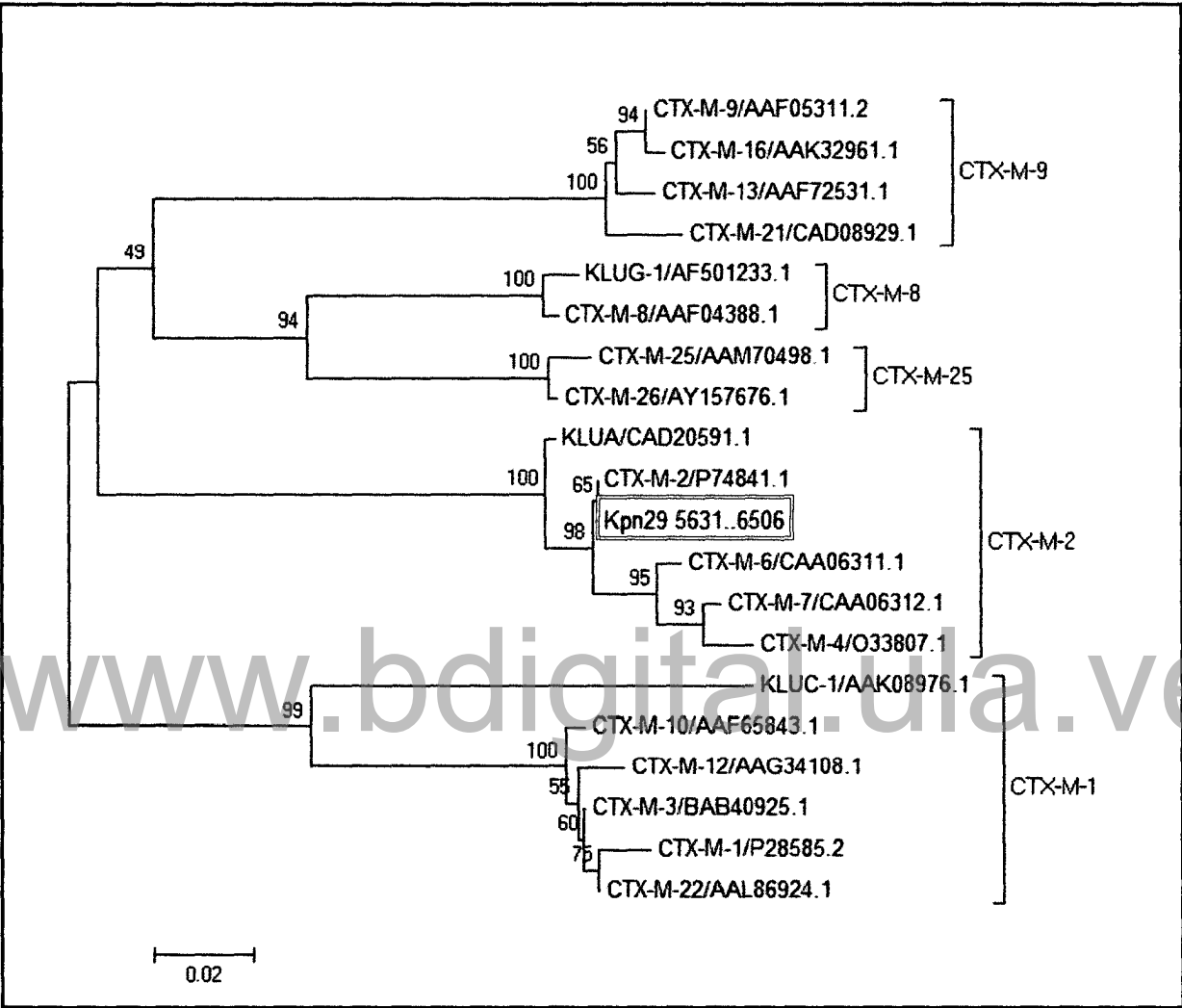


Figura 11. Árbol filogenético basado en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen *bla*_{CTX-M-2} y secuencias de referencia de los subgrupos CTX-M.

