

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y**

**Microbiología Médica**



**Entorno Genético de  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido en**

**Enterobacterias**

**TESIS DOCTORAL**

**Marta Fernández Vázquez**

**2010**

## **INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN**

### **REVISIÓN**

#### **INTRODUCCIÓN**

#### **PRIMERA PARTE: INTERCAMBIO GENÉTICO INTERCELULAR POR CONJUGACIÓN: PLÁSMIDOS DE RESISTENCIA Y TRANSPOSONES CONJUGATIVOS.**

1. DEFINICION DE PLASMIDO
2. REPLICACIÓN PLASMÍDICA
  - 2.1. TIPOS DE REPLICACIÓN PLASMÍDICA
    - 2.1.1. Replicación theta
    - 2.1.2. Replicación por desplazamiento de hebras
    - 2.1.3. Replicación *Rolling Circle*
  - 2.2. FUNCIONES DE LA REGIÓN *ori*
    - 2.2.1. Rango de hospedadores
    - 2.2.2. Regulación de la replicación: Control del número de copias de un plásmido.
      - a. ARN antisentido: ColE1, R1 y pT181.
      - b. ARN antisentido y una proteína (represores transcripcionales): pMV158 y pIP501.
      - c. Plásmidos controlados por *iterons*: pSC101, F, P1, R6K y RK22-RP4.
3. SISTEMAS DE PARTICIÓN
4. INCOMPATIBILIDAD PLASMÍDICA
  - 4.1. INCOMPATIBILIDAD DEBIDA A SISTEMAS DE PARTICIÓN
  - 4.2. INCOMPATIBILIDAD DEBIDA AL CONTROL DE LA REPLICACIÓN
5. CONJUGACIÓN
6. CLASIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS
7. ICES: TRANSPOSONES CONJUGATIVOS

#### **SEGUNDA PARTE: PROCESOS DE RECOMBINACIÓN: TRANSPOSONES DE RESISTENCIA, INTEGRONES Y GENES MOVILIZADOS POR ISCR.**

8. RECOMBINACIÓN-NO HOMÓLOGA: PROCESOS DE RECOMBINACIÓN
  - 8.1. ESTRUCTURA DE UN TRANSPOSÓN
  - 8.2. TIPOS DE TRANSPOSONES BACTERIANOS EN FUNCIÓN DE SU ESTRUCTURA GENÉTICA
    - 8.2.1. Secuencias de Inserción: IS
    - 8.2.2. Transposones compuestos (Clase I): Tn10 y Tn5
    - 8.2.3. Transposones complejos (Clase II): Tn3
  - 8.3. TIPOS DE TRANSPOSONES EN FUNCIÓN DE LA TRANSPOSASA
    - 8.3.1. Transposones DDE
    - 8.3.2. Transposones Y2: Transposones *Rolling Circle*
    - 8.3.3. Transposones S e Y.

- 8.4. PROPIEDADES GENERALES DE LOS TRANSPOSONES:
  - 8.4.1. Especificidad de diana
  - 8.4.2. Efectos en los genes adyacentes al punto de inserción
  - 8.4.3. Regulación
  - 8.4.4. Inmunidad para “dianas ocupadas”
9. RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SITIO
  - 9.1. INTEGRONES
    - 9.1.1. Estructura de un integrón de clase 1
    - 9.1.2. ISCR
    - 9.1.3. Superintegrones
  - 9.2. RESOLVASAS
  - 9.3. RECOMBINASAS Y e S

**TERCERA PARTE: REVISIÓN DE ENTORNOS GENÉTICOS DESCRITOS PARA LAS  $\beta$ -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO CTX-M, SHV Y TEM, Y PARA EL GEN DE RESISTENCIA A QUINOLONAS *qnrA*.**

10. ENTORNOS GENÉTICOS DE BLEE TIPO CTX-M
  - 10.1. *ISEcp1*
  - 10.2. *ISCR1*
  - 10.3. DESCRIPCIONES DE ENTORNOS GENÉTICOS DE  $BLA_{CTX-M}$ 
    - 10.3.1. *ISEcp1-Cluster 1*:  $bla_{CTX-M-1}$ ,  $bla_{CTX-M-3}$ ,  $bla_{CTX-M-15}$ ,  $bla_{CTX-M-32}$ .
    - 10.3.2. *ISEcp1-Cluster 9*:  $bla_{CTX-M-9}$ ,  $bla_{CTX-M-14}$ ,  $bla_{CTX-M-16}$ ,  $bla_{CTX-M-19}$ .
11. ENTORNOS GENÉTICOS DE BLEE TIPO SHV
  - 11.1. ENTORNO DE LAS BLEE –SHV DERIVADAS DE  $bla_{SHV-1v1}$ :  $bla_{SHV-5}$  Y  $bla_{SHV-2}$ .
    - 11.1.1. SHV-5
    - 11.1.2. SHV-2
  - 11.2. ENTORNO DE LAS BLEE –SHV DERIVADAS DE  $bla_{SHV-1v2}$ :  $bla_{SHV-2a}$  Y  $bla_{SHV-12}$ .
    - 11.2.1. SHV-2a
    - 11.2.2. SHV-12
12. ENTORNOS GENÉTICOS DE BLEE TIPO TEM
13. ENTORNOS GENÉTICOS DE QNR
  - 13.1. ENTORNOS GENÉTICOS HABITUALES PARA QNR
  - 13.2. ENTORNOS GENÉTICOS NOVEDOSOS PARA QNR
  - 13.3. ENTORNOS GENÉTICOS EN CEPAS DE QNR PORTADORAS DE BLEE

**MATERIAL Y MÉTODOS**

1. SELECCIÓN DE LAS CEPAS
2. EXPERIMENTOS DE CONJUGACIÓN
3. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMIDICO
4. AMPLIFICACION Y ELECTROFORESIS EN GEL

5. OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS
  - 5.1. Grupos de incompatibilidad
  - 5.2. Entornos genéticos de BLEEs
    - 5.2.1. *Primers* BLEE SHV
    - 5.2.2. *Primers* BLEE TEM
    - 5.2.3. *Primers* BLEE CTX-M
  - 5.3. Entornos genéticos de integrones de clase 1
  - 5.4. Entornos de *qnr*
6. DETECCION Y SECUENCIACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS

## **RESULTADOS**

1. **CEPAS PORTADORAS DE UNA ÚNICA BLEE**
  - 1.1. CEPAS PORTADORAS DE BLA<sub>CTX-M-14</sub> O BLA<sub>CTX-M-15</sub>, ASOCIADAS A ISECP1
    - 1.1.1. *E. coli* (cepas nº 32B, 40 y 42) portadores de bla<sub>CTX-M-14</sub> y *E. coli* (cepa nº 54) portador de una bla<sub>CTX-M-15</sub>.
    - 1.1.2. *E. coli* (cepa nº100) portadora de bla<sub>CTX-M-14</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.
    - 1.1.3. *E. coli* (cepa nº 51) portador de una bla<sub>CTX-M-15</sub>.
  - 1.2. CEPAS PORTADORAS DE UNA BLA<sub>SHV-12</sub> MOVILIZADA POR DOS ELEMENTOS TERMINALES IS26.
    - 1.2.1. *E. coli* (cepa nº 48) portador de una bla<sub>SHV-12</sub> y una bla<sub>TEM-1</sub>.
    - 1.2.2. *E. coli* (cepa nº 8) portador de bla<sub>SHV-12</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.
    - 1.2.3. *E. coli* (cepa nº 12) portador de bla<sub>SHV-12</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.
    - 1.2.4. *K. pneumoniae* (cepa nº 29) portadora de bla<sub>SHV-12</sub>.
    - 1.2.5. *K. pneumoniae* (cepa nº 4) portadora de bla<sub>SHV-12</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.
  - 1.3. CEPAS PORTADORAS DE UNA BLA<sub>SHV-12</sub> EN UN TN COMPUESTO IS26 INTERRUMPIDO POR UN TN1721.
    - 1.3.1. *E. coli* (cepa nº 9) portador de una bla<sub>SHV-12</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.
    - 1.3.2. *E. coli* (cepa nº 98) portador de bla<sub>SHV-12</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.
  - 1.4. CEPA PORTADORA DE BLA<sub>CTX-M-9</sub>
    - 1.4.1. *E. coli* (cepa nº 52) portador de bla<sub>CTX-M-9</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.
  - 1.5. CEPAS PORTADORAS DE BLA<sub>SHV-2</sub>
    - 1.5.1. *K. pneumoniae* (cepas nº 78, 79 y 101) portadoras de bla<sub>SHV-2</sub>
  - 1.6. CEPA PORTADORA DE UNA SHV DE NUEVA DESCRIPCIÓN: BLA<sub>SHV-132</sub>
    - 1.6.1. *K. pneumoniae* (cepa nº 102) portadora de bla<sub>SHV-132</sub>
2. **CEPAS PORTADORAS DE DOS BLEES**
  - 2.1. *E. coli* (cepa nº 84) portador de bla<sub>CTX-M-14</sub>, bla<sub>SHV-12</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.
  - 2.2. *E. coli* (cepa nº 32A) portadora de bla<sub>CTX-M-14</sub> y bla<sub>SHV-12</sub>.
  - 2.3. *E. coli* (cepa nº 60) portador de bla<sub>SHV-12</sub> y bla<sub>CTX-M-15</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.
  - 2.4. *E. coli* (cepa nº 99) portador de bla<sub>CTX-M-9</sub>, bla<sub>SHV-5</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.

- 2.5. *K. pneumoniae* (cepa nº 44) portadora de una bla<sub>TEM-4</sub> y una bla<sub>SHV-2</sub>.
- 2.6. *K. oxytoca* (cepa nº 121) portadora de bla<sub>CTX-M 9</sub>, bla<sub>SHV-12</sub> y el gen de resistencia a quinolonas *qnrA1*.

#### **DISCUSIÓN**

#### **CONCLUSIONES**

#### **BIBLIOGRAFIA**

## **INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN**

## INTRODUCCION Y JUSTIFICACIÓN

Desde su descripción en los años 70, los microorganismos productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se han ido convirtiendo, progresivamente, en un problema de primer orden dentro de la patología infecciosa actual. Inicialmente generaron una alarma considerable, al tratarse, al menos desde un punto de vista teórico, de enzimas de 3ª generación y una capacidad de difusión semejante a la que habían tenido las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas clásicas, en especial las de tipo TEM. Posteriormente, su evolución epidemiológica fue sugiriendo que, si bien su capacidad de hidrólisis sobre las cefalosporinas de 3ª generación era real y clínicamente trascendente, su capacidad de difusión por algún motivo, no parecía ser equiparable a la que habían venido mostrando las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas clásicas, pese a su gran similitud estructural.

Sin embargo, esta difusión sí se ha ido produciendo, aunque no de una forma tan explosiva como se temió en un principio. Actualmente numerosos estudios cifran ya los porcentajes de cepas productoras de BLEEs por encima del 5%, sobre todo en algunos géneros y especies de enterobacterias. Además, la irrupción desde hace unos años de microorganismos productores de BLEEs del grupo CTX-M y su expansión, relativamente rápida, ha modificado de manera decisiva sus características epidemiológicas. De ser un tipo de resistencia asociado en sus orígenes a microorganismos hospitalarios y brotes epidémicos, sobre todo en determinadas áreas, la producción de BLEEs ha pasado a ser una situación endémica, en la que cada vez es más frecuente su hallazgo en microorganismos extrahospitalarios, en especial en *Escherichia coli*.

Este comportamiento epidemiológico peculiar está claramente asociado a los elementos genéticos que albergan la información que permite a los organismos producir estas enzimas, y a su forma transmitirse. Los estudios muestran cómo, con gran frecuencia, microorganismos productores de la misma BLEE, e incluso microorganismos productores de los mismos perfiles de BLEEs múltiples, no están en absoluto emparentados desde el punto de vista genético. Ello se debe a que la difusión de la producción de BLEEs no se asocia a la difusión de una o unas cuantas cepas muy próximas genéticamente y portadoras de unas determinadas capacidades de resistencia, sino a la difusión, entre cepas sin relación alguna, de elementos genéticos extremadamente móviles que son capaces de expandir la capacidad de producción de estas enzimas en poblaciones bacterianas no relacionadas.

Estos elementos se han empezado a estudiar recientemente en cepas productoras de BLEEs. Sin embargo, los estudios son incompletos, y además apenas existen estudios de este tipo en aislamientos productores de varias BLEEs, de modo que se ignora si estas enzimas se alojan en los mismos o en distintos elementos móviles, y se transmiten por tanto de forma conjunta o no.

La reciente descripción en nuestro grupo de una frecuencia anormalmente alta de aislamientos productores de BLEEs múltiples, sin ningún tipo de relación genética entre ellos, nos llevó a plantear el presente estudio con los siguientes objetivos:

1. Conocer los elementos genéticos a los que se asocian las BLEEs más frecuentes en nuestro ámbito.
2. Conocer si esos elementos genéticos son los mismos en cepas productoras de BLEEs múltiples, de modo que aparecen en la misma cepa por simple acumulación de elementos móviles, o si por el contrario esta producción se asocia a elementos

genéticos específicos, que vehiculen de manera simultánea los genes codificadores de varias enzimas.

3. Conocer los elementos genéticos que vehiculan estas BLEEs cuando éstas se asocian a otros genes de resistencia con los que se asocian con relativa frecuencia, como los genes *qnr* de resistencia a fluoroquinolonas.

## **REVISIÓN**

*“There is probably no chemotherapeutic drug to which in suitable circumstances the bacteria cannot react by in some way acquiring fastness”* Alexander Fleming, 1946.

Cuando Fleming escribe esto en 1946, habían pasado tan solo 8 años desde el inicio del uso clínico de la penicilina, y tan sólo algunas sustancias más, como el Salvarsán, el Prontosil, la estreptomina y la sulfapiridina, se utilizaban como agentes antibacterianos. En medio de aquel estrecho panorama terapéutico, y con lo que a día de hoy ya podemos intuir, su afirmación cobra si cabe, mucho más valor.

Las bacterias que nos rodean poseen, aparentemente, una capacidad casi ilimitada para evolucionar hacia formas resistentes a las agresiones externas. El mundo actual, sumamente globalizado, facilita el encuentro de diferentes poblaciones bacterianas y la consecuente comunicación entre ellas, dotando a las bacterias de herramientas para poder adaptarse a cualquier ambiente hostil; no en vano llevan habitando el planeta, al menos que sepamos, 3.500 millones de años.

Parte del modo en que las bacterias se “comunican” y adaptan es el objeto de esta revisión. Se desarrollará la forma en que adquieren información y los elementos genéticos móviles que les permiten resistir a lo que para ellas es, una amenaza exterior.

## INTRODUCCIÓN

La **resistencia antibiótica** en las bacterias se divide clásicamente en dos formas diferenciadas: la debida a mecanismos propios del microorganismo, denominada resistencia intrínseca, y las resistencias adquiridas (*Alekshun, 2007*).

Algunos ejemplos claros de **resistencia intrínseca** son las  $\beta$ -lactamasas AmpC de algunos Gram negativos (como genes constitutivos cromosómicos), y otros como por ejemplo, las bombas de expulsión activa de ciertos antimicrobianos. Los mecanismos de **resistencia adquiridos** incluyen tanto mutaciones en genes diana para determinados antimicrobianos, como adquisiciones de determinantes de resistencia vehiculados en bacteriófagos, plásmidos, transposones y otros elementos genéticos móviles. Las mutaciones alteran el ADN pre-existente, pero no añaden nuevos genes completos. La segunda opción, la transferencia genética horizontal, amplía el genoma de la bacteria receptora a partir de otra portadora inicial.

Esta transferencia horizontal de material genético **intercelular**, requiere de alguno de los siguientes procesos de intercambio genético (*Frost, 2005*):

- **Transformación**, donde la bacteria capta ADN libre del entorno. Fue el primer mecanismo descubierto de transferencia horizontal de genes, entre procariontas.
- **Conjugación**, proceso que requiere de un contacto directo célula con célula. Los elementos genéticos móviles que participan en este tipo de transferencia horizontal de genes (plásmidos y transposones conjugativos), poseen capacidad para replicarse de forma autónoma y para codificar las proteínas que promueven su propia transferencia entre diferentes células bacterianas.

- **Transducción**, forma de transferencia de ADN mediada por ciertos virus bacterianos que se replican de forma independiente, llamados bacteriófagos, que captan accidentalmente ADN de una célula al infectarla y se lo inyectan a la siguiente que parasiten, en la que podrá recombinarse con el cromosoma celular y ser así heredado.

Además del intercambio genético **intercelular**, existen también movimientos **intracelulares** de ADN. Esto involucra a algunos otros elementos genéticos móviles que son capaces de cambiar la localización genética de un determinado fragmento de ADN dentro de la misma célula. Se trata de transposones, integrasas y el elemento ISCR (*Bennett, 2008*). La transferencia llevada a cabo por este tipo de elementos, ya sea entre diferentes moléculas de ADN o dentro de la misma, implica necesariamente algún tipo de **proceso de recombinación**, lo cual puede incluir o no replicación posterior. Gracias a estos movimientos recombinatorios, un mismo plásmido puede acumular diversos genes de resistencia sin que ocurra ningún evento replicativo; sin embargo los intercambios **intercelulares** mediados por conjugación implican necesariamente **replicación** del ADN involucrado.

## Primera Parte

### INTERCAMBIO GENÉTICO INTERCELULAR POR CONJUGACIÓN: PLÁSMIDOS DE RESISTENCIA Y TRANSPOSONES CONJUGATIVOS.

#### 1. DEFINICION DE PLASMIDO

Un **plásmido** es una unidad de ADN extracromosómico de tamaño variable (1- >100 kb) que se replica de forma autónoma y autorregulada, y que puede ser movilizado entre diferentes células bacterianas a través de un proceso denominado **conjugación**. A pesar de que los plásmidos codifican los genes necesarios para la iniciación de su replicación, lo cierto es que dependen de factores codificados por la célula hospedadora (ligasas, ADN polimerasas, helicasas...) para llevar a cabo el proceso completo.

Se han hallado tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, así como en levaduras y algún otro tipo de hongo. Pueden alcanzar hasta el 10% del material genético celular total. La mayoría de los plásmidos son moléculas circulares de doble cadena sin extremos libres, esto es, cada nucleótido de cada hebra está unido de forma covalente al siguiente. A este tipo de plásmidos se les ha llamado ADN CCC (del inglés: *Covalently Closed Circular*), aunque también existen plásmidos lineales en diferentes especies bacterianas y fúngicas.

Los plásmidos no son imprescindibles para la supervivencia celular, ya que, a diferencia del cromosoma, no codifican los genes esenciales para las funciones celulares; sin embargo, a menudo codifican genes que permiten a la bacteria portadora adaptarse mejor a condiciones externas adversas o competir en superioridad con otros microorganismos para ocupar un nicho ecológico. Está ampliamente documentada la participación de los plásmidos en el

soporte y movilización de genes de resistencia antibiótica y otros componentes tóxicos, en la mayoría de especies bacterianas de interés médico. Este hecho, sumado a la capacidad de los mismos de transferirse entre diferentes especies bacterianas es de primordial importancia para el entendimiento de la evolución de las poblaciones bacterianas. 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 éstos participan también en la transmisión de la resistencia a agentes antimicrobianos (*Cantón, 2003; Dobrindt, 2001*).

Existen diferentes tipos de plásmidos y cada uno de ellos se caracteriza al menos por dos propiedades constantes:

- el **número de copias** existentes en el interior celular, que puede variar desde una a miles de ellas,
- la **incompatibilidad** entre plásmidos para poder ser heredados en la misma línea celular, lo que ha permitido clasificar a los plásmidos en grupos de incompatibilidad.

Una misma célula bacteriana puede ser portadora de dos o más tipos de plásmidos diferentes, pudiendo estar cada uno de ellos en cantidades totalmente dispares.

## **2. REPLICACION PLASMIDICA**

Para poder existir independientemente del cromosoma, los plásmidos han de poder replicarse de forma autónoma. A los plásmidos con esta capacidad, que son la mayoría, se les ha denominado **replicones**, esto es, estructuras de ácidos nucleicos con capacidad de autorreplicación, al igual que lo son los cromosomas y el ADN de los fagos. Los plásmidos que

no poseen esta capacidad y que se integran de forma reversible en el cromosoma bacteriano para replicarse bajo su control, se les denominan ***episomas***.

El hecho en si de la **autorreplicación** no es suficiente para asegurar la continuidad en la línea celular: los plásmidos han de heredarse de manera estable en la progenie de la célula hospedadora. El conjunto de mecanismos encargados de este proceso se denominan **sistemas de partición plasmídicos**. Estos sistemas son habitualmente codificados por el propio plásmido aunque también requieran de funciones propias de la célula hospedadora (*Actis, 1999*).

El **inicio de la replicación** de un plásmido es un proceso específico, y de vital importancia para su herencia, para el número de copias en el interior celular y para las propiedades de incompatibilidad plasmídica.

## 2.1. TIPOS DE REPLICACIÓN PLASMÍDICA

Hay tres tipos de mecanismos básicos de replicación para los plásmidos circulares (*del Solar, 1998*):

- replicación  $\theta$  (*theta*)
- replicación por desplazamiento de hebras
- replicación *Rolling-Circle* (RC)

Cada tipo de plásmido se replica por uno de estos mecanismos, lo cual viene determinado junto a otras propiedades, por los genes localizados en una región específica y esencial para el plásmido que se encarga del proceso de replicación y su control. Dentro de esta región esencial se agrupan genes y secuencias fundamentales, como son:

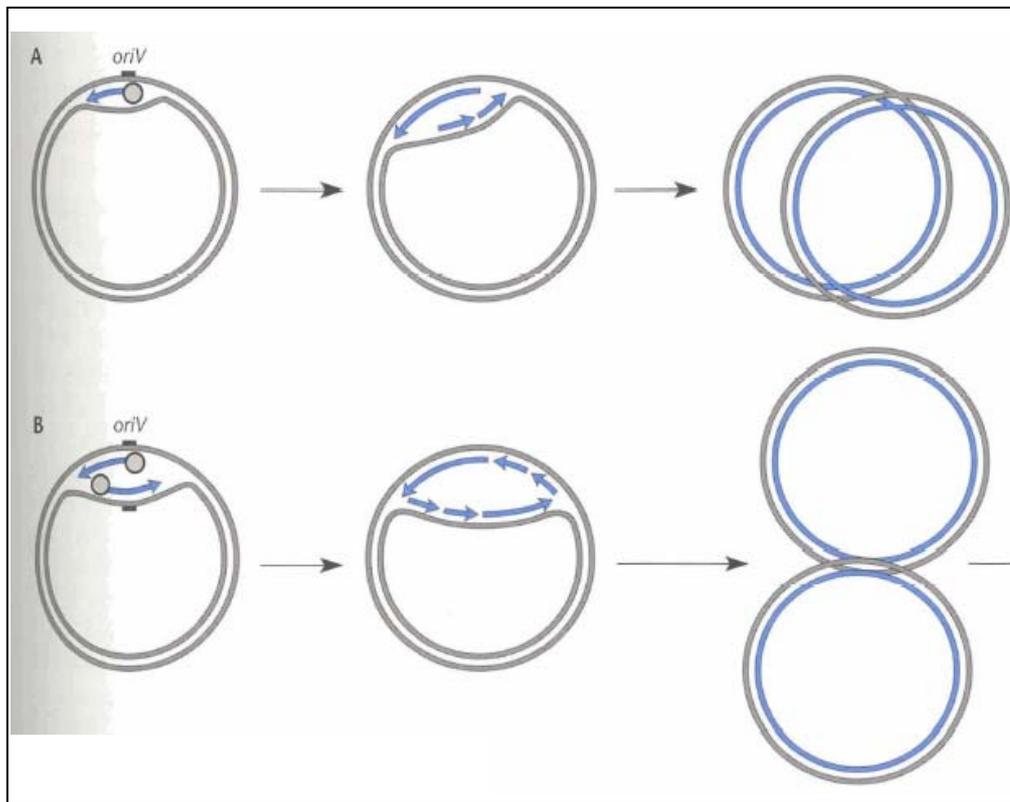
- **el origen de replicación, *ori***, característico de cada replicón. Un plásmido puede poseer más de un *ori* (“plásmidos compuestos multi-replicón”) y funcionar cada origen de manera simultánea e independiente.
- los genes implicados en el necesario **control de la replicación**. Una función relacionada se suma a ésta: el **control del número de copias** de un plásmido por célula.
- adicionalmente, la mayoría de los plásmidos son portadores de un gen que codifica una proteína, denominada **proteína Rep**, que funcionará como *primer* de la replicación del ADN plasmídico. Estas proteínas Rep son específicas del origen de replicación y esto se refleja en la existencia de sitios específicos de unión para ellas en *ori*. Esto es lo que diferencia el proceso de la replicación de plásmidos del proceso en el cromosoma procariota: la iniciación de la replicación plasmídica en bacterias posee especificidad de molécula (*Actis, 1999*). Estas proteínas codificadas por el propio plásmido, no solo cumplen funciones como iniciadores de la replicación, sino que son reguladoras de la frecuencia de dicha iniciación y también de su propia síntesis (*del Solar, 1998*).

### 2.1.1. Replicación *theta*

Este modelo de replicación implica la apertura de ambas hebras parentales en el origen de replicación, la síntesis de una molécula de ARN iniciadora, ARN<sub>p</sub>, y el inicio de la síntesis de ADN por extensión covalente de dicho ARN<sub>p</sub> de manera unidireccional o bidireccional (figura 1).

La síntesis de una hebra es continua mientras que la de la otra es discontinua, pero se trata de una síntesis acoplada, acompañada. En el caso de replications unidireccionales, una única horquilla de replicación se desplaza a lo largo de toda la molécula hasta alcanzar de nuevo el

origen, y después ambas hebras se separan. En replications bidireccionales, dos horquillas de replicación se desplazan en sentido opuesto. Este tipo de replicación puede tener uno o más orígenes simultáneos. Se denomina *theta* por la forma intermedia resultante, que recuerda a la letra griega  $\theta$ .



**Figura 1.** Replicación plasmídica *theta*. Modelo A: unidireccional; modelo B: bidireccional (Snyder, 1997)

Con algunas excepciones, los plásmidos que usan este mecanismo utilizan la **proteína Rep iniciadora** específica. En el origen de replicación están las secuencias específicas para la unión de esta proteína plasmídica y para el resto de proteínas necesarias para la síntesis, codificadas por el hospedador. Se unen en una región adyacente a *ori* rica en A-T que contiene secuencias repetidas. En esa misma región comienza también la apertura de hebras para su replicación. La proteína *Rep* actúa en lugar de o en combinación con **DnaA**, otra proteína iniciadora propia de la replicación cromosómica del hospedador.

En la mayoría de los casos de replicación *theta*, los sitios de unión específicos para las proteínas *Rep* son unas secuencias directas repetidas llamadas ***iterons*** localizadas en *ori*. Estos elementos son esenciales tanto para la replicación como para su control (*del Solar, 2000*). La presencia de *iterons* no está restringida a los plásmidos que se replican por mecanismo *theta*, del mismo modo que tampoco la totalidad de los plásmidos que se replican por este mecanismo poseen *iterons*. De hecho se han localizado también en plásmidos que se replican por cualquiera de los otros dos mecanismos.

Ejemplos de plásmidos con **mecanismo *theta*** y que posean ***iterons*** en su sitio *ori* son:

- RK2/RK4, pCU1 y pSa, que son plásmidos con amplio rango de hospedadores.
- P1, F, pSC101 y R6K, plásmidos de menor rango de hospedadores.

No sólo se pueden encontrar *iterons* dentro de *ori*, también existen en regiones distantes. De los plásmidos citados anteriormente, P1, F, RK2 y R6K poseen *iterons* más allá de la región *ori*. Estas otras secuencias repetidas, no son necesarias para el inicio de la replicación, pero sí lo son para el control de la replicación en estos plásmidos. Los plásmidos que no contienen estos “*iterons* auxiliares”, utilizan los propios del origen de replicación para el proceso de regulación.

Existen también otros plásmidos con mecanismo *theta* **sin *iterons*** en el origen de replicación, como son: R1 (grupo de incompatibilidad IncFII), ColE1 en *E. coli* y pLS20 en *B. subtilis*:

- **Plásmido R1:** El inicio de la replicación en ellos depende de la proteína iniciadora plasmídica, **RepA**. En el delimitado origen de replicación de 188 pb de estos plásmidos, se puede diferenciar: una secuencia de 9 pb para la unión de DnaA, una región adyacente de 100 pb para la unión de RepA y a continuación una región rica en A-T. El estudio de este *ori* reveló que existen dos sitios de unión para RepA: uno preferente, contiguo al de DnaA (sitio-1) y otro, adyacente a la región rica en A-T, de

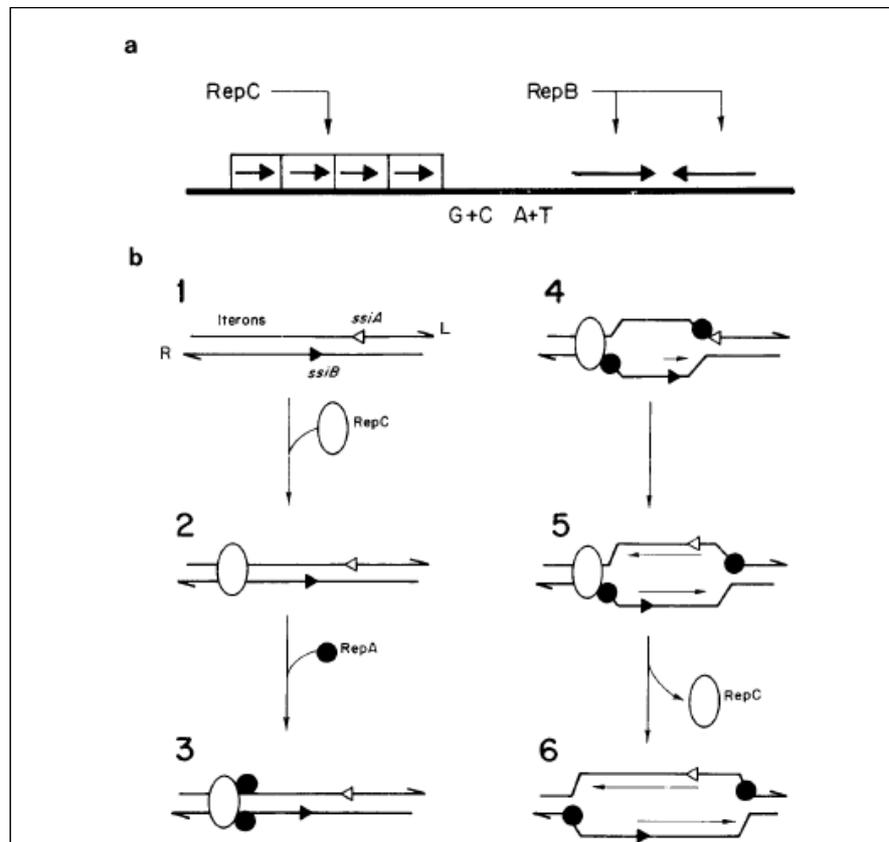
menor afinidad de unión (sitio-2). El funcionamiento de todos estos elementos, forma parte del propio mecanismo de control de la replicación en R1.

- **Plásmido ColE1:** Este plásmido ampliamente conocido habita de forma natural en cepas de *E. coli* que gracias a él, producen una bacteriocina llamada “colicina-1” que las defiende frente a otras cepas de *E. coli*. Es el prototipo de plásmido de pequeño tamaño multicopia que se replica por este tipo de mecanismo. No requiere de ninguna proteína iniciadora codificada por él mismo, y sí de la participación de la **ADN polimerasa-I** del hospedador para el inicio de la replicación. Entre otras secuencias, en su origen de replicación de 1 kb se pueden diferenciar las secuencias que promueven la síntesis de un **ARN II** (el *primer* de la hebra principal), las secuencias que permite una unión estable entre ARN II y el ADN, y las secuencias que permiten el procesamiento de este complejo por una RNasa H, que genera el extremo 3`-OH libre necesario para que la ADNpol I comience la síntesis de la hebra principal.
- Un último ejemplo de plásmidos sin *iterons* es el plásmido de *Bacillus subtilis* **PLS20**, que no requiere de ninguna proteína propia ni de la ADN polimerasa-I (Meijer, 1995).

### 2.1.2. Replicación por desplazamiento de hebras

El ejemplo mejor conocido es el de los promiscuos plásmidos de la familia IncQ, y el caso mejor descrito es el plásmido **RSF1010** de *E. coli*. Los miembros de esta familia requieren de tres proteínas específicas codificadas por el plásmido para el inicio de la replicación (figura 2): **RepA**, con actividad helicasa, **RepB**, primasa que se une en un par de pequeñas secuencias, una por hebra, formando un palíndromo dentro de la región *ori*, y **RepC**, proteína con actividad de iniciador que se une a los *iterons* específicos en *ori*. La replicación se inicia en dos orígenes

adyacentes y simétricos posicionados cada uno en una hebra de ADN del plásmido: *ssiA* y *ssiB*, donde se une RepB.



**Figura 2.** Replicación por desplazamiento de hebras. a) Esquema del origen de replicación. RepB (primasa) interactúa con secuencias repetidas invertidas (flechas opuestas) y RepC en *iterons*. b) La replicación ocurre desde dos orígenes con polaridades opuestas que funcionan de forma independiente. La actividad primasa de RepB no está representada (*del Solar, 1998*)

En una primera etapa, **RepC** se une a los *iterons* de *ori*. **RepA**, lo hace en una región rica en A-T muy próxima al sitio de unión de RepC. Su actividad helicasa implica la separación de las hebras, dejando al descubierto los sitios *ssi*. Éstos se activan precisamente cuando se encuentran en estado monocatenario y posibilita la unión de **RepB**. Gracias a su actividad primasa cataliza la síntesis de ADN y comienza la replicación. La síntesis de cada hebra transcurre de forma continua pero en direcciones opuestas, e implica el desplazamiento de la hebra complementaria. La existencia de estas tres proteínas hace que el inicio de la replicación en RSF1010 sea **independiente de factores de la célula hospedadora**, y es precisamente esta característica lo que hace que este plásmido posea tan **amplio rango** de hospedadores.

### 2.1.3. Replicación RC (*Rolling circle*)

Este es un proceso de replicación unidireccional y asimétrico, ya que la síntesis de ambas hebras está desacompañada. Se conocen hasta cuatro grupos de plásmidos que se replican por este mecanismo. Normalmente se describe el del **plásmido** de *S. aureus* **pT181**, por ser el mejor estudiado. De hecho, es un tipo de replicación clásico entre los plásmidos multicopia de pequeño tamaño en Gram positivos. Actualmente se conocen ejemplos también entre Gram negativos y especies de *Archaea* (Khan, 2000; del Solar, 2000).

En este mecanismo de replicación, una proteína propia del plásmido, **Rep**, corta una de las hebras (la hebra parental principal) en un punto específico denominado "**dso**" (del inglés: *double strand origin*) y se queda unida covalentemente al extremo 5'. Esto genera un extremo 3'-OH libre, que sirve como *primer* para la nueva síntesis de ADN, al formarse un complejo de iniciación junto a la ADN polimerasa III del hospedador, entre otras. Lo característico del caso, es que la nueva hebra principal sintetizada queda unida covalentemente a su idéntica hebra parental principal, quedando ésta al mismo tiempo desplazada (figura 3).

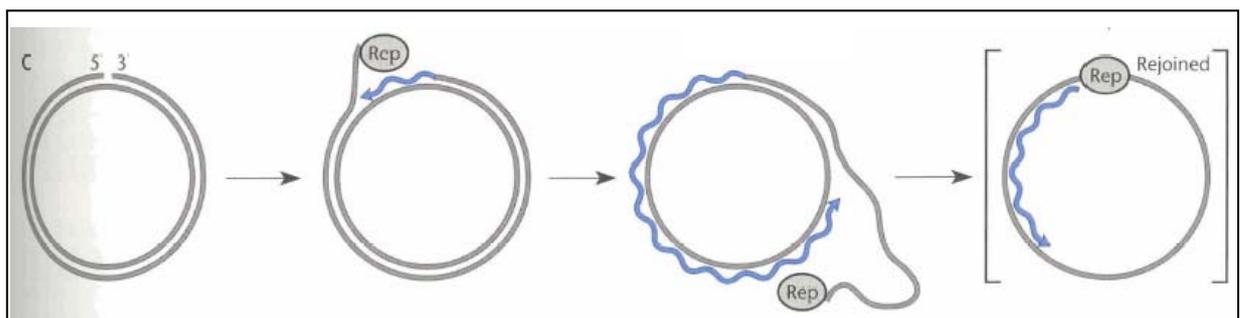


Figura 3. Replicación plasmídica. Modelo C: *Rolling circle* (Snyder, 1997).

El proceso finaliza con la formación de una molécula de doble cadena formada por la nueva hebra sintetizada más la antigua hebra parental no replicada, y una molécula de ADN monocatenario correspondiente a la antigua hebra parental principal, como producto

intermedio del proceso. Esta molécula intermedia sencilla es convertida en ADN de doble cadena por proteínas propias del hospedador que inician el proceso de replicación en un sitio específico de esta hebra parental principal, diferente y distante de *dso*, llamado “*sso*” (del inglés: *single strand origin*). La replicación de esta hebra parental no involucra a ninguna proteína codificada por el propio plásmido. El origen *sso* es una región específica no codificante que tiene capacidad para generar estructuras imperfectas *stem-loop*. Se conocen hasta 4 tipos diferentes *ssoA*, *ssoW*, *ssoT* y *ssoU*. Un mismo plásmido puede acumular varios de ellos, aunque se cree que sólo uno de los mismos es el activo en un evento replicativo para una molécula en particular. Una característica interesante es que los dos primeros, parecen funcionar eficazmente solamente cuando se hallan en sus hospedadores nativos. Sin embargo, los otros dos, pueden lograr una replicación eficaz del plásmido en un rango mayor de hospedadores (*Khan, 2000*).

## 2.2. FUNCIONES DE LA REGION *ori*

### 2.2.1. Rango de hospedadores

El rango de posibles hospedadores de un plásmido es el total de tipos bacterianos diferentes donde éste se puede replicar. Esta característica viene determinada generalmente por la región *ori*. Divide a los plásmidos en dos grandes grupos: aquellos con un amplio rango de posibles células hospedadoras y otros con escaso margen a la hora de replicarse entre diferentes tipos bacterianos.

El prototipo de plásmido con **escasos hospedadores** es **ColE1**. Este plásmido y otros como él, solo pueden replicarse en *E. coli* y otras bacterias relacionadas como *Salmonella* y *Klebsiella* spp. Otros ejemplos son: **F**, **pSC101**, **R6K**. Por el contrario, plásmidos como **RK2**, que confiere

resistencia a ampicilina, tetraciclinas y kanamicina, **RSF1010 (IncQ)**, y plásmidos con mecanismo RC en Gram positivos como **pUB110** y **pC194** en *S. aureus*, poseen un **amplio rango de hospedadores**. Otros plásmidos con esta misma característica son los que pertenecen al grupo IncA/C (Llanes, 1996) e IncP (Zechner, 2004).

Existe una barrera considerable entre Gram positivos y negativos. La mayoría de plásmidos aislados en bacterias Gram negativas no se replican en Gram positivas y viceversa. Los plásmidos de amplio rango necesitan codificar todas las proteínas necesarias para su replicación si no quieren depender del ambiente del hospedador.

### 2.2.2. Regulación de la replicación: Control del número de copias de un plásmido

El **número de copias** de un plásmido es una característica constante en condiciones normales para un hospedador celular en particular. Los plásmidos han de controlar su propia producción para **asegurarse la herencia** tras la división celular, cuidando de que no sea ni insuficiente ni excesiva y por lo tanto contraproducente, ya que supondría un exceso de carga metabólica para el hospedador (del Solar, 2000).

Los sistemas de regulación del número de copias difieren entre los plásmidos caracterizados por poseer un **alto número de copias por célula** de los que se hallan **en bajo número**. Los primeros, como **ColE1**, sólo requieren de un mecanismo que inhiba la iniciación de la replicación plasmídica cuando el número de copias alcanza determinado nivel. Son “plásmidos tolerantes”. El otro grupo, con representantes como el plásmido **F**, deben replicarse sólo una o muy pocas veces por cada ciclo celular. Se les denomina “plásmidos exigentes” (Snyder, 1997).

El control del número de copias está regulado por sistemas codificados por el propio plásmido, que modulan la velocidad de iniciación de la replicación. Dado que la replicación en los plásmidos es auto-catalítica, la estrategia reguladora primaria es la inhibición. El sistema de control de la replicación de un plásmido debe ser capaz de detectar y corregir las fluctuaciones en la cantidad generada. Esto se logra asegurándose una relación inversa entre el número de copias y la velocidad de replicación en cada unidad celular (*Novick, 1987*).

En el control del número de copias de un plásmido se pueden diferenciar dos fases: una inicial, donde para que se produzca un **asentamiento** exitoso del plásmido al introducirse en un nuevo hospedador, éste debe replicarse rápidamente antes de su división celular. Este estado implica una sobreproducción del mismo antes de alcanzar su número de copias predeterminado (N). En la segunda fase, la del **estado estacionario**, el objetivo es mantener N. Para mantener una tasa promedio de replicación, los plásmidos utilizan sistemas propios de autocontrol negativo, que son capaces de detectar y corregir las fluctuaciones por arriba y por abajo que se dan de ese N predeterminado para un tipo de plásmido y una célula determinada.