7. DISCUSIÓN

En la familia *Enterobacteriaceae*, la adaptación de los genes *bla*_{CTX-M} se ha asociado a determinadas estructuras genéticas, plásmidos y clones bacterianos. El éxito de estas unidades genéticas y la coexistencia de los genes *bla*_{CTX-M} con otros determinantes de resistencia se relacionan directamente con la diseminación mundial de estas enzimas (Cantón y col, 2012). Los plásmidos que median la producción de BLEE en cepas de *K. pneumoniae*, usualmente también poseen otros determinantes, entre ellos, resistencia a los inhibidores de beta-lactamasas o a los aminoglucósidos (Kisirgil y col., 2005; Barreto, 2006). En este estudio se pudo demostrar que la presencia de plásmidos conjugables de 85 kb portaban genes de resistencia para ceftalosporinas de amplio espectro, además de otros marcadores como la resistencia aminoglucósidos. El fenotipo de resistencia a los aminoglucósidos puede ser atribuido a diferentes determinantes genéticos ubicados en los plásmidos dentro o fuera del entorno genético de los genes *bla*_{CTX-M}. En este estudio se pudo confirmar por secuenciación la presencia de los genes *aadA1* (Kpn29) y *aadA5* (cepa Kpn28) en la región variable del integron. Estos genes *aadA1* y *aadA5* codifican para aminoglucósido-adeniltransferasas, las que confieren resistencia estreptomycin y espectinomycin. En este contexto, autores como Morosini y col. (2006); Cantón y Ruiz-Garbajosa (2011), atribuyen a este fenómeno de co-resistencia en organismos que producen CTX-M como una de las razones que podría facilitar el proceso de co-selección en genes *bla*_{CTX-M} resultando en una alta incidencia y distribución de los mismos en las poblaciones bacterianas.

El árbol filogenético construido con la secuencia aminoacídica Mostro una topología en donde se pueden distinguir los cinco subgrupos de las cefotaximasas tipo CTX-M (CTX-M-1; CTX-M-2; CTX-M-8; CTX-M-9 y CTX-M-25) y confirma los resultados obtenidos inicialmente por Blastp (2013) describiendo la cefotaximasa de Kpn-29 como una *bla*_{CTX-M-2}.

Otra característica que se relaciona directamente con la diseminación de los genes *bla*_{CTX-M} en la población bacteriana, es la vinculación directa con secuencias de inserción particulares que participan tanto en su movilización como en la promoción de la expresión de dichos genes (Cantón y col, 2012). La secuencia de inserción *ISCR1* anteriormente llamada *ORF513*, que codifica para una recombinasa hipotética, ha sido asociada previamente con genes *bla*_{CTX-M} (Sabate y col., 2000 y Cao y col., 2002), principalmente los del grupo *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-9} (Cantón y Coque 2006) y suelen encontrarse en integrones clase 1 (Fernández, 2010). En este estudio se determinó la presencia del gen *bla*_{CTX-M-2} en la cepa Kpn29 asociado con la secuencia de inserción *ISCR1*, a su vez este elemento fue ubicado en un integrón compuesto tipo 1 derivado de In6/In7. En la región de 499 pb aguas arriba del gen *bla*_{CTX-M-2}, de los cuales 264 pb mostraron una identidad de 97% con la región aguas arriba de KluA-1 (Beta-lactamasa cromosomal de *Kluyvera ascorbata* gb AJ272538), mientras que los pares de bases restante mostraron una identidad del 100% con la región común de integrones In6 e In7. Similares resultados fueron reportados por Arduino y col., (2002) en Argentina, quienes describieron los genes *bla*_{CTX-M-2} asociados a *ISCR1* en integrones clase 1 similares a In35, en enterobacterias aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales de 4 hospitales en Buenos Aires.

El análisis de la estructura organizativa del integrón compuesto clase 1 para la Kpn29, permitió identificar tres módulos conservados. En el módulo 5'CS se encuentra una integrasa de clase 1 (*Int1*); el módulo 3'CS contiene los genes *qacEΔ1* y *sul1* que confieren resistencia marginal a compuestos de amonio cuaternario y sulfonamidas respectivamente y un segundo 3'CS que contiene el ORF3 y el gen *qacEΔ1*. La conformación de esta estructura es similar a la propuesta para los genes *bla*_{CTX-M-2} por Di Conza y col., (2002) en cepas de *Salmonella enterica*, así como la descrita por Power y col., (2005) en *Morganella morganii* y Vignoli y col., (2006) en cepas *K. pneumoniae*. En estos estudios todas las cepas fueron aisladas de ambientes hospitalarios y relacionadas a infecciones

nosocomiales en Argentina y Uruguay respectivamente, en donde los genes *bla*_{CTX-M-2} circulan con alta frecuencia. Los hallazgos de estos estudios y los aquí reportados, nos hacen suponer que la similitud del entorno genético y la identidad encontrada entre las secuencias estudiadas están estrechamente relacionadas. Por tanto, es posible que estas estructuras tengan un origen común cuya distribución geográfica y diseminación es particular para Suramérica.

Por otro lado, los genes *bla*_{CTX-M-1} están más frecuentemente asociados con la secuencia de inserción *ISEcp1* (Bou y col., 2002; Dutour y col., 2002; Saladin y col., 2002). Sin embargo en el 2008, Su y col., reportaron por primera vez genes *bla*_{CTX-M-1} asociados con el elemento *ISCR1*, formando parte de un integrón clase 1, en *E. coli* aisladas del hospital de la Universidad de Jiangsu (China). Una estructura genética semejante fue encontrada en la cepa Kpn28 del presente estudio, donde el gen *bla*_{CTX-M-1} se detectó asociado a *ISCR1*, con la diferencia de que estas estructuras no se relacionaron con un integrón de clase 1. Es probable que estos resultados indiquen que la asociación *ISCR1-bla*_{CTX-M-1} esté sustentada sobre la estructura de otra clase de integrón poco convencional, por lo que esta plataforma genética novedosa requerirá de una caracterización profunda en estudios futuros.

Adicionalmente, en este estudio se determinaron la presencia de otros elementos que pueden estar involucrados en la movilización y diseminación de genes *bla*_{CTX-M}, tales como IS26 descrito “aguas arriba” de *bla*_{CTX-M-1} (Saladin, 2002) e IS903 reportado “aguas abajo” de los genes *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-17} y *bla*_{CTX-M-19} (Chanawong y col., 2002; Poirel y col., 2003 y Cao y col., 2002). Los resultados obtenidos demostraron la presencia de secuencias de inserción IS26 en las cepas estudiadas (Kpn28 y Kpn29), pero sin evidencia de asociación con los genes *bla*_{CTX-M}, estos resultados ponen de manifiesto que dicha secuencia se encuentra fuera del entorno genético de ambos genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2}, pero no se descarta que el IS26 esté relacionado con otro tipo de beta-lactamasa o genes de resistencia que pudieran estar en el mismo plásmido. A diferencia de IS26, la

secuencia de inserción IS903 fue determinada en las cepas salvajes o donadoras pero no en los transconjugantes. Esto indica que dicha secuencia no está asociada a la plataforma genética descrita en este estudio. Sin embargo, es posible que IS903 esté vinculado con otra estructura genética que pudiera encontrarse en el genoma de la célula donadora.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las cepas de *K. pneumoniae* aisladas en la Unidad de Alto Riesgo Neonatal (UARN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), con características fenotípicas indiferenciables, poseen un contexto genético diferente en relación a los genes que codifican las BLEE CTX-M-1 y CTX-M-2. Sin embargo, presentan elementos genéticos comunes como el ISCR1, responsables de la diseminación, circulación y reordenamiento de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-2} en la población bacteriana estudiada.

www.bdigital.ula.ve

8. CONCLUSIONES

1. El entorno genético propuesto para los aislados portadores de genes *bla*_{CTX-M-2} es similar a la estructura de un integrón compuesto clase 1 derivados de *In6/In7*.
2. La secuencia de inserción *ISCR1* fue detectada en los entornos genéticos de *bla*_{CTX-M-1} y de *bla*_{CTX-M-2}.
3. La región variable mostró la presencia del gen *aadA1* para la cepa Kpn29, mientras que la cepa Kpn28 alberga en esa misma región el gen *aadA5*.
4. La secuencia de inserción *IS26* fue encontrada en las cepas salvajes de los aislados estudiados, así como en sus transconjugantes pero no relacionada directamente con la movilización o expresión de los genes *bla*_{CTX-M}.
5. Este estudio representa la primera descripción de la estructura molecular por mapeo físico de la secuenciación de los elementos genéticos que conforman el entorno del gen *bla*_{CTX-M-2} y la propuesta preliminar para el ambiente genético de *bla*_{CTX-M-1} en Venezuela.