El control de la replicación a través de inhibidores implica que se pueda controlar de alguna manera la concentración de copias/célula. Esto se logra o bien a través de un inhibidor inestable que se expresa constitutivamente, o por medio de inhibidores estables que se generan poco después de cada inicio de replicación plasmídica. Cuando la frecuencia de inicio está determinada por una proteína iniciadora, un mecanismo válido para regular el proceso es inactivar dicha proteína iniciadora tras cada proceso de replicación. De este hecho va a derivar otra de las propiedades fundamentales de los plásmidos, la **incompatibilidad plasmídica**.

La estrategia utilizada por un plásmido para la regulación de su replicación no se correlacionan con el mecanismo por el cual dicho plásmido inicia su replicación (*del Solar, 1998*).

En función del tipo de elemento regulador negativo, se pueden clasificar en tres los principales **mecanismos que controlan la replicación plasmídica** y por lo tanto el número de copias de un plásmido:

- los que se valen de un **ARN antisentido** que hibridan en una región complementaria de un ARN esencial para el proceso de replicación.
- aquellos que utilizan un **ARN antisentido y una proteína**
- los que usan secuencias directas repetidas (**iterons**) que se emparejan con una proteína Rep iniciadora.

**a. ARN antisentido: ColE1, R1 y pT181**

Todos los plásmidos que se regulan por este sistema, comparten una serie de características comunes: la síntesis de un **ARN esencial** para la replicación (ARNm precursor de Rep, ARNp) y la síntesis de un **ARN antisentido** inhibidor. Los ARN antisentido son moléculas complementarias a una región del extremo 5' del ARN esencial. Estos ARN inhibidores son sintetizados por un **promotor constitutivo** y tienen una corta viabilidad, así que su concentración intracelular es proporcional a N. La inhibición de la replicación viene dada por el emparejamiento entre el ARN esencial y el antisentido, anulando la actividad del primero. Otra característica importante es que en este tipo de sistemas de control, la tasa de síntesis del ARN inhibidor es mucho mayor que la del esencial (*del Solar, 2000*). Se conocen diferentes modelos de regulación por ARN antisentido, dependiendo del modo en el que se desarrolle dicha inhibición. A continuación se detallan tres ejemplos diferentes:

- El primero de ellos está representado por **ColE1**. La regulación ocurre al inhibirse el procesamiento necesario para la generación de lo que va a ser el *primer* esencial para la replicación. Como se detallaba anteriormente, para que ColE1 inicie su replicación, un gen de la región *ori* ha de expresarse y resultar en un ARN-II, que se unirá al ADN de la hebra parental. Una vez unidos, la RNasa H del hospedador genera un extremo

3'-OH libre que es lo que hace las funciones de *primer* para iniciar la síntesis de ADN. Este hecho ocurre durante cierto tiempo, de modo que la célula va acumulando varias copias de ColE1. Mientras tanto, la célula va acumulando otro producto, un "ARN antisentido" de 108 nucleótidos, que va a funcionar como regulador negativo. Se le denomina **ARN-I** y se produce a partir de la cadena opuesta a la que expresa el ARN-II. Por lo tanto, ARN-I y ARN-II son complementarios. Cuando ARN-I alcanza cierto nivel, hibrida con ARN-II, formándose un ARN de cadena doble, de modo que ya no puede unirse al ADN parental. Al no existir el complejo ARN-II/ADN, la RNasa-H no puede actuar y suministrar ese extremo 3' libre. Como se ha dicho previamente, ARN-I es sintetizado por un promotor **constitutivo** y es **inestable**.

- Otro caso es el del plásmido **R1**, donde el control tiene lugar al impedirse la traducción del gen *repA*, inhibiendo para ello la síntesis de una primera proteína precursora. El plásmido R1 es el representante de la familia IncFII. Este plásmido codifica una proteína iniciadora de replicación llamada **RepA**. El control de su síntesis y por tanto de la replicación del plásmido, está modulado por dos genes: ***copA*** y ***copB***. El primero de ellos es considerado el elemento regulador principal, y el segundo, el auxiliar. El producto de *copA* inhibe la expresión de *repA* a nivel post-transcripcional, y el de *copB* a nivel transcripcional.

El gen *repA* puede ser transcrito por dos promotores:  **$p_{copB}$**  y  **$p_{repA}$** . El  $p_{copB}$  transcribe tanto *repA* como su propio gen *copB*, generando un ARNm que se traducirá respectivamente en las proteínas RepA y CopB. El segundo promotor,  $p_{repA}$ , se halla dentro del gen *repA*, y genera un ARN que sólo codifica RepA y es inhibido a vez por la presencia de la proteína CopB. Por esta razón, sólo funciona cuando ésta aún no se ha generado, es decir, inmediatamente después de que el plásmido entre en la célula.

La actividad de  $p_{repA}$  provoca que el plásmido se replique hasta que alcanza su número de copias. A partir de ese momento CopB inhibe a  $p_{repA}$  y el gen *repA* es transcrito solamente por  $p_{copB}$ . Una vez alcanzado el número de copias, la regulación pasa a cargo del elemento principal, **CopA**. Es un ARN inestable, cuyo gen (*copA*), que es transcrito por un promotor constitutivo, se halla en la hebra opuesta a *repA* en su región inicial. El producto generado es por tanto complementario al transcrito de dicha región inicial de *repA*, a la que se denomina **tap**. Dada esta complementariedad, los productos CopA y CopT (*tap*) hibridan formando un ARN de doble cadena, e inhiben la síntesis de RepA al impedir la traducción de este gen *tap* que codifica una proteína iniciadora, necesaria para la traducción del propio RepA. El complejo CopA-CopT es hidrolizado por una RNasa III, y esto inutiliza el ARNm CopT y paraliza la síntesis proteica de RepA. La regulación de la replicación en R1 depende de la concentración de CopA y ésta de la concentración del plásmido en la célula.

- Por último, el plásmido **pT181** posee un mecanismo especial de control, donde la síntesis de la proteína iniciadora Rep está limitada por dos ARN antisentido que son complementarios al extremo 5' del ARNm de *rep*. Este hecho implica una prematura atenuación transcripcional del ARNm de *rep* (Brantl, 2000).

#### **b. ARN antisentido y una proteína (represores transcripcionales)**

En este modelo, ambos elementos, actuando en diferentes dianas pero con idéntica importancia, pueden corregir N en el estado estacionario. Dos familias de plásmidos representan este sistema: **pMV158** y **pip501**. Al contrario que los sistemas de regulación que emplean únicamente un ARN antisentido como inhibidor, el promotor que dirige la expresión del gen *rep* esencial en estos plásmidos **no es constitutivo** pero sí está regulado por una proteína Cop.

El modelo detallado anteriormente para el plásmido **R1**, entraría dentro de una categoría intermedia, ya que controla N codificando una proteína como elemento inhibidor secundario o auxiliar, CopB. CopA es el elemento regulador principal, inhibiendo la traducción de *tap* e indirectamente la de *repA*. La expresión del gen esencial *repA* requiere de la traducción de *tap*. CopB es el represor transcripcional del  $p_{repA}$ . En el estado estacionario, CopB se encuentra en concentración de saturación, bloqueando  $p_{repA}$  y permitiendo que sólo  $p_{copB}$  funcione.

Otra diferencia fundamental con los sistemas que emplean únicamente un ARN antisentido como inhibidor es que, en éstos, la tasa de síntesis del ARN esencial por copia de plásmido necesaria para la replicación es constante aunque mucho menor que la del ARN antisentido. Y en el sistema de control que nos ocupa, la expresión del gen *rep* es dirigida por un promotor regulado por Cop, de tal forma que, cuando esta proteína no está operativa, hay una alta tasa de transcripción de *rep*. Esto representa una ventaja para los plásmidos regulados por este segundo sistema durante el estado inicial, ya que pueden replicarse rápidamente disminuyendo la cantidad de células libres del plásmido en bacterias recién colonizadas. El plásmido pMV158 se moviliza con facilidad y de hecho posee un amplio rango de hospedadores.

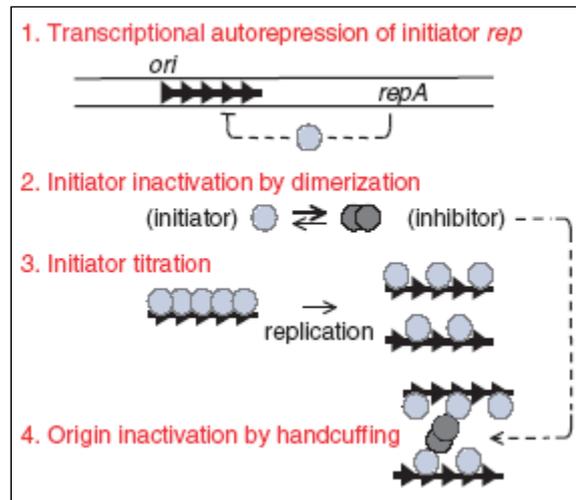
**c. Plásmidos controlados por *Iterons*: pSC101, F, P1, R6K y RK2-RP4**

Los plásmidos controlados por *iterons* utilizan una proteína propia para iniciar su replicación: Rep. La región *ori* de estos plásmidos contiene varias **repeticiones** de una serie de **secuencias directas** llamadas ***iterons***. Poseen característicamente de 17 a 22 pb y hay entre tres y siete copias por región (*Snyder, 1997*). Los *iterons* de un mismo plásmido muestran un alto grado de conservación de secuencia entre ellos. Son característicos de cada plásmido y son sitio de unión específico para estas proteínas iniciadoras. Suelen existir copias adicionales de los *iterons* a cierta distancia de *ori* (*Chattoraj, 2000*).

La saturación de los *iterons* de *ori* con la proteína iniciadora permite el inicio de la replicación. Algunos plásmidos (**P1**, **F** y **RK2**) poseen un segundo grupo de *iterons* fuera de la región *ori*, probablemente para un control más estricto de su replicación, ya que todos ellos son plásmidos de bajo número de copias. El hecho de que la delección *in vitro* de estos otros *iterons* provocaba un aumento en el número de copias, ha llevado al postulado actual de que los *iterons* son también inhibidores de la replicación (Paulsson, 2006).

Cuatro mecanismos basados en *iterons* pueden limitar la iniciación en plásmidos, pero antes, es preciso detallar una característica de la proteína iniciadora **RepA**: la capacidad de ésta de estar presente en forma de monómero y/o en forma de dímero. Los **monómeros** de RepA son los que pueden unirse específicamente a los *iterons* y servir así de iniciadores de la replicación. Los **dímeros** no pueden, pero sin embargo sí se unen a otras secuencias de ADN próximas a *repA*, que son **secuencias inversas repetidas (IR)**, funcionando como reguladores del gen *rep* (Chattoraj, 2000).

De los cuatro mecanismos (figura 4) que se detallan a continuación, los tres primeros hacen referencia a una **limitación** para el **iniciador** (RepA) y solo el último implica **inactivación del origen**. Éste está considerado como el verdadero motor de la regulación y los otros tres de importancia menor (Paulsson, 2006).



**Figura 4.** Mecanismos de control del inicio de la replicación en plásmidos basados en *iterons*. El segmento de flechas continuas representa los *iterons*. Los círculos, RepA en monómero y dímeros (Paulsson, 2006).

- **(1) Autorregulación transcripcional:** se reduce la síntesis de iniciador RepA. La unión de los monómeros a los *iterons* de *ori* tiene un doble papel de iniciación y autorrepresión. Se trata de un mecanismo de homeostasis ampliamente conocido en la naturaleza, por el cual es posible mantener los niveles de un producto genético dentro de unos márgenes estrechos. La unión de la proteína (como dímero) a su región promotora (IR) bloquea la transcripción del propio gen. Un importante incremento en el número de copias de plásmido, sólo implica un muy pequeño aumento en la concentración de iniciador. Así la concentración de RepA se mantiene dentro de unos límites y la iniciación de la replicación está estrictamente regulada. Pero este mecanismo no es suficiente para evitar el exceso de replicación. Para prevenirla, el nivel de iniciador tras un episodio de replicación debe disminuir por debajo del nivel que permitió la replicación en primer lugar.

En **P1** no existen IR y el promotor del iniciador se halla dentro de los propios *iterons* de *ori*, funcionando éstos de IR. Un suplemento externo de *iterons* en una célula hospedadora de plásmidos P1 hace que disminuya el número de copias, pero no si se aporta un extra de proteína iniciadora de forma constitutiva (no autorregulada).

- **(2) Dimerización:** como se ha expuesto, los dímeros no están bien adaptados para unirse a los *iterons* y son por lo tanto inactivos como iniciadores. Sin embargo sí se unen a las IR que son parcialmente homólogas a los *iterons* para inhibir el promotor del iniciador. Es posible que la dimerización de la proteína sea una manera de limitar la disponibilidad de los monómeros como iniciadores, más que un simple mecanismo de autorregulación, y poder retrasar así el inicio de la replicación. Actualmente se sabe que los dímeros participan en el proceso de esposado, actuando como inhibidores directos del proceso de replicación y no como simples coadyuvantes.
  
- **(3) Ajuste de la cantidad de iniciador:** tras una replicación la cantidad de proteína se reajusta distribuyéndose a los *oris* de las copias hijas o incluso a los *iterons* que existen fuera de *ori*, de tal forma que ninguno llegue a estar saturado. Esto debería prevenir la iniciación, ya que se requiere una saturación completa de todos los *iterons* de *ori* para la iniciación.
  
- **(4) Esposado:** los plásmidos se emparejan, uniéndose entre ellos, a través del acoplamiento entre sus *iterons*. La regulación del número de copias está controlada por la concentración de *iterons* disponibles en la célula hospedadora y no sólo por la cantidad de RepA viable. La forma en que se emparejan los plásmidos es la siguiente: una proteína en forma de dímero crea un puente entre dos monómeros unidos a *iterons* de diferentes orígenes, de tal forma que se crea una estructura tetramérica monómero – dímero – monómero. A **altas concentraciones de plásmido**, la presencia de dímeros hace más probable la inactivación de la replicación por este mecanismo que el potencial incremento de la iniciación que se podría dar por un pequeño incremento en la cantidad de RepA-monómero. Adicionalmente, el mecanismo de esposado puede colaborar con el de auto-represión, ya que puede reducir el nivel de

proteína iniciadora (monómero) tras una replicación, y generar así un control homeostático sin llegar a generar inactivación de *ori*, ya que las reacciones de esposado se dan con alto número de copias de plásmido. La **ratio dímero/monómero** es el parámetro crítico que decide entre iniciación e inactivación y depende de la cantidad total de proteína, lo cual viene determinado por la autorregulación (Das, 2004).

### 3. SISTEMAS DE PARTICIÓN

La forma de evitar la pérdida del plásmido en la herencia vertical es responsabilidad de los sistemas de partición. Estos sistemas se aseguran de que al menos una copia vaya en cada célula hija por cada ciclo celular. Por el simple hecho de que una célula se divida en dos, no implica que se repartan equitativamente las copias que contenga de un plásmido determinado, sobre todo si se trata de plásmidos de bajo número de copias (F, P1, R1). Si no existiesen mecanismos que lo controlasen habría una alta probabilidad de que células de la progenie se generasen sin esos plásmidos. Dejar al azar la repartición de copias no aseguraría la continuidad. Los sistemas de partición son sistemas activos, funcionalmente muy similares a la mitosis (Gerdes, 2000; Bouet, 2007)

Los sistemas de partición requieren de tres elementos:

- Una serie de secuencias *cis* repetidas, a modo de centrómero, llamadas genéricamente ***parS***
- El gen de una ATPasa: ***parA***
- El gen de la proteína que se une al centrómero: ***parB***

Estas dos últimas proteínas se unen en el sitio *parS* formando un complejo núcleo-proteico. Estos elementos actúan de forma independiente a la región de replicación de su replicón (*ori*). Se conocen dos tipos de ATPasa, y los sistemas de partición se pueden dividir en dos en función de cuál de ellas posean. El primero posee una ATPasa relacionada con la superfamilia de *Walker-box* que entre otros agrupa a los plásmido F y P1. El plásmido R1 pertenece al segundo grupo cuya ATPasa pertenece a la superfamilia *actin/hps70*.

ParB se une al sitio *parS* (figura 5). Este complejo se puede agrandar gracias a la unión no específica de más moléculas ParB al ADN de alrededor. Las ATPasas ParA reconocen su plásmido interactuando específicamente con ParB en el complejo. Ese hecho provoca que ParA forme uniones metaestables que empujan cada copia hacia uno de los polos, quedando situados en regiones celulares concretas. La figura 5 representa el caso más común que es el de plásmidos como F y P1 (Bouet, 2007).

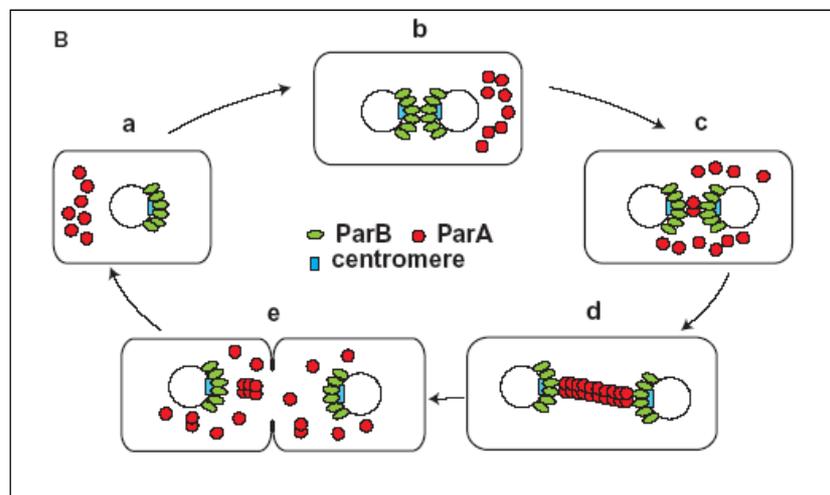


Figura 5: Visión general de la partición plasmídica. (Bouet, 2007)

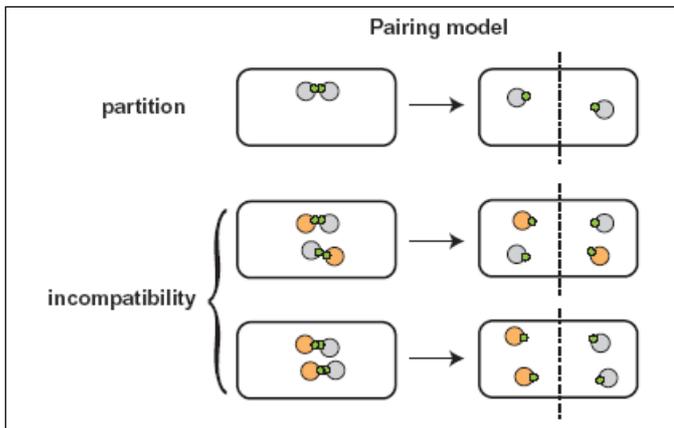
#### 4. INCOMPATIBILIDAD PLASMÍDICA.

Desde el inicio del conocimiento de la existencia de los plásmidos se quiso clasificarlos en base a alguna característica. Los primeros intentos de hacerlo en base al tipo de genes transportados o al hospedador celular no dieron fruto dada la enorme movilidad de los plásmidos y el intercambio genético entre ellos. A principios de los años 1960 se describió una propiedad distintiva de los plásmidos: la incompatibilidad.

La **incompatibilidad plasmídica** se define como el fracaso de dos plásmidos co-residentes para ser heredados de forma estable en ausencia de presión selectiva externa. Esto es, si la introducción de un segundo plásmido desestabiliza la herencia del primero estos dos son incompatibles. Este fenómeno es consecuencia de compartir elementos de herencia plasmídica, como son los **mecanismos de replicación o partición** (Novick, 1987; Actis, 1999), y no a la existencia de genes específicos de incompatibilidad. En relación a estos elementos, los plásmidos han sido agrupados en diferentes grupos de incompatibilidad y ya a finales de los años '80 se creó un sistema para poder tipificarlos y clasificarlos (Couturier, 1988). Sólo plásmidos de diferente grupo de incompatibilidad plasmídica pueden coexistir en la misma célula.

##### 4.1. INCOMPATIBILIDAD DEBIDA A SISTEMAS DE PARTICIÓN

Este tipo de incompatibilidad se basa en el hecho de que, si dos plásmidos co-residentes compartieran el mismo centrómero, la distribución de los plásmidos en la progenie celular llevaría a la pérdida de uno de los plásmidos (figura 6):



**Figura 6:** Visto un proceso de partición normal, la introducción de un plásmido nuevo (en naranja) haría que dependiese del azar que se heredara o no en la progenie celular si comparten el mismo centrómero (Bouet, 2007).

No es el único modelo que intenta explicar el proceso de incompatibilidad, pero sí quizás sea el preferido por la comunidad científica (Funnell, 2005).

#### 4.2. INCOMPATIBILIDAD DEBIDA AL CONTROL REPLICACIÓN

El control de la replicación plasmídica a través de reguladores negativos y la selección aleatoria de los plásmidos para su replicación, hace que dos plásmidos diferentes pero con el mismo mecanismo de regulación de la replicación no puedan coexistir en la misma célula en ausencia de presión selectiva. Los elementos propios del mecanismo de control de la replicación no van a reconocer ambos plásmidos como diferentes. Eso hace que el hecho de que se replicasen o no fuese aleatorio. Si por el contrario, ambos plásmidos poseyeran mecanismos de control diferentes, cada sistema regularía su propio número de copias, heredándose de manera estable.

Los mecanismos de control de la replicación son por tanto los últimos responsables del número de copias y de las propiedades de incompatibilidad de un plásmido determinado.

## 5. CONJUGACIÓN

La **conjugación** permite la transferencia de ADN entre diferentes células, a diferencia de la transformación que es una captación exógena de ADN del entorno. Tanto la conjugación como la **transformación**, implican el transporte de ADN monocatenario a través de una o más membranas. El tercer mecanismo de transferencia intercelular genética, la **transducción** (bacteriófagos), conlleva el pase de moléculas de ADN de doble cadena (*Chen, 2005*).

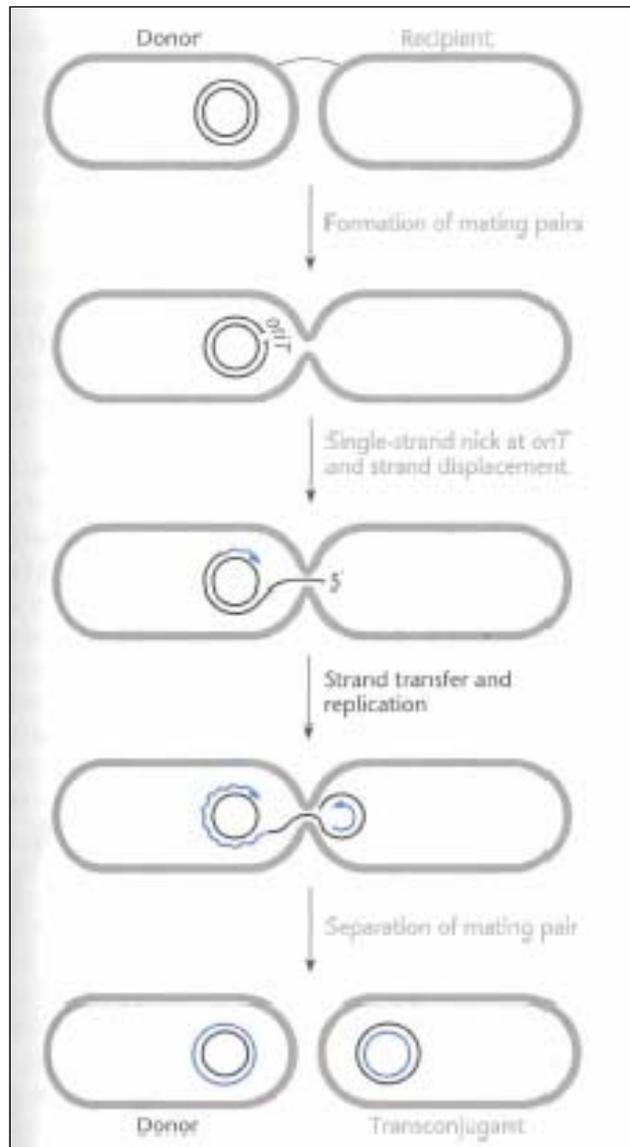
La mayoría de las bacterias y algunas de las especies arqueanas codifican sistemas de conjugación, y existen varias clases de elementos genéticos móviles que utilizan esta vía de propagación, incluyendo los **plásmidos conjugativos**, los **plásmidos movilizables** (*Bennett, 2008*), y una serie de elementos conjugativos recientemente agrupados en una denominación común: **ICEs**, del inglés *Integrative Conjugative Elements* (*Burrus, 2002*), entre los que se encuentran los **transposones conjugativos**.

Durante el proceso de conjugación las dos hebras del plásmido se separan, quedando una de ellas en la célula donadora y la otra en el interior de la célula receptora, o transconjugante. De esta forma ambas hebras sirven de plantilla en cada una de las células para la síntesis de una nueva molécula completa de doble cadena y ambas células siguen siendo portadoras de una copia del plásmido.

Todas las células portadoras de un plásmido auto-transferible (plásmido conjugativo) son células donadoras potenciales. Para poder conjugarse con otras, producen una estructura proteica, llamada *pilus* sexual que facilita el proceso. Pero existen diferentes **sistemas de transferencia** por conjugación en el extenso mundo de los plásmidos bacterianos. Estos sistemas están codificados por los **genes tra**. Estos genes están localizados distantes de la

región *ori*, donde se concentraban los genes implicados en el proceso de partición, replicación y pertinente control y que clasificaban a los plásmidos en diferentes grupos de incompatibilidad. No existe a *priori* ninguna correlación entre los genes *tra* y aquellos que definen a un plásmido. Sin embargo sí se ha podido demostrar una correlación entre estos sistemas de transferencia y los grupos de incompatibilidad. Existe una razón que lo apoya: algunos productos del sistema de transferencia inhiben la entrada de plásmidos con el mismo sistema "*Tra*". Si los genes *tra* no se correlacionasen con los grupos de incompatibilidad, un plásmido podría transferirse a una célula que ya posee uno del mismo grupo de incompatibilidad, y una vez dentro, uno de los plásmidos se perdería en la línea celular. De esta forma, se dice que los plásmidos del tipo F usan el sistema de transferencia conocido como "Sistema Tra de IncF", o que el plásmido RP4 usa el "Sistema de Tra de IncP" (Snyder, 1997).

Uno de los productos de este grupo de genes *tra* es el ***pilus sexual***, formado íntegramente por una proteína llamada pilina. Este apéndice sobresale de la superficie celular y posibilita el empareamiento con otra célula receptora (que no ha de contener el plásmido que se va a transferir) al retraerse hasta juntar por completo ambas células. Es entonces cuando se forma un **poro** entre ambas superficies (figura 7). Esto genera una señal que hace que comience el proceso de transferencia del plásmido. Otro de los productos codificados por el grupo de genes *tra* desarrolla una actividad **endonucleasa** específica, que corta una de las hebras del plásmido objeto, en un sitio determinado, ***oriT***, diferente del origen de replicación (*ori*).



**Figura 7.** Proceso de conjugación. (Snyder, 1997)

Este producto permanece unido al extremo 5' de la hebra y comienza entonces su actividad **helicasa** para desplazar en este sentido a la hebra hacia la célula receptora. Al tiempo que esto ocurre, otros dos procesos dan comienzo: por un lado la replicación de la hebra sencilla parental en la célula donadora, se cree que a partir del extremo 3' libre generado en el *oriT* de la hebra desplazada, en un proceso de replicación similar al mecanismo RC. Por otro lado, la replicación de la hebra transferida al transconjugante. La replicación de esta segunda hebra depende generalmente de una **primasa** codificada y generada previamente en la célula

donadora, cuando aún el plásmido se mantiene como molécula bicatenaria. Esta enzima pasaría junto a la hebra desplazada para comenzar en el receptor una nueva replicación. Los plásmidos codifican sus propias primasas para el proceso de conjugación, con el fin de no tener que depender de que en la célula hospedadora exista una enzima compatible, y poder así ampliar el rango de posibles hospedadores.

## 6. CLASIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

En función de la característica a la que se atiende, los plásmidos pueden clasificarse de diversos modos:

- Según el sistema de replicación y segregación de copias, se pueden clasificar por **grupos de incompatibilidad**.
- Según el fenotipo que codifiquen, hablamos de **plásmidos de resistencia** si portan genes de resistencia a antibióticos y metales pesados (Plásmidos R), **plásmidos bacteriocinogénicos** (ColE1), **plásmidos de virulencia**, como por ejemplo los portadores de la toxina tetánica en *Clostridium tetani* o de la toxina del carbunco en *Bacillus anthracis* y otros muchos más.
- Según sean autotransferibles o no, se pueden clasificar como ya hemos apuntado, en **conjugativos, movilizables** por un plásmido conjugativo y **no movilizables**.

Los **plásmidos conjugativos** son aquellos que promueven la transferencia horizontal de genes de resistencia entre diferentes células por sí mismos, a través de un proceso de conjugación. Poseen todos los genes necesarios en este proceso (sistema *Tra* completo). Los plásmidos conjugativos pueden poseer un rango de hospedadores amplio o estrecho. Cuanto más estrecho, menor número de receptores compatibles. Lo que determina el rango no está del

todo dilucidado, pero podría tener que ver con alguna estructura en la superficie del receptor requerida por la particular maquinaria de conjugación del plásmido (Bennett, 2008). Para algunos de ellos lo que puede determinar esta especificidad de receptor, es la interacción del “sistema de formación de parejas” (generalmente el *pilus* sexual) con los lipopolisacáridos y proteínas de la membrana externa de la superficie de la célula receptora. Si la distribución de los receptores que necesita un donante potencial es limitada, este plásmido tendrá un estrecho margen de expansión. En el otro extremo se sitúan los **plásmidos promiscuos**. Son aquellos capaces de conjugarse con especies muy poco relacionadas. Gracias a esta capacidad pueden movilizarse entre un amplio rango de hospedadores. Los más destacados pertenecen a los grupos de incompatibilidad IncW, IncP e IncN (Snyder, 1997). Este tipo de plásmidos juegan un papel decisivo en la diseminación de poblaciones bacterianas resistentes. Los del grupo IncP que pueden aparearse con superficies celulares de Gram positivos, Gram negativos, levaduras incluso plantas y células animales (Thomas, 2005). La existencia de este tipo de casos, ha tenido y tiene una gran importancia en el proceso evolutivo de las especies. El uso indiscriminado de antibióticos entre animales y humanos hace que se desequilibre la balanza, seleccionando las bacterias portadoras de plásmidos que las hacen sobrevivir frente a la microbiota normal.

Los **plásmidos movilizables** son transmisibles sólo en presencia de funciones conjugativas adicionales, esto es, en presencia de un plásmido conjugativo co-residente. Los plásmidos movilizables carecen de los genes que se requieren para el emparejamiento celular, pero sí de los necesarios para generar las proteínas específicas de movilización y de un sitio *oriT* donde actuarán los productos del sistema *tra* del plásmido conjugativo. A esto se le denomina **sistema *mob***. El sistema *mob* codifica una proteína llamada relaxasa (endonucleasa) que genera un corte en una de las hebras del plásmido al nivel de *oriT*. La relaxasa inicia y termina el procesamiento del ADN conjugativo. Para que se dé la movilización del plásmido es

necesaria la interacción específica de las proteínas de movilización acopladas en *oriT* formando el **relaxoma** con el “sistema de formación de parejas” que desarrolle el plásmido conjugativo (Thomas, 2005). Una vez que una de las hebras ha pasado a la célula transconjugante, ésta se replica finalizando así el proceso.

La región genética *mob* que codifican estos plásmidos, les permite ser más pequeños (generalmente menores a 10kb) que los plásmidos conjugativos, ya que la carga genética del sistema *tra* les hace ser superiores a 30 kb (lo mínimo para llevar las funciones de conjugación son ya 20 a 30 kb). Recientemente se ha propuesto una clasificación de los plásmidos movilizables genéticos en seis familias según la relaxasa del sistema *mob*: MOB-H, -C, -P, -Q, -V y -F (Garcillán-Barcia, 2009).

## 7. ICES: TRANSPOSONES CONJUGATIVOS

La primera referencia a la existencia de transferencia de genes cromosómicos de una bacteria a otra sin la implicación de un plásmido fue hecha en 1981 por Clewell D.B. (Clewell, 1981).

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 (Burrus, 2002). Tn916 proporciona resistencia a tetraciclinas y minociclina, y Tn1545 a mayores a eritromicina y kanamicina.

Los transposones conjugativos son capaces de transferirse desde un cromosoma bacteriano al cromosoma de otra célula diferente. Contienen las recombinasas sitio-específicas que

promueven la escisión y posterior integración cromosómica. No podrán nunca ser 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 (Burrus, 2002).

**Tn916**, al igual que otros elementos conjugativos de bacterias Gram positivas, no codifica *pili* sexuales. Sin embargo, el mecanismo de emparejamiento celular sigue siendo un tanto desconocido. Este elemento codifica una integrasa perteneciente a la familia de las recombinasas sitio-específicas de tirosina (recombinasas Y). El primer paso en la transferencia conjugativa es la escisión catalizada por la integrasa y la escisionasa. Esto conlleva la formación de una molécula circular cerrada resultante de la recombinación de dos sitios de anclaje en los extremos de Tn916: *attL* y *attR*. El segundo paso es la transferencia conjugativa en si misma, que se aproxima mucho a la de los plásmidos conjugativos. Tn916 codifica todas las proteínas necesarias para la formación del poro y mediar su propia transferencia. Un corte sobre el origen de transferencia *oriT*, podría iniciar la transferencia de una de las hebras del intermediario circular. Al terminar dicha transferencia y la posterior replicación, tanto el donante como el receptor contienen una copia de doble cadena del elemento conjugativo. La recombinasa Y de Tn916 se encarga de reintegrar este elemento circular en una gran variedad de sitios del cromosoma, aunque preferentemente ricos en A-T. Este último paso, una integración de baja especificidad, implica una transposición intracelular del elemento que se acaba de conjugar (Burrus, 2002).

Pero no todos los elementos conjugativos son de baja especificidad a la hora de reintegrarse en el cromosoma. Otros transposones conjugativos, como TC<sup>r</sup>ERL y CTnDOT de *Bacteroides*

spp. poseen integrasas de estrecho margen, con solamente entre tres y siete posibles sitios de integración cromosómica.

La existencia de diversos tipos de elementos, los ya conocidos y otros de menor tamaño, que podían ser movilizados gracias a la presencia de grandes transposones conjugativos presentes en la misma célula hospedadora, ha llevado a algunos autores a hablar de forma conjunta de elementos integradores y conjugativos, o **ICEs** (*Churchward, 2008*).

## Segunda Parte

### PROCESOS DE RECOMBINACIÓN:

#### TRANSPOSONES DE RESISTENCIA, INTEGRONES Y GENES MOVILIZADOS POR ISCR.

Cuando un fragmento de ADN se moviliza, pero no intercelularmente a través de procesos de conjugación, transformación o transducción, sino cambiando de ubicación dentro de la misma célula, ya sea en la misma o entre diferentes moléculas de ADN, emplea necesariamente procesos de recombinación para poder reubicarse.

La **recombinación genética** es un proceso de rotura y re-unión de ADN para generar nuevas combinaciones. Este proceso permite, al suministrar una fuente de variación genética importantísima, una evolución y selección bacteriana más rápida y eficaz que la proporcionada por simples mutaciones. Se conocen diferentes tipos de procesos recombinatorios en el interior celular:

- a. El más frecuente, **la recombinación homóloga**. Ocurre entre secuencias del genoma similares o idénticas entre sí, pudiendo emparejarse por complementariedad de bases. Estos sistemas dependen de un equipo enzimático potente, donde la principal proteína implicada es **RecA**. Ejemplo clásico de este mecanismo es el desarrollo de los genes mosaico en *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a penicilina (Bennett, 1999).
- b. El otro tipo conocido, **la recombinación no-homóloga**, incluye dos mecanismos de acción diferentes:
  - la recombinación **específica de sitio** (conservativa o legítima) que es independiente del sistema RecA y requiere de recombinasas específicas de sitio que reconozcan secuencias cortas concretas. Se da en la integración y escisión de profagos y otros

elementos de ADN, en la inversión de secuencias invertibles y en la actividad de **integrinas y resolvasas**.

- la recombinación ocurrida en los **procesos de transposición** (recombinación ilegítima), que es aleatoria y no-específica ya que no requiere de homología entre las secuencias que recombinan. Son ejemplos conocidos las topoisomerasas, los **transposones** y las **secuencias de inserción**. Es una recombinación independiente de RecA, pero dependiente de la actividad de unas enzimas llamadas transposasas que reconocen secuencias invertidas repetidas (**IR**). Este tipo de recombinación puede ser **replicativa** o no, es decir, puede movilizarse dejando una copia en la ubicación original o desaparecer de ésta al transponerse.

## 8. RECOMBINACION NO-HOMÓLOGA: PROCESOS DE TRANSPOSICIÓN

Los **transposones** son elementos genéticos móviles que tienen la habilidad de moverse tanto intra- como inter-molecularmente entre diferentes tipos de secuencias de ADN, esto es: de un plásmido a otro, de un plásmido a un cromosoma y viceversa (*Bennett, 2008*). Al movimiento de un transposón se le denomina transposición, y a la enzima que codifican y promueve dicho proceso, transposasa. Pueden existir en plásmidos, en el cromosoma de un hospedador o integrados en otros transposones, valiéndose siempre de sus regiones terminales para promover su recombinación desde una región a otra de ADN (*Alekshun, 2007*). Los denominados transposones de resistencia lo son por llevar incluidos en el elemento genético al menos un gen de resistencia a antimicrobianos. En esta categoría se incluyen otros elementos genéticos de menos de 2,5 kb pero con la misma capacidad de transposición que los grandes transposones. Son las **secuencias de inserción**.

Los movimientos de transposición no necesitan de homología entre la secuencia del elemento y el sitio de inserción, y aunque hay ejemplos donde un transposón particular sí tiene mayor preferencia por una secuencia de nucleótidos concreta y para un determinado sitio de inserción, la mayoría no denota preferencia y se insertan en sitios nuevos más o menos al azar. Independientemente de la información que puedan transportar, este hecho genera de por sí una mutación insercional, ya que una nueva “pieza” genética (transposones o secuencias de inserción) se integra en una secuencia diana distante de la ubicación original.

El resultado neto de la transposición es la aparición del elemento en una localización diferente a la original, ya sea tras haber sido escindido e insertado, o primero copiado por replicación y después insertado. En todos los diferentes procesos de transposición, una **transposasa** corta la secuencia donadora en los extremos del transposón reconociendo determinadas secuencias IR, y después inserta dicho fragmento en el ADN diana (receptor).

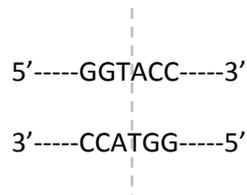
Se conoce de la existencia de transposones en todos los organismos terrestres, incluidos en humanos, aunque son en las bacterias donde alcanzan mayor sentido, ya que su presencia juega un papel fundamental en la supervivencia bacteriana. Los transposones ofrecen un método eficaz de introducir genes en el cromosoma o en plásmidos de una bacteria, a pesar de tener muy poca homología entre ambas secuencias de ADN. Para introducirse en bacterias de géneros poco relacionados aprovechan los procesos de conjugación de plásmidos promiscuos, o los fagos bacterianos (*Snyder, 2007*).

### **8.1. ESTRUCTURA DE UN TRANSPOSÓN**

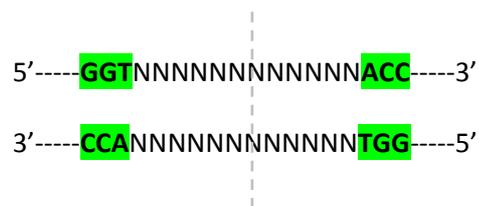
Un **transposón** se define como un segmento de ADN que no codifica sus propias funciones de replicación, pero sí aquellas relacionadas con la capacidad de moverse entre los elementos de

ADN replicativos (plásmidos y cromosomas) sin la ayuda de la maquinaria recombinatoria del hospedador. Es un elemento móvil no replicativo (*Rice, 2000*).

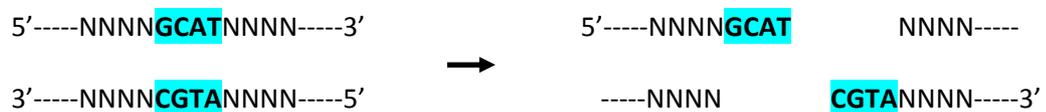
Una característica común en los transposones, exceptuando aquellos denominados transposones *Rolling-Circle* (RC), es que contienen secuencias repetidas en sus extremos denominadas **secuencias repetidas invertidas (IR)**. Son dos secuencias que, siendo una idéntica o prácticamente idéntica a la otra, se encuentran dispuestas en orientación inversa, una en cada hebra, generando un eje de simetría entre ellas:



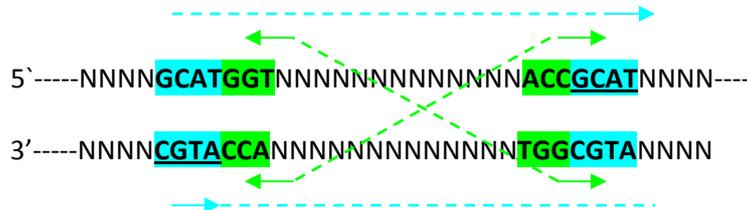
En el caso de los transposones, estas secuencias generadas a cada lado del eje de simetría, no se hallan contiguas, pero aún así siguen formando una repetición invertida. Las IR de los transposones suelen tener varios pb (entre 10 y 30) y no siempre son una copia perfecta entre ellas, basta con que presenten alta homología.