9. RECOMENDACIONES

1. Continuar la caracterización de la plataforma genética relacionada con el gen *bla*_{CTX-M-1}.
2. Ampliar la caracterización del entorno genético de las BLEEs tipo CTX-M en poblaciones bacterianas de interés epidemiológico que circulan en ambientes intrahospitalarios y/o de la comunidad.

www.bdigital.ula.ve

10. REFERENCIAS

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> actualizada en agosto de 2013.

Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 289: 321-31.

Araque, M. y Rivera, I. (2004). Simultaneous presence of *bla*TEM and *bla*SHV genes on a large conjugative plasmid carried by extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Am J Med Sci. 327:118-22.

Araque, M., Nieves, B., Lauretti, L. y Rossolini, G.M. (2000). Molecular basis of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela. Int. J. Antimicrob. Agents. 15 (1):37-42.

Arduino, S., Roy, P., Jacoby, G., Orman, B., Pineiro, S. y Centron, D. (2002). *Blac_{TXM-2}* Is Located in an Unusual Class 1 Integron (In35) Which Includes Orf513. Antimicrob. Agents Ch. 46 (7):2303-2306.

Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I. y Stockinger, H. (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res*, 40(W1):W597-W603.

Barreto, S. (2006). Relación fenotípica entre cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y la presencia de

resistencia a la piperacilina-tazobactam y a los aminoglucósidos. Monografía. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S. y Casellas, J.M. (1996). Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (2): 509-513.

Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria, Review. *Brit. J. Pharmacol.* 153: S347–S357.

Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -lactamases: the CTX-M Enzymes, Minireview. *Antimicrob. Agents Ch.* 48: 1-14.

Bou, G., Cartelle, M., Tomás, M., Canle, D., Molina, F., Moure, R., Eiros, J.M. y Guerrero, A. (2002). Identification and broad dissemination of the CTXM-14 β -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40:4030-4036.

Brisse, S., Grimont, F. y Grimont, P. (2006). The Genus *Klebsiella*, capítulo 3.3.8. *Prokaryotes* 6: 159-196.

Brown, T.A. (2002). *Genomes*. 2nd edition. Chapter 5. Oxford: Wiley-Liss. England.

Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. y Guédon, G. (2002). MicroReview Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol.* 46 (3): 601–610.

Bush, K., Jacoby, G.A. y Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Ch* 39: 1211-33.

Bush, K., Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases, Review. *Antimicrob. Agents Ch.* 54(3): 969-76.

Cameron, F.H., Groot Obbink, D.J., Ackerman, V.P. y Hall, R.M. (1986). Nucleotide sequence of the AAD(2") aminoglycoside adenylyltransferase determinant aadB. Evolutionary relationship of this region with those surrounding aadA in R538-1 and dhfrII in R388. *Nucleic Acids Res.* 14 (21): 8625-8635.

Cantón, R. y Coque, T. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 466-475.

Cantón, R. y Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11: 477-485.

Cantón, R., Gonzalez, J. y Galán, J. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front. Microbiol.* 3 article 110.

Cao, V., Lambert, T. y Courvalin, P. (2002). ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum β -lactamase CTXM-17. *Antimicrob. Agents. Ch.* 46: 1212-1217.

Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L. y Threlfall, E.J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Meth.* 63(3): 219-28.

Carattoli, A. (2009). Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. Minireview. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (6): 2227-2238.

Chanawong, A., M'Zali, F.H., Heritage, J., Xiong, J.H. y Hawkey, P.M. (2002). Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13 and CTX-M-14, among

Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. Antimicrob. Agents Ch. 46: 630-637.

Clinical and Laboratory Standar Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement Document M100-S21. 2011; 31(1). Disponible en <http://www.svmicrobiologia.org/>

ClustalW and ClustalX version 2 (2007) Larkin, M,A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. y Higgins, D.G. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.

Cullik, A., Pfeifer, Y., Prager, R., Von Baum, H. y Witte, W. (2010). A novel IS26 structure surrounds bla_{CTX-M} genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *Journal Med Microbiol* 59 (5): 580-587.

Da Silva, A. (2010). Unidad de Captura y dispersión génica en la evolución de las beta-lactamasas de espectro extendido. Tesis de grado para optar al título de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. España.

Di Conza, J., Ayala, J.A., Power, P., Mollerach, M. y Gutkind, G. (2002). Novel class 1 integron (InS21) carrying bla_{CTX-M-2} in *Salmonella enterica* serovar infantis. Antimicrob. Agents Ch. 46: 2257-61.

Diestra, K. (2010). Caracterización del entorno genético de genes bla_{ble} y plásmidos asociados en cepas circulantes de *E. coli* y *K. pneumoniae* en España. Tesis de grado para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

Dutour, C., Bonnet, R., Marchandin, H., Boyer, M., Chanal, C., Sirot, D. y Sirot J. (2002). CTXM-1, CTXM-3, CTXM-14 β -lactamase from *Enterobacteriaceae* isolated in France. *Antimicrob. Agents Ch.* 46:534-537.

Eckert, C., Gautier, V. y Arlet, G. (2006). DNA sequence Analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. *J. Antimicrob. Ch.* 57: 14-23.

Espinal, P., Mantilla, J., Saavedra, C., Leal, A., Alpuche, C. y Valenzuela, E. (2004). "Epidemiología Molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasa de espectro extendido" *Biomedica* 24 (3): 252-261.

Fernández, M. (2010). Entorno genético de beta-lactamasas de espectro extendido en Enterobacterias. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca, España.

Fernández-González, A. (2012). "Beta-lactamasas en Enterobacteriaceae: Aspectos genéticos, epidemiológicos, clínicos y biológicos", Tesis doctoral. Universidade da Coruña, España.

Francia, M., Varsaki, A., Garcillan- Barcia, M., Latorre, A., Drainas, C. y de la Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev.* 28(1): 79-100.

González, G., Mella, S., Zemelman, R., Bello, H. y Domínguez, M. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos *Rev. Med. Chile* 132: 619-626.

González, C., Gil, F., Solórzano, M., Cruz, J., Puig, J., Suárez, M. y Nieves, B. (2011). Brote de *Klebsiella pneumoniae* multiresistente y productora de β -lactamasa de espectro extendido en una unidad de alto riesgo neonatal. *Rev. Chil. Infect.* 28 (1): 28-34.

Grindley, N., Craig, N., Craigie, R., Gellert, M. y Lambowitz, A. (2001). The movement of Tn3-like elements: Transposition and cointegrate resolution. In: Mobile DNA II. ASM Press, Washington D.C.

Gupta, A., Ampofo, K., Rubenstein, D. y Saiman, L. (2003). Extended Spectrum beta-Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. Infections: a Review of the Literature. J. Perinatol. 23: 439–443.

Haeggman, S., Lofdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J. y Brisse, S. (2004). Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Ch. 48(7): 2400–2408.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Hall, R.M. y Vockler, C. (1987). The region of the IncN plasmid R46 coding for resistance to beta-lactam antibiotics, streptomycin/spectinomycin and sulphonamides is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmids and in Tn21-like transposons. Nucleic. Acids. Res. 15 (18): 7491-7501.

Izquierdo, L. (2003). "Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella Pneumoniae*". Tesis doctoral para optar al título de Doctor en Biología. Universidad de Barcelona, España.

Jeziorowski, A. y Gordon, M. (2007). Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 189(19): 7045-52.

Jones, R. N. (2001). Resistance patterns among nosocomial pathogens: Trends over the past few years. Chest. 119(2): 397S–404S.

Kizirgil, A., Demirdag, K., Orden, M., Bulut, Y., Yakupogullari, Y. y Toraman, Z. (2005). In vitro activity of three different antimicrobial agents against ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* blood isolates. Microbiol Res. 160: 135-140.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M. y Schreckenberger, P. C. (2004) "Diagnostico microbiológico". Quinta edición. Buenos Aires Argentina. Editorial Médica Panamericana S.A.

Lahey Clinic foundation. A teaching hospital of Tufts University School of Medicine, Boston Estados Unidos. Base de datos disponible en <http://www.lahey.org/>

Lartigue, M. F., Poirel, L. y Nordmann, P. (2004). Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. FEMS Microbiol. Letters. 234: 201-07.

Levesque, C., Piché L., Larose, C. y Roy, P. (1995). PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. Antimicrob Agents Chemother 39 (1): 185-191.