Otra característica común, exceptuando a los transposones RC, es la presencia adicional de **secuencias cortas repetidas directas (DR) en el ADN diana** una vez ha ocurrido el proceso de transposición (sitio diana en azul). Su presencia es consecuencia de la inserción del transposón.



Durante el proceso de transposición, la secuencia de inserción o transposón se inserta en este corte generado en el ADN diana. Una vez ocurrida la transposición, hay un proceso natural de rellenado de “huecos” que deriva en la formación de estas DR al duplicarse en la misma cadena:



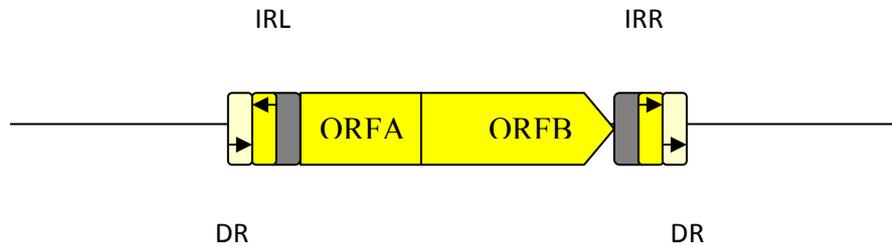
## 8.2. TIPOS DE TRANSPOSONES BACTERIANOS EN FUNCIÓN DE SU ESTRUCTURA GENÉTICA.

### 8.2.1. Secuencias de inserción: IS

Las secuencias de inserción son los transposones bacterianos más pequeños. Fueron descubiertas y estudiadas, no porque transportasen ningún tipo de gen relevante, sino porque las mutaciones insercionales que provocaban implicaban la inactivación del gen en el cual se transponían.

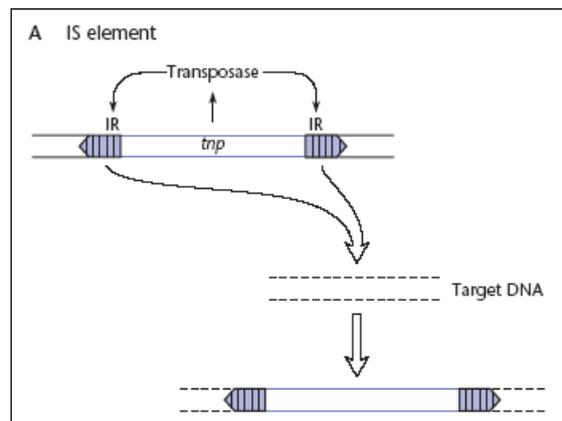
Actualmente se conocen múltiples **familias de IS**. Se denominan con las siglas IS y un número. Las familias son: IS1, IS3, IS4, IS5, IS6, IS21, IS30, IS66, IS91, IS110, IS200/IS605, IS256, IS630, IS982, IS1380, ISAs1 e ISL3. Su estructura es sencilla, ya que codifican poco más que la transposasa que les permite promover su propia transposición e integrarse en multitud de sitios específicos. Esta enzima está codificada por uno o dos marcos de lectura abierta que consumen la práctica totalidad de la longitud del elemento. Como ya se ha apuntado en el apartado anterior, las IS van flanqueadas por unas secuencias repetidas invertidas, IRR e IRL

(*Inverted Repeat Right/Left* respectivamente). Sólo algunas excepciones notables carecen de ellas: son las familias IS91, IS110 e IS200/605 (Mahillon, 1998). La estructura de una secuencia de inserción cualquiera podría ser la representada en la figura 8:



**Figura 8:** Representación esquemática de una IS. En gris se representan zonas de ADN no codificante. ORF: marco de lectura abierta. En amarillo fuerte: IRR y IRL (*Inverted Repeat Right/Left*). En amarillo pálido DR (*Direct Repeat*)

Tras la inserción se generan las DR en el ADN diana, que quedan flanqueando la IS. La longitud de estas DR, de entre 2 y 14 pb, es característica para cada elemento y generalmente siempre se generará una duplicación de longitud determinada, por ejemplo, para IS1 son 9 pb. Las IR tienen una doble funcionalidad: por un lado, proporcionan el sitio exacto para el reconocimiento específico de la transposasa, y por otro son el punto de anclaje en las reacciones de corte y transferencia de cadena que llevan a la transposición del elemento (figura 9).



**Figura 9:** La acción de la transposasa sobre sus extremos terminales IR provoca la transposición de la secuencia de inserción (Snyder, 2007).

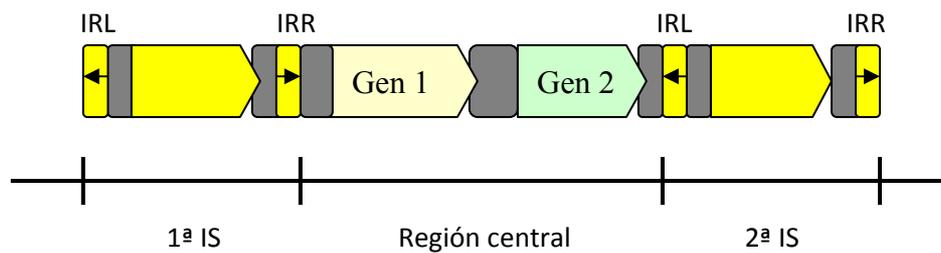
### 8.2.2. Transposones compuestos (Clase I)

Son elementos genéticos móviles formados por una serie central de genes, que por si solos no podrían transponerse, flanqueados por una pareja de IS del mismo tipo formando así un transposón compuesto. Una de las diferencias con una IS, es que aporta al menos una alteración del fenotipo celular por la expresión de dichos genes centrales. En la tabla 1 se enumeran algunos de los transposones compuestos más conocidos, junto a algunas de sus características.

Tabla 1: TRANSPONES COMPUESTOS			
TRANSPOSON	TAMAÑO (kb)	IS TERMINAL	RESISTENCIA
En Gram negativos:			
Tn5	5,7	IS50	Kn, Bl, St
Tn9	2,5	IS1	Cl
Tn10	9,3	IS10	Tt
Tn903	3,1	IS903	Kn
Tn1525	4,4	IS15	Kn
Tn2350	10,4	IS1	Kn
En Gram positivos			
Tn4001	4,7	IS256	Gn, Tb, Kn
Tn4003	3,6	IS257	Tb

**Tabla 1.** Abreviaturas: kb (kilobase), Kn (kanamicina), Bl (bleomicina), St (estreptomycin), Cl (cloranfenicol), Tt (tetraciclina), Gn (gentamicina), Tb (tobramicina) (Bennett 2008).

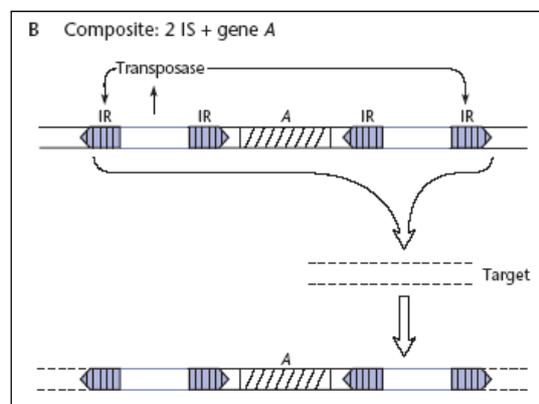
La estructura de un transposón compuesto cualquiera podría ser la detallada en la figura 10:



**Figura 10:** Representación esquemática de un transposón compuesto. En gris, zonas de ADN no codificante, en amarillo fuerte: transposasas, IRR y IRL (*Inverted Repeat Right/Left*), en amarillo pálido DR (*Direct Repeat*).

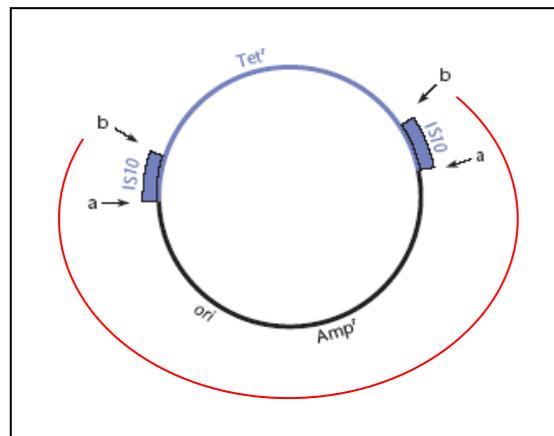
Las IS terminales pueden estar dispuestas en la misma dirección o en direcciones opuestas. Así por ejemplo, de entre los citados, las IS50 de Tn5 y las IS10 de Tn10 están orientadas en direcciones opuestas y las IS1 de Tn9 en la misma dirección.

Cada IS puede transponerse de forma independiente, ya que la transposasa que codifica cada una trabaja sobre las secuencias terminales que forman parte de la propia IS unitaria. Sin embargo, de la misma forma, también puede actuar desde la IRL más próxima a la IRR más distal del elemento compuesto, ya que ambas IS en un transposón de este tipo son idénticas. Si esto ocurre así, los dos elementos IS se transponen en bloque, como una unidad, transportando de paso los genes que formaban la región central (figura 11). Con una sola de las IS que codifique correctamente la transposasa (por ejemplo en casos de mutaciones en la otra) es suficiente para promover la transferencia del transposón completo.



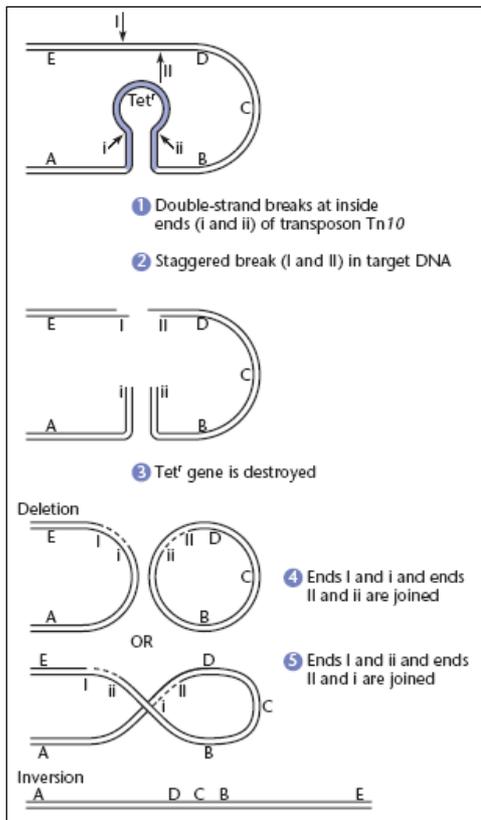
**Figura 11:** la acción de la transposasa sobre los extremos terminales IR más externos de dos IS cercanos del mismo tipo provoca la transposición del elemento completo en su conjunto (Snyder, 2007).

En moléculas circulares, la transposición que se acaba de exponer puede ocurrir en dos posibles direcciones: actuando sobre los **extremos externos** (figura 11), o sobre los **internos** en la dirección contraria (figura 12), provocando la creación de un nuevo transposón, que a su vez incluirá los genes que hayan quedado dentro de lo delimitado por la pareja de IS. En el ejemplo que se muestra, un hipotético Tn10 que transporta el gen *tet* de resistencia a tetraciclinas, se halla en un plásmido con su *ori* y un gen de resistencia a ampicilina no movilizable hasta la llegada de Tn10 y la transposición desde sus extremos internos.



**Figura 12:** la acción de la transposasa: de a-a (azul) sobre los extremos externos, o de b-b (rojo) sobre los extremos terminales IR más internos (Snyder, 2007).

Pero todavía pueden generarse reajustes más complicados. La movilización hacia dianas próximas en la misma molécula de ADN a través de los extremos internos de un transposón compuesto puede llevar a deleciones o inversiones, pudiendo perder así el/los genes de resistencia que originariamente transportase. Una última consecuencia final de esto, es la pérdida de ese factor que le confería resistencia a la molécula de ADN. En la figura 13 se aprecia cómo un hipotético Tn10 tras seccionarse por sus extremos internos (i e ii) por existir muy próximo a él una secuencia de ADN diana (I e II), pierde el gen *tet*. Una vez ocurrido esto, el reajuste puede ocurrir de dos formas: uniéndose I con i, e II con ii, generándose una deleción en la molécula de ADN, o unirse I con ii e II con i, generándose una inversión de la secuencia de ADN original.



En cualquier caso, este proceso lleva a la pérdida del gen de resistencia. Por eso, para evitar este tipo de pérdidas “no deseadas”, algunos transposones compuestos, como Tn5 han desarrollado mecanismos para evitar la transposición vía extremos internos. Tn5 metila las adeninas de los extremos internos para que no sean bien reconocidos por la transposasa.

**Figura 13:** reajustes en el ADN a causa de procesos de transposición por los extremos internos de un Tn compuesto (Snyder, 2007).

En resumen, la existencia de transposones compuestos hace que sean posibles múltiples combinaciones. Siempre que ocurra un proceso de transferencia de un transposón compuesto, los genes situados entre ambas IS van a ser movilizados de una molécula a otra, o dentro de la misma.

EJEMPLO DE MECANISMO DE TRANSPOSICIÓN EN TN COMPUESTOS:

### **Transposición conservativa en Tn10 y Tn5**

Estos transposones se transponen por un mecanismo denominado **transposición conservativa** o “mecanismo de cortar-y-pegar” (Naumann, 2002). En este caso el transposón es eliminado de un sitio e insertado en otra ubicación diferente. La transposasa genera cortes en los extremos del transposón en ambas hebras, y “cortes escalonados” en la secuencia diana del ADN receptor (de la misma forma que la descrita en el apartado de secuencias de inserción). De esta manera, al finalizar el proceso de transposición se generan sendas secuencias duplicadas en los extremos del transposón recién insertado (DR). Posteriormente es también la

transposasa quien se encarga de ligar los extremos 3' libres del ADN donador a los 5' del ADN diana. La ADN polimerasa se encarga de rellenar los huecos en el ADN receptor, generando los extremos duplicados. El resto del ADN donador es destruido (Figura 14). En este mecanismo, ambas hebras del Tn se transponen y éste desaparece de su ubicación original.

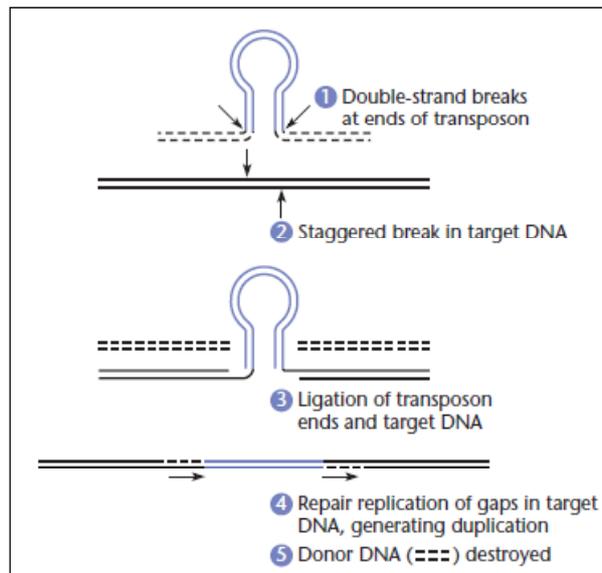


Figura 14: Transposición conservativa (Snyder, 2007)

### 8.2.3. Transposones complejos (Clase II)

Se cree que los anteriores transposones de clase I surgen, por casualidad, a través de múltiples eventos de transposición, estableciéndose de manera estable entre la población bacteriana portadora gracias a las propiedades que confieren y permiten a dicha población sobrevivir a las fuerzas selectivas a las que normalmente se ve afectada. El origen de la generación de esta otra clase II de transposones está mucho menos clara que el propuesto para los de clase I.

Los transposones complejos pueden moverse entre el cromosoma bacteriano y los plásmidos presentes en la bacteria. La estructura genética consta de una transposasa junto a una resolvasa, más los determinantes de resistencia que transporte, todo ello flanqueado por una copia de una IR en cada extremo. La presencia de estas dos enzimas les permite su

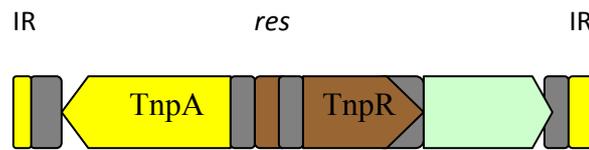
recombinación e integración en el cromosoma bacteriano o en plásmidos (*García-Rodríguez, 2006*).

Hay un grupo de transposones de clase II que pueden transferirse con una estructura circular similar a la de los plásmidos, son los **transposones conjugativos**, sobre los que se ha hablado en el punto 7 de esta revisión. La tabla 2 enumera los ejemplos más relevantes de transposones complejos:

<b>Tabla 2: TRANSPOSONES COMPLEJOS</b>			
<b>TRANSPOSON</b>	<b>TAMAÑO (kb)</b>	<b>IRs TERMINAL (pb)</b>	<b>RESISTENCIA</b>
En Gram negativos:			
Tn1	5	38/38	Am
Tn3	5	38/38	Am
Tn21	20	35/38	St, Sl, Hg
Tn501	8,2	35/38	Hg
Tn1721	11,4	35/38	Tt
Tn3926	7,8	36/38	Hg
En Gram positivos			
Tn551	5,3	35	Er
Tn917	5,3	38	Er

**Tabla 2.** Abreviaturas: kb (kilobase), Am (ampicilina), St (estreptomicina), Sl (sulfonamidas), Tt (tetraciclina), Hg (mercuriales), Er (eritromicina). (*Bennett,2008*)

La estructura de un transposón complejo cualquiera podría ser la detallada en la figura 15:



**Figura 15:** Representación esquemática de un transposón complejo. En gris, zonas de ADN no codificante, en amarillo transposasas e IRR-IRL (*Inverted Repeat Right/Left*), en marrón resolvasa y sitios *res* de recombinación. Adyacente a la resolvasa un gen de resistencia cualquiera transportado por el Tn complejo.

La transposasa **TnpA**, codificada por el gen *tnpA*, es la enzima que promueve la transposición: genera los cortes tanto en el ADN diana como en el transposón y liga determinados extremos de estos cortes para generar un “cointegrado”. Las **IR** terminales son los sitios donde la TnpA actuará para promover la transposición. Cualquier mutación en estos elementos impide que desarrolle el proceso. La resolvasa **TnpR**, codificada por el gen *tnpR*, es una proteína con doble funcionalidad: por un lado actúa como represor de la transcripción de la transposasa (una mutación en este gen que inactivase la proteína implicaría unas tasas superiores de transposición al permitirse una síntesis mayor de la transposasa), y por otro lado, escinde los cointegrados generados a través de un proceso de **recombinación específica de sitio** entre las secuencias *res* de las dos copias del transposón en el cointegrado.

#### EJEMPLO DE MECANISMO DE TRANSPOSICIÓN EN TN COMPLEJOS

##### Transposición replicativa en Tn3

El proceso comienza con cortes escalonados en ambas hebras del ADN receptor, de tal manera que ambos están separados por el mismo número de pb, en este caso 5 pb, que serán los duplicados al final del proceso. La TnpA produce también cortes en ambos extremos del propio Tn3 pero, en una hebra en uno de los extremos, y en la opuesta en el otro.

Como se puede observar en la figura 16, los extremos 3'-OH del Tn3 son los que se ligan con los extremos 5'-PO<sub>4</sub> del ADN diana. Los extremos 3' aun libres del ADN diana actúan como *primers* de la replicación en ambas direcciones sobre el transposón, lo que resulta en la generación del "cointegrado"; una molécula fusionada del ADN diana y el ADN donador, donde concurren dos copias del transposón. Esta molécula intermedia es escindida gracias a la actuación de la resolvasa por recombinación específica de sitio sobre los dos sitios *res* (el primario y el duplicado). Este proceso también podría ser llevado a cabo por los sistemas de recombinación del hospedador. El resultado final es que ambas moléculas de ADN poseen su copia

del transposón. Se trata pues de una **transposición replicativa**.

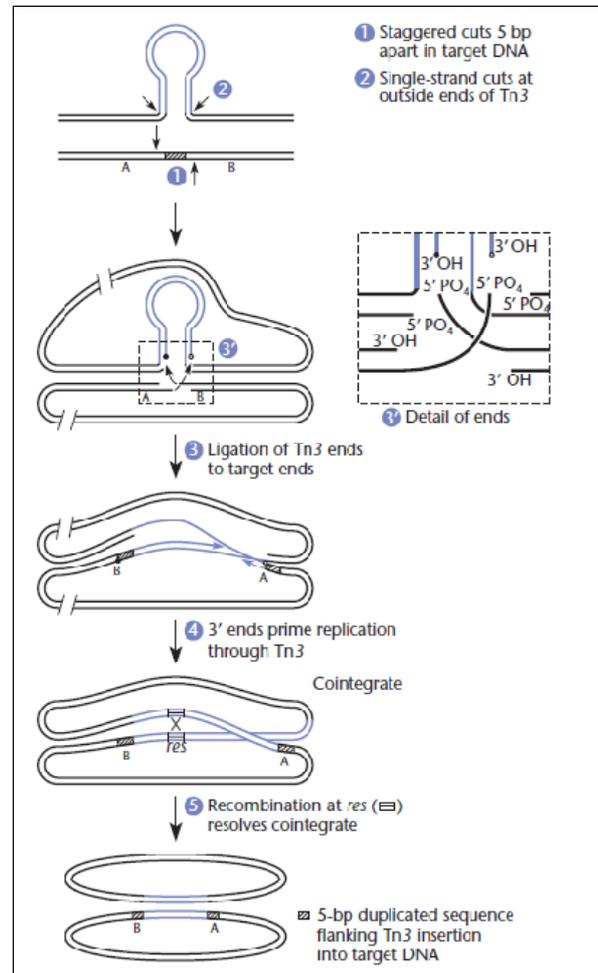


Figura 16: Transposición replicativa para un Tn3 (Snyder, 2007)

Si comparamos el proceso de transposición conservativa (en transposones compuestos) y el replicativo (en transposones complejos) hallamos ciertas **diferencias**:

- en los procesos conservativos, la enzima provoca cortes en ambas hebras de los extremos del transposón, y en los replicativos, solo una de las hebras de cada extremo se ve afectada.
- en la transposición conservativa no se generan cointegrados como intermediarios del proceso.

- en la transposición conservativa ambas hebras del transposón se movilizan. En la replicativa, cada hebra se duplica de tal forma que en realidad al final, ambas moléculas de ADN poseen una hebra "original" y otra replicada.
- en la transposición replicativa, la replicación recae sobre todo el transposón y en la conservativa, solo sobre el pequeño escalón que se generó en el corte del ADN diana y que formará las regiones duplicadas en el ADN receptor.
- la diferencia principal es que en el proceso conservativo no se genera ninguna copia adicional del transposón movilizado, éste simplemente pasa de una ubicación a otra. En el proceso replicativo se genera una copia del mismo por cada proceso de transposición.

y algunas **similitudes**:

- en ambos, el extremo 5' libre del ADN diana se une al 3' libre del transposón
- en ambos, los extremos 3' libres del ADN diana sirven como cebadores de una replicación que prosigue hasta que se encuentra con un extremo libre 5' de ADN donador.

### **8.3 TIPOS DE TRANSPOSONES EN FUNCIÓN DE LA TRANSPOSASA**

#### **8.3.1 Transposones DDE**

Las transposasas de la mayoría de los transposones con mecanismo conservativo, y también las de otras como Tn3, transposón con mecanismo replicativo, poseen una característica común: la presencia de tres aminoácidos esenciales para su actividad: dos ácidos aspártico (D) y un ácido glutámico (E), de ahí la denominación **DDE**. Estos tres aminoácidos no están próximos en el polipéptido, pero sí lo están en el centro activo cuando se genera la proteína. Estas enzimas pertenecen a una antigua superfamilia de proteínas que catalizan reacciones de transferencia de grupos fosforilo (PO<sub>4</sub>) a través de mecanismos basados en la presencia de dos

iones metálicos (*Bischerour, 2009*). Un centro activo tal que éste se puede hallar también en otras conocidas proteínas como la integrasa del VIH y la proteína RAG-1 (generación de anticuerpos en vertebrados) entre otros. Recientemente se ha determinado este centro activo en la transposasa codificada por *IS1* (*Ohta, 2002*). La función de las TnpA de estos transposones es atrapar y mantener dos iones  $Mg^{2+}$  que participan en la fragmentación del enlace fosfodiéster del ADN durante el proceso de transposición.

A pesar de que en esta revisión se han desarrollado los procesos de transposición conservativa y replicativa de forma separada, ya que se dan en tipos de transposones diferentes, en realidad sí están relacionados en cuanto a su mecanismo, ya que pueden compartir el mismo tipo de transposasa DDE.

### **8.3.2 Transposones Y2: Transposones *Rolling-circle* (Tn-RC)**

Las transposasas de este tipo de transposones poseen dos tirosinas esenciales en su centro activo, de ahí la denominación **Y2**. Su representante es **IS91**. En este caso, el mecanismo de transposición no pasa por un intercambio de hebras, como ocurre en los transposones DDE, sino que implica un movimiento RC para integrarse en el ADN diana. En todos los casos donde se da un movimiento genético por RC, la proteína ejecutora tiene una tirosina en su centro activo cuya función es unirse covalentemente al grupo fosfato en el extremo 5' del ADN implicado en el proceso de replicación o transferencia. Ejemplo de este tipo de mecanismo es uno de los tres tipos de replicación en plásmidos.

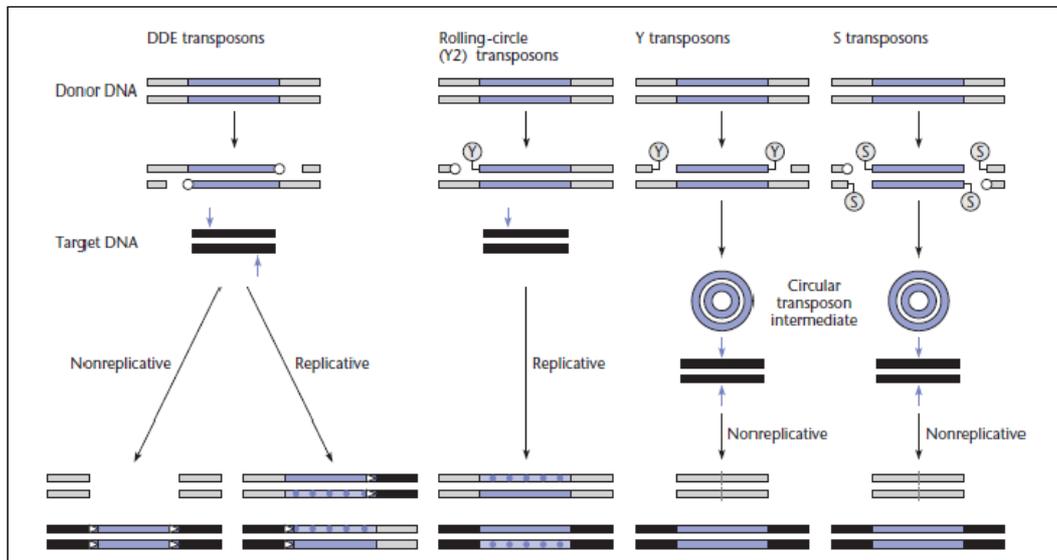
En la estructura genética de este tipo de elementos no existen IR en sus extremos ni tampoco secuencias cortas duplicadas como consecuencia del evento de transposición. En líneas generales, lo que ocurre es que la TnpA corta una de las hebras del ADN adyacente muy cerca

de uno de los extremos (este punto también se ha denominado extremo *ori*, en semejanza al mecanismo de replicación de plásmidos). Tras el corte, la enzima queda unida al grupo fosfato del extremo 5' libre generado gracias a su aminoácido Y. El extremo 3' sirve, como es habitual, como cebador del proceso de replicación sobre el transposón que prosigue. La hebra desplazada, correspondiente al transposón, es la que se incorpora en el ADN diana, y su complementario es sintetizado allí mismo. De esta forma, tanto el ADN receptor como el donador, poseen una hebra recién sintetizada y otra del transposón original.

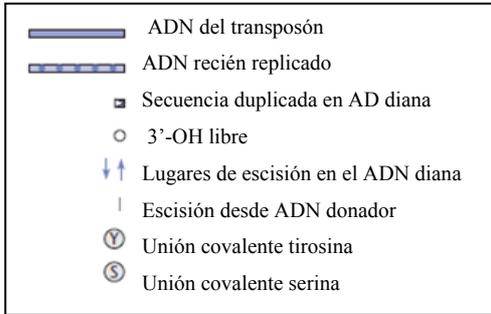
Actualmente se conoce la presencia de este tipo de mecanismo de transposición en otro tipo de elementos portadores de genes de resistencias. El ejemplo más claro está en los integrones compuestos, que se detallarán más adelante, en cuales existe una región común de 2154 pb, **CR** (del inglés *common regions*), a continuación del primer segmento 3'-CS de éstos. Al secuenciar estas CRs en diferentes integrones, se ha visto que guardan similitud entre ellas y que recuerdan a este tipo de transposones atípicos representados por IS91. Estas CR son lo que hoy en día se conoce como **ISCR** (Toleman, 2006).

### 8.3.3 Transposones S e Y.

Existe otra clase de elementos genéticos que se transfieren sin utilizar ni TnpA-DDE ni TnpA-Y2. Según posean en su centro activo una tirosina o una serina, se denominan transposones Y y transposones S. Este tipo de elementos están a medio camino entre integrasas y transposasas. Los transposones Y y S se transponen por un mecanismo de **recombinación no-homóloga específica de sitio**. En la figura 17 se puede observar de forma comparada, los diferentes tipos de transposición en bacterias:



**Figura 17:** Comparación esquemática entre mecanismos de transposición (*Snyder, 2007*)



### 8.4 PROPIEDADES GENERALES DE LOS TRANSPOSONES

La mayoría de los transposones comparten una serie de propiedades comunes aunque difieran entre ellos en su mecanismo de transposición.

#### 8.4.1 Especificidad de diana

La recombinación no-homóloga es el proceso de recombinación que se da entre dos secuencias concretas de ADN, y que ocurre aunque éstas sean completamente diferentes. La transposición de transposones en bacterias sigue este mecanismo, y depende de una enzima

determinada que promueva la recombinación entre estas regiones de ADN, que pueden tener o no secuencias en común.

A pesar de que parece que la transposición de los transposones bacterianos podría ser completamente al azar, ningún elemento transponible se inserta de forma exclusivamente aleatoria en el ADN diana. La mayoría de los elementos poseen cierto grado de especificidad para sus dianas, movilizándose más en unos sitios que en otros. Incluso **Tn5** (Tn compuesto), que parece ser el ejemplo de transposón con más variabilidad en sus destinos, también se decanta por unas localizaciones más que por otras (*Reznikoff, 2003*). **Tn7** (Tn complejo) es el caso opuesto de transposón con alta especificidad de diana. Se transpone con alta frecuencia pero sólo en un sitio concreto del ADN de *E. coli* llamado *attTn7*. Su compleja maquinaria de transposición incluye 5 proteínas. Con todo, esta especificidad no es del todo estricta. Si fuese así, su diseminación se vería seriamente disminuida cuando no existiese este punto concreto de anclaje. Las posibilidades de las que dispone incluyen movilizarse a un plásmido que incluya *attTn7*, y aunque esto suceda no suele ser lo habitual, o transferirse con peor eficiencia pero de forma más aleatoria sobre elementos conjugativos que le puedan llevar a células portadoras a las que sí pueda transponerse de forma específica. Esta segunda vía de transposición está fomentada por una de las cinco proteínas, la TnsE (*Parks, 2009*).

#### **8.4.2 Efectos en los genes adyacentes al punto de inserción**

La expresión de los genes adyacentes al elemento recién insertado puede verse incrementada gracias a promotores del propio transposón. Por ejemplo tanto Tn5 como Tn10 poseen promotores en la parte exterior de sus extremos terminales que pueden iniciar la transcripción de los genes vecinos. Lo mismo puede ocurrir en sentido contrario. Los elementos insertados

poseen muchas veces de señales de STOP que pueden afectar a los genes cercanos, generándose un tipo de inactivación insercional.

#### **8.4.3 Regulación**

Los sistemas que emplean los transposones para su regulación son diversos, pero lo que sí tienen en común es que todos ellos auto-regulan su propia transposición, lo cual hace que estos eventos sean relativamente escasos. Estos elementos genéticos móviles han de encontrar el equilibrio justo que les permita sobrevivir en una población dada. Excesivos eventos de transposición llevarían probablemente a la muerte celular y eso a la pérdida de transmisión del elemento (*Reznikoff, 2003*).

#### **8.4.4 Inmunidad para “dianas ocupadas”**

Aquellas secuencias de ADN próximas a un transposón recién insertado presentan cierto grado de inmunidad a que sobrevenga otra inserción de una copia del mismo. Este grado de protección, aunque varía para el transposón puede llegar hasta las 100,000 pb. Esta propiedad afecta a las familias de transposones Tn3 y Tn7.

## 9. RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SITIO.

La recombinación **no-homóloga específica de sitio**, requiere de la actuación de recombinasas específicas que reconocen secuencias concretas de ADN y promueven la recombinación entre ellas. Estas secuencias pueden poseer cierta similitud, pero es demasiado corta como para considerarse recombinación homóloga. Son ejemplos ya citados: la resolvasa de Tn3 y las recombinasas S e Y. El otro gran grupo de recombinasas específicas de sitio son las **integrasas** pertenecientes a los integrones.

### 9.1. INTEGRONES.

Un **integrón** es un elemento genético que, gracias a la acción de una integrasa, incorpora ADN nuevo en forma de genes casete, por un mecanismo de recombinación específica de sitio en un sitio propio denominado *attI*. Los **genes casete** son pequeñas piezas genéticas que contienen un gen en un marco de lectura abierta (ORF, de las siglas en inglés *Open Reading Frames*) y una secuencia corta adicional de 59 pb (*59-be* o *attC*), que funciona como sitio específico para el proceso de recombinación. No suelen llevar promotor para el gen que codifican y utilizan el del integrón que ocupan para expresarlo. Normalmente suelen tener entre 500 y 1000 pb. Cuando son movilizados de una ubicación a otra, se hallan en forma de moléculas libres circulares no-replicativas (*Bennett, 1999*).

Los integrones fueron descubiertos en la década de los '80 cuando en el estudio molecular de plásmidos y transposones se localizaron genes de resistencia que poseían una estructura común en el lado 5', conteniendo siempre una integrasa y un promotor. Se constató así que estas secuencias formaban parte de una estructura genética conservada que se denominó integrón (*Sabaté, 2002*). Los integrones actúan como sistemas naturales de clonaje y expresión

genética que incorporan ciertos ORFs (genes casete) y los convierten en genes funcionales (Rowe-Magnus, 2001). La forma más sencilla de un integrón se caracteriza por:

- una integrasa (IntI) que es un tirosina-recombinasa
- un sitio específico de recombinación *attI* de 65 pb
- un promotor principal ( $P_{ant}$ ) que promueve la expresión de los genes integrados
- un segundo promotor ( $P_{int}$ ) muy cerca de  $P_{ant}$  en su extremo 3' (no está siempre presente).

Los genes casete son movilizados gracias a que la integrasa reconoce los sitios *attC* en el gen casete y *attI* en su propia secuencia, provocando esto la escisión e integración de dicho gen casete. En la figura 18 se puede ver el proceso de integración de sucesivos genes casete.

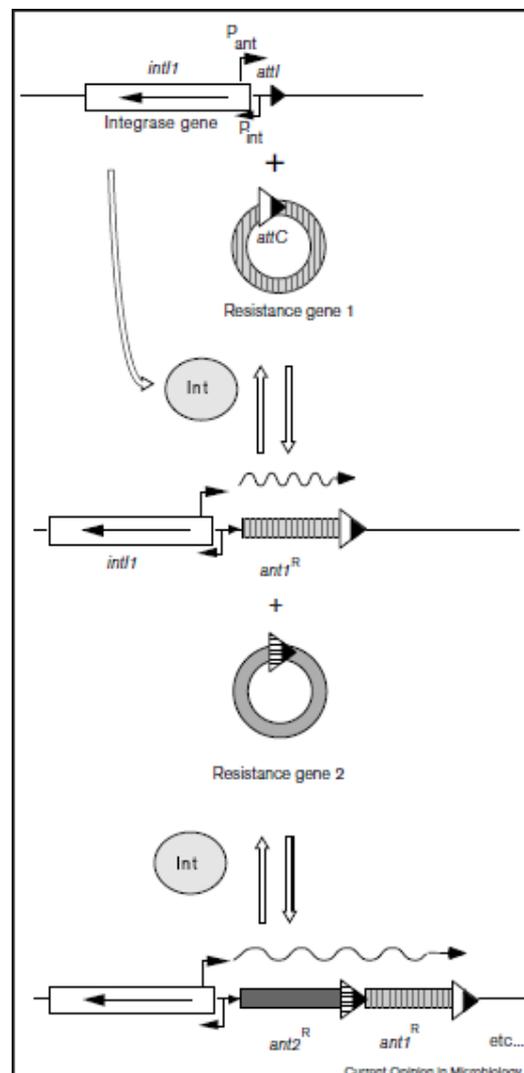
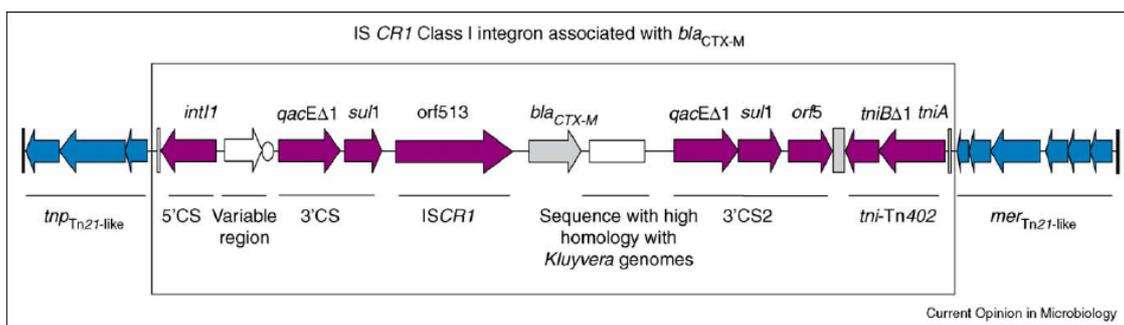


Figura 18: Proceso de integración (Rowe-Magnus, 1999).

Se conocen diferentes **tipos de integrones** y se dividen en base a la secuencia de la integrasa. Se dividen en clases y se conocen hasta 9. Los de las clases 1, 2, y 3 transportan genes de resistencia antibiótica y por ello entran dentro de nuestro interés.

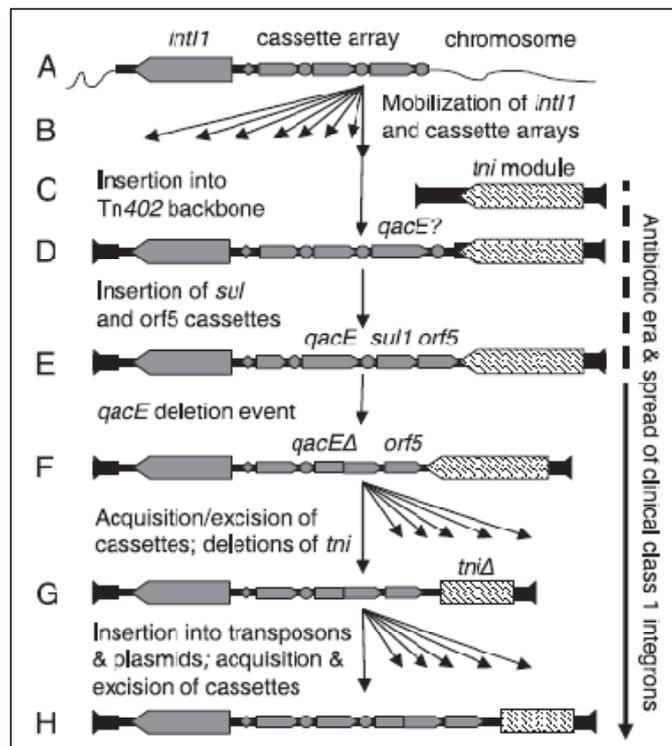
Los **integrones de clase 1** (integrasa *IntI1*) agrupan a la mayoría de integrones conocidos. Son un claro ejemplo de elemento genético común en proteobacterias. Muchos de los integrones de clase 1 hallados en aislados clínicos están vinculados a un módulo de transposición, siendo el mejor ejemplo el transposón **Tn402**, denominado actualmente **Tn5090**. Esta familia de transposones contiene un grupo de 4 genes de transposición, conocidos como “módulo *tni*”, un sitio *res*, y una pareja de IR cerrando la estructura. Los miembros de esta familia son muy comunes entre aislados ambientales, ya que habitualmente poseen un *operon mer* asociado que les confiere resistencia a compuestos de mercurio (Labbate, 2008). Este *operon* suele en realidad formar parte a su vez de un **Tn21**, también conocido como el representante clásico de resistencia a mercuriales (figura 19).