López, J. y Echeverri, L. (2010). *K. pneumoniae*: ¿la nueva "superbacteria"? patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. Iatreia 23 (2): 157-165.

Ma, L., Chang, F. Y., Fung, C. P., Chen, T. L., Lin, J. C., Lu, P. L., Huang, L. Y., Chang, J. C. y Siu, L. K. (2005). Variety of TEM-, SHV-, and CTX-M-type beta-lactamases present in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. Microb. Drug Resist. 11(1): 31-9.

Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. Nat. Ver. Microbiol. 4(8): 608-20.

Meurer, B., Lemos, M., Dias, A., Silvana, M. y Clayton, R. (2010). *Klebsiella*. Molecular Detection of Foodborne Pathogens, CRC Press, Taylor & Francis Group, capítulo 28: 391-403.

Millán, B., Castro, D., Araque, M., Ghiglione, B., Gutkind, G. (2013). ISCR1 asociado con genes blaCTX-M-1 y blaCTX-M-2 en plásmidos IncN e IncFIIA aislados en *Klebsiella pneumoniae* de origen hospitalario en Mérida, Venezuela. Biomédica 33: 268-275.

Millán, B., Ghiglione, B., Díaz, T., Gutkind, G. y Araque, M. (2011). CTXM- 14 β -lactamase-producing *Citrobacter freundii* isolated in Venezuela. Ann Clin Microb Antimicrob.10: 22.

Morosini, M., García-Castillo, M., Coque, T., Valverde, A., Novais, A., Loza, E., Baquero, F. y Cantón, R. (2006). Antibiotic coreistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2695–2699.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Base de datos disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Navarro, F., y Miró, E. (2007) "Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión". Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 25 (2): 11-7.

Paterson, D.L. y Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 18 (4): 657-686.

Sabaté, M., Tarrago, R., Navarro, F., Miró, E., Verges, C., Barbe, J. y Prats, G. (2000). Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime hydrolyzing β -lactamase (CTXM-9) from *Escherichia coli* in Spain. Antimicrob. Agents Chemother 44:1970-1973.

Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.

Saladin, M., Cao V.T., Lambert, T., Donay, J.L., Herrmann, J.L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A. y Arlet, G. (2002). Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. FEMS Microbiol. Lett. 209: 161–168.

Sambrook, J., Fritsch, F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sherburne, C., Lawley, T., Gilmour, M., Blattner, F., Burland, V., Grotbeck, E., Rose, D. y Taylor, D. (2000). The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. Nucleic Acids Res. 28(10): 2177-86.

Su, Z., Dai, X., Chen, J., Kong, F., Wang, H., Li, Y., Peng, S., Wang, S., Shao, Q., Lv, L. y Xu, H. (2008). The blaCTX-M-1 gene located in a novel complex class I integron bearing an ISCR1 element in *Escherichia coli* isolates from Zhenjiang, China. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 62: 1150–1164.

Sundstroem, L., Radstroem, P., Swedberg, G. y Skoeld, O. (1988). Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of dhfrV and sull and a recombination active locus of Tn21. Mol. Gen. Genet. 213 (2-3): 191-201.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Taylor, D., Gribeel, A., Lawley, T. y Tracz, D. (2004). Antibiotic resistance plasmids. In: *Plasmid Biology*. Funnell BE, Phillips GJ (eds). American Society for Microbiology, Washington D.C.

Torres, L., Benítez, M., Dominguez, M., Torres, O., Gagliotta, V., Calvo, A., Rodriguez, N., Ardila, J. y Pedroza, R. (2005). Detección de integrones clase I en cepas de Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido tipo SHV y CTX-M grupo-2. *VITAE Academia Biomédica Digital* Número 25.

Vignoli, R., Cordeiro, N., Seija, V., Schelotto, F., Radice, M., Ayala, J., Power, P. y Gutkind, G. (2006). Entorno genético de CTX-M-2 en aislamientos de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes hospitalizados en Uruguay. *Revista Argentina de Microbiología* 38: 84-88.

Weissensteiner, T., Griffin, H.G y Griffin, A. (2004). *PCR Technology: Current Innovations*, Second Edition. CRC Press LLC. United States of America.

Zuckerkandl, E. y Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*. 8: 357-366.