**Figura 19:** Integrón clase 1 y su asociación con Tn402, Tn21 (Cantón, 2006).

Recientemente se ha propuesto un modelo de evolución y origen de los integrones de clase 1 (Gillings, 2008). En él (figura 20) dividen en diferentes etapas esta hipotética evolución. En un primer estadio (figura 20-A) la estructura del integrón corresponde al cromosoma de un progenitor, pero no posee ninguno de los genes de resistencia antibiótica que actualmente transportan los aislados clínicos que conocemos. Uno de estos integrones es movilizad e

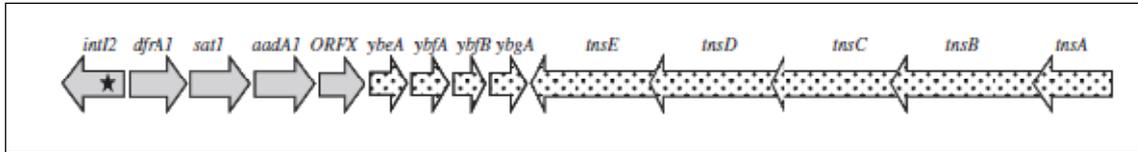
insertado en un elemento Tn402-like (figura 20-B y C). En un momento indeterminado adquiere un gen que le confiere un ventaja selectiva frente a otros, probablemente el primero fue **qacE** (gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario) (figura 20-D). Sucesivos eventos de inserción de otros genes van configurando la estructura tal y como la conocemos hoy en día (figura 20-E y F). Estos mismos hechos acaban truncando Tn402 (Figura 20-G) convirtiéndolo en una estructura incompetente. Pero transposiciones en *trans* permiten reintegrar esta estructura en plásmidos y/o en transposones funcionales como Tn21 (figura 20-H), permitiendo al integrón sobrevivir penetrando en multitud de organismos y evolucionar adquiriendo nuevos genes de resistencia.



**Figura 20:** Evolución integrones clase 1 (Gillings, 2008).

Los **integrones de clase 2** poseen una integrasa defectiva, *IntI2\**, ya que el gen que la codifica tiene un codón de stop interno TAA. Para que esta integrasa sea funcional, el codón STOP ha de cambiar a traducible (Hansson, 2002). Los integrones de clase 2 se encuentran vinculados a

la familia Tn7, que al igual que ocurría con los integrones de clase 1, contribuye a su diseminación entre la población bacteriana (figura 21).

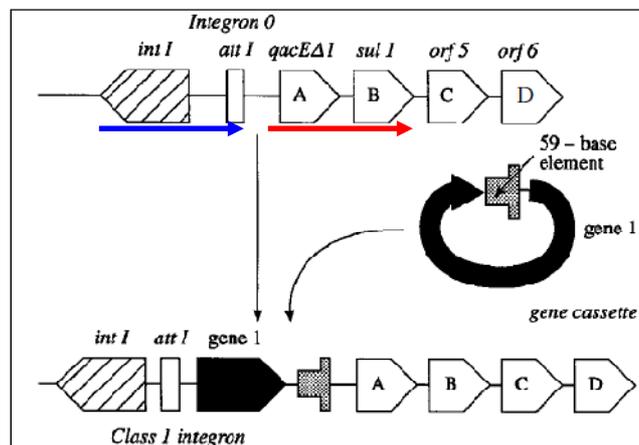


**Figura 21:** Integron clase 2 (flechas grises) y Tn7 (flechas punteadas) (Rodríguez, 2008).

La última clase de integrones, la **clase 3** (IntI3) se encontró por primera vez en una cepa de *Serratia marcescens* (cepa AK9373) y posteriormente en bacterias Gram negativas resistentes a imipenem de aislados clínicos (Japón) transportando todos ellos la metalo-beta-lactamasa bla<sub>IMP</sub> como gen casete (Arakawa, 1995; Senda, 1996).

### 9.1.1. Estructura de un integron de clase 1.

El **integron de clase 1** está compuesto por dos regiones conservadas (figura 22), una en el extremo 5' (**5'-CS**) que incluye el gen de la integrasa, los promotores y el sitio *attI*, y otra región en el extremo 3' (**3'-CS**) que contiene un gen de resistencia a sulfonamidas (*sul1*) y un gen truncado de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔ1*). Estos dos últimos genes no son genes casete ya que se encuentran fijos en el integron.



**Figura 22:** Arriba, un In0 donde la región 5'-CS (flecha azul) está inmediatamente a continuación de 3'-CS (flecha roja). Al integrarse un gen casete, amplía la longitud de 3'-CS de una forma determinada, lo cual lo clasificará en In1, In2... (Bennett, 1999)

La integración de genes casete ocurre normalmente en el sitio *attI*, desplazando hacia la derecha a los ya existentes previamente. En función de la longitud entre *attI* y 3'-CS, dada por los genes casete incorporados, se describen los sucesivos integrones: In1, In2, In3, In4 e In5 (Sabaté, 2002B). A los integrones que transportan genes casete que codifican resistencia a antimicrobianos y desinfectantes se les denomina **integrones de resistencia**.

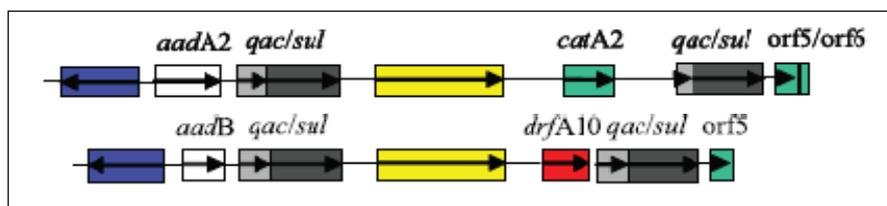
Los integrones se encuentran frecuentemente formando parte de transposones. Ya se han detallado su inclusión en Tn21 (figura 19). Otros casos son Tn1403, Tn1404, Tn1696, Tn1412, y Tn2000, añadiendo que estos transposones pueden localizarse tanto en plásmidos como en cromosomas.

Se conocen al menos 60 genes de resistencia en formato gen casete, cubriendo la práctica totalidad del arsenal terapéutico que se emplea en la práctica clínica (tabla 3). El acúmulo de varios de estos genes en un único integrón es lo que les convierte en integrones multiresistentes.

Tabla 3: GENES CASETE CONOCIDOS		
TIPO DE RESISTENCIA	DENOMINACIÓN	EJEMPLOS GENES CASETE
β-lactámicos	Clase A β-lactamasas	<i>bla<sub>p</sub></i>
	Clase B β-lactamasas	<i>bla<sub>IMP</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i>
	Clase C β-lactamasas	<i>bla<sub>OXA</sub></i>
Aminoglicósidos	Aminoglicosidasa	<i>aadA1a</i> , <i>aadA1b</i> , <i>aadA2</i> ,
	adeniltransferasa	<i>aadB</i>
	Aminoglicosidasa	<i>aacA1</i> , <i>aacA4</i> , <i>aacA7</i> , <i>aacC1</i> ,
	acetiltransferasa	<i>aacC</i> .

Cloranfenicol	Cloranfenicol acetiltransferasa	<i>catB2, catB3, catB5</i>
	Exportador de cloranfenicol	<i>CmlA</i>
Trimetroprim	Clase A dihidrofolato- reductasa	<i>dfrA1, dfrA5, dfrA7, dfrA12,</i> <i>dfrA14</i>
	Clase B dihidrofolato- reductasa	<i>dfrB1, dfrB2, dfrB3</i>
Desinfectantes	Compuestos de amonio cuaternario	<i>qacE, qacG</i>

Existe otro gran grupo de integrones de clase 1, los **integrones compuestos**, que son los que poseen una segunda copia de 3'-CS. Estos integrones incluyen entre ambas regiones conservadas 3'-CS el elemento **ISCR**, con capacidad propia para capturar otros genes de resistencia. Dos de los ejemplos más clásicos son **In6** e **In7**, ya que fueron los primeros donde se descubrió la presencia de ISCR y una segunda copia de 3'-CS. Los genes casete que transportan son característicos de cada uno de ellos (figura 23).



**Figura 23:** La primera estructura corresponde a In6 (GenBank accession L06822) y la segunda a In7 (L06418). En azul *intI1* y en amarillo ISCR1 (Toleman, 2006)

Lo que más llamó la atención de estas nuevas estructuras es que, tras la CR (*common region*) de In6 e In7, se hallaban, respectivamente, un gen de resistencia a cloranfenicol (*catA2*) y un gen de resistencia a trimetoprim (*drfA10*) que no poseían la secuencia *attC* (59-be): no eran

genes casete. El mecanismo por el cual habían llegado hasta ahí era diferente al encabezado por la integrasa *intI1*. Estos hechos apoyaron la hipótesis de que estas estructuras genéticas eran el resultado de múltiples sucesos de recombinación y transposición a lo largo del tiempo.

### 9.1.2. ISCR

Los **integrones complejos de clase 1**, son estructuralmente idénticos a un *IntI1*, solo que a continuación de la primera secuencia 3'-CS existe una región de 2154 pb, que se denominó región común o CR, compuesta por un *orf513* (llamado así por codificar una transposasa de 513 aminoácidos) y un sitio de recombinación de 33 pb localizado en su extremo derecho, seguido de genes que no son genes casete aunque sí pueden ser genes de resistencia, rematando el integrón otra copia de 3'-CS (Rodríguez-Martínez, 2006).

Las regiones CR se asemejan a las secuencias de inserción atípicas *IS91*, atípicas por su transposasa *Y2* y por carecer de *IR*, ya que su mecanismo de transposición se basa en replicación RC. Esta característica les permite transponer ADN adyacente con una única copia de elemento, en contraste con la mayoría de IS donde son necesarias dos copias para movilizar el gen. Actualmente se sostiene que las CRs representan una familia de distribución universal entre la población bacteriana, de elementos genéticos móviles presentes tanto en plásmidos como en cromosomas, similares a *IS91*, que son responsables de la movilización y diseminación de muchos genes de resistencia (Toleman, 2006). Se han descrito asociaciones con toda clase de genes: *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>DHA-1</sub>*, *bla<sub>VEB</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*, *qnr*, genes de resistencia a cloranfenicol, trimetoprim, aminoglicósidos, tetraciclinas...

Al comparar la secuencia del *orf513* de CR, se observó que compartía similitud con la secuencia de las transposasas de *IS91* y otras IS relacionadas como la *IS801* e *IS1294* (*IS91-like*). Las

transposasas de estas IS son proteínas con dos tirosinas en su centro activo, al igual que ocurría en la secuencia de la proteína codificada por CR, apoyando la teoría de que las CR eran elementos transponibles. Es más, en las *IS91-like* un extremo del elemento, denominado *oriIS* sirve como origen de replicación, y otro, *terIS* como terminador. La secuencia de este fragmento localizada en el extremo 3' de las transposasas de *IS91-like* posee una alta similitud con la hallada a 211 pb del final de la secuencia que codifica la transposasa de un integrón complejo de clase 1. Esta secuencia es también un origen de replicación para CR. De todas estas observaciones, deriva la denominación de las CR como **ISCR** (Toleman, 2006). En este mismo trabajo se ha postulado la hipótesis de que haya sido *ISCR1* el elemento que hubiese introducido la segunda copia de 3'CS presente en los integrones compuestos, desde otro integrón por RC transposición. Además de estas propiedades, hay que atribuirle funciones de promotor de los genes adyacentes a su extremo derecho, gracias a secuencias -35 (TAAACG) y -10 (TAAGAT) situadas a 73 y 50 pb respectivamente de la última base que completa el *ISCR1*.

### 9.1.3. Superintegrones

La denominación **superintegrones** (SI) se refiere a los grandes integrones localizados en el cromosoma bacteriano, que también acumulan genes casete incorporados en tándem que contienen una región *attC* similar a la descrita en otros genes casete en integrones de clase 1, 2 y 3, sólo que en estos casos esta región pasa a ser característica de especie (Fluit, 2004; Sabate, 2002B). El género donde más SI se han detectado es *Vibrio*. Muchos de los conocimientos actuales de los SI parten del hallazgo en 1998 de un superintegrón de clase 4 en el cromosoma de menor tamaño de los dos de *Vibrio cholerae* (Mazel, 1998).

Actualmente se baraja la hipótesis de que los integrones multiresistentes han evolucionado desde los SI a través de la captura genética llevada a cabo por los genes *intl* y puntos de

integración *attI* dentro de estructuras móviles como los transposones. El acúmulo de genes casete de varios SI lleva al establecimiento contemporáneo de los integrones de resistencia.

La potencia de los sistemas de integrones yace en su versatilidad, ya que pueden reconocer una cantidad enorme de dianas diferentes en sus procesos de recombinación y una inagotable capacidad de intercambiar y acumular genes. Esta flexibilidad les permite adaptarse rápidamente al los impredecibles cambios que puedan ocurrir en el nicho ecológico que ocupen, permitiendo a las bacterias incrementar su *fitness* y evolucionar. La demostración de la presencia de integrones en microorganismos ancestrales de diferentes géneros corrobora que son antiguas estructuras que ha ido evolucionando conjuntamente con el genoma bacteriano (Rowe-Magnus, 2001).

## 9.2. RESOLVASAS

Las resolvasas son **recombinasas específicas de sitio**. El ejemplo ya mencionado es el de la TnR de Tn3. Esta posee una doble funcionalidad, como se detallaba en el apartado 1.2.3 de la segunda parte de esta revisión. Otras resolvasas son las implicadas en la resolución de los dímeros de plásmidos como P1, formados en procesos de dimerización.

## 9.3. RECOMBINASAS Y e S

Estas enzimas son las presentes en los transposones Y y S respectivamente. Como se ha citado anteriormente, las siglas se corresponden a la presencia de una tirosina (Y) o una serina (S) en el centro activo de la enzima. Podemos encontrarlas Tn916 (*Y recombinasa*) y en IS607 de *Helicobacter pylori* (*S recombinasa*).

### Tercera parte

#### REVISIÓN DE ENTORNOS GENÉTICOS DESCRITOS PARA LAS BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO CTX-M, SHV Y TEM Y PARA EL GEN DE RESISTENCIA A QUINOLONAS *qnrA*.

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) se definen como enzimas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y las monobactamas, pero no las cefamicinas ni las carbapenemas. Se caracterizan por ser inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas de clase A, por encontrarse generalmente en plásmidos, y por derivar de otras  $\beta$ -lactamasas de menor espectro hidrolítico o de ciertas  $\beta$ -lactamasas cromosómicas (Cantón, 2007).

Existen dos formas de clasificarlas:

- a. Clasificación molecular de **Ambler**: las divide clásicamente en 4 grandes grupos (A-D) basados en 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 (Ambler, 1991; Paterson, 2005).
- b. Clasificación de **Bush, Jacoby y Medeiros**: se atiende al espectro de sustrato y al comportamiento frente a inhibidores. Las principales BLEEs quedarían englobadas en los grupos 2be y 2de de esta clasificación (Bush, 1995; Paterson, 2005).

Su aparición se describe desde dos vías de evolución diferentes. Una vía es la evolución desde  $\beta$ -lactamasas de menor espectro hidrolítico como  $bla_{SHV-1}$ ,  $bla_{TEM-1}$  y  $bla_{TEM-2}$ , pertenecientes todas ellas al grupo 2b, por mutaciones en los genes que las codifican, resultando las familias BLEE TEM y SHV que actualmente conocemos. La otra vía resulta de la movilización de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de diversas especies del género *Kluyvera* por integración en

estructuras genéticas que fomentan su movilidad y diseminación (Cantón, 2007). En la tabla 4 se detallan las principales BLEEs conocidas en Gram negativos (Jacoby, 2005):

Tabla 4: BLEEs en Gram negativos			
EJEMPLOS BLEE	SUSTRATOS PRINCIPALES	INHIBICIÓN POR ÁCIDO CLAVULÁNICO	CLASE MOLECULAR
Familia TEM Familia SHV	Oximino- cefalosporinas. Monobactams.	+++++	A
BES-1, Familia GES/IBC, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1 VEB-1, VEB-2	Oximino- cefalosporinas Monobactams	++++	A
Familia CTX-M	Mismos que bla <sub>TEM/SHV</sub> Incluye para algunas enzimas, cefepima	++++	A
Familia OXA	Igual que bla <sub>CTX-M</sub>	+	D

Las BLEEs de tipo **SHV** y **TEM** están universalmente distribuidas, y se conocen actualmente más de 100 y 160 variantes respectivamente ([www.lahey.org](http://www.lahey.org)). Las BLEEs tipo **OXA** a diferencia de estas otras dos, se encuentran mayoritariamente en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. En cuanto al grupo de las BLEEs tipo **CTX-M**, se sabe que no guardan relación con otras BLEEs descritas. Diferentes  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de algunas especies de *Kluyvera* han sido identificadas como fuentes potenciales de estas BLEEs. Podrían haberse movilizado desde su ubicación original gracias a diferentes secuencias de inserción (ISCR, ISEcp1) o a algún bacteriófago. Incluso se ha demostrado que los genes de los entornos genéticos de estas BLEEs muestran una alta homología con las secuencias vecinas de las  $\beta$ -lactamasas originales de *Kluyvera*

(Cantón, 2006). El género *Kluyvera* pertenece a nuestra flora intestinal, pero es una causa poco frecuente de infección humanas (Poirel, 2003).

En la actualidad se conocen hasta 65 variantes de **CTX-M** que se agrupan en 5 *clusters* según su secuencia aminoacídica (tabla 5): CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25.

<b>Tabla 5: PRINCIPALES BLEE TIPO CTX-M SEGUN CLUSTER</b>				
<b>Cluster 1</b>	<b>Cluster 2</b>	<b>Cluster 8</b>	<b>Cluster 9</b>	<b>Cluster 25</b>
bla <sub>CTX-M-1</sub>	bla <sub>CTX-M-2</sub>	bla <sub>CTX-M-8</sub>	bla <sub>CTX-M-9</sub>	bla <sub>CTX-M-25</sub>
bla <sub>CTX-M-3</sub>	bla <sub>CTX-M-4</sub>	bla <sub>CTX-M-40</sub>	bla <sub>CTX-M-13</sub>	bla <sub>CTX-M-26</sub>
bla <sub>CTX-M-10</sub>	bla <sub>CTX-M-5</sub>		bla <sub>CTX-M-14/18</sub>	
bla <sub>CTX-M-11</sub>	bla <sub>CTX-M-6</sub>		bla <sub>CTX-M-16</sub>	
bla <sub>CTX-M-12</sub>	bla <sub>CTX-M-7</sub>		bla <sub>CTX-M-17</sub>	
bla <sub>CTX-M-15</sub>	bla <sub>CTX-M-20</sub>		bla <sub>CTX-M-19</sub>	
bla <sub>CTX-M-32</sub>			bla <sub>CTX-M-21</sub>	
			bla <sub>CTX-M-24</sub>	
			bla <sub>CTX-M-27</sub>	

Actualmente las BLEE tipo CTX-M son el tipo predominante y se encuentran mayoritariamente en *E. coli*, y en menor grado en *K. pneumoniae*. Su prevalencia está aumentando de manera global, tanto a nivel hospitalario como sorprendentemente a nivel comunitario, encontrándose sobre todo en aislamientos de origen urinario. Los factores de riesgo parecen haberse modificado, y otros antibióticos, entre los que se encuentran las quinolonas, podrían estar desempeñando un papel relevante en su selección (Cantón, 2007). Uno de los aspectos que más sorprende es este incremento de la prevalencia de microorganismos portadores de BLEEs en pacientes comunitarios que jamás han tenido contacto previo con el hospital. Se ha sugerido en algunos estudios, que el flujo incluso podría ser a la inversa del esperado, y que

fuesen los pacientes comunitarios los que al ingreso introdujesen las BLEE en el hospital, donde, gracias a los ambientes de presión selectiva, amplificarían su presencia. Diversas explicaciones se han postulado al respecto, entre otras, movilizaciones desde bacterias ambientales (Cantón, 2009) y la presencia de BLEEs en la flora intestinal de animales sanos, no pudiéndose descartar la transmisión al hombre a través de la cadena alimentaria, que al caso, también actúa como portador fecal (Torres, 2007; Vinué, 2009).

## 10. ENTORNOS GENÉTICOS DE BLEE TIPO CTX-M

La diseminación de los genes codificadores de las  $bla_{CTX-M}$  preocupa especialmente a la comunidad científica, sobre todo al comparar la expansión de esta diseminación con la de sus semejantes  $bla_{SHV}$  y  $bla_{TEM}$ . La adquisición de las  $bla_{CTX-M}$  involucra a elementos genéticos como **ISCR1** ( $bla_{CTX-M-9}$ ,  $bla_{CTX-M-2}$  y  $bla_{CTX-M-1}$ ) e **ISEcp1** (clusters 9, 2 y 1), así como a determinados bacteriófagos: en España sólo en  $bla_{CTX-M-10}$  (Poirel, 2008; Cantón, 2006).

En estos últimos años ha habido un importante incremento en los aislados comunitarios de *E.coli* portadores de este tipo de BLEE, así como en cepas de origen veterinario. Las razones que justifican este incremento tienen que ver con su entorno genético. La vinculación directa de las CTX-M con estas IS particulares, que participan tanto en su movilización como en la promoción de su expresión, se suma al hecho de que las propias IS están a su vez contenidas en transposones y plásmidos conjugativos. El estudio completo de los grandes plásmidos ha puesto de manifiesto este contexto de forma global, más allá de los genes inmediatamente adyacentes a la BLEE, desvelando su asociación con estructuras transponibles y ampliamente distribuidas como por ejemplo **Tn21**. Es importante destacar que las  $bla_{CTX-M}$  asociadas a **ISCR1** suelen encontrarse asociadas a integrones de clase 1 dentro de estos otros transposones que

las vehicular. Los integrones capturan genes de resistencia adicionales en forma de genes casete, e incluso el propio transposón en el que va transportado suele estar asociado a genes de resistencia a biocidas y compuestos mercuriales que provocan una selección medio ambiental a favor de las cepas portadoras (*Cantón, 2009; Cantón, 2007*).

La distribución de las bla<sub>CTX-M</sub> entre plásmidos, en función del **grupo de incompatibilidad**, es diversa. Así se han hallado bla<sub>CTX-M</sub> entre los siguientes plásmidos con amplio rango de hospedadores: Inc N o L/M (bla<sub>CTX-M-1</sub>), Inc A/C (bla<sub>CTX-M-3</sub>) e Inc P1α (bla<sub>CTX-M-9</sub>); y entre los siguientes de estrecho rango: Inc FII (bla<sub>CTX-M-15</sub>), Inc HI2 (bla<sub>CTX-M-9</sub>) e Inc FI (bla<sub>CTX-M-9</sub>) (*Navarro, 2007-A; Navarro, 2007-B*).

La diseminación de algunas BLEEs de esta familia, como bla<sub>CTX-M-9</sub>, bla<sub>CTX-M-14</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub> y bla<sub>CTX-M-32</sub>, se ha asociado a **brotes epidémicos**. La diseminación de bla<sub>CTX-M-15</sub> parece estar ligada a plásmidos IncFII, como ocurrió en el brote descrito en Canadá causado por el plásmido **pC15-1a** (*Boyd, 2004*), localizado también en regiones como Francia y norte de África. Estudios de diseminación de un hospital madrileño describen desde 1996 cepas portadoras de bla<sub>CTX-M-9</sub> mayoritariamente vinculadas a plásmidos de amplio rango como HI2, aunque también a otros de estrecho margen como los del grupo IncP1 (*Novais, 2006*). En estos mismos estudios se destaca la alta variabilidad detectada entre los diversos módulos que componen el entorno genético de las bla<sub>CTX-M-9</sub>, relacionándolo con una alta frecuencia de intercambios recombinatorios entre los diferentes *puntos calientes* (*intI1*, 3'CS, Tn402, sitios *res* de Tn21) y sus correspondientes homólogos en el mismo plásmido u otros presentes (figura 19).

### 10.1. ISEcp1

ISEcp1 es una secuencia de inserción relacionada con la familia IS1380 (<http://www-is.biotoul.fr/>). Este elemento se halla asociado con frecuencia con las bla<sub>CTX-M</sub> de los **Cluster 1, 2 y 9**, y es capaz de movilizar estos genes a través de un proceso especial de transposición. Moviliza secuencias adyacentes a su extremo 3' por transposición después de haber reconocido una variedad de secuencias cortas de ADN a modo de IRR. Es decir, una sola copia de ISEcp1 situada por delante de la bla<sub>CTX-M</sub> con su IRL fija, es suficiente para movilizar el gen, primero desde un ADN cromosómico progenitor y posteriormente a un plásmido conjugativo capaz de diseminarlo. A este peculiar proceso se le denomina transposición "one-ended".

A mayores, esta peculiar IS proporciona secuencias promotoras -35 y -10 que potencian la expresión del gen BLEE que en condiciones silvestres, como en las cepas de *Kluyvera sp*, es más baja. El hallazgo de sendas secuencias repetidas directas de 5 pb en cada extremo es la firma del movimiento de transposición de ISEcp1 y nos señala los límites del pseudo-transposón (Poirel, 2008; Lartigue, 2006).

Hasta ahora se conocen tres formas de esta transposasa, **ISEcp1**, **ISEcp1B** e **ISEcp1C**. ISEcp1B difiere de ISEcp1 en tres cambios nucleotídicos en tres puntos diferentes de la secuencia, pero sólo uno de ellos implica cambio de aminoácido (Q379R). La tercera, ISEcp1C, difiere en un aminoácido con ISEcp1 y en dos con ISEcp1B (Cattoir, 2008). Las IRL de las tres IS son idénticas.

Otros elementos genéticos como **IS91**, **IS911** y **Tn21** son capaces también de movilizar secuencias adyacentes a través de un mecanismo de transposición "one-ended" al reconocer secuencias aleatorias como IRR, definiendo así el extremo derecho del fragmento transpuesto.

Las IRR utilizadas por *ISEcp1* no son completamente aleatorias, sino que guardan hasta un 50% de homología con su IRL original, lo cual se traduce en una frecuencia de transposición menor (Poirel, 2005). Se definen las IR de *ISEcp1* como secuencias imperfectas de 14 pb. En un trabajo reciente (Poirel, 2005) se describen las diferentes IRR descritas para *ISEcp1B* y su grado de homología con la IRL (tabla 6). El hecho de que *ISEcp1* utilice tal variedad de IRR explica su capacidad para movilizar genes de  $\beta$ -lactamasas estructuralmente no relacionadas (Doloy, 2006).

Description of sequence	Nucleotide sequence (5'→3') <sup>a</sup>	No. of base pairs identical to perfect IRR <sup>b</sup>	Size of transposed fragment (bp)
IRL of <i>ISEcp1B</i>	GATTCTACGTCAGT		
Deduced perfect IRR of <i>ISEcp1B</i>	ACGTAGAATCTAGG		
IRR of <i>ISEcp1B</i>	ACGTGGAATTTAGG	12	
IRR1 at the potential transposon end of pILT-3	GCGTTGATTCTGG	9	4,798
IRR2 in plasmid pACYC184	GCATGGATTGTAGG	9	4,726
IRR3 in plasmid pBK-CMV	CCACAGAATCAGGG	9	4,541
IRR4 in the <i>tnpA</i> gene of <i>IS903D</i>	GATGAACTGCGGCG	3	3,273
IRR5 in the <i>iron</i> gene of pILT-3	GATGTGGAACCTCG	4	3,817
IRR6 in the <i>iron</i> gene of pILT-3	GCACCGGGATGGCG	3	4,167
IRR7 in the <i>iron</i> gene of pILT-3	GCGCCGCCGCGGGG	6	4,273
IRR8 in the <i>iron</i> gene of pILT-3	GGGTCGAACTGGG	6	4,283

**Tabla 6:** IRR de *ISEcp1B* (Poirel, 2005)

Los autores que describen la estructura y proceso de transposición de este elemento genético concluyen adicionalmente que, ya que la distancia entre la secuencia de inserción y la BLEE es diferente para cada *cluster*, es muy probable que cada BLEE haya pasado un proceso de inserción diferente (Poirel, 2003; Poirel, 2005). En este último trabajo se demuestra que uno de los elementos genéticos que frecuentemente está a la derecha de algunas *bla*<sub>CTX-M</sub>, **IS903**, no tiene ningún papel en el proceso de transposición.

## 10.2. ISCR1

El segundo mecanismo común de movilización de algunas  $bla_{CTX-M}$  es la transposición *Rolling-Circle* a través de elementos CR1. Estas  $bla_{CTX-M}$  se hallan frecuentemente asociadas a integrones de clase 1, pero no como genes casete. Se localizan tras la transposasa codificada por ISCR, codificada por el gen anteriormente conocido como *orf513*, y que carece de IR. ISCR1 puede movilizar genes cromosómicos, transponiéndose primero en una posición adyacente y después volviéndose a transponer, pero de una forma aberrante ya que moviliza ese ADN adyacente a una nueva ubicación, en este caso, un plásmido conjugativo. La movilización de ISCR1 con  $bla_{CTX-M}$  podría ser consecuencia de un proceso de recombinación homóloga entre este fragmento y otro ISCR1 originalmente asociado a un integrón de clase 1. Adicionalmente, se ha demostrado que posee la capacidad para potenciar la expresión de las  $bla_{CTX-M}$  (Poirel, 2008; Rodríguez-Martínez, 2006).

## 10.3. DESCRIPCIONES DE ENTORNOS GENETICOS DE $bla_{CTX-M}$

### 10.3.1. *ISEcp1- Cluster 1*: $bla_{CTX-M-1}$ , $bla_{CTX-M-3}$ , $bla_{CTX-M-15}$ , $bla_{CTX-M-32}$ .

A excepción de una  $bla_{CTX-M}$  descrita recientemente (Su, 2008), las  $bla_{CTX-M}$  pertenecientes a este *cluster* se ven precedidas por *ISEcp1 e ISEcp1B*, a pesar de que puede ocurrir que, debido a diferentes sucesos insercionales posteriores, dicha transposasa no permanezca íntegra.

La estructura clásica es común para todas las  $bla_{CTX-M}$  del *cluster*. La diferencia radica principalmente en el número de pb que existe entre la última base del IRR inmediato a la *ISEcp1* y el primer codón de inicio de la BLEE. Así, de entre las más frecuentes, las  $bla_{CTX-M-1}$  y las  $bla_{CTX-M-32}$  distan “32 + 48” pb (total de 80 pb) de IRR-1, las  $bla_{CTX-M-3}$  “79 + 48” pb (total de 127 pb) y las  $bla_{CTX-M-15}$  sólo 48 pb. Comparando la secuencia del fragmento de 48 pb de estas

tres BLEEs se observa una total coincidencia (GenBank *accession* FM865623, AM003904, EU418914).

Estos datos fueron expuestos de forma explícita en un estudio desarrollado en Francia en 2006 con diversas enterobacterias productoras de  $bla_{CTX-M}$  (Eckert, 2006). En las figuras 24 A-C se pueden ver representaciones esquemáticas de las estructuras descritas:

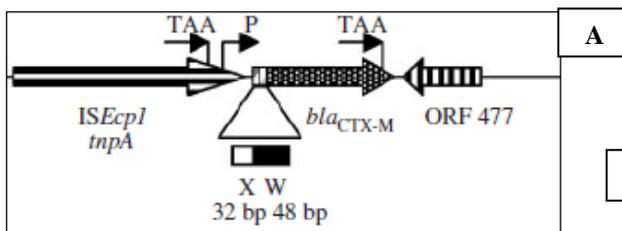


Figura 24A: CTX-M-1. (Eckert, 2006)

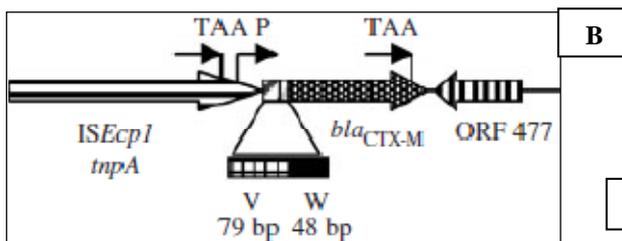


Figura 24B: CTX-M-3. (Eckert, 2006)

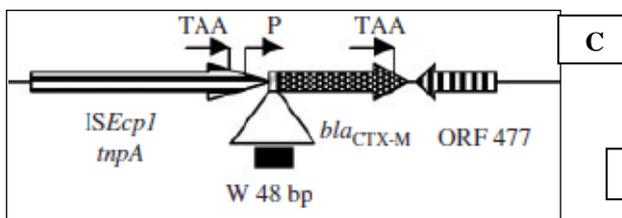


Figura 24C: CTX-M-15. (Eckert, 2006)

Otros trabajos que corroboran dichas estructuras aparecen en la tabla 7.

Tabla 7: OTRAS DESCRIPCIONES PUBLICADAS PARA CLUSTER-1		
PUBLICACIÓN	ENTORNOS DESCRITOS	COMENTARIOS
Poirel, 2002	$bla_{CTX-M-3}$ y $bla_{CTX-M-15}$	Citan distancias de 128 y 48 pb respectivamente.
Lartigue, 2004	$bla_{CTX-M-3}$ y $bla_{CTX-M-15}$	Citan distancias de 128 y 48 pb



revelando información acerca de cuáles eran las IRL/IRR1/IRR2. Asimismo se puede observar cómo la unidad *ISEcp1* está englobada en un Tn3, que a su vez se halla ubicado en el clásico Tn21.

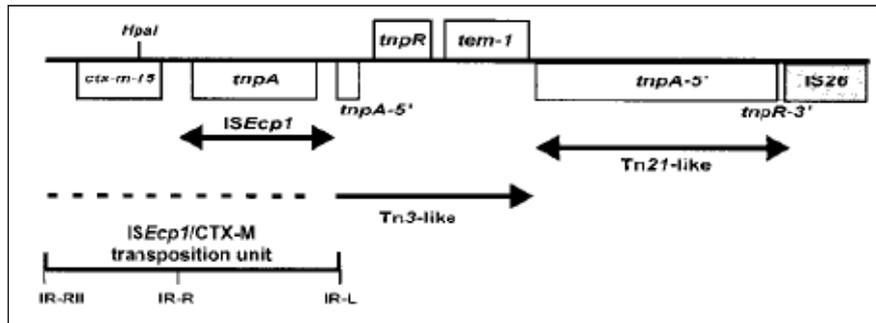


Figura 26: Fragmento de la secuencia de pC15-1a en un brote de Toronto (Boyd, 2004)

Como ya se ha adelantado, no siempre la transposasa permanece íntegra, y diferentes elementos la pueden interrumpir. En cuanto a las estructuras truncadas descritas, el caso más frecuente es el de una *IS26* interponiéndose en medio de *ISEcp1* (figura 27), tanto en *bla<sub>CTX-M-3</sub>*, en *bla<sub>CTX-M-15</sub>* como en *bla<sub>CTX-M-1</sub>* (Eckert, 2006; Ensor, 2007; Jouini, 2007; Vinué, 2009; Diestra, 2009), pero este hecho no tiene por qué afectar a la expresión de la BLEE. Mientras se conserven intactos los promotores -35 y -10, se mantiene intacta la capacidad de potenciar la expresión de la BLEE. Se encuentran dentro del *ISEcp1*, pero entre el último codón de la transposasa y el primer IRR.

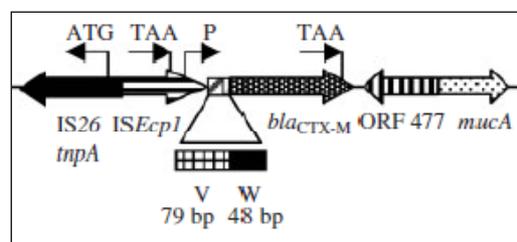


Figura 27: *IS26/ISEcp1*. (Eckert, 2006)

Otro caso (figura 28) es la introducción de una **IS1** en medio de la transposasa **ISEcp1** adyacente a una  $bla_{CTX-M-3}$  (Eckert, 2006).

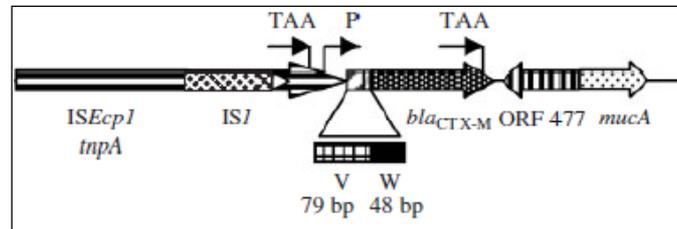


Figura 28: IS1/ ISEcp1. (Eckert, 2006)

De forma similar se han descrito cepas portadoras de  $bla_{CTX-M-32}$  cuya **ISEcp1** se ve truncada por un **IS5** (figura 29). En relación a la inserción de IS en medio de **ISEcp1**, existe la descripción de un caso clínico (Fernández, 2007) donde los autores confirmaron la transmisión *in vivo* de una  $bla_{CTX-M-32}$  entre un *E. coli* y un *P. mirabilis* del mismo paciente, y donde la inserción de una **IS1** entre la **IS5** (figura 28), que ya truncaba **ISEcp1** en *E. coli* pero sin modificar la posición de los promotores -35 y -10, hacía que en el *P. mirabilis* receptor los promotores sí se viesen distanciados de la BLEE por esta nueva inserción, y ello repercutiese negativamente en la promoción de la expresión que se ejercía sobre la BLEE.

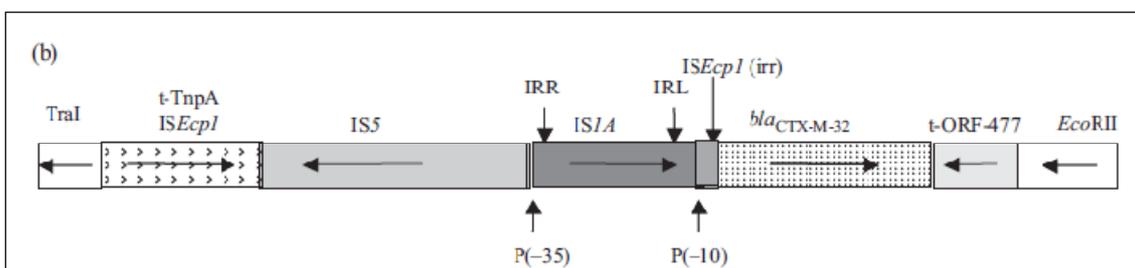


Figura 29: IS5/ IS1/ ISEcp1. (Fernández, 2007).

Un trabajo de reciente publicación resume los tipos y estructuras hallados en España para una colección de BLEEs recopiladas de 11 centros españoles, así como su distribución entre los

diferentes plásmidos en función de su grupo de incompatibilidad (Diestra, 2009). Entre las BLEEs tipo CTX-M pertenecientes al *Cluster 1* la distribución entre plásmidos en función de su grupo de incompatibilidad es la que muestra en la tabla 8:

<b>Tabla 8: GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD LIGADOS A CTX-M CLUSTER 1</b>			
<b>BLA<sub>CTX-M</sub></b>	<b>MICROORGANISMO</b>	<b>Nº CEPAS</b>	<b>GRUPO INC.</b>
bla <sub>CTX-M-1</sub>	<i>E. coli</i>	2	N
	<i>K. pneumoniae</i>	3	N
	<i>K. pneumoniae</i>	2	FII
bla <sub>CTX-M-3</sub>	<i>E. coli</i>	1	N
		1	A/C
bla <sub>CTX-M-15</sub>	<i>E. coli</i>	2	FIA
	<i>E. coli</i>	1	FII
	<i>K. pneumoniae</i>	1	FIA
bla <sub>CTX-M-32</sub>	<i>E. coli</i>	3	N

En la figura 30 se exponen los entornos de las BLEES pertenecientes al *Cluster-1* descritas en este trabajo.

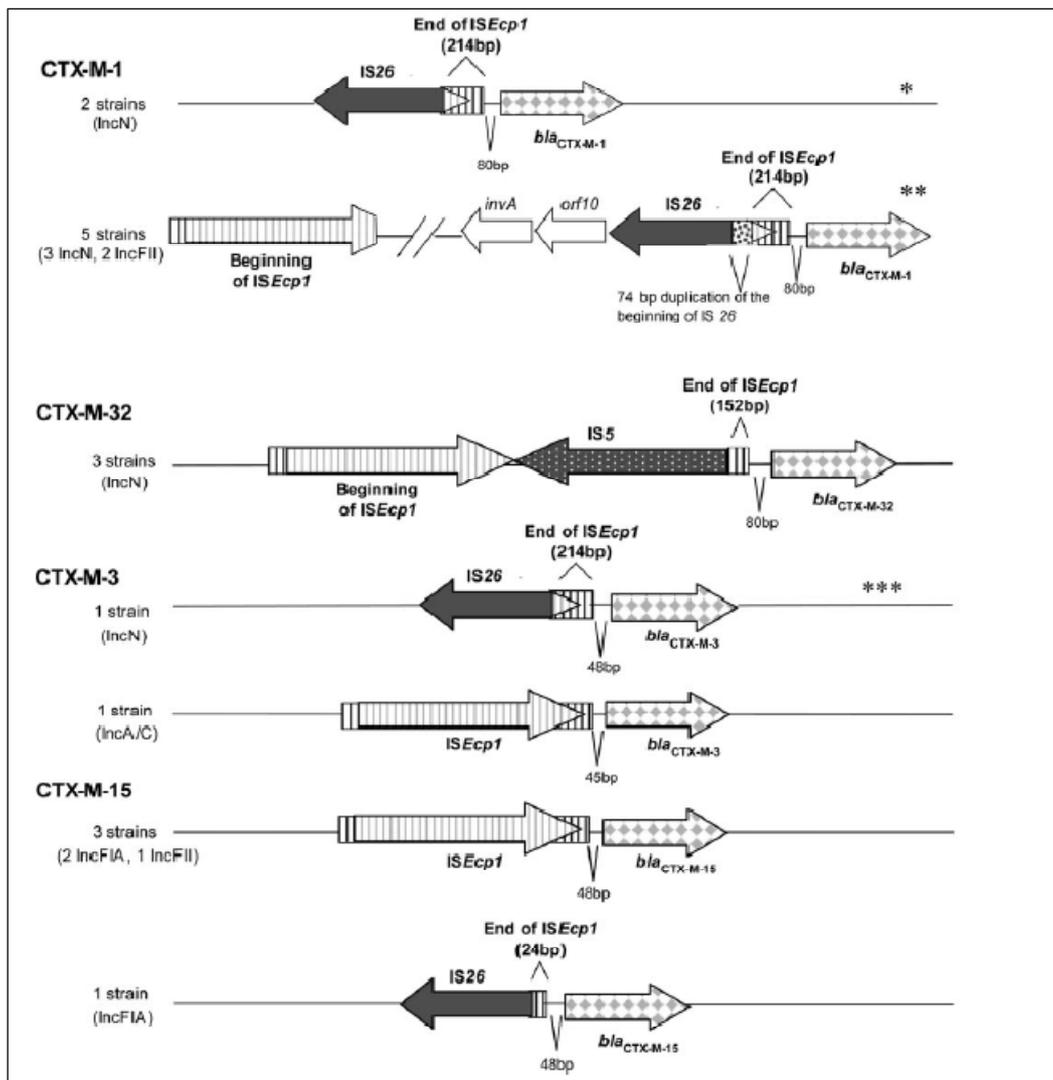


Figura 30: Entornos CTX-M cluster 1. (Diestra, 2009).

La excepción citada al inicio de este apartado en cuanto a entornos de CTX-M de *Cluster 1* corresponde a la primera descripción de una  $bla_{CTX-M-1}$  localizada en un integrón de clase 1 precedida por un *ISCR1* (figura 31), en un aislado clínico en China (Su, 2008).

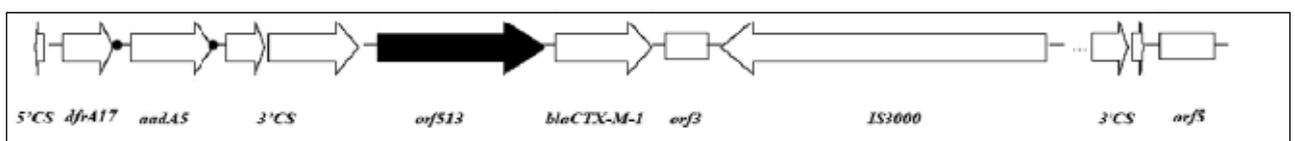
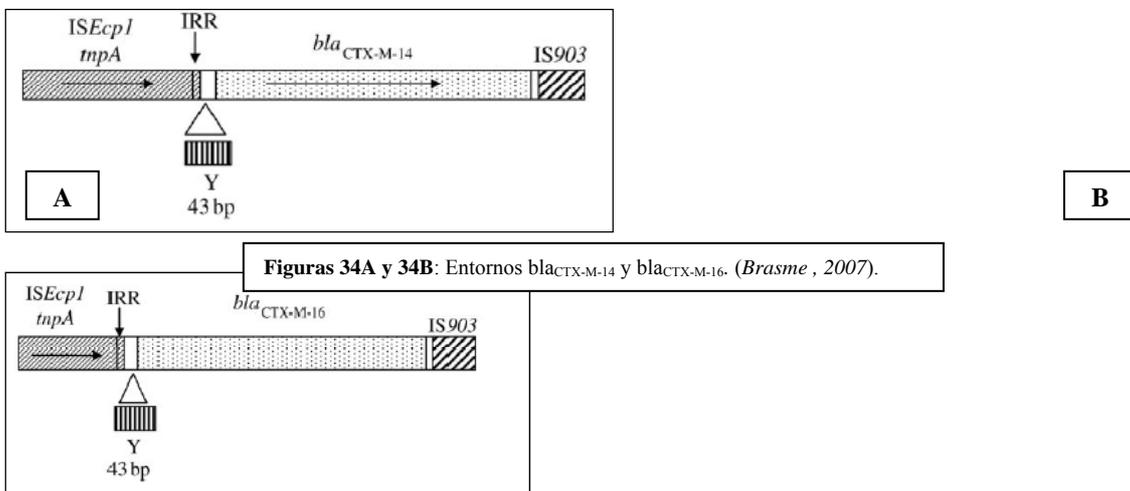


Figura 31:  $bla_{CTX-M-1}$  precedida por *ISCR1* (Su, 2008)



El entorno genético más frecuente para las **bla**<sub>CTX-M-14</sub> sin embargo es, la asociación los elementos genéticos móviles **ISEcp1 e ISEcp1B** en el extremo 5', al igual que ocurre para las CTX-M del *cluster 1*, pero con una secuencia **IS903** en el extremo 3', a pesar de que esta última no posee poder movilizador (Eckert, 2006). Esta estructura también se ha definido para otras BLEE del *cluster 9* (figura 34A y 34B) como son **bla**<sub>CTX-M-16</sub> (Brasme, 2007) y **bla**<sub>CTX-M-19</sub> (Poirel, 2003). Para los tres casos la IRR-1 imperfecta es idéntica y la secuencia que separa la IRR-1 de ISEcp1 del codón de inicio de la BLEE tiene 42/43 pb comunes (depende de autores).



En el trabajo de L. Poirel y colaboradores (Poirel, 2003), se detalla la secuencia completa del entorno de una **bla**<sub>CTX-M-19</sub> (plásmido **pILT-3**, GeneBank *accession* AF458080) donde un **Tn1721** precede al conjunto **ISEcp1B\_CTX-M-19\_IS903**. En la figura 35 se puede ver la secuencia del final de **ISEcp1B**, su **IRR**, las bases comunes antes nombradas entre ésta y el codón de inicio **ATG** de la BLEE, así como la situación de los promotores -35 y -10.

```

--> tnpA
4857 ATTATCAGCTTTTATGACTCGATATATGGTAAAATAATAGTAAGAAAAGTAGTAAAAAGGGTTCTAATTATGATTAATAAAA
M I N K

4932 -----//-----TATGAAAAATGTCTGGTATAATAAGAATATCATCAATAAAATTGAGTGTGCTCTGTGGATAAC
Y E K C L V *

6233 TTGCAGAGTTTATTAAGTATCATTGCAGCAAAGATAAAAATCAATGATTTATCAAAAATGATTGAAAGGTGTTGTAATAATG
-35

6316 TTACAATGTGTGAGAAGCAGTCTAAATTCCTTCGTGAAATAGTGATTTTGAAGCTAATAAAAAACACCGTGGAAATTTAGGGA
-10 +1 <-- IRR ISEcp1B-->

--> blaCTX-M-19
6399 ATACTGATGTAACACGGATTGACCGTATTGGGAGTTTGAGATGGTGACAAAAGAGAGTGCAACGGA-----//-----
M V T K R V Q R

```

**Figura 35:** Secuencia de pILT-3 (Poirel, 2003).

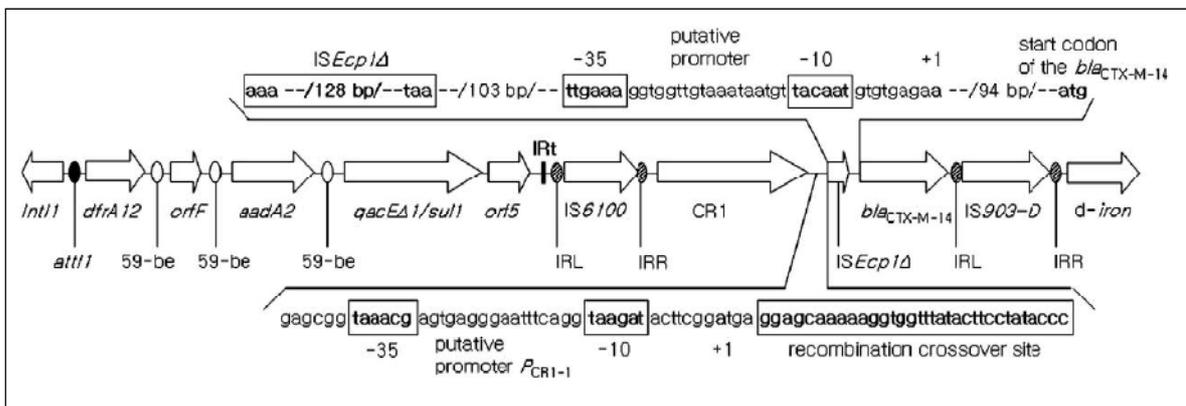
Otros trabajos que corroboran la asociación ISEcp1 y bla<sub>CTX-M-14</sub> y bla<sub>CTX-M-19</sub> aparecen en la tabla

9:

Tabla 9		
PUBLICACIÓN	ENTORNOS DESCRITOS	COMENTARIOS
Lartigue, 2004	bla <sub>CTX-M-14</sub>	Citan distancias de 43 pb.
Jouini, 2007	bla <sub>CTX-M-14</sub>	Citan distancia de 42 pb.
Vinué, 2009	bla <sub>CTX-M-14a</sub>	Citan distancias de 42 pb.
Poirel, 2003	bla <sub>CTX-M-19</sub>	Citan distancias de 42 pb.
Diestra, 2009	bla <sub>CTX-M-14</sub>	-
Navarro, 2007	bla <sub>CTX-M-14a</sub>	-

Un trabajo español describe dos secuencias nucleotídicas diferentes para la misma BLEE bla<sub>CTX-M-14</sub>: bla<sub>CTX-M-14a</sub> y bla<sub>CTX-M-14b</sub>. Ambas difieren en tres cambios nucleotídicos (Navarro, 2007). En él denominan bla<sub>CTX-M-14a</sub> a la clásica bla<sub>CTX-M-14</sub>, que va emparejada con ISEcp1 e incluida en plásmidos del grupo incK. Existe una amplia mayoría de trabajos que ubican a las bla<sub>CTX-M-14</sub> en plásmidos del grupo de incompatibilidad K (Diestra, 2009; Valverde, 2009). La bla<sub>CTX-M-14b</sub> es hallada en plásmidos del grupo incH12 y bajo el mismo entorno genético que las bla<sub>CTX-M-9</sub>.

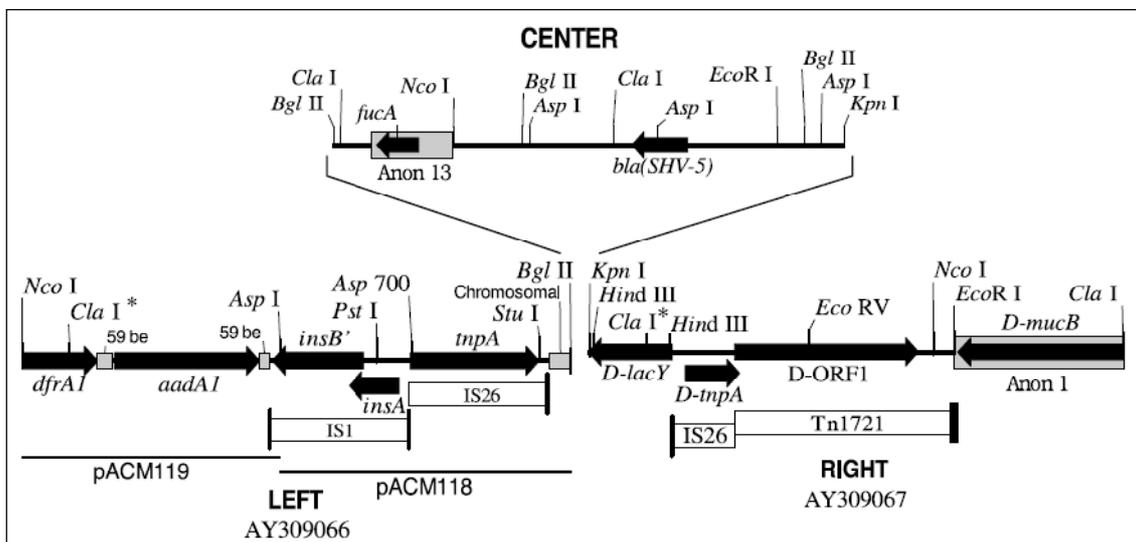
Al igual que ocurría con las CTX-M del *Cluster 1*, también se han descrito cepas con la transposasa de *ISEcp1* truncada en su extremo 5' por otras estructuras como *IS10* o *TnpA* correspondientes a *IS26* (Eckert, 2006). Una estructura novedosa para las *bla<sub>CTX-M-14</sub>* es la descrita en un trabajo coreano, donde la *ISEcp1* se ve truncada por un integrón de clase 1 (In4), de tal forma que una copia completa de *ISCR1* y parte de una *ISEcp1* se encuentran por delante de la BLEE (figura 36). Los promotores de *ISEcp1* permanecen intactos y por delante de la BLEE. Los autores no especifican si la presencia conjunta de sendas parejas de promotores de *ISCR1* y de *ISEcp1* tiene algún tipo de relevancia especial (Bae, 2008).



**Figura 36:** Entorno de *bla<sub>CTX-M-14</sub>* con *ISCR1* y *ISEcp1* (Bae, 2008)

## 11. ENTORNOS GENÉTICOS DE BLEE TIPO SHV

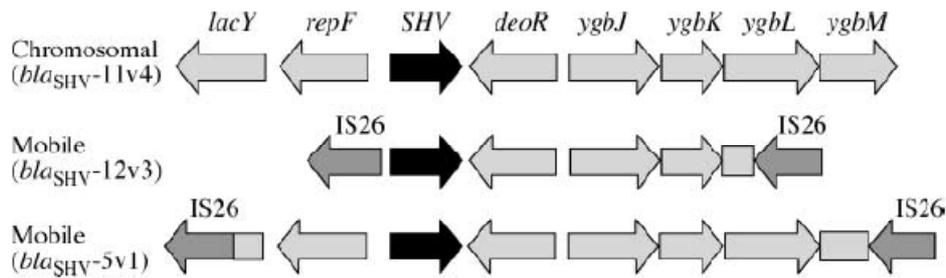
Las BLEE tipo SHV están ampliamente distribuidas entre bacterias Gram negativas. Corresponden a mutaciones específicas en la secuencia de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 ([www.lahey.org](http://www.lahey.org)). Se sabe que  $bla_{SHV}$  está presente como gen cromosómico en todas las cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Babini, 2000), y es desde esta ubicación desde donde se moviliza hacia plásmidos. El trabajo que sitúa el origen de los genes SHV en el cromosoma bacteriano de *K. pneumoniae* (Preston, 2002) demuestra cómo, por ejemplo, la  $bla_{SHV-5}$  del plásmido **pACM1** se localiza en un fragmento de 7,9 kb (figura 37) homólogo a un segmento del cromosoma de *K. pneumoniae* MGH78578. Un trabajo posterior de este mismo grupo de estudio (Preston, 2004) sugiere que es el propio cromosoma de *K. pneumoniae* el que contenía los elementos genéticos móviles que transfirieron las  $bla_{SHV}$  a los plásmidos.



**Figura 37:** Entorno genético de  $bla_{SHV-5}$  en pACM1 (Preston, 2004)

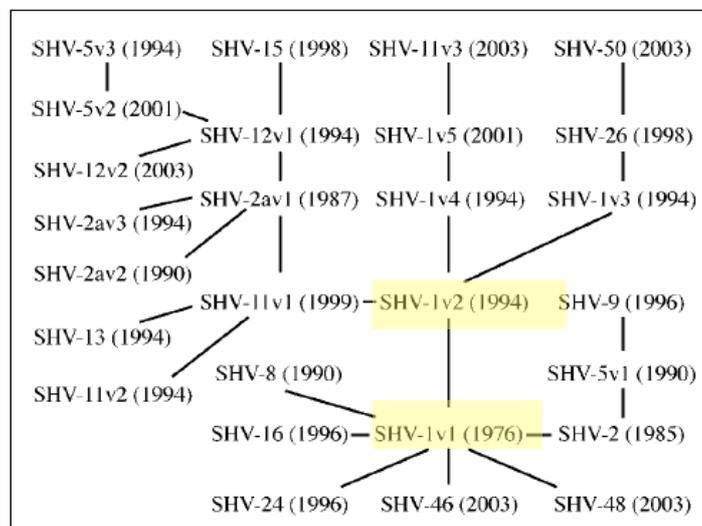
El mapeo del fragmento al completo revela la presencia de dos elementos IS26, en la misma dirección, reminiscencia ambas de Tn2680 (Mollet, 1985), a pesar de que en este caso, la copia de IS26 más próxima a la BLEE está truncada por un Tn1721 (figura 37). Este hecho es el que utilizan K.E. Preston y colaboradores para justificar el fracaso obtenido en el intento de la transposición *in vitro* de bla<sub>SHV-5</sub> de pACM1, ya que sí se ha logrado con otros plásmidos de estructuras no truncadas, como ocurre con el plásmido **p1658/97** (Zienkiewicz, 2007) que también contiene una SHV-5 (GenBank accession NC\_004998)

Para comprender mejor la evolución de la movilización de las bla<sub>SHV</sub> nos referiremos a los datos publicados por P.J. Ford y M.B. Avison para la *K. pneumoniae* MGH78578 (Ford, 2004). Esta cepa posee dos β-lactamasas SHV, una β-lactamasa no-BLEE SHV-11 **cromosómica** y otra BLEE SHV-12 **plasmídica**. La bla<sub>SHV-11</sub> se localiza entre un grupo de genes conocidos, de los cuales unos (operon-*lac*) se encuentran en otras *K. pneumoniae*, y otros (operon-*ygb*) pertenecen al cromosoma de *E. coli* (figura 38). No hay evidencia de que bla<sub>SHV-11</sub> haya sido adquirida para esta ubicación de forma reciente. La bla<sub>SHV-12</sub> está claramente relacionada con la anterior, sólo que flanqueada por dos elementos IS26 en el plásmido, siendo altamente probable que haya sido movilizada desde un origen similar (figura 38) ya que parte de los genes que quedan dentro de las dos IS26 son equivalentes a los hallados al lado de la SHV-11 del cromosoma. Sin embargo no es probable que la SHV-12 de *K. pneumoniae* MGH78578 proceda de un proceso de movilización y mutación posterior desde la SHV-11 del cromosoma de la misma cepa, ya que de haber sido así, habría algún rastro del fragmento IS26-bla<sub>SHV-11</sub>-IS26. Tal y como sugieren los autores, el fragmento IS26-bla<sub>SHV-12</sub>-IS26 procede con una mayor probabilidad de los genes cromosómicos de otra cepa de *K. pneumoniae*.



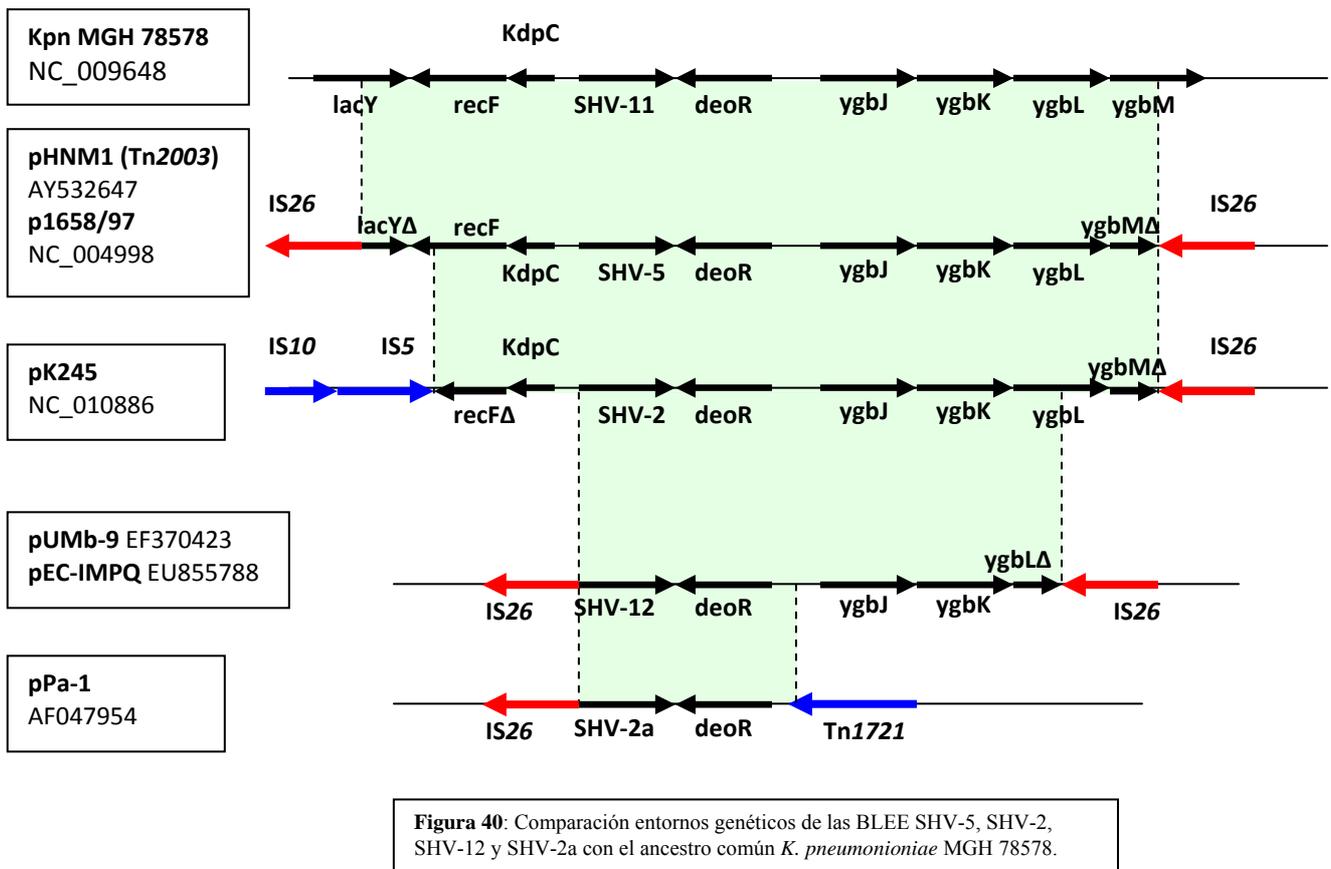
**Figura 38:** Entorno genético de (de arriba a abajo): *bla<sub>SHV</sub>-11* crmosómica de *K. pneumoniae* MGH78578, *bla<sub>SHV</sub>-12* plasmídica de MGH78578, *bla<sub>SHV</sub>-5* plasmídica de otras cepas estudiadas. (Ford, 2004)

En este trabajo estudian la secuencia completa de todas las *bla<sub>SHV</sub>* depositadas en GenBank. Reparando en las mutaciones silentes y en los entornos genéticos, concluyen que existen dos ramas evolutivas diferenciadas y separadas, pero ambas derivadas de la *bla<sub>SHV</sub>-1* y con origen en genoma cromosómico de *K. pneumoniae*. El responsable de la movilización de las *bla<sub>SHV</sub>* en ambas ramas es *IS26*, pero sucediendo en momentos diferentes. Las dos ramas que proponen son: una, la derivada de la ***bla<sub>SHV</sub>-1v1*** (denominan así a la primera forma de *bla<sub>SHV</sub>-1*) de la cual derivarían a su vez BLEEs plasmídicas como *bla<sub>SHV</sub>-2* y *bla<sub>SHV</sub>-5*; y otra, la rama ***bla<sub>SHV</sub>-1v2***, de la que derivarían BLEEs como *bla<sub>SHV</sub>-2a* y *bla<sub>SHV</sub>-12*. La forma cromosómica *bla<sub>SHV</sub>-1v1* es probablemente el ancestro de la otra forma cromosómica *bla<sub>SHV</sub>-1v2* (figura 39). Es probable que las diferentes mutaciones que han dado lugar a las diferentes BLEEs desde sus progenitoras hayan ocurrido tras la movilización (Ford, 2004).



**Figura 39:** Árbol evolutivo para SHV (Ford, 2004)

Esta teoría coincide con los diferentes entornos genéticos descritos para las SHV plasmídicas más frecuentemente descritas: SHV-2 y SHV-5, y SHV-12 y SHV-2a. Si comparamos los entornos descritos para estas BLEE se encuentra, tomando como referencia la secuencia cromosómica del ancestro común *K. pneumoniae* MGH 78578 (GenBank accession NC\_009648) que existe una región común y coincidente, y que la diferencia radica en la posición de las *tnpA* de IS26, común para las SHV de cada rama y diferente respecto de la otra (figura 40)



En la figura podemos distinguir los siguientes genes rodeando a las *bla<sub>SHV</sub>*:

- *lacY*: lactosa permeasa
- *recF*: Posible ATP-asa (GenBank accession Protein AAS47047)
- *KdpC*: subunidad C de la ATP-asa transportadora de potasio del sistema de alta afinidad KDP.
- *deoR*: regulador transcripcional

- *ygbJ*: óxido-reductasa
- *ygbK*: RNAt-sintetasa
- *ygbL*: L-fuculosa-1-fosfato aldolasa, *fucA*, proteína que escinde la L-fuculosa-1-fosfato en dihidroxiacetona-fosfato y L-lactoaldehído.
- *ygbM*: endonucleasa

### 11.1. ENTORNO DE BLEEs SHV DERIVADAS DE LA RAMA $bla_{SHV-1v1}$ : $bla_{SHV-5}$ Y $bla_{SHV-2}$ .

En la movilización tanto de la  $bla_{SHV-2}$  como de la  $bla_{SHV-5}$  plasmídicas, se describen siempre asociadas de alguna forma al elemento **IS26**, y a pesar de haberse encontrado estas BLEEs en el extremo 5' de integrones (*Preston, 2004; Villa, 2000*), nunca se ha tenido evidencia de que estuviesen movilizadas de forma directa por el integrón.

#### 11.1.1. SHV-5

En las figuras 38 y 40 se relacionaba la estructura clásica para SHV plasmídicas como  $bla_{SHV-5}$  y  $bla_{SHV-12}$  con la de una cromosómica ( $bla_{SHV-11}$ ). En la figura 41 se detallan los entornos genéticos de varias de las  $bla_{SHV-5}$  publicadas. Se puede observar cómo efectivamente es frecuente el hallazgo del gen *recF* previo a la BLEE, indicando una estrecha relación entre los genes *recF* de estos plásmidos. La función exacta sigue siendo desconocida aunque se cree que puede contribuir a la movilización de  $bla_{SHV}$  a otros plásmidos a través de un proceso recombinatorio RecF (*Yu, 2006*), si bien existen otros autores que le asignan una función ATP-asa (*Garza-Ramos, 2009*: GenBank *accession* Protein AAS47047).

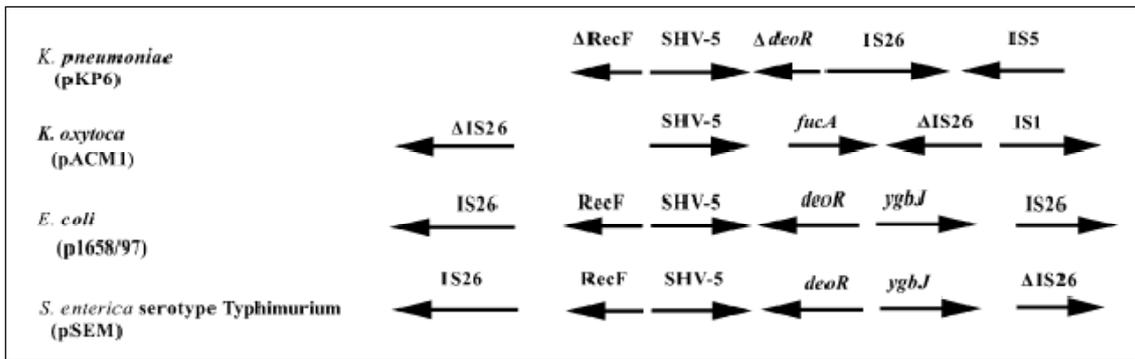


Figura 41: Entornos de *bla*<sub>SHV-5</sub> (Yu, 2006)

Otros genes hallados a continuación de *bla*<sub>SHV-5</sub> y citados tras la figura 40 incluyen: *deoR* y genes pertenecientes al operon *ygb*.

Una reciente publicación mejicana describe en el plásmido conjugativo **pHNM1** de una cepa clínica de *Enterobacter cloacae* asociada a un brote nosocomial, la misma estructura para *bla*<sub>SHV-5</sub> ya descrita en **pSEM** y **p1658/97** (GenBank *accession* NC\_004998), pero duplicada en *tandem* (figura 42) (Garza-Ramos, 2009). A cada “unidad” de transposón compuesto de dos copias de IS26 en la misma dirección y la vez opuesta a la de la SHV, la denomina **Tn2003** (GenBank *accession* AY532647).

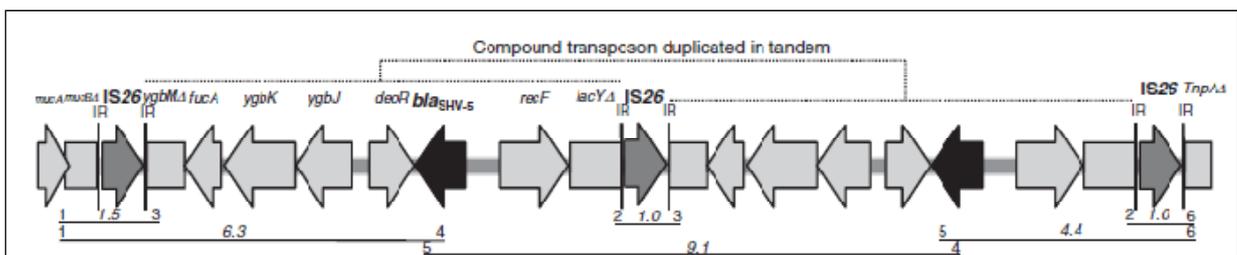


Figura 42: Entorno genético de *bla*<sub>SHV-5</sub> de pHNM1 (Garza-Ramos, 2009)

Son escasas las asociaciones entre grupos de incompatibilidad plasmídica y SHV-5. Un trabajo publicado en 1991 las asocia a grupo M (Jacoby, 1991) y en la secuencia de pHNM1 se puede observar el fragmento inc L/M (GenBank *accession* AY532647).

### 11.1.2. SHV-2

Las BLEE tipo SHV-2 pertenecen como ya se ha dicho a la misma rama evolutiva que las SHV-5. De tal manera, los entornos genéticos descritos para estas BLEE son altamente coincidentes con los hallados en los clásicos plásmidos portadores de SHV-5. Lo más importante a destacar de las SHV de esta rama en comparación con la otra, es la distancia que existe entre la TnpA de IS26 y la BLEE en cada grupo. Para las  $bla_{SHV-1v1}$  la distancia es mayor que la de las  $bla_{SHV-1v2}$  donde TnpA y SHV están una a continuación de la otra (figura 40). Algunos autores postularon la idea de que este hecho pudiese influir en la expresión y diseminación de las SHV de transposón corto (SHV-12 y SHV-2a) ya que en ellas el promotor -35, contenido en IRL de TnpA estaba a una distancia mucho más adecuada que en sus compañeras SHV-5 y SHV-2, transportadas en transposones de largo tamaño (Kim, 2002). Pero en un artículo de reciente publicación (Turner, 2009) se demuestra por PCR reversa a tiempo real del ARNm de estas SHV contenidas en transposón largo, que la expresión en ellas también está potenciada y que este hecho se debe a la existencia de una mutación en la secuencia -10 C→A (Turner, 2009).

Uno de los plásmidos descritos conteniendo SHV-2 es el **pK245** de una cepa de *K. pneumoniae*, portadora además de un gen *qnrS* (Chen, 2006). La estructura del entorno genético de esta SHV-2 está detallada en la figura 40. En la secuencia depositada para este plásmido (GenBank accession NC\_010886) se puede observar cómo es totalmente coincidente con el de los plásmidos SHV-5, de no ser por una inserción en el extremo 3' de sendas IS5 e IS10 que truncan *recF* prácticamente a mitad del gen. Existe otra secuencia depositada para una SHV-2; pertenece a una *Shigella* sp (GenBank accession AF282921) y coincide, hasta las IS con la de pK245.

Las SHV-2 se han descrito habitualmente en cepas de *K. pneumoniae* asociadas a plásmidos del grupo de incompatibilidad **A/C** (Hrabak, 2009; Jacoby, 1991).

## 11.2. ENTORNO DE LAS BLEE SHV DERIVADAS DE $bla_{SHV-1v2}$ : $bla_{SHV-2a}$ Y $bla_{SHV-12}$ .

En cuanto a los entornos genéticos de las BLEE derivadas de  $bla_{SHV-1v2}$ , también se describen siempre vehiculadas por IS26.

### 11.2.1. SHV-2a

De  $bla_{SHV-2a}$ , uno de los entornos descritos es el que se muestra en la figura 43 para el plásmido recombinante **pPL20** de una *Pseudomonas aeruginosa*, similar al descrito en otras *K. pneumoniae* (**pMPA2a**), pero truncado en este caso por un Tn1721 (Naas, 1999). En el artículo sitúan los promotores -35 y -10 que emplea la  $bla_{SHV-2a}$  en su expresión (GenBank *accession* AF074954 y AM988779).

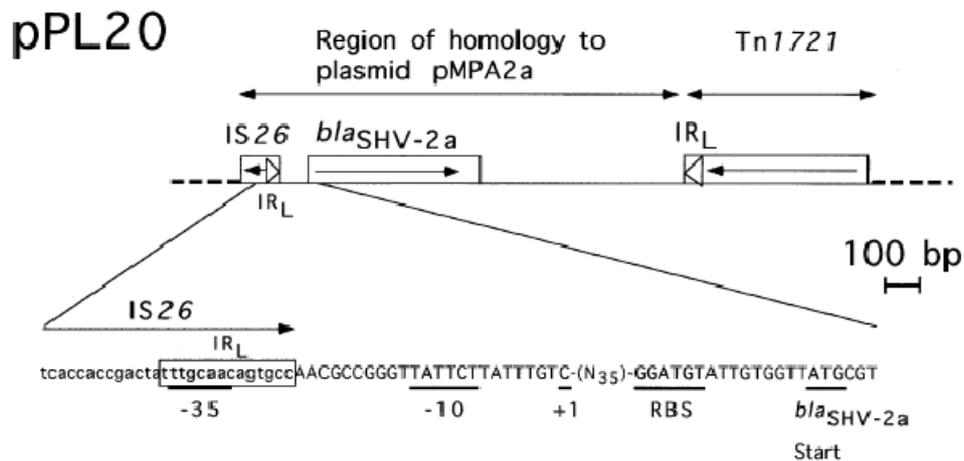


Figura 43: Entorno genético de  $bla_{SHV-2a}$  de pPL20 (Naas, 1999)

Recientemente se ha descrito una estructura idéntica pero en una cepa de *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (STYM61/9) y para otra SHV pero de la misma rama evolutiva, **bla<sub>SHV-12</sub>**. La estructura IS26-**bla<sub>SHV-12</sub>**-*deoR* se ve también truncada por un Tn1721. El plásmido de esta cepa, **p61.9** (GenBank *accession* FJ790886), transporta otros genes de resistencia como *qnrB19*, *bla<sub>TEM-1</sub>* y *aphI* (Dionisi, 2009).

### 11.2.2. SHV-12

El entorno más frecuente para **bla<sub>SHV-12</sub>** ha sido el publicado en el plásmido de *K. pneumoniae* **MGH78578** (<http://genome.wustl.edu>) (figura 38), aunque una descripción más detallada de los genes de este entorno y su posición exacta se puede ver en el plásmido de *E. coli* **pUMB-9** (GenBank *accession* EF370423, datos no publicados). Tras *deoR* y *ygbJ*, se encuentran ***ygbK***, una proteína ARN-sintetasa no funcional con una delección de 14 pb, y ***ygbL***, en este caso truncado por la segunda copia de IS26. Otra estructura plásmídica idéntica a pUMB-9, sí publicada, es la del plásmido del grupo de incompatibilidad HI2 de un aislado clínico de *Enterobacter cloacae*, **pEC-IMPQ** (GenBank *accession* EU855788), cuya **bla<sub>SHV-12</sub>** se halla en un fragmento idéntico al de estas otras dos descripciones. Este plásmido transporta otros genes de resistencia como *qnrB2*, *bla<sub>IMP-8</sub>*, *bla<sub>TEM-1</sub>* y diversos genes casete integrados en integrones de clase 1 (Chen, 2009).

## 12. ENTORNOS GENÉTICOS DE BLEE TIPO TEM

Se conocen hasta 150 variantes de la  $\beta$ -lactamasa TEM que demuestran fenotipo BLEE ([www.lahey.org](http://www.lahey.org)). Todas ellas son variantes de TEM-1 y TEM-2 y están transportadas por tres transposones complejos relacionados: Tn1, Tn2/Tn2\* y Tn3, denominándose en conjunto Tn3-like. Estos transposones de clase II poseen IR de 38 pb y son capaces de transponer eficientemente bla<sub>TEM</sub> (Poirel, 2008).

Estos transposones incluyen, como se ha mencionado en la segunda parte de esta revisión, una transposasa *tnpA*, una resolvasa *tnpR*, unos determinados sitios de recombinación denominados *res*, situados justo antes del codón ATG de inicio de la resolvasa, y el gen bla<sub>TEM</sub> (figura 44):

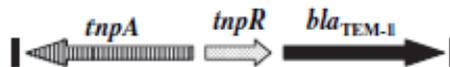


Figura 44: Tn3-like (Poirel ; 2008)

Estos tres transposones son prácticamente idénticos, concentrándose las diferencias dentro de la región *res*. El análisis de dichos sitios *res* es lo que concreta el tipo de transposón (Partridge, 2005). Es así como se diferencia entre Tn1 (GenBank accession L27758), Tn3 (GenBank accession V00613) y Tn2\* (GenBank accession AY123253). En la figura 45 se detallan los cambios para cada uno de los transposones.

B		3051		<i>resI</i>		3210	
Tn1	TGCC	TGACGGGCATT	TAGTAACATTTT	TGCAAC	CSTCCGAAATGTT	ATAAATTATCAGACA	TAGTAAAACGGCTTCGTTT
Tn2*	.....	.....	.....c.....	.....	.....a.....	.....g.....	.....t.t.a.a.a
Tn3	.....	.....-c-.....	.....tt.....	.....caac.....	.....	.....t.....	.....a.....
		<i>resII</i>		<i>resIII</i>		<i>tnpR</i>	
Tn1	GAGT	GTCCATTAAATCGTCATTTT	TGGCATAAATAGACA	CATCG	TGTCTGATATTCGATTTAAGGTACA	TTTT	ATGCGAATT
Tn2*	ata	.....t.....	.....a.a.....	ta	.....tgagt.....	.....	.....c.....
Tn3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

Figura 45: Sitios *res* en Tn3-like (Partridge, 2005)

El origen de la denominación Tn2\* proviene de una secuencia Tn3-like publicada en 2004 por los autores S. R. Partridge y R. M. Hall, donde describen en el plásmido **pRMH760** (GenBank *accession* AY123253) una estructura idéntica a la previamente depositada como Tn2 (GenBank *accession*: X54607), solo que para esta última se hallaba depositado únicamente la bla<sub>TEM</sub> y unas 200 pb previas a la misma. No incluía secuencia ni de la resolvasa completa, ni de los sitios *res* ni de la transposasa. Los autores denominan a esta “nueva” estructura ampliada Tn2\*, aunque apuntan que la suponen idéntica al transposón Tn2 anterior (*Partridge SR, 2004*).

Muchas de las estructuras genéticas actuales alrededor de bla<sub>TEM</sub> son consecuencia de inserciones en mitad de estos transposones, tal y como se ha visto en la descripción de otras BLEE (como por ejemplo el plásmido pC15-1a). No se han asociado nunca a integrones como genes casete, ni de forma directa a otros tipos de estructuras transponibles.

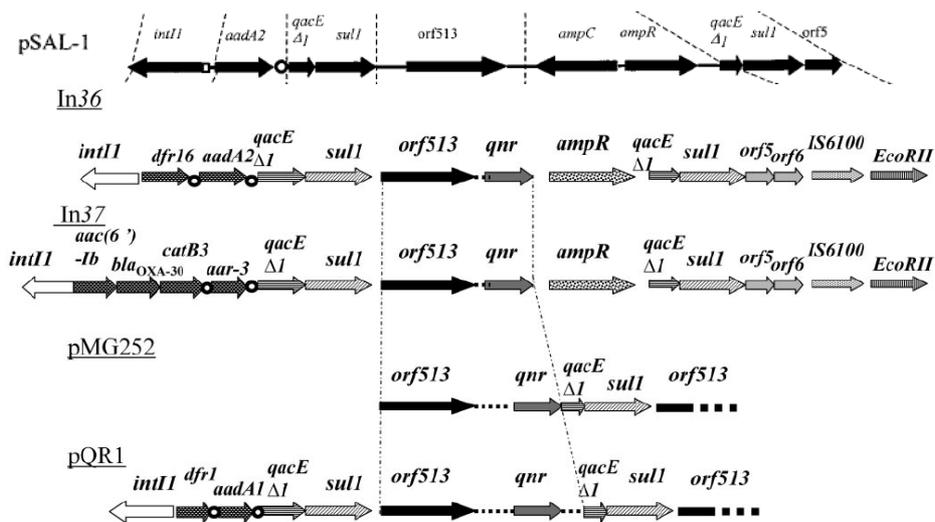
En cuanto a los grupos de incompatibilidad relacionados con BLEE tipo TEM, se han asociado, por ejemplo, las TEM-4 con grupo **C** (*Jacoby, 1991*), una de las TEM más frecuentes en nuestro medio.

### **13. ENTORNOS GENÉTICOS DE QNR**

Durante mucho tiempo se pensó que la transferencia plásmidica de resistencia a quinolonas no existía. El primer hallazgo demostrado fue en una cepa de *K. pneumoniae* (portadora del plásmido **pMG252**) que podía transmitir un nivel bajo de resistencia a quinolonas a otras enterobacterias (*Martínez- Martínez, 1998*). El gen transferido se denominó **qnr** (*Jacoby, 2005*).

### 13.1. ENTORNOS GENETICOS HABITUALES PARA QNR

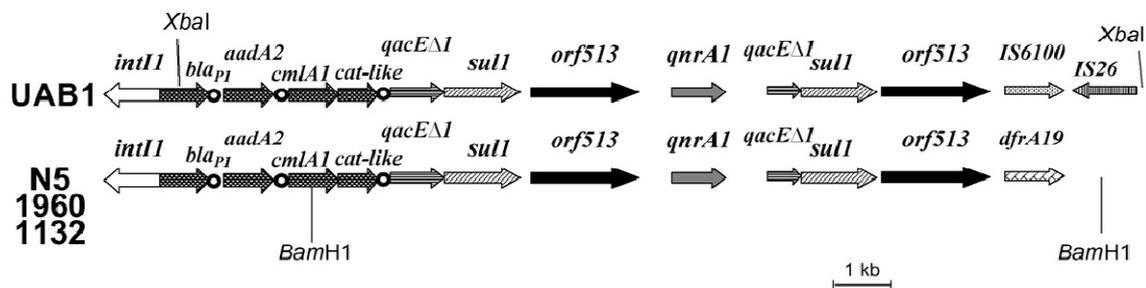
Las primeras descripciones del entorno genético que rodeaba a estos genes fue realizada por M. Wang y colaboradores en aislados clínicos de *E. coli* en China (Wang, 2003). Las estructuras que describieron mostraban al gen *qnr* incluido en integrones complejos de la familia In4, adyacentes a ISCR, y por delante de la segunda copia de 3'CS. Hallaron dos estructuras diferentes en función de los genes casete que se localizaban tras la integrasa: **In36 (pHSH1)** e **In37 (pHSH2)**. Una de las diferencias con la organización de **pMG252** radicaba en la secuencia tras *qnr*. La segunda copia de 3'CS estaba inmediatamente a continuación de *qnr* en pMG252, y en In36 e In37 un gen *ampR* se interponía entre *qnr* y 3'CS, recordando a la estructura del plásmido **pSAL-1** (figura 46). La primera descripción de transferencia plasmídica de quinolonas en Europa se hace en 2005 en un aislado de *E. coli* en Francia (Mammeri, 2005). El plásmido se denominó **pQR1** y poseía una organización idéntica a la descrita para pMG252. La estructura comparada de los entornos genéticos de *qnr* en estos cinco plásmidos se muestra en la figura 46:



**Figura 46:** Se muestran los genéticos de *qnr* para los plásmidos pHSH1 (In36) y pHSH2 (In37), pMG252 y pQR1 comparando con la de pSAL-1 (Wang, 2003; Mammeri, 2005)

La expresión de *qnr* depende de las secuencias promotoras -10 y -35 localizadas en *ISCR1* en su extremo derecho, en las 232 pb tras el final de la transposasa, corroborando no sólo la participación de esta secuencia en la movilización genética sino también en la expresión.

La secuencia del integrón conteniendo *qnrA1* en pMG252 (en la **cepa UAB1** aislada en 1994 en Alabama, EEUU) fue publicada en 2006 en EEUU (Robicsek, 2006), y en 2007 en España (Rodríguez-Martínez, 2007) pero esta vez junto con otras tres cepas de *K. pneumoniae* (N5, 1969 y 1132) no clonalmente relacionadas y aisladas en también en EEUU entre 1995-97. La estructura del integrón conteniendo *qnrA1* en UAB1 había sufrido algunos cambios en el tiempo que había transcurrido hasta su secuenciación en España. La determinada por A. Robicsek y colaboradores es idéntica a las cepas N5, 1969 y 1132. La determinada por J.M. Rodríguez-Martínez y colaboradores presenta tras la segunda copia de *ISCR1* la inserción completa de dos IS, *IS6100* e *IS26* (figura 47).



**Figura 47:** Comparación de las dos diferentes estructuras para estas 4 cepas (Rodríguez-Martínez, 2007)

Otros muchos trabajos corroboran estas estructuras genéticas: bien **tipo UAB1/pMG252**, con la segunda copia de 3'CS inmediatamente tras *qnr* y finalizados por *IS6100* ("tipo 1A"), bien **tipo N5, 1960 y 1132**, igual pero sin *IS6100* y en su lugar *dfrA19* ("tipo 1B"), o bien como **In36/37**, con la presencia de un gen *ampR* entre *qnr* y la segunda copia de 3'CS y sin un segundo *ISCR1* ("tipo 2"). En la tabla 10 se hace referencia al tipo de estructuras publicadas según estos modelos:

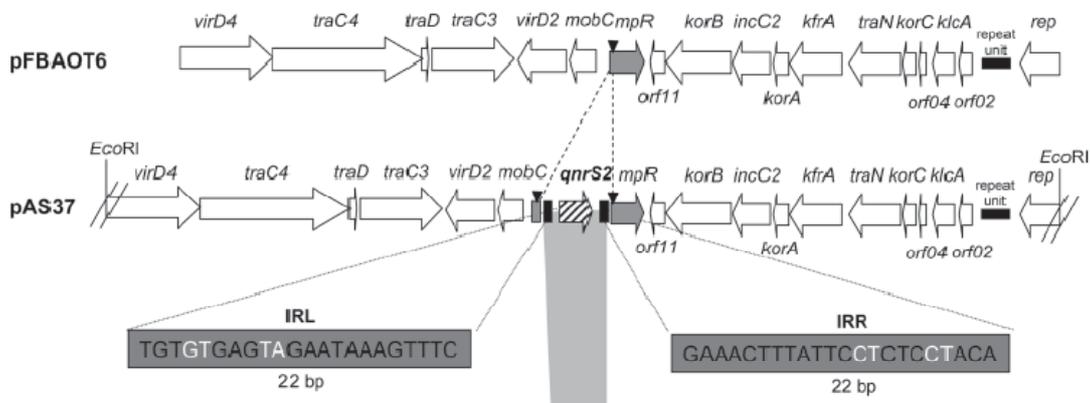
TABLA 10: ENTORNOS GENETICOS PARA QNR		
TRABAJO	PLÁSMIDO/GEN QNR	ESTRUCTURA TIPO
Garnier, 2006	<i>Salmonella enterica</i> ser. Keurmassar <b>qnrB2</b>	Tipo 1B
Chen, 2009	<i>Enterobacter cloacae</i> pEC-IMPQ/ <b>qnrB2</b>	Tipo 1B
Gutierrez, 2009	<i>Salmonella enterica</i> ser. Bredeney <b>qnrB2</b>	Tipo 1B*
Jeong, 2005	<b>Qnr</b>	Tipo 1B pero con <i>dfrA3b</i> .
Robicsek, 2005	<i>Enterobacter</i> sp. <b>qnrA</b>	Tipo 1.
Poirel, 2006	<i>E. coli</i> Cepa 1 <sup>a</sup> /1B <b>qnrA1</b>	Tipo 1
Shen, 2008	<i>K. pneumoniae</i> pKP96/ <b>qnrA1</b>	Tipo 2
Lavilla, 2008	Enterobacterias <b>qnrA1</b>	Tipo 2

\* Existe una importante delección que separa la secuencia anterior a *qnrB2* si se compara con pEC-IMPQ.

### 13.2. ENTORNOS GENETICOS NOVEDOSOS PARA QNR

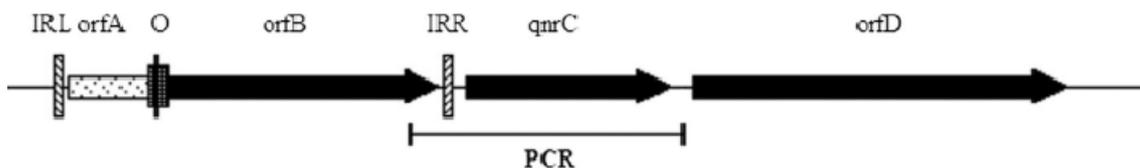
De entre las últimas publicaciones sobre entornos genéticos de *qnr*, se hallan ciertos casos que se salen de lo habitualmente descrito. El más llamativo es la descripción del entorno de un gen **qnrS2** en una cepa ambiental de *Aeromonas punctata* donde *qnrS2* forma parte de una estructura de 1.375 pb flanqueada por dos IR imperfectas de 22 pb y sus correspondientes DR

de 5 pb (figura 48), recordando a la estructura de un transposón, pero sin transposasa en el fragmento (Cattoir, 2008A). Dada la presencia de DR, la estructura parece haberse adquirido por transposición. De esta forma, lo descrito es así denominado **mic (mobile insertion cassette)**, esto es, como si fuese una IS pero sustituyendo la transposasa por un gen de resistencia. Lo que sí incluye este mic son sendas secuencias promotoras -35 y -10. Una estructura similar fue por primera y única vez descrita hasta la fecha para un gen fos (resistencia a fosfomicina) en una cepa de *Bacillus cereus* (de Palmenaer, 2004).



**Figura 48:** Comparación de la estructura del plásmido pFBAOT6 de una cepa de *Aeromonas punctata* vs. pA3S7 portador de *qnrS2*, insertado en medio de mpR (metalopeptidasa). Dos barras negras señalan las IR y dos triángulos pequeños las DR (CCTCC) (Cattoir, 2008A).

Otro caso excepcional corresponde al entorno de un **qnrC** de un aislado clínico de *P. mirabilis* (Wang, 2009). Este nuevo determinante *qnr* se halla por detrás de un nuevo elemento de la familia **IS3 ISPmi1** como se detalla en la figura 49.



**Figura 49:** ISPmi1 está comprendido entre las IRL e IRR marcadas. En su interior, orfA y orfB, solapados, contienen un centro activo DDE. orfA es una proteína tipo-amidasa. (Wang, 2009)

Por último, es novedosa la demostración de la movilización, que no de la expresión, de un gen *qnrB19* por un *ISEcp1C* en una aislado clínico de *E. coli* (Cattoir, 2008B) denominado los autores a esta estructura **Tn2012** (figura 50). El hecho de que *ISEcp1C* y *qnrB19* se hallen en direcciones opuestas es la razón por la que *ISEcp1C* no ejerza de promotor como en otras ocasiones.

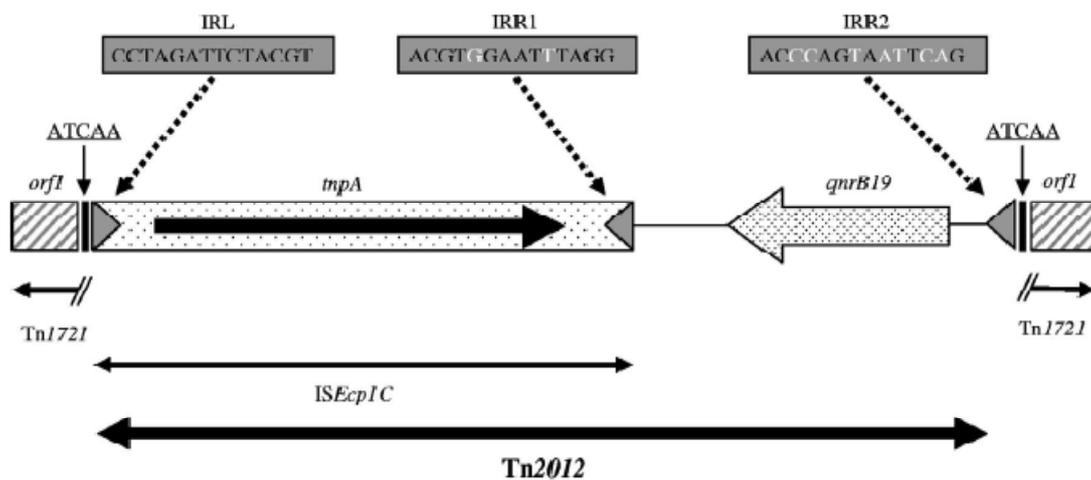
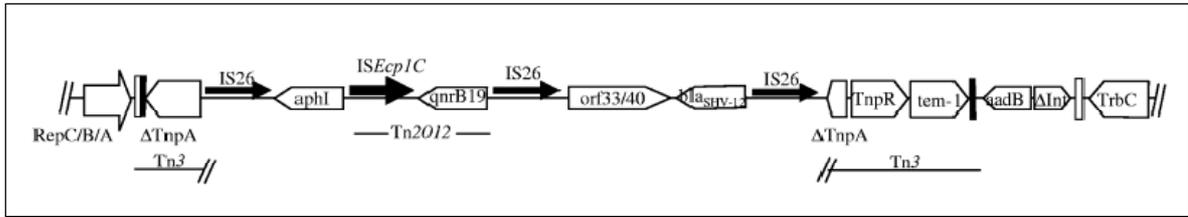


Figura 50: Tn2012 descrito por primera vez para *ISEcp1C* y *qnrB19* (Cattoir, 2008B)

Este mismo transposón Tn2012 fue hallado con posterioridad en una cepa de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium incluido en un Tn3 portador de *bla<sub>TEM-1</sub>* (Dionisi, 2009). Este Tn3 habría sido probablemente truncado en una primera fase por un par de IS26 portadoras del gen *aphI*. Posteriormente Tn2012 se inserta en medio de estas dos IS26 (figura 51). La presencia de IS26 atrae por último una *bla<sub>SHV-12</sub>* quedando así en el interior del Tn3 cuatro genes de resistencia: *aphI*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *qnrB19* y *bla<sub>SHV-12</sub>*. El *orf33* que los autores describen adyacente a la BLEE es coincidente con el Tn1721 que se interponía por delante de *bla<sub>SHV-2a</sub>* en *P. aeruginosa* (figura 43).



**Figura 51:** Estructura del plásmido p61/9 (Dionisi, 2009)

La presencia de IS26 e ISEcp1C en el interior de este Tn3 truncado puede facilitar la diseminación del fragmento a otros plásmidos o material cromosómico a otras especies contribuyendo más aún a la transferencia genética horizontal.

### 13.3. ENTORNOS GENÉTICOS EN CEPAS CON QNR PORTADORAS DE BLEE

Frecuentemente se ha detectado la presencia de BLEE en cepas portadoras al mismo tiempo de algún determinante *qnr*. En la tabla 11 se detallan algunas de las publicaciones existentes, en primer lugar aquellas que poseen número de acceso de secuencia en GenBank., tras ellas las que no.

TABLA 11: PUBLICACIONES DE AISLADOS QNR PORTADORES DE BLEEs		
COMBINACIÓN QNR + BLEE (GenBank <i>accession</i> )	MICROORGANISMO	CITA BIBLIOGRAFICA
<i>qnrA1</i> + VEB-1 (DQ091243)	<i>E. coli</i>	Poirel, 2006
<i>qnr</i> + CTX-M-14 (AY906856)	<i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis	Cheung, 2005
<i>qnrB2</i> + SHV-12 Plásmido pEC-IMPQ (EU855788)	<i>E. cloacae</i>	Chen, 2009
<i>qnrB19</i> + SHV-12 Plásmido p61/9 (FJ790886)	<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	Dionisi, 2009
<i>qnrB2</i> + SHV-12 Entorno descrito para <i>qnrB2</i> (EU643617)	<i>Salmonella enterica</i> ser. Bredeney	Gutierrez, 2009
<i>qnrA1</i> + CTX-M-24 Plásmido pKP96 (EU195449)	<i>K. pneumoniae</i>	Shen, 2008
COMBINACIÓN QNR + BLEE SIN REFERENCIA EN GENBANK.	MICROORGANISMO	CITA BIBLIOGRAFICA
<i>qnr</i> + SHV-7	<i>K. pneumoniae</i>	Wang, 2004
<i>qnrB2/B4</i> + SHV-12	<i>K. pneumoniae</i>	Pai, 2007
<i>qnrB4/B2</i> + CTX-M-14	<i>K. pneumoniae</i>	Yang, 2008
<i>qnrB6</i> + CTX-M-3	<i>K. pneumoniae</i>	Yang, 2008
<i>qnrB1/B2/S1</i> + CTX-M-15	<i>E. coli</i>	Damen, 2009
<i>qnrS1</i> + CTX-M-14	<i>E. coli</i>	Yang, 2008
<i>qnrB6</i> + CTX-M-3	<i>E. coli</i>	Yang, 2008

<i>qnrB2</i> + SHV-12/ CTX-M-15	<i>E. cloacae</i>	Damen, 2009
<i>qnrS1</i> + CTX-M-15/-3	<i>E. cloacae</i>	Damen, 2009
<i>qnrB4</i> + SHV-12	<i>E. cloacae</i>	Yang, 2008
<i>qnrB2</i> + CTX-M-15	<i>C. freundii</i>	Damen, 2009
<i>qnrB2</i> + SHV-2a	<i>C. freundii</i>	Damen, 2009
<i>qnrA1</i> + CTX-M-14	<i>C. freundii</i>	Yang, 2008
<i>qnrA1</i> + CTX-M-9 + SHV-12	<i>E. coli</i> <i>E. cloacae</i> <i>K. pneumoniae</i>	Lavilla, 2008
<i>qnrA6</i> + SHV-28/ CTX-M-15	<i>K. pneumoniae</i>	Damen, 2009
<i>qnrB1/B2</i> + SHV-28 + CTX-M-15	<i>K. pneumoniae</i>	Damen, 2009
<i>qnrA1</i> + CTX-M-14 + SHV-12	<i>E. cloacae</i>	Yang, 2008
<i>qnrA1</i> + CTX-M-9 + SHV-92	<i>K. pneumoniae</i>	Lavilla, 2008

## **MATERIAL Y METODOS**

## 1. SELECCIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas utilizadas para este trabajo provienen de la colección de cepas resultante de la Tesis Doctoral presentada en el presente Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología Médica de la Universidad de Salamanca por el Dr. Emilio D. Valverde Romero y dirigida por el Prof. Dr. José Angel García-Rodríguez y por el Dr. Juan Luis Muñoz Bellido. En ella se obtuvieron múltiples cepas productoras de una o varias BLEEs, incluyendo una asociada al gen de resistencia a quinolonas *qnr*, de un total de 156 cepas caracterizadas, todas ellas procedentes de aislados clínicos recogidos en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca durante el periodo 2001-2004.

Se seleccionaron **24 cepas** de diferente perfil, representativos de las especies y BLEEs más frecuentes en dicho estudio:

- De entre las cepas productoras de una **única BLEE**:

***E. coli***: 4 aislamientos productores de CTX-M 14, 5 de SHV-12, 2 de CTX-M 15, 1 de CTX-M 9.

***K. pneumoniae***: 3 aislamientos productores de SHV-2, 2 de SHV-12, 1 de una SHV inicialmente similar en los fragmentos secuenciados previamente a SHV-1, pero con perfil fenotípico de BLEE.

- De entre las **dobles productoras de BLEEs**:

***E. coli***: 2 aislamientos productores de CTX-M 14 + SHV-12, 1 de CTX-M 15 + SHV-12, 1 de CTX-M 9 + SHV-5.

***K. pneumoniae***: 1 aislamiento productor de SHV-2 + TEM-4

***K. oxytoca***: 1 aislamiento productor de CTX-M 9 + SHV-12, y portador además de un gen *qnrA1*.

A todas ellas se les extrajo ADN plasmídico con el sistema “WIZARD® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega Co., USA” y todas fueron sometidas a experimentos de conjugación. En caso de obtenerse transconjugante, se extraía nuevamente ADN plasmídico y se analizaba el entorno genético de la BLEE, o del gen *qnr* en su caso, en el plásmido transferido a la cepa receptora.

## 2. EXPERIMENTOS DE CONJUGACIÓN

El material específico para este experimento es el que sigue:

- Cepas seleccionadas y cepa receptora para experimentos de conjugación *E. coli* J53 Az<sup>R</sup>
- Paneles de identificación y microdilución **MIC Gram Negativos**, del Sistema WIDER (Francisco Soria Melguizo, S.A.)
- Placas de agar Mac Conkey preparadas manualmente a una concentración de 100 mg/L de azida sódica (Sigma-Aldrich Co.) y 10 mg/L de ceftazidima (Ceftazidima Normon, polvo para solución inyectable)
- Stericup® Filter Units Millipore 0.45 µm
- Bomba de vacío.

La **cepa receptora** utilizada para los experimentos de conjugación, *E. coli* J53 Az<sup>R</sup>, se emplea también habitualmente en otros trabajos relacionados publicados con estudios de conjugación (Jacoby, 1996). Esta cepa presenta un perfil bioquímico determinado en cuanto a la acidificación de carbohidratos en los paneles WIDER empleados en la identificación de las cepas de este estudio. Acidifica: sorbitol, rhamnosa, arabinosa y melódica, y se muestra inactivo frente a rafinosa, inositol, adonitol y sacarosa. Es sensible a todos los antimicrobianos

analizados por este sistema, aunque se caracteriza por ser resistente a azida sódica (CIM = 250 µg/mL). Requiere metionina y prolina.

Para el desarrollo del proceso, se inoculan sendas suspensiones en tubo de cepa donadora y receptora en caldo nutritivo común a 37°C toda la noche con agitación suave. Al día siguiente se inoculan, en un tubo con 5 mL de caldo, ambas suspensiones en una proporción 1:10 (donadora/receptora) y se incuban a 37°C sin agitación. Se probó también la proporción 1:1 descrita en algunos otros estudios (*Wang, 2004*), obteniéndose resultados similares. Al cabo de 24 horas, esta mezcla se filtra utilizando los soportes Millipore conectándolos a una bomba de vacío, que ejerce la fuerza de succión. A continuación la membrana se retira y se incuba sobre el agar de una placa Chocolate-PolyViteX (bioMeriéux) toda la noche. Tras este periodo, la membrana se introduce en un cono de 50 mL de volumen, conteniendo aproximadamente 10 mL de caldo nutritivo. Se agita vigorosamente para desprender todas las UFC de la superficie del filtro y se centrifuga. Para poder seleccionar las cepas receptoras que hayan adquirido el plásmido que confiere resistencia (en este caso a β-lactámicos) se siembra el sedimento en las placas con azida y ceftazidima preparadas previamente. Se incuban hasta 48 horas a 37°C. Las colonias que crecen en este medio selectivo se identifican utilizando los paneles WIDER y se verifica que el perfil bioquímico pertenezca al *E. coli* J53 Az<sup>R</sup> y que la sensibilidad antibiótica corresponda a una cepa productora de β-lactamasa de espectro extendido.

### **3. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMIDICO**

Para las extracciones de ADN plasmídico se utilizó el sistema comercial: “WIZARD® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega Co., USA”, en el modo “Extracción por

centrifugación” según las instrucciones del fabricante. Todos los reactivos necesarios son proporcionados en cada *kit* comercial.

Para ello era necesario que cada cepa se inoculase en un tubo con caldo nutritivo y se dejase incubando a 37°C toda una noche con agitación, hasta alcanzar una densidad óptica ( $A_{600}$ ) de entre 2 y 4. A continuación se centrifugaba 5 minutos a 10.000 g, se eliminaba el sobrenadante y se resuspendía el *pellet* con uno de los reactivos comerciales proporcionados (*Cell Suspension*). Siguiendo los pasos del fabricante, se añadía proteasa alcalina, separando posteriormente el producto de la lisis por microcentrifugación. Es este sobrenadante resultante el que hay que hacer pasar por las columnas Wizard® SV Minicolumns que separan el ADN plasmídico. El material genético obtenido se conserva congelado a -20°C.

#### **4. AMPLIFICACIÓN POR PCR Y ELECTROFORESIS EN GEL**

Para realizar las amplificaciones pertinentes se utilizó el siguiente material específico:

- Oligonucleótidos a modo de *primers* utilizados
- **PCR Master Mix 2x** (Promega, USA)
- **FideliTaq™ PCR Master Mix (2x)** (USB Corporation, USA)
- Termocicladores programables

## 4.1 OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS

### 4.1.1 Grupos de incompatibilidad

Para caracterizar los plásmidos presentes en las cepas de este trabajo en función de su grupo de incompatibilidad, se utilizó un método de tipificación de replicones basado en el análisis de dianas específicas por PCR, que determina 18 de los más predominantes grupos en enterobacterias (Carattoli, 2005). Estas 18 parejas de oligonucleótidos (F, *forward*, *primer* directo; R, *reverse*, *primer* reverso) de las tablas 12-19 se dirigen a genes implicados en la replicación plasmídica o su control y que se correlacionan con 18 grupos de incompatibilidad diferentes: HI1, HI2, I1/I $\gamma$ , X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FII<sub>s</sub>, F<sub>repB</sub>, B/O y K. Consta de 5 PCR múltiples y 3 sencillas:

- PCR Múltiple nº1: HI1, HI2, I1/I $\gamma$

TABLA 12. PCR MÚLTIPLE Nº1.				
INC	SECUENCIA 5' – 3'	DIANA	GENBANK ACCESSION	PESO
HI1-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	parA/B	AF250878	471
HI1-R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			pb
HI2-F	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	iterons	BX664015	644
HI2-R	GGCTCACTACCGTTGTCATCC			pb
I1/I $\gamma$ -F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	iARN	M20413	139
I1/ I $\gamma$ -R	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			pb

- PCR Múltiple nº2: X, L/M, N.

TABLA 13. PCR MÚLTIPLE Nº2.				
INC	SECUENCIA 5' – 3'	DIANA	GENBANK ACCESSION	PESO
X-F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	ori $\gamma$	Y00768	376
X-R	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC			pb
L/M-F	GGATGAAAACATATCAGCATCTGAAG	repA,B,C	U27345	785
L/M-R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			pb
N-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	repA	NC003292	559
N-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			pb

- PCR Múltiple nº3: FIA, FIB, W.

TABLA 14. PCR MÚLTIPLE Nº3.				
INC	SECUENCIA 5' – 3'	DIANA	GENBANK ACCESSION	PESO
FIA-F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	iterons	J01724	462
FIA-R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			pb
FIB-F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	repA	M26308	702
FIB-R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			pb
W-F	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	repA	U12441	242
W-R	GGTGCGCGGCATAGAACCGT			pb

- PCR Múltiple nº4: Y, P, FIC.

TABLA 15. PCR MÚLTIPLE Nº4.				
INC	SECUENCIA 5' – 3'	DIANA	GENBANK ACCESSION	PESO
Y-F	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	repA	K02380	765p
Y-R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT			b
P-F	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	iterons	M20134	534p
P-R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			b
FIC-F	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	repA2	AH003523	262p
FIC-R	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			b

- PCR Múltiple nº5: A/C, T, FII<sub>s</sub>

TABLA 16. PCR MÚLTIPLE Nº5.				
INC	SECUENCIA 5' – 3'	DIANA	GENBANK ACCESSION	PESO
A/C-F	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	repA	X73674	465
A/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			pb
T-F	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	repA	K00053	750
T-R	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			pb
FII <sub>s</sub> -F	CTGTGTAAGCTGATGGC	repA	AE006471	270
FII <sub>s</sub> -R	CTCTGCCACAAACTTCAGC			pb

- PCR nº6: F<sub>RepB</sub>

TABLA 17. PCR SENCILLA Nº6.				
INC	SECUENCIA 5' – 3'	DIANA	GENBANK ACCESSION	PESO
F <sub>RepB</sub> -F	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	iARN/	AY234375	270
F <sub>RepB</sub> -R	GAAGATCAGTCACACCATCC	repA		pb

- PCR nº7: K

TABLA 18. PCR SENCILLA Nº7.				
INC	SECUENCIA 5' – 3'	DIANA	GENBANK ACCESSION	PESO
K/B-F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	iARN	M93063	160 pb
K-R	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA			

- PCR nº8: B/O

TABLA 19. PCR SENCILLA Nº8.				
INC	SECUENCIA 5' – 3'	DIANA	GENBANK ACCESSION	PESO
K/B-F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	iARN	M28718	159 pb
B/O-R	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA			

Todas la PCR, exceptuando la nº6, se amplificaron con el siguiente ciclo de programas: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos combinados de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C, y un último ciclo a 72°C de 5 minutos. La PCR simple nº 6 siguió el mismo esquema solo que con una temperatura de anillamiento de 52°C. Para estas PCR se utilizó el producto *PCR MasterMix* (Promega Corporation, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 4.1.2 Entornos genéticos de BLEEs:

Todas las parejas de *primers* relacionadas con los entornos genéticos de BLEEs y *qnr* de este trabajo fueron amplificadas siguiendo un esquema de programación estándar para PCR:

- Ciclo inicial de 5 minutos a 95°C
- 30 ciclos combinados de: desnaturalización (30 segundos a 95°C), anillamiento (Tª según secuencia del oligonucleótido) y elongación, variando para cada caso tanto la

temperatura de unión de los *primers*, ajustándola para cada pareja entre 3 y 5°C por debajo de la obtenida de la siguiente fórmula:  $2 \times (\text{n}^\circ \text{ de A} + \text{n}^\circ \text{ T}) + 4 \times (\text{n}^\circ \text{ de C} + \text{n}^\circ \text{ de G})$ , como el tiempo de elongación, que varió en función del tamaño esperado del amplificado: 30 segundos para tamaños  $\leq 1000$  pb y un minuto si 1000 – 1500 pb.

- Ciclo final de elongación de 5 minutos a 72°C.

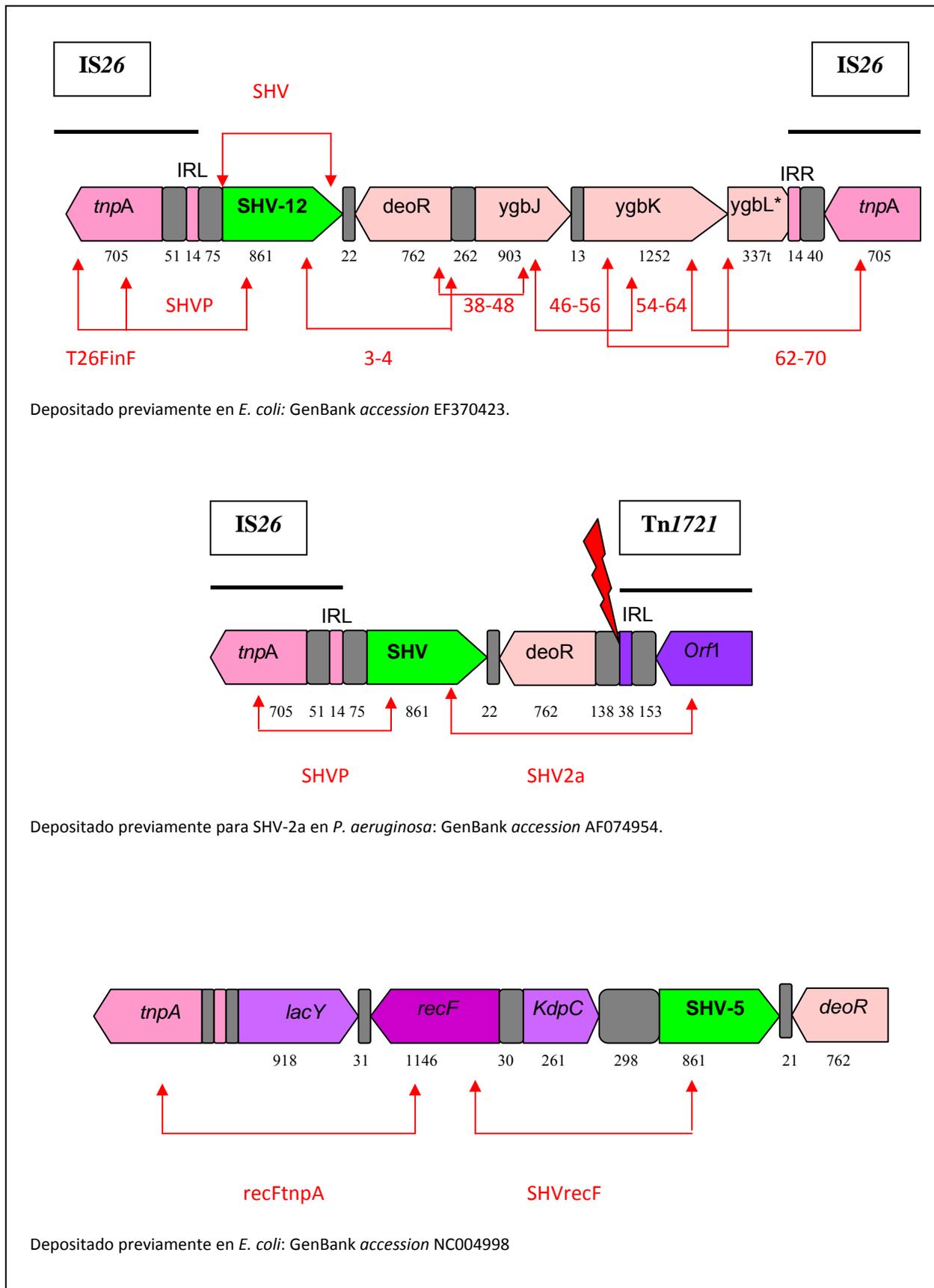
Para tamaños esperados de amplificados de hasta 1500 pb se utilizó **PCR MasterMix**. Si el tamaño esperado era superior a 1500 pb se utilizaba el producto **FideliTaq™**. Siempre que se usara este segundo producto, la temperatura de elongación tenía que ser de 68°C.

### **PRIMERS BLEE SHV**

Los *primers* utilizados para el **entorno genético de bla<sub>SHV</sub>** se muestran en la tabla 20. En la figura 52 se presentan de forma esquemática las piezas genéticas implicadas, indicando con flechas rojas los puntos aproximados de anclaje de cada *primer* en el gen correspondiente. Las secuencias intermedias no codificantes se representan en color gris. Debajo de cada gen se encuentra el dato numérico de pares de bases (pb) de cada uno de los genes.

TABLA 20: ENTORNO DE $bla_{SHV}$				
IS26 y Tn1721.				
NOMBRE		NOMBRE		PESO
PRIMER F	SECUENCIA 5' – 3'	PRIMER R	SECUENCIA 5' – 3'	pb
(GENBANK)		(GENBANK)		aprox
<b>SHV F</b> (EF370423)	ATGCGTTATATTCGCCTGTG Posición 1/861 en $bla_{SHV}$	<b>SHV R</b> (EF370423)	TTAGCGTTGCCAGTGCTCT Posición 861/861 en $bla_{SHV}$	861 pb
<b>SHVP F</b> (EF370423)	CGGTAAATCGTGGAGTGA Posición 560/705 en <i>tnpA</i> de IS26	<b>SHVP R</b> (EF370423)	AGGTGCTCATCATGGGAA Posición 202/861 en $bla_{SHV}$	487 pb
<b>T26FIN F</b> (EF370423)	GCCTTTGCGTAGTGCA Posición 77/705 <i>tnpA</i> de IS26	<b>SHVP R</b> (EF370423)	AGGTGCTCATCATGGGAA Posición 202/861 en $bla_{SHV}$	970 pb
<b>3-4 F</b> (EF370423)	GGCCCGAATAACAAAGCA Posición 753/861 en $bla_{SHV}$	<b>3-4 R</b> (EF370423)	GTGACGCCTGGTGTGA Posición +37 tras <i>deoR</i>	930 pb
<b>38-48 F</b> (EF370423)	GGATGGTCATATGGGACA Posición 654/762 en <i>deoR</i>	<b>38 – 48 R</b> (EF370423)	CAACGGCGATGTGCA Posición 568/903 en <i>ygbJ</i>	938 pb
<b>46 – 56 F</b> (EF370423)	ACATTGGTCTTGGCACGA Posición 503/903 en <i>yjbJ</i> .	<b>46 – 56 R</b> (EF370423)	TCCTCCATCGGCGTCA Posición 446/1252 <i>ygbK</i> .	868 pb
<b>54 – 64 F</b> (EF370423)	CTGATCGAGCTGGGTGA Posición 304/1252 en <i>ygbK</i> .	<b>54 – 64 R</b> (EF370423)	CTCGCAGTTGTTGCTCA Posición 30/337 <i>ygbL</i> (truncado)	980 pb
<b>62 -70 F</b> (EF370423)	GGGTTGAGGCGTTCCA Posición 1101/1252 en <i>ygbK</i>	<b>62 – 70 R</b> (EF370423)	CTCTGCTCAAACGCGAA Posición 263/705 <i>tnpA</i> de IS26	920 pb

<b>SHVrecF F</b> (NC004998)	AGGTGCTCATCATGGGAA Posición 202/861 en bla <sub>SHV</sub>	<b>SHVrecF R</b> (NC004998)	CGTTAGGGCCGAAGACA Posición 1016/1146 de <i>recF</i>	919 pb
<b>recFtnpA F</b> (NC004998)	CAGCCAGATCTGGCTGA Posición 118/1146 de <i>recF</i>	<b>recFtnpA R</b> (NC004998)	GCCATTGACCTTCACGTA Posición 465/705 de tnpA de IS26	1330 Pb
<b>SHV2a F</b> (AF074954)	GGCCCGAATAACAAAGCA Posición 734/861 en bla <sub>SHV</sub>	<b>SHV2a R</b> (AF074954)	ATCGCCGAGCAAACGA Posición 495 de <i>orf1</i> de Tn1721	1560 pb

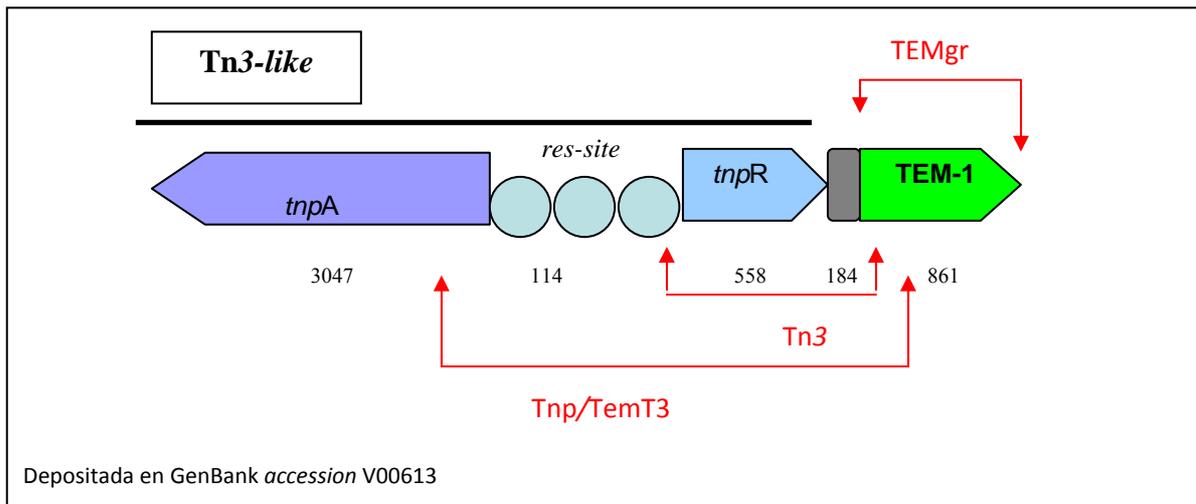


**Figura 52:** Figuras esquemáticas de los entornos de bla<sub>SHV</sub> hallados en las cepas de este trabajo. En rojo, los nombres de los primers. Las flechas indican de forma aproximada los puntos de anclaje.

**PRIMERS BLEE TEM**

Los *primers* utilizados para detectar el **entorno de bla<sub>TEM</sub>** se detallan en la tabla 21 y en la figura 53 se muestran de forma esquemática los puntos de anclaje de estos *primers*.

TABLA 21: ENTORNO DE bla <sub>TEM</sub>				
Tn3 like				
NOMBRE PRIMER F (GENBANK)	SECUENCIA 5' – 3'	NOMBRE PRIMER R (GENBANK)	SECUENCIA 5' – 3'	PESO PB
<b>TEM- grande F</b>	ATGAGTATTCAACATTTCCGT G Posición 1/861 en bla <sub>TEM</sub> .	<b>TEM- grande R</b>	TTACCAATGCTTAATCAGTG AG Posición 861/861 en bla <sub>TEM</sub> .	861 pb
<b>Tn3 F</b> (V00613)	CACGAATGAGGGCCGACAG GA Posición 375/558 en resolvasa Tn3.	<b>Tn3 R</b> (V00613)	ACCCAATCGTGACCCCAACT G Posición 129/861 en bla <sub>TEM</sub> .	500 pb
<b>TnpT3 F</b> (V00613)	CCCAGAAAACGCACACA Pos. 2820/3047 en <i>tnpA</i> /Tn3.	<b>TemT3 R</b> (V00613)	ACTGTCATGCCATCCGTA Posición 350/861 en bla <sub>TEM</sub> .	1450 pb

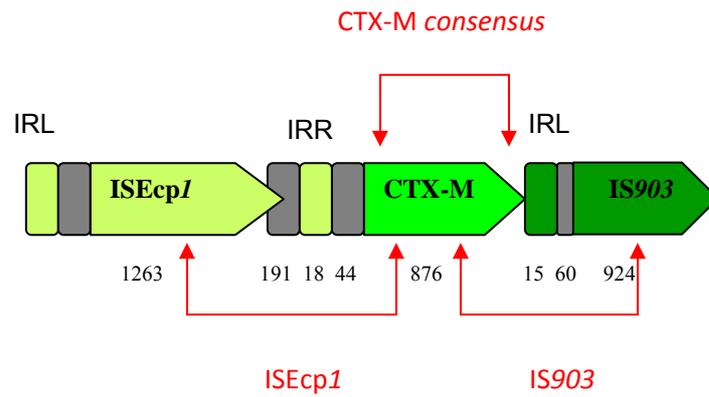


**Figura 53:** Figura esquemáticas de los entornos de  $bla_{TEM}$  hallados en las cepas de este trabajo. En rojo, los nombres de los *primers*. Las flechas indican de forma aproximada los puntos de anclaje.

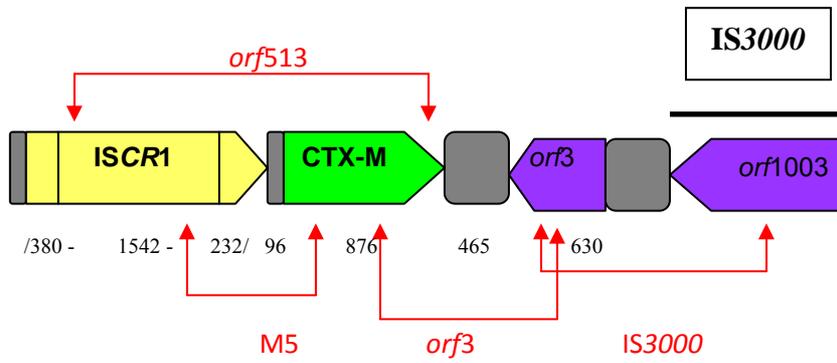
### **PRIMERS BLEE CTX-M**

Los *primers* utilizados para la determinación del **entorno genético** más inmediato de  $bla_{CTX-M}$  se presentan en la tabla 22, y en la figura 54 la representación esquemática de los genes y puntos de unión de los *primers*.

TABLA 22: ENTORNO DE BLA <sub>CTX-M</sub>				
ISCR1, ISEcp1, IS903, IS3000				
NOMBRE		NOMBRE		Peso
PRIMER F	SECUENCIA 5' – 3'	PRIMER R	SECUENCIA 5' – 3'	aprox
(GenBank)		(GenBank)		pb
<b>CTX-M F</b> <i>consensus</i>	SCSATGTGCAGYACCAGTAA Posición 208/876 en bla <sub>CTX-M</sub>	<b>CTX-M R</b> <i>consensus</i>	CCGCRATATGRTTGGTGGTG Posición 751/876 en bla <sub>CTX-M</sub>	543 pb.
<b>ISEcp1 F</b> (AJ972954)	CACCTCACAAGCAACGA Posición 720/1263 de ISEcp1	<b>CTX-M R</b> <i>consensus</i>	CCGCRATATGRTTGGTGGTG Posición 751/876 en bla <sub>CTX-M</sub>	1548 pb.
<b>orf513 F</b> (AF174129)	CTCGAAGCCCAAGGTCA Posición 130/1542 en transposasa de ISCR1.	<b>CTX-M R</b> <i>consensus</i>	CCGCRATATGRTTGGTGGTG Posición 751/876 en bla <sub>CTX-M</sub>	2500 pb.
<b>M5 F</b> (AF174129)	GTGAGCTGCCACCAGA Posición 1466/1542 en transposasa de ISCR1.	<b>M5 R</b> (AF174129)	CTGGTACTGCACATTGGA Posición 224/876 bla <sub>CTX-M</sub>	1200 pb
<b>CTX-M F</b> <i>consensus</i>	SCSATGTGCAGYACCAGTAA Posición 208/876 en bla <sub>CTX-M</sub> .	<b>IS903 R</b>	GCAACCTGACCATCGTA Posición 848/924 en IS903.	1600 pb
<b>CTX-M F</b> <i>consensus</i>	SCSATGTGCAGYACCAGTAA Posición 208/876 en bla <sub>CTX-M</sub> .	<b>orf3 R1</b> (EU687490)	GTTTCATCAGCCAGTTGCA Posición 529/630 de orf3.	1650 pb.
<b>orf3 F</b> (EU687490)	ATCAGCAAGATCGGCTGA Posición 371/630 de orf3.	<b>orf3 R2</b> (EU687490)	CATTGACTGCTTCGCTCA Posición 1222/3018 orf1005.	2400 pb



Depositado en GenBank *accession* AJ972954.



Depositado en GenBank *accession* AF174129 y EU687490.

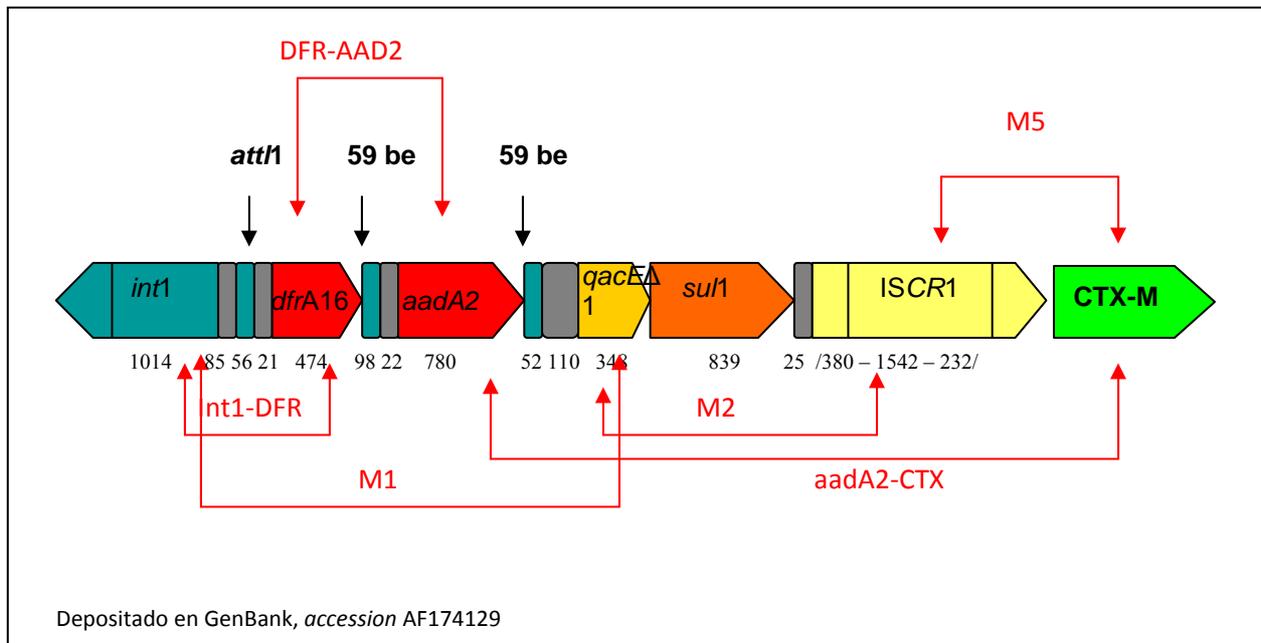
**Figura 54:** Figura esquemáticas de los entornos de  $bla_{CTX-M}$  hallados en las cepas de este trabajo. En rojo, los nombres de los *primers*. Las flechas indican de forma aproximada los puntos de anclaje.

### 4.1.3 Entornos genéticos de integrones de clase 1

Los integrones de clase 1 son habituales portadores de genes de resistencia, tanto por su capacidad para capturar genes en forma de genes casete como por la capacidad de la transposasa de ISCR que acompaña a los integrones compuestos, de insertar genes como son *bla<sub>CTX-M</sub>* y *qnr*. Los *primers* utilizados para los **integrones vinculados a *bla<sub>CTX-M</sub>*** se detallan en la tabla 23 y el esquema de los genes involucrados en la figura 55.

TABLA 23: INTEGRONES DE CLASE 1 LIGADOS A <i>BLA<sub>CTX-M</sub></i>				
NOMBRE <i>PRIMER F</i> (GenBank)	SECUENCIA 5' – 3'	NOMBRE <i>PRIMER R</i> (GenBank)	SECUENCIA 5' – 3'	PESO Pb
<b>M1 F</b> (AY259085)	AGCCTGTTCTGTTGTA Posición 907/1014 en <i>intl1</i> .	<b>M1 R</b> (AY259085)	TGCGATTACTTCGCCAA Posición 53/351 en <i>qacEd1</i>	1700 pb
<b>M2 F</b> (AY259085)	CGATCCCCATCGTGGAA Posición 307/351 en <i>qacEd1</i>	<b>M2 R</b> (AY259085)	TTGACCTTGGGCTTCGA Posición 130/1542 en transposasa transposasa de ISCR1.	1450 pb
<b>Intl F</b> (AY259085)	TTCGCTGCTGCCAA Posición 835/1014 en <i>intl1</i> .	<b>DFR 16 R</b> (AY259085)	TTTGGCGCTCCATGGA Posición 78/473 de dihidrofolato reductasa <i>dfrA16</i>	308 pb
<b>Dfr16 F</b> (AY259085)	CGCTCTCCCAAATCGAA Posición 156/473 de <i>dfrA16</i>	<b>AAD2 R</b> (AY259085)	TCAAGTAAGACGGGCTGA Posición 665/780 de aminoglicósido- adeniltransferasa <i>aadA2</i> .	1100 pb

<b>AAD2CTX F</b> (AF174129)	GCTTTGTGAAAGGCGAGA Posición 740/780 de <i>aadA2</i>	<b>AAD2CTX R</b> (AF174129)	CGAACATCATCCGTTGCA Posición 17/876 de <i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	3670 pb
<b>M5 F</b> (AF174129)	GTGAGCTGCCACCAGA Posición 1466/1542 en transposasa de <i>ISCR1</i> .	<b>M5 R</b> (AF174129)	CTGGTACTGCACATTGGA Posición 224/876 <i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	1200 pb
<b>AAD2 F</b>	TTGGTTACTGTGGCCGTA Posición 139/780 de <i>aadA2</i> .	<b>AAD2 R</b>	TCAAGTAAGACGGGCTGA Posición 665/780 de <i>aadA2</i> .	527 pb
<b>qacEd1 F</b>	TCGCAATAGTTGGCGAA Posición 29/351 en <i>qacEd1</i>	<b>qacEd1 R</b>	GAGCAAAAAGGCAGCAA Pos. 229/351 en <i>qacEd1</i>	200 pb
<b>sul1 F</b>	CTGCGAGTCGGATCAGA Posición 103/840 en <i>sul1</i>	<b>sul1 R</b>	AATAGCGGAAGCCCCAA Posición 617/840 en <i>sul1</i>	569 pb
<b>orf513 F</b>	CTCGAAGCCCAAGGTCAC Posición 130/1542 en transposasa de <i>ISCR1</i> .	<b>orf513 R</b>	GGGTGCCTTGACACGA Posición 645/1542 en transposasa de <i>ISCR1</i> .	516 pb



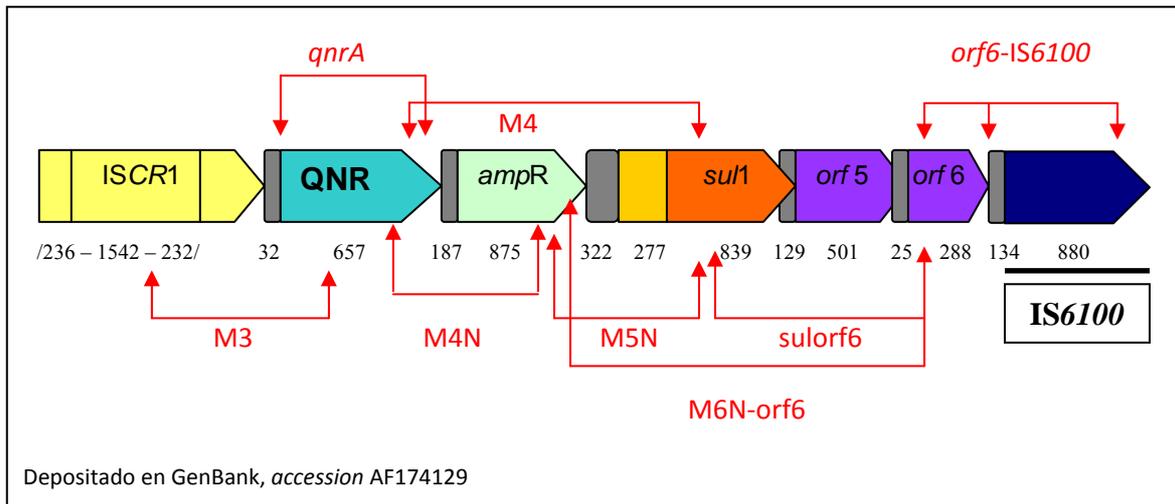
**Figura 55:** Figura esquemática de un *IntI1* frecuentemente vinculado a *bla<sub>CTX-M</sub>*. En rojo, los nombres de los *primers*. Las flechas indican de forma aproximada los puntos de anclaje. Se señala también los sitios *attI1* y *59be*.

#### 4.1.4 Entorno *qnr*:

Tomando como referencia la descripción del entorno genético de *qnr* en In36 e In37 (Wang, 2003) se elaboraron una serie de *primers* cuya combinación podía cubrir las secuencias adyacentes al determinante *qnr*. En la Tabla 24 se muestran estos oligonucleótidos y en la figura 56 la representación esquemática de los puntos de unión sobre estos genes próximos. Al haberse hallado el gen *qnr* habitualmente en **integrone de clase 1**, los *primers* utilizados para el primer segmento 3`CS son los reflejados en la tabla 24.

TABLA 24: ENTORNO DE QNRA1				
Int11, ISCR1, IS6100				
NOMBRE PRIMER F (GenBank)	SECUENCIA 5' – 3'	NOMBRE PRIMER R (GenBank)	SECUENCIA 5' – 3'	Peso aprox pb
<b>qnrA F</b> (AY259085)	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAG G: Posición 13/657 de <i>qnr</i>	<b>qnrA R</b> (AY259085)	TAACCTTTGCCGATCTGGAT Posición 536/657 de <i>qnr</i>	510 pb
<b>M3 F</b> (AY259085)	GTGAGCTGCCACCAGA Posición 1466/1542 en transposasa de ISCR1.	<b>M3 R</b> (AY259085)	CAGGTTGCAACCTGAGA Posición 372/657 de <i>qnr</i>	720 pb
<b>M4 F</b> (AY259085)	AGATCTGTGCCTGGCAA Posición 593/657 de <i>qnr</i>	<b>M4 R</b> (AY259085)	GAAACACGGTGCATCTGA Posición 237/840 de <i>sul1</i>	2000 pb
<b>M4 F</b> (AY259085)	AGATCTGTGCCTGGCAA Posición 593/657 de <i>qnr</i>	<b>M4N R</b> (AY259085)	CCGCCGTATTCAGCA Posición 868/876 de <i>ampR</i>	1100 pb
<b>M5N F</b> (AY259085)	GTCAGGCGCACTGGTA Posición 741/876 de <i>ampR</i>	<b>M5N R</b> (AY259085)	GGTCCGACATCCACGA Posición 137/840 de <i>sul1</i> .	850 pb

<b>M6N F</b> (AY259085)	GCGGTTACAGTCCCGTA Posición 876/801 de <i>ampR</i>	<b>sulorf6 R</b> (AY259085)	GGTCGGACTGCAAGTGA Posición 50/288 en <i>orf6</i>	2200 pb
<b>sulorf6 F</b> (AY259085)	CGGAAACCCTCGCGAA Posición 779/840 de <i>sul1</i>	<b>sulorf6 R</b> (AY259085)	GGTCGGACTGCAAGTGA Posición 50/288 en <i>orf6</i>	750 pb
<b>IS6100 F</b> (AY259085)	ACCAAGTTGATTGGGCGTA Posición +35 tras final de <i>orf6</i>	<b>IS6100 R</b> (AY259085)	CGAAATGGTGGTTGAGCA Posición 812/880 en IS6100	
<b>orf6 F</b> (AY259085)	TCCATCATCAACCCTGGA Posición 93/288 de <i>orf6</i>			



**Figura 56:** Figura esquemáticas de la parte correspondiente a *qnr* en un integrón compuesto de clase I. En rojo, los nombres de los *primers*. Las flechas indican de forma aproximada los puntos de anclaje.

## 4.2 DETECCIÓN Y SECUENCIACION DE LOS AMPLIFICADOS

Para la **detección** de los amplificados se utilizó la **electroforesis en gel de agarosa**, incorporando como agente colorante bromuro de etidio, que revela la presencia de las bandas de ADN al ser expuesto a luz ultravioleta de onda corta (310 nm).

Tras la amplificación por PCR, permanecen en la mezcla de reacción junto con las copias del amplificado muchos dNTPs y oligonucleótidos sin consumir. Todos estos restos pueden interferir en la posterior reacción de secuenciación. Para evitarlo, antes de preparar los viales para secuenciar, se utilizó un preparado comercial que hidroliza todos estos restos de ADN utilizando enzimas hidrolíticas, una exonucleasa y fosfatasa alcalina (**ExoSAP-IT<sup>®</sup>, USB Corporation, USA**) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello es necesario incubar en termociclador la mezcla a 37°C durante 15 minutos y a continuación 15 minutos más a 80°C.

Para **secuenciar** todos los amplificados resultantes de este trabajo se enviaron las muestras al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. La reacción allí utilizada es marcaje con fluorocromos. El Servicio de Secuenciación devolvía una secuencia en forma de cromatograma, que era interpretado y analizado utilizando el programa informático Chromas.exe para desvelar la lectura de la secuencia, el programa BLAST disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> para comparar las secuencias obtenidas con las depositadas en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (NCBI, National Center for Biotechnology).

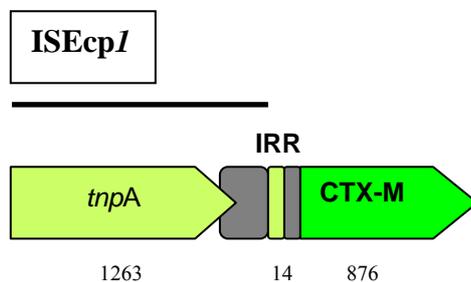
## **RESULTADOS**

## 1. CEPAS PORTADORAS DE UNA ÚNICA BLEE

De las 24 cepas seleccionadas, 18 aislamientos correspondían a enterobacterias portadoras de una única BLEE, 12 *E. coli* y 6 *K. pneumoniae*, cuyos entornos se describen a continuación.

### 1.1. CEPAS PORTADORAS DE $bla_{CTX-M-14}$ O $bla_{CTX-M-15}$ , ASOCIADAS A *ISEcp1*

4 aislamientos de *E. coli* eran portadores de  $bla_{CTX-M-14}$  y 2 de  $bla_{CTX-M-15}$ , ubicadas éstas tras la transposasa del elemento *ISEcp1* (Figura 57). Ninguna cepa era portadora de la mutación que implica el cambio aminoacídico publicado para la transposasa *ISEcp1B* (Poirel, 2005). No resultó tampoco para ninguna de las  $bla_{CTX-M-14}$  el enlace de la BLEE con la transposasa de la secuencia de inserción *IS903*, frecuentemente descrita a continuación de las mismas (Eckert, 2006; Lartigue, 2004).



**Figura 57:** Representación del entorno genético de la  $bla_{CTX-M-14}$  y  $bla_{CTX-M-15}$  de las cepas 32B, 40, 42, 54 y 100.

Los detalles de cada una de estas 6 cepas se describen a continuación:

- 1.1.1.** *E. coli* (cepas nº 32B, 40 y 42) portadores de  $bla_{CTX-M-14}$  y *E. coli* (cepa nº 54) portador de una  $bla_{CTX-M-15}$ .

En ninguno de los cuatro casos se obtuvo transconjugante. La  $bla_{CTX-M}$  se halló en todas tal y como se describe en la figura 66. Las CIMs se exponen en la tabla 25:

TABLA 25: CEPAS 32B, 40, 42 Y 54.				
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)	CIM (mg/L)	CIM (mg/L)	CIM (mg/L)
	Cepa 32B	Cepa 40	Cepa 42	Cepa 54
Ceftazidima	2	2	<=1	>16
Cefotaxima	>8	>8	>8	>8
Cefepima	16	16	2	>16

Las 3 cepas de *E. coli* portadoras de  $bla_{CTX-M-14}$  resultaron positivas para la amplificación del grupo de incompatibilidad plasmídica **K** (Diestra, 2009; Valverde, 2009), y la cepa nº 54, portadora de  $bla_{CTX-M-15}$  del grupo **F** (Diestra, 2009) tal y como suele recogerse en otros trabajos publicados.

#### 1.1.2. *E. coli* (cepa nº100) portadora de $bla_{CTX-M-14}$ y $bla_{TEM-1}$ .

No se obtuvo transconjugante para la cepa 100. En ella la  $bla_{CTX-M-14}$  también se hallaba tras un *IsEcp1* y se detectó el grupo de incompatibilidad **K** al igual que para las tres anteriores cepas. No resultó ninguna de las combinaciones probadas en este trabajo para el entorno de  $bla_{TEM-1}$ . Las CIMs de la cepa original están en la tabla 26:

Tabla 26: Cepa 100	
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)
Ceftazidima	2
Cefotaxima	>8
Cefepima	16

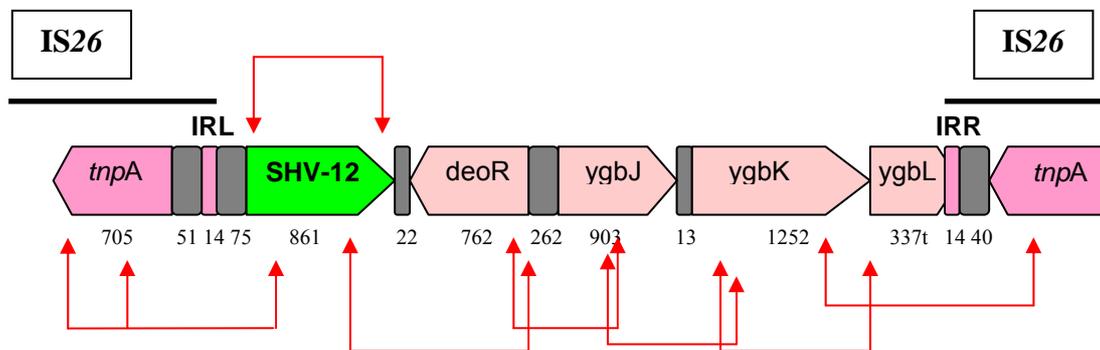
**1.1.3. *E. coli* (cepa nº 51) portador de una  $bla_{CTX-M-15}$ .**

No resultó el intento de vincular la  $bla_{CTX-M-15}$  de la cepa 51 a un *ISEcp1*. Es probable que otra estructura trunque la estructura, tal y como se ha descrito en la Revisión de este trabajo (figura 27). No resultó la amplificación utilizando como *primer* F *tnpA* de IS26 como otros casos descritos (Eckert, 2006) en ninguna de las dos direcciones. Tampoco se obtuvo transconjugante. Esta cepa era portadora de algún plásmido del grupo de incompatibilidad **F**, como su homóloga, la cepa nº 54. Las CIMs se muestran en la tabla 27:

TABLA 27: CEPA 51	
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)
Ceftazidima	>16
Cefotaxima	>8
Cefepima	>16

## 1.2. CEPAS PORTADORAS DE UNA $bla_{SHV-12}$ MOVILIZADA POR UN TN COMPUESTO FORMADO POR DOS ELEMENTOS IS26

De las 7 cepas portadoras de una SHV-12, en 5 aislamientos (3 de *E. coli* y 2 *K. pneumoniae*) la BLEE se halló siempre vinculada en algún modo a este tipo de estructura. SHV-12 se describe habitualmente inmediatamente a continuación de la transposasa de un IS26 que a su vez forma parte de un transposón compuesto, que de hallarse íntegro, se encuentra formado por dos copias idénticas de IS26 a modo de extremos, ambas siempre en el mismo sentido y a la vez opuesto al de la BLEE. Esta estructura aparece reflejada en la figura 58. A continuación de la  $bla_{SHV-12}$  se encuentran el gen *deoR*, regulador transcripcional DEOR, y tras él, los genes pertenecientes al **operon ygb**: *ygbJ* que codifica una proteína con funciones óxido-reductasa, *ygbK*, una ARNt sintetasa y *ygbL*, una aldolasa L-fuculosa-1-fosfato, que se encuentra truncada en su extremo final a causa de la inserción de la segunda copia de IS26.



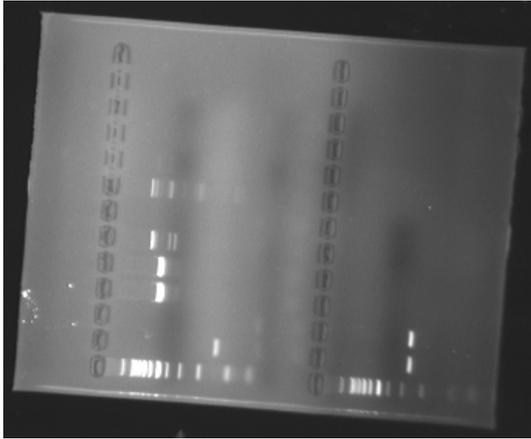
**Figura 58:** Entorno genético de la  $bla_{SHV-12}$  de las cepas nº 48, 8, 12 y 29. Con las flechas en color rojo se recuerda los *primers* utilizados, expuestos en Material y Métodos.

**1.2.1. *E. coli* (cepa nº 48) portador de una  $bla_{SHV-12}$  y una  $bla_{TEM-1}$ .**

Tras los experimentos de conjugación entre la cepa 48 y la cepa receptora *E. coli* J53 se obtuvo un transconjugante, denominado **T48**. Las CIMs de ambas cepas a ceftazidima, cefotaxima y cefepima, se detallan en la tabla 28:

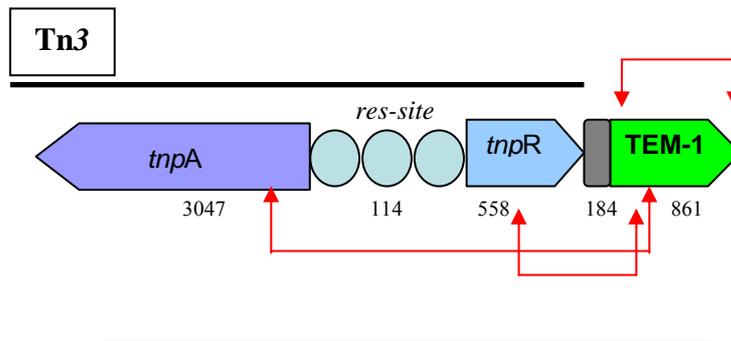
<b>TABLA 28: CEPA 48 Y T48</b>		
<b>ANTIMICROBIANO</b>	<b>CIM (mg/L) Cepa donadora</b>	<b>CIM (mg/L) Transconjugante</b>
Ceftazidima	>16	16
Cefotaxima	>8	4
Cefepima	>16	<=1

El transconjugante T48 adquirió la  $bla_{SHV-12}$ . Al obtenerse dicho transconjugante, se analizaron y compararon los grupos de incompatibilidad plasmídica presentes en ambas cepas. En la cepa donadora se pudieron distinguir: I1/Iy, N, F y FIB. En T48: **N** y **F**. Dado que la PCR nº6 (tabla 17) está diseñada para reconocer todos los plásmidos del heterogéneo grupo Inc-F, es probable que ambas cepas (donadora y transconjugante) posean un plásmido de este grupo, que no pertenezca a los que se han buscado específicamente (FIA, FIB, FIC, y el replicón FIIA) pero que sí se ha transmitido al transconjugante (figura 59):



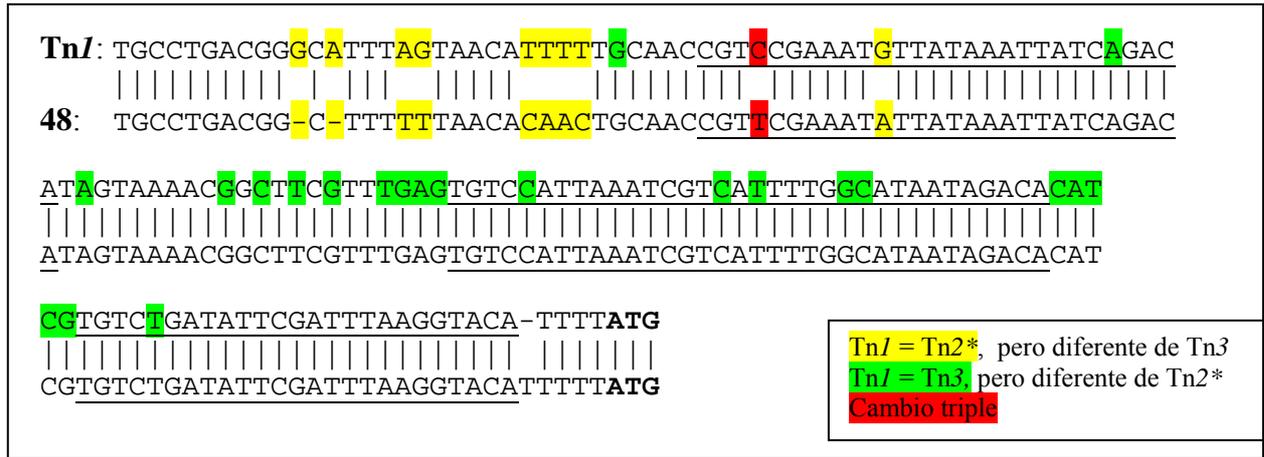
**Figura 59:** Gel con amplificados de PCR para grupos de incompatibilidad plasmídica. Primer peine: PCR múltiples del 1 al 5 para 48 y T48 respectivamente. Segundo peine: PCR simples 6, 7 y 8 para 48 y T48 respectivamente. Los primeros carriles están inoculados con un marcador de peso de 100 hasta 1500 pb.

El entorno genético de la *bla<sub>SHV-12</sub>* se analizó en T48. Se halló flanqueada por las correspondientes transposasas e IR de los elementos IS26, tal y como se describe en la figura 58. La *bla<sub>TEM-1</sub>* no se transmitió por conjugación, pero se encontró formando parte de un **Tn3** en la cepa donadora (figura 60).



**Figura 60:** Entorno genético de la *bla<sub>TEM-1</sub>* en cepa 48

El análisis de los sitios *res* del Tn3 de la cepa 48 concreta el tipo de transposón (Tn1: GenBank *accession* L27758; Tn3: GenBank *accession* V00613; Tn2\*: GenBank *accession* AY123253). En la figura 61 se compara la secuencia donde se localizaron los tres sitios *res* adyacentes a la β-lactamasa de la cepa 48, frente a la secuencia de un Tn1 como referencia, revelando que se posee los cambios característicos de un Tn3.



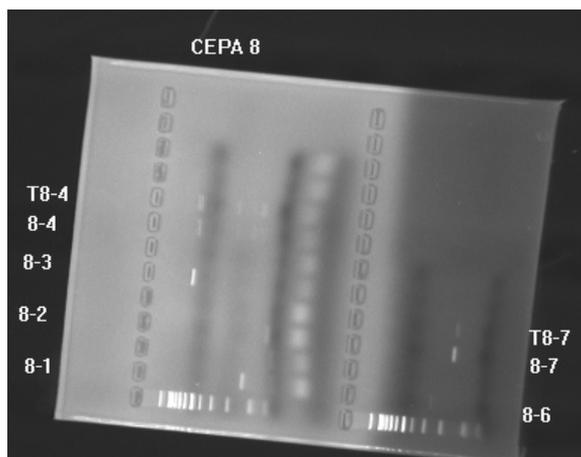
**Figura 61:** Los segmentos subrayados corresponden respectivamente a *resI*, *resII* y *resIII* del Tn3 de la cepa 48. Las tres últimas bases remarcadas en negrita, ATG, corresponden al codón de inicio de la resolvasa.

**1.2.2. E. coli (cepa nº 8) portador de bla<sub>SHV-12</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.**

El transconjugante obtenido en este caso, denominado **T8**, tras conjugación con el receptor *E. coli* J53, adquirió ambas β-lactamasas. Las CIMs de ambas cepas se detallan en la tabla 29:

TABLA 29: CEPA 8 Y T8		
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)	CIM (mg/L)
	Cepa donadora	Transconjugante
Ceftazidima	>16	>16
Cefotaxima	>8	>8
Cefepima	4	4

Al obtenerse dicho transconjugante, se analizaron y compararon los grupos de incompatibilidad plasmídica en ambas cepas. En la donadora se pudo distinguir: I1/Iy, FIB, F, Y y K. En T8: Y y K (figura 62).



**Figura 62:** Gel con amplificados de PCR para grupos de incompatibilidad plasmídica. Primer peine: PCR múltiples del 1 al 5 para 8 y T8 respectivamente. Segundo peine: PCR simples 6, 7 y 8 para 8 y T8 respectivamente.

El entorno genético de la **bla<sub>SHV-12</sub>** se estudió en T8. Se halló tal y como se describe en la figura 58. No se hallaron asociadas a la **bla<sub>TEM-1</sub>**, con los oligonucleótidos utilizados en este estudio, ni la transposasa ni la resolvasa de los *Tn3-like*, ni en la cepa donadora ni en el transconjugante.

### 1.2.3. *E. coli* (cepa nº 12) portador de **bla<sub>SHV-12</sub>** y **bla<sub>TEM-1</sub>**.

No se obtuvo transconjugante para la cepa 12. Los grupos de incompatibilidad plasmídica detectados en ella fueron **N**, **K** y **FIB** y **F**. Las CIM de la cepa original se detallan en la tabla 30:

Tabla 30: Cepa 12	
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)
Ceftazidima	>16
Cefotaxima	>8
Cefepima	>16

El entorno genético de **bla<sub>SHV-12</sub>** en la cepa 12 corresponde al mismo transposón compuesto mostrado en la figura 58.

**1.2.4. *K. pneumoniae* (cepa nº 29) portadora de bla<sub>SHV-12</sub>.**

No se obtuvo transconjugante para la cepa 29. Los grupos de incompatibilidad plasmídica hallados fueron: **N** y **K**. Las CIMs se detallan en la tabla 31:

TABLA 31: CEPA 29	
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)
Ceftazidima	>16
Cefotaxima	>8
Cefepima	>16

El entorno genético de bla<sub>SHV-12</sub> en la cepa 29 es idéntico al de la figura 58.

**1.2.5. *K. pneumoniae* (cepa nº 4) portadora de bla<sub>SHV-12</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.**

En este caso tampoco se obtuvo transconjugante. Los grupos de incompatibilidad plasmídica hallados fueron **N** y **K**. Las CIMs de la cepa original se especifican en la tabla 32:

TABLA 32: CEPA 4	
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)
Ceftazidima	>16
Cefotaxima	>8
Cefepima	>16

Este caso representa una pequeña excepción respecto al resto de las 4 cepas del grupo. El transposón compuesto en el que se ubica la bla<sub>SHV-12</sub> no parece estar completo. Solamente se logró amplificar hasta el gen *ygbK*, no siendo posible vincularlo al IRR y *tnpA* de la segunda copia de la secuencia de inserción IS26 (figura 63).

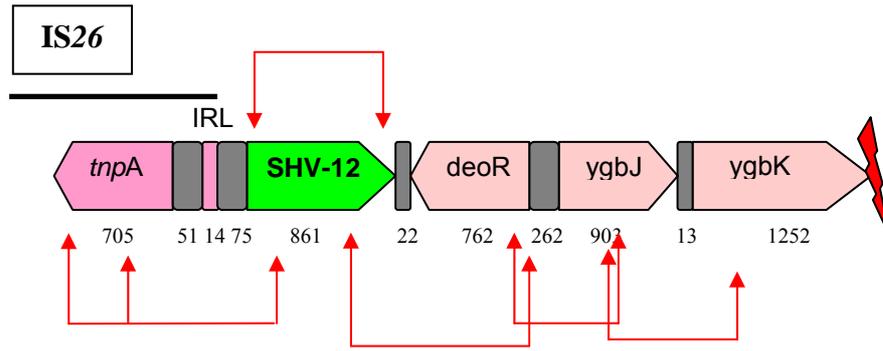


Figura 63: Esquema del transposón incompleto para la bla<sub>SHV-12</sub> de la cepa 4.

### 1.3. CEPAS PORTADORAS DE UNA bla<sub>SHV-12</sub> EN UN TN COMPUESTO IS26 INTERRUPTO POR UN TN1721.

Esta estructura es la **primera vez que se describe en *E. coli***. Se ha descrito muy recientemente para una cepa de *Salmonella* Typhimurium, también portadora de una bla<sub>SHV-12</sub> (Dionisi, 2009) y con anterioridad, en dos *P. aeruginosa* con bla<sub>SHV-2a</sub> (Naas, 1999. GenBank accession AF074954 y AM988779), ambas SHV, pertenecientes a la misma rama evolutiva (Ford, 2004). Esta misma composición (figura 64) se halló en tres de las cepas seleccionadas para este trabajo, 3 *E. coli* con bla<sub>SHV-12</sub>: las cepas 9, 98 y 84. La cepa 84 es portadora de dos BLEEs, por lo que está incluida en el apartado 2.

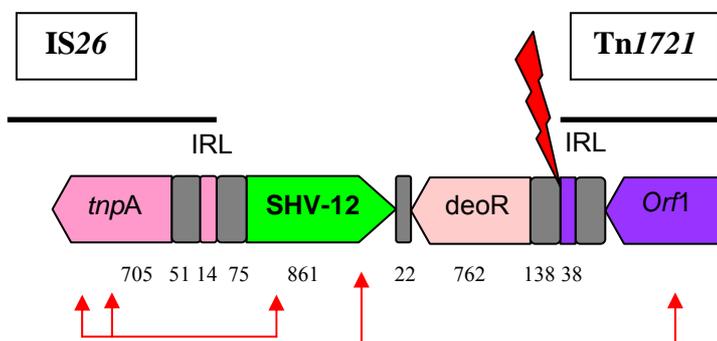


Figura 64: Tn compuesto IS26 truncado por un Tn1721 para la bla<sub>SHV-12</sub> de las cepas 9, 98 y 84.

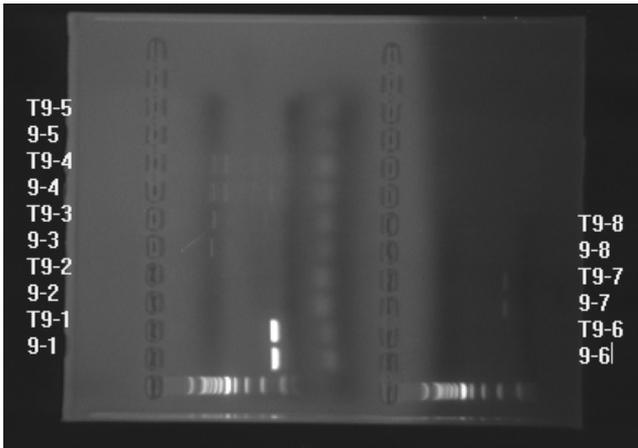
En este caso, el IRL de un Tn1721 junto con su transposasa trunca la estructura del transposón compuesto primario (figura 58) a 138 pb tras el final del gen *deoR*. El intento de localizar una segunda *tnpA* de IS26 tras la BLEE resultó negativo.

**1.3.1. *E. coli* (cepa nº 9) portador de una *bla*<sub>SHV-12</sub> y *bla*<sub>TEM-1</sub>.**

El transconjugante obtenido se denominó **T9**. Adquiere ambas  $\beta$ -lactamasas. La comparación entre CIMs se detalla en la tabla 33:

TABLA 33: CEPA 9 Y T9		
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)	
	Cepa donadora	Transconjugante
Ceftazidima	>16	>16
Cefotaxima	>8	4
Cefepima	<=1	<=1

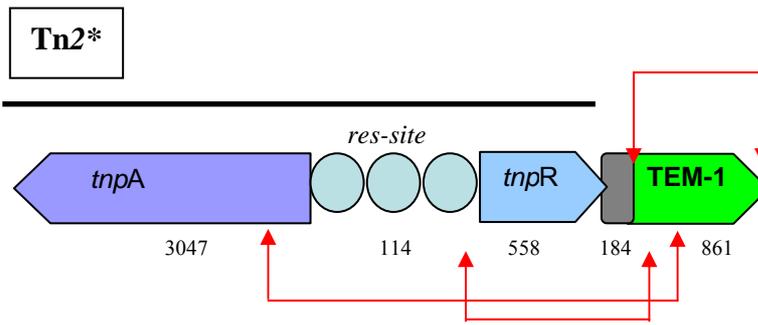
El estudio de los grupos de incompatibilidad plasmídica presentes en ambas cepas reveló la presencia de plásmidos pertenecientes a los grupos **I1/Iy** y **K** (figura 65). Las bandas observadas en la PCR nº 3 no se consideraron por ser ligeramente más pesados que el tamaño esperado para FIB y ser además ligeramente diferentes en peso.



**Figura 65:** Gel con los amplificadores de las PCR para grupos de incompatibilidad plasmídica. Primer peine: PCR múltiples del 1 al 5 para 9 y T9 respectivamente. Segundo peine: PCR simples 6, 7 y 8 para 9 y T9 respectivamente.

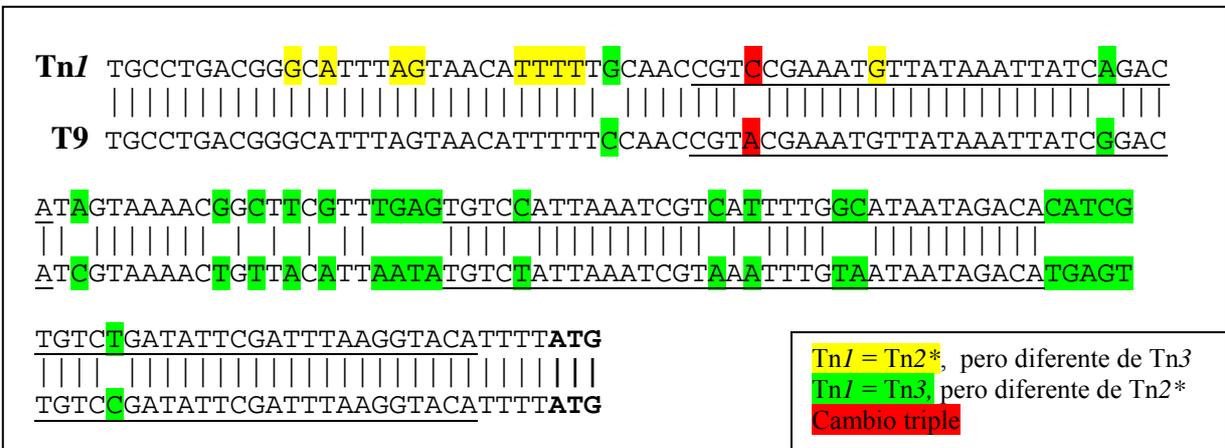
La *bla<sub>SHV-12</sub>*, analizada en T9, se halló en un entorno como el descrito en la figura 64.

La *bla<sub>TEM-1</sub>* se halló en un **Tn2\*** (Figura 66).



**Figura 66:** transposón Tn2\* para la *bla<sub>TEM-1</sub>* de la cepa 9.

El análisis de los sitios *res* (figura 67) diferencia el Tn2\* de T9 de Tn1 y Tn3:



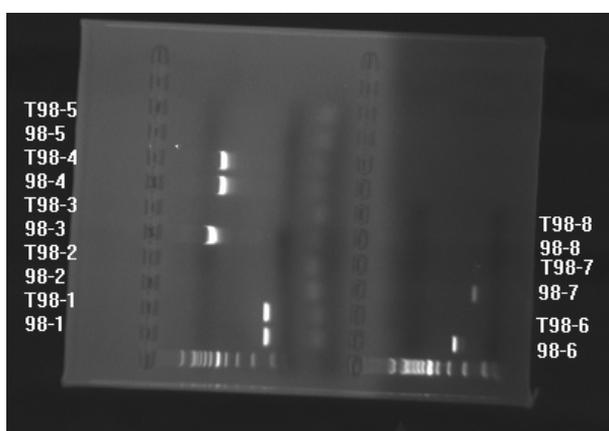
**Figura 67:** Los segmentos subrayados corresponden respectivamente a *resI*, *resII* y *resIII* de la cepa 9. Las tres últimas bases remarcadas, ATG, corresponden al codón de inicio de la resolvasa.

**1.3.2. *E. coli* (cepa nº 98) portador de  $bla_{SHV-12}$  y  $bla_{TEM-1}$ .**

Sí se obtuvo transconjugante para esta cepa: **T98**. Adquiere la  $\beta$ -lactamasa  $bla_{SHV-12}$ . La comparación entre CIMs se detalla en la tabla 34:

TABLA 34: CEPA 98 Y T98		
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)	CIM (mg/L)
	Cepa donadora	Transconjugante
Ceftazidima	>16	16
Cefotaxima	>8	<=1
Cefepima	2	<=1

El análisis de los grupos de incompatibilidad plasmídica (figura 68) presentes tanto en la cepa donadora como en T98 reveló que los grupos comunes son **I1/Iy** y **P**. La cepa original es portadora a mayores plásmidos de los grupos FIB, F y K.



**Figura 68:** Gel con los amplificados de las PCR para grupos de incompatibilidad plasmídica. Primer peine: PCR múltiples del 1 al 5 para 98 y T98 respectivamente. Segundo peine: PCR simples 6, 7 y 8 para 98 y T98 respectivamente.

El entorno genético de  $bla_{SHV-12}$  en T98 es idéntico al de la figura 64. La  $bla_{TEM-1}$  no se vinculó a ninguna estructura *Tn3-like* con los oligonucleótidos de este estudio.

#### 1.4. CEPA PORTADORA DE BLEE BLA<sub>CTX-M-9</sub>

##### 1.4.1. *E. coli* (cepa nº 52) portador de bla<sub>CTX-M-9</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.

No se obtuvo transconjugante para la única cepa seleccionada con bla<sub>CTX-M-9</sub> de entre el grupo de las portadoras de una única BLEE. Las CIMs se detallan en la tabla 35:

TABLA 35: CEPA 52	
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)
Ceftazidima	<=1
Cefotaxima	>8
Cefepima	4

La bla<sub>CTX-M-9</sub> de la cepa 52 se encontró a continuación de un ISCR1, anteriormente denominado orf513, siendo ésta la descripción más frecuente para dicha β-lactamasa (Novais, 2006). Por delante de ISCR1 existe una copia de una región 3'-CS perteneciente a integrones de clase 1 (Sabaté, 2002A). A continuación de la BLEE la estructura finaliza con el hallazgo de una secuencia de inserción IS3000 tal y como se describe para muchas de las bla<sub>CTX-M-9</sub> (Novais, 2006; Sabaté, 2002B) (figura 69).

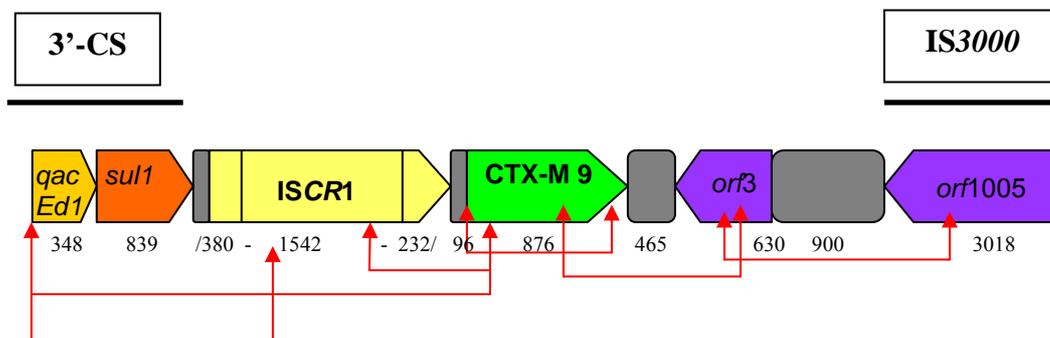
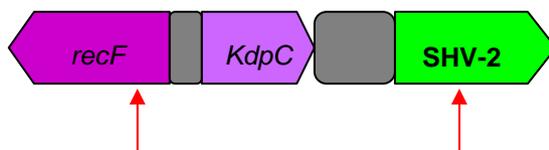


Figura 69: Representación del entorno genético de la bla<sub>CTX-M-9</sub> de la cepa 52



Tabla 36: CEPAS 78, T78, 79, 101 y T101					
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)				
	Cepa 78	Cepa T78	Cepa 79	Cepa 101	Cepa T101
Ceftazidima	>16	4	>16	8	16
Cefotaxima	>8	>8	>8	>8	>8
Cefepima	>16	4	>16	8	8

En todas las cepas la estructura era coincidente. Se probaron las parejas de *primers* relacionadas con SHV-5 (figura 52) por estar ambas SHV emparentadas evolutivamente (Ford, 2004) y por los hallazgos de otros trabajos publicados (Chen, 2006; Turner, 2009), resultando ser positiva la que enlaza el gen *recF* con la SHV-2 (figura 71) pero no así la que une ese mismo gen *recF* a una TnpA de IS26 anterior. Esto coincide también con las dos secuencias depositadas en PubMed para esta BLEE, en las que existe un corte en medio del gen *recF* (GenBank *accession* NC\_010886 y AF282921).



**Figura 71:** Asociación con RecF en las cepas portadoras de SHV-2

## 1.6. CEPA PORTADORA DE UNA SHV DE NUEVA DESCRIPCIÓN: bla<sub>SHV-132</sub>

### 1.6.1. *K. pneumoniae* (cepa nº 102) portadora de bla<sub>SHV-132</sub>

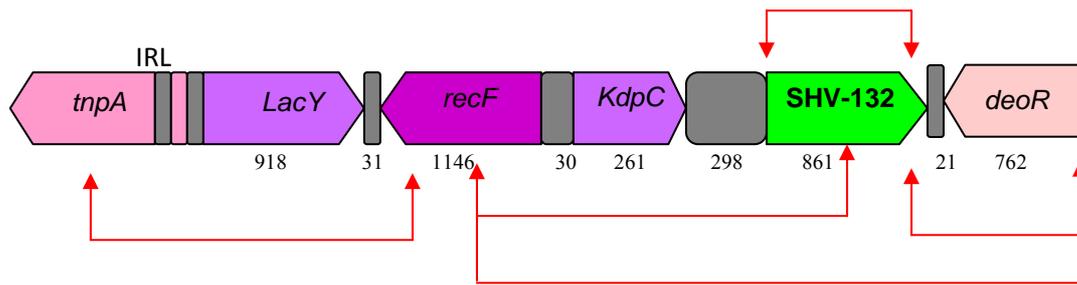
(GenBank *accession* GU981741)

En el cribaje de cepas posibles portadoras de BLEE tipo SHV, se halló una *K. pneumoniae* con el perfil de CIM expuesto en la tabla 37:

TABLA 37: CEPA 102	
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)
Ceftazidima	16
Cefotaxima	>8
Cefepima	>16

No resultaron positivas las amplificaciones para CTX-M ni TEM. Sólo para SHV. No se obtuvo transconjugante.

El análisis de la secuencia de la bla<sub>SHV</sub> desveló que, poseyendo la misma cadena de aminoácidos que la bla<sub>SHV-1</sub>, existía una **mutación significativa en el aminoácido número 65** (nº69 en las tablas de Lahey: <http://www.lahey.org/Studies/>) que es M (Metionina) para SHV-1 (GenBank *accession* AF148850) y en esta nueva variante cambia a **L (Leucina)** variando el triplete ATG por **TTG**. La nueva bla<sub>SHV</sub> se encontró ubicada en una estructura idéntica a la depositada para la bla<sub>SHV-5</sub> del plásmido p1658/97 (GenBank *accession* NC004998). En la cepa 102 se detectó dicha secuencia: *tnpA* (IS26) – IRL – *lacY* (*orf43*) – *recF* – *KdpC* (*orf41*) – bla<sub>SHV-132</sub> – *deoR* (figura 72):



**Figura 72:** Representación del entorno genético de la bla<sub>SHV-132</sub> de la cepa 102.

Es cierto que aunque la secuencia de lectura para el aminoácido nº 65 es siempre TTG, en el cromatograma se observa un doble pico en la primera base (el de mayor intensidad para T y el de menor para A) cuando la secuencia pertenecía o bien a la BLEE unitaria, o bien a ésta vinculada a *deoR*, probablemente debido a la existencia de una SHV-1 propia de la *K. pneumoniae* también asociada a *deoR*. Sin embargo, en la amplificación que vincula la SHV a *recF*, el cromatograma revela una única señal en la primera base del triplete: una T. Otros cambios puntuales no significativos (no implican cambio aminoacídico) observados son:

- Aminoácido nº 119 (123 en tablas de Lahey): **TGT**. En SHV-1 el triplete es TGC, pero ambos codifican para C (Cisteína).
- Aminoácido nº 134 (138 en tablas de Lahey): **CTG**. En SHV-1 el triplete es CTA, pero ambos codifican para L.

Y en las posiciones señaladas a continuación, se observa un doble pico de lectura, correspondiendo el de menor intensidad a las bases clásicas de la secuencia de SHV-1 y el predominante a la variación no significativa.

- Aminoácido nº 235 (239 en tablas de Lahey): **GAA** predomina sobre GAG. En SHV-1 el triplete es GAG, pero ambos codifican para E (Acido Glutámico).
- Aminoácido nº 253 (257 en tablas de Lahey): **CGG** predomina sobre CGC. En SHV-1 el triplete es CGC, pero ambos codifican para R (Arginina).

- Aminoácido nº 262 (266 en tablas de Lahey): **ACC** predomina sobre ACG. En SHV-1 el triplete es ACG, pero ambos codifican para T (Treonina).

La secuencia completa de este fragmento ya se encuentra disponible en GenBank (**GU981741**) y a la nueva SHV se la ha denominado como **SHV-132**, en relación con las ya depositadas en la base de datos de Lahey (<http://www.lahey.org/Studies/>).

## 2. CEPAS PORTADORAS DE DOS BLEEs

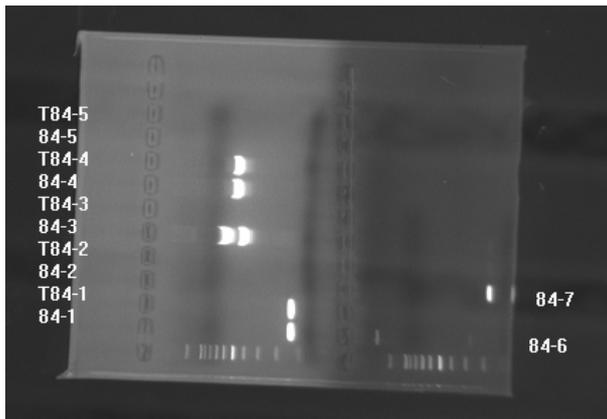
De las 24 cepas estudiadas, 6 eran portadoras de dos BLEE. Entre ellas: 2 aislamientos de *E. coli* productores de CTX-M 14 + SHV-12, 1 aislamiento de *E. coli* productor de CTX-M 15 + SHV-12, 1 aislamiento de *E. coli* productor de CTX-M 9 + SHV-5, 1 aislamiento de *K. pneumoniae* productor de SHV-2 + TEM-4 y 1 aislamiento de *K. oxytoca* productor de CTX-M 9 + SHV-12, portador además de un gen qnrA1.

### 2.1. *E. coli* (cepa nº 84) portador de bla<sub>CTX-M 14</sub>, bla<sub>SHV-12</sub> y bla<sub>TEM-1</sub>.

El transconjugante **T84**, obtenido con el receptor *E. coli* J53, adquirió la bla<sub>SHV-12</sub>. Las CIMs de ambas cepas se comparan en la tabla 38:

TABLA 38: CEPA 84 Y T84		
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L) Cepa donadora	CIM (mg/L) Transconjugante
Ceftazidima	>16	8
Cefotaxima	>8	<=1
Cefepima	>16	<=1

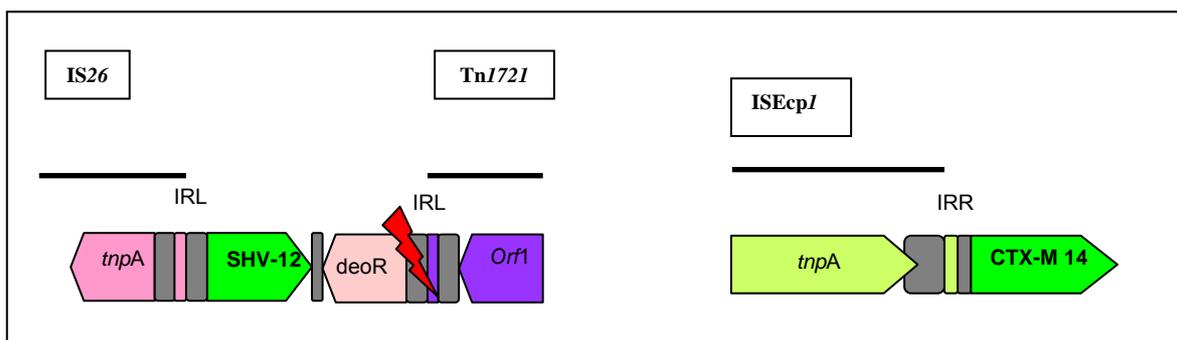
Al analizar los grupos de incompatibilidad plasmídica, se hallaron: en la cepa donadora I1/I $\gamma$ , P, FIA, FIB (F+) y K; y en T84 I1/I $\gamma$  y P (figura 73):



**Figura 73:** Gel con los amplificadores de las PCR para grupos de incompatibilidad plasmídica. Primer peine: PCR múltiples del 1 al 5 para 84 y T84 respectivamente. Segundo peine: PCR simples 6, 7 y 8 para 84 y T84 respectivamente.

El entorno genético de la *bla*<sub>SHV-12</sub> estudiado en T84, coincide con el de las cepas T9 y T98 (figura 64). Es el inicio de un transposón compuesto IS26 truncado por un Tn1721 a 137 pb tras *deoR*. Los tres transconjugantes portadores de esta estructura tienen en común que uno de los plásmidos transmitidos pertenece al grupo de incompatibilidad **I1/Iy**.

El entorno genético de *bla*<sub>CTX-M-14</sub> en la cepa original 84 es idéntico a los hallados para las cepas portadoras de una única BLEE (figura 57). Tampoco resultó la amplificación de la pareja de oligonucleótidos CTX-M *consensus* con la transposasa de IS903. Las representaciones de ambas BLEEs se muestran en la figura 74.



**Figura 74:** Representación esquemática de los entornos de las *bla*<sub>CTX-M-14</sub> y *bla*<sub>SHV-12</sub> de la cepa 84.

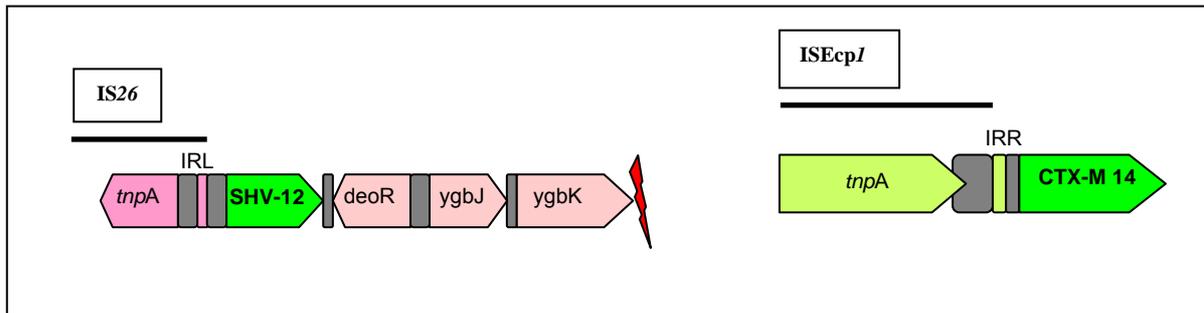
La *bla*<sub>TEM-1</sub> se encuentra sólo en la cepa donadora, pero no obtuvieron resultados positivos al intentar vincularla a la resolvasa y transposasa de un transposón Tn3-like.

**2.2 E. coli (cepa nº 32A) portadora de bla<sub>CTX-M-14</sub> y bla<sub>SHV-12</sub>.**

En este caso no se logró obtener transconjugante. Las CIMs se muestran en la tabla 39:

TABLA 39: CEPA 32A	
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)
Ceftazidima	2
Cefotaxima	>8
Cefepima	16

La bla<sub>SHV-12</sub> se halla en un IS26 pero no se logra su amplificación completa, y, al igual que para la cepa 4 (figura 63) faltaban el gen *ygbL* y la *tnpA* correspondiente al extremo derecho de la secuencia de inserción. El entorno de bla<sub>CTX-M 14</sub> en 32A corresponde a un ISEcp1. No resulta positivo el intento de localizar la transposasa de IS903. Las representaciones de ambas BLEE se muestran en la figura 75. Los grupos de incompatibilidad detectados para esta cepa son **F y K**.



**Figura 75:** Representación esquemática de los entornos de las bla<sub>CTX-M-14</sub> y bla<sub>SHV-12</sub> de la cepa 32A.

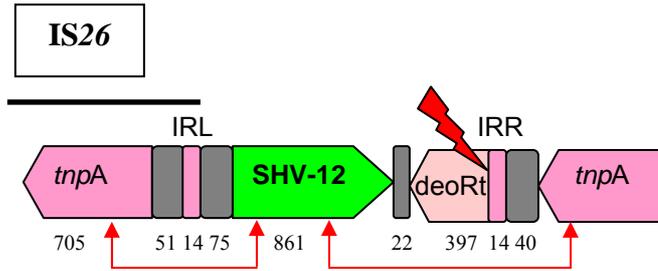
### 2.3 *E. coli* (cepa nº 60) portador de *bla*<sub>SHV-12</sub> Y *bla*<sub>CTX-M-15</sub> Y *bla*<sub>TEM-1</sub>.

El transconjugante obtenido, **T60**, adquirió la  $\beta$ -lactamasa *bla*<sub>SHV-12</sub>. La comparación entre CIMs se muestra en la tabla 40:

TABLA 40: CEPA 60 Y T60		
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)	CIM (mg/L)
	Cepa donadora	Transconjugante
Ceftazidima	>16	>16
Cefotaxima	>8	4
Cefepima	2	<=1

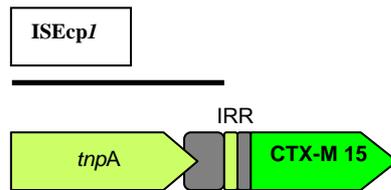
Los grupos de incompatibilidad plasmídica hallados en el donador son I1/Iy, FIB, F, K y N. El plásmido adquirido por T60 es del grupo **N**.

El entorno genético de la *bla*<sub>SHV-12</sub> del T60 podría haber sido originariamente el mismo transposón compuesto descrito en la figura 58, pero se al analizarlo se vio que estaba interrumpido a mitad del gen *deoR*. Al resultar negativa la primera hipótesis de dicho transposón estuviese truncado por un Tn1721, se planteó la posibilidad de que otra *tnpA* de un IS26 más próxima a la  $\beta$ -lactamasa de lo que hasta ahora habíamos obtenido, fuera la responsable de la interrupción. Esta opción quedó demostrada como aparece en la figura 76. Al cotejar esta organización con lo depositado en GenBank (NCBI), no se halló ninguna secuencia de forma continua igual a ésta.



**Figura 76:** Representación esquemática del entorno de la  $bla_{SHV-12}$  de la cepa 60/T60.

En cuanto a la  $bla_{CTX-M-15}$  de la cepa donadora, sí se halló vinculada a la transposasa de un  $ISEcp1$  (figura 77).



**Figura 77:** Entorno de la  $bla_{CTX-M-15}$  de la cepa 60/T60.

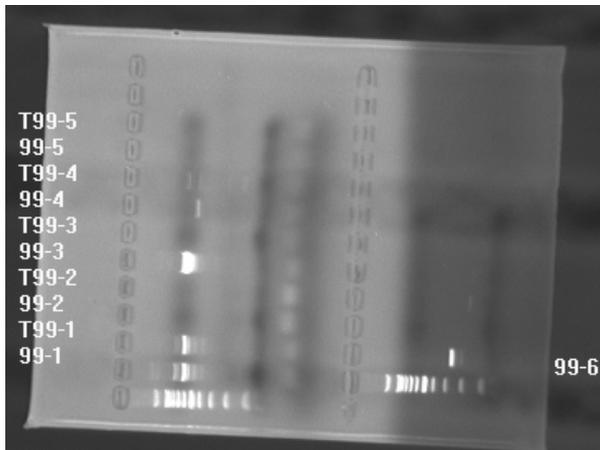
En cuanto a la  $bla_{TEM-1}$  no se logra localizar el transposón que la vehicularía en la cepa donadora con los oligonucleótidos utilizados en este estudio.

**2.4 E. coli** (cepa nº 99) portador de **bla<sub>CTX-M-9</sub>**, **bla<sub>SHV-5</sub>** y **bla<sub>TEM-1</sub>**.

El transconjugante obtenido, **T99**, adquirió las β-lactamasas **bla<sub>CTX-M-9</sub>** y **bla<sub>TEM-1</sub>**. La comparación entre CIMs se muestra en la tabla 41:

TABLA 41: CEPA 99 Y T99		
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)	CIM (mg/L)
	Cepa donadora	Transconjugante
Ceftazidima	8	4
Cefotaxima	>8	>8
Cefepima	>16	8

Los grupos de incompatibilidad plasmídica hallados en la cepa donadora fueron HI2 FIB, F, P y K. El transconjugante adquiere **HI2** (figura 78).



**Figura 78:** Gel con los amplificados de las PCR para grupos de incompatibilidad plasmídica. Primer peine: PCR múltiples del 1 al 5 para 99 y T99 respectivamente. Segundo peine: PCR simples 6, 7 y 8 para 99 y T99 respectivamente.

El entorno genético de **bla<sub>CTX-M-9</sub>** en T99 se corresponde a un **ISCR1** precedido de una copia 3`CS perteneciente a un integró de clase 1 (figura 79).

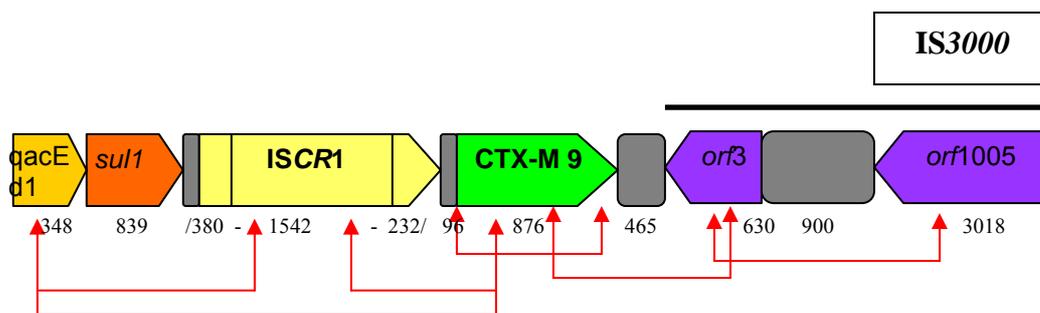


Figura 79: Entorno de la bla<sub>CTX-M-9</sub> de la cepa 99/T99.

La bla<sub>TEM-1</sub> se encuentra precedida por una resolvasa típica de estructuras Tn3-like como otras cepas de este trabajo. Lo diferente en este caso es que dicha resolvasa se halla truncada por una tnpA perteneciente a una IS26 dejando al descubierto las últimas 287 pb de la resolvasa (figura 80). No es posible distinguir qué tipo de transposón Tn3 es, ya que no hay acceso a la lectura de la secuencia de los sitios *res*. No resultó positiva la amplificación desde *ygbK* hasta *tnpR*, por si el IS26 hallado perteneciese a un transposón compuesto IS26.

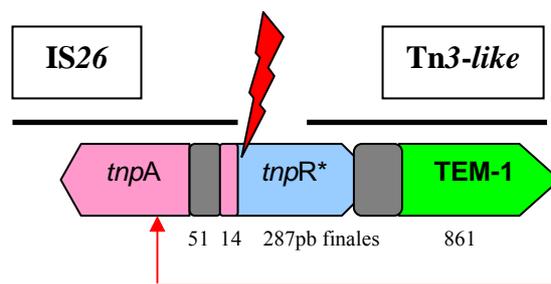


Figura 80: Entorno de la bla<sub>TEM-1</sub> de la cepa 99/T99.

La bla<sub>SHV-5</sub> se halló en una estructura parcial similar a la depositada para una bla<sub>SHV-5</sub> (GenBank accession NC\_004998) del plásmido p1658/97. En nuestra estructura no resultó positiva la amplificación que uniría una hipotética TnpA perteneciente a un IS26 con *recF*, como ocurre en p165/97 y en la estructura de la cepa 102 de este trabajo (figura 81).

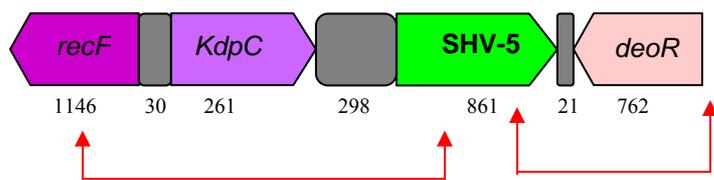


Figura 81: Entorno de la bla<sub>SHV-5</sub> de la cepa 99.

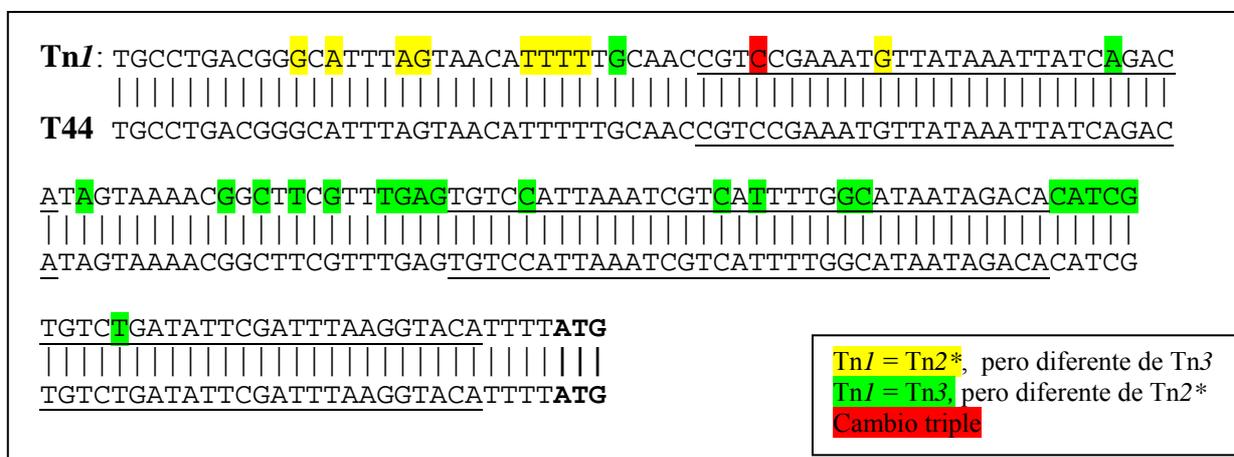
2.5 *K. pneumoniae* (cepa nº 44) portadora de una **bla<sub>TEM-4</sub>** y una **bla<sub>SHV-2</sub>**.

Al transconjugante obtenido utilizando el receptor *E. coli* J53 se le denominó **T44**. Adquirió la β-lactamasa **bla<sub>TEM-4</sub>**. La comparación entre las CIMs de ambas cepas se muestra en la tabla 42:

TABLA 42: CEPA 44 Y T44		
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)	CIM (mg/L)
	Cepa donadora	Transconjugante
Ceftazidima	>16	16
Cefotaxima	>8	>8
Cefepima	>16	<=1

Al analizar los grupos de incompatibilidad plasmídica, se detectó únicamente en la cepa donadora un grupo **A/C**, y ninguno en T44, lo cual podría implicar que el plásmido movilizado no fuese de ninguno de los grupos de incompatibilidad estudiados.

La BLEE **bla<sub>TEM-4</sub>** estudiada en **T44** se halla en una estructura **Tn1**. Como se ha comentado, lo que las diferencia es la secuencia de los sitios *res*. El análisis de esta secuencia demostró que se trataba de un **Tn1** al no existir ninguna diferencia entre T44, y lo depositado para este transposón (figura 82).



**Figura 82:** Los segmentos subrayados corresponden respectivamente a *resI*, *resII* y *resIII* del **Tn1** de la cepa T44. Las tres últimas bases remarcadas, ATG, corresponden al codón de inicio de la resolvasa.

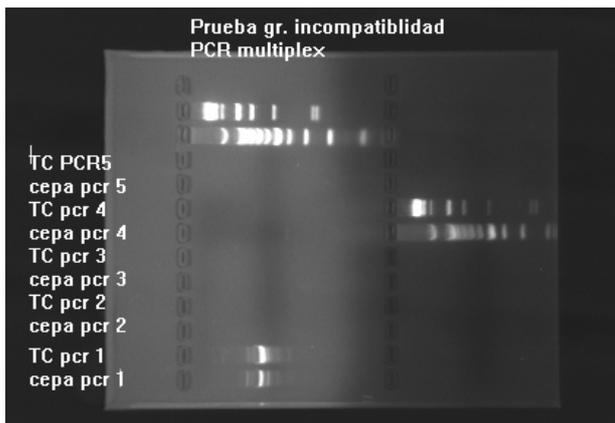
**2.6 K. oxytoca** (cepa nº 121) portadora de **bla<sub>CTX-M 9</sub>**, **bla<sub>SHV-12</sub>** y el gen de resistencia a quinolonas **qnrA1**.

Esta es la **primera vez** que se describen los entornos genéticos para una misma cepa albergando las BLEEs **bla<sub>CTX-M 9</sub>** y **bla<sub>SHV-12</sub>** al mismo tiempo y en el mismo plásmido que el gen de resistencia a quinolonas **qnrA1**.

Tras los experimentos de conjugación, se logró obtener un transconjugante, **T121**, que adquirió las **bla<sub>CTX-M 9</sub>**, la **bla<sub>SHV-12</sub>** y el gen **qnrA1**. Las CIMs de ambas cepas se comparan en la tabla 43:

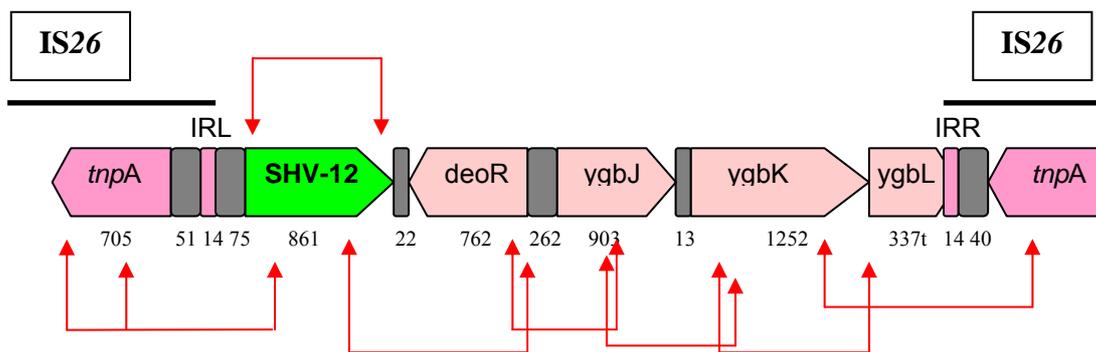
TABLA 43: CEPA 121 Y T121		
ANTIMICROBIANO	CIM (mg/L)	
	Cepa donadora	Transconjugante
Ceftazidima	>16	16
Cefotaxima	>8	>8
Cefepima	8	16
Acido nalidíxico	16	16
Ciprofloxacino	<=0.12	<=0.12

El único grupo de incompatibilidad plasmídica hallado en ambas cepas es **HI2** (figura 83). El tamaño de este único plásmido es igual o mayor al patrón comparador utilizado de 29,950 pb.



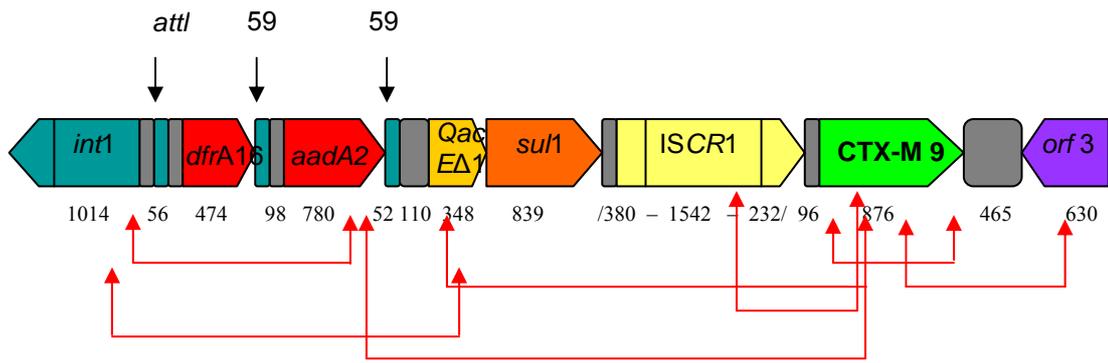
**Figura 83:** Gel con los amplificadores de las PCR para grupos de incompatibilidad plasmídica. Primer peine: PCR múltiples del 1 al 5 para 121 y T121 respectivamente. Segundo peine: PCR simples 6, 7 y 8 para 121 y T121 respectivamente.

El transposón compuesto formado por dos copias de IS26 que transporta la **bla<sub>SHV-12</sub>** es idéntico al descrito en la figura 58 para el resto de cepas portadoras de **bla<sub>SHV-12</sub>** de este trabajo. El fragmento se encuentra íntegro en el plásmido adquirido por T121 (figura 84).



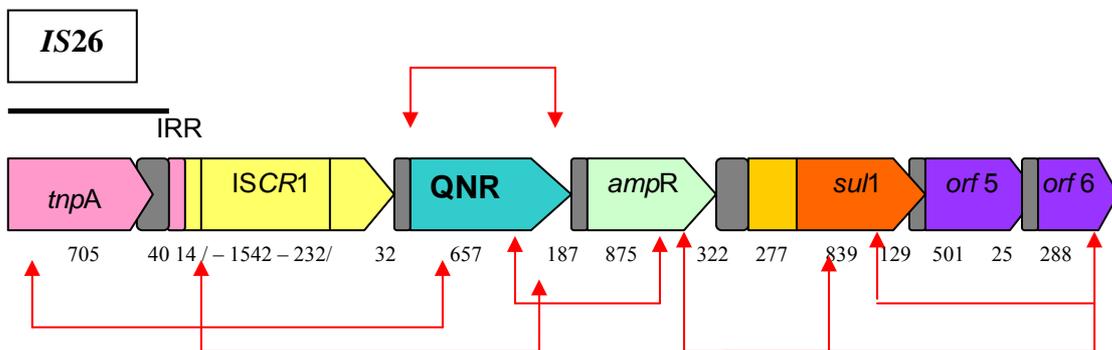
**Figura 84:** Representación esquemática del entorno de la **bla<sub>SHV-12</sub>** de la cepa 121/T121.

La  $\beta$ -lactamasa **bla<sub>CTX-M-9</sub>** se halló precedida por la transposasa de un **ISCR1** (figura 85). Se encontró en un **integrón de clase 1** similar al **In60** (Sabaté, 2002B) portador de los genes casete *dfrA16* (dihidrofolato-reductasa) y *aadA2* (aminoglicosido-adenil-transferasa). No fue posible localizar la secuencia de inserción IS3000 que remata esta estructura tras el *orf3* en la mayoría de los casos. Tampoco resultaron los intentos de localizar en ese punto alguna otra transposasa de un IS26 o alguna otra integrasa de otro integrón de clase 1 que pudiesen estar truncando esta estructura.



**Figura 85:** Representación esquemática del entorno de la bla<sub>CTX-M-9</sub> de la cepa 121/T121

La estructura que precede al gen de resistencia a quinolonas **qnrA1** es, como en la mayoría de estudios publicados (*Wang, 2003; Nordmann 2005*) un ISCR1, pero no estaba, en este caso, acompañado de forma inmediata por un integrón de clase 1, sino que, la transposasa de ISCR1 se encontraba truncada en su inicio por otra perteneciente a un IS26 (figura 86). En concreto, las 135 primeras pb habían sido desplazadas por esta inserción.



**Figura 86:** Representación esquemática del entorno de qnrA1 de la cepa 121/T121

## **DISCUSSION**

## DISCUSION

Como se ha referido en el apartado de Material y Métodos, el estudio se planteó sobre una serie de aislamientos productores de BLEEs obtenidos en un estudio previo, con el fin de conocer los entornos genéticos más habituales en las BLEEs detectadas como más frecuentes en nuestro medio. Además, se incluyeron una serie de aislamientos productores de varias BLEEs de manera conjunta, circunstancia que a partir de entonces se ha ido describiendo con mayor frecuencia (*Lavilla, 2008*), pero que en aquel momento era novedosa y llamativa (*Valverde Romero, 2005*) y respecto a las cuales no se había realizado aún estudio alguno de entornos genéticos, de modo que se ignoraba si las distintas BLEEs se encontraban unidas en los mismos elementos genéticos móviles, o al menos en los mismos plásmidos, lo que les permitiría transmitirse de manera conjunta, o en elementos o plásmidos distintos, lo que podía significar que la coincidencia de varias BLEEs en la misma cepa pudiera ser circunstancial, pero que la transmisión posterior a otros microorganismos no tendría por qué mantener ese mismo perfil. Todos los aislamientos estudiados, también de acuerdo con los perfiles de AP-PCR realizados en estudios previos, no tenían relación clonal alguna (*Valverde Romero, 2007*).

En el estudio previamente mencionado, las BLEEs obtenidas con mayor frecuencia en *E. coli* fueron bla<sub>CTX-M-14</sub>, que suponía el 32,7% del total de cepas productoras, seguido de bla<sub>SHV-12</sub> (7.1%), bla<sub>CTX-M-15</sub> (6.4%) y bla<sub>CTX-M-9</sub> (3.2%); mientras que en *K. pneumoniae* lo fueron bla<sub>SHV-2</sub> (11.5% del total de cepas productoras) y bla<sub>SHV-12</sub> (1.3%).

Por tanto, se seleccionaron **24 aislamientos** representativos de las especies y BLEEs más frecuentes en dicho estudio, con el siguiente perfil:

- De entre las cepas productoras de una **única BLEE**:
  - 4 aislamientos de *E. coli* productores de CTX-M-14
  - 5 aislamientos de *E. coli* productores de SHV-12
  - 2 aislamientos de *E. coli* productores de CTX-M-15
  - 1 aislamiento de *E. coli* productor de CTX-M-9
  - 3 aislamientos de *K. pneumoniae* productores de SHV-2
  - 2 aislamientos de *K. pneumoniae* productores de SHV-12
  - 1 aislamiento de *K. pneumoniae* productor de un enzima SHV inicialmente similar, en los fragmentos secuenciados previamente, a SHV-1, pero con perfil fenotípico de BLEE.
  
- De entre las **dobles productoras de BLEEs**:
  - 2 aislamientos de *E. coli* productores de CTX-M-14 + SHV-12
  - 1 aislamiento de *E. coli* productor de CTX-M-15 + SHV-12
  - 1 aislamiento de *E. coli* productor de CTX-M-9 + SHV-5
  - 1 aislamiento de *K. pneumoniae* productor de SHV-2 + TEM-4
  - 1 aislamiento de *K. oxytoca* productor de CTX-M-9 + SHV-12, además de un gen *qnrA1*.

De las 4 cepas estudiadas pertenecientes al grupo de producción de BLEEs más frecuentes en nuestro medio, ***E. coli* productor de CTX-M-14**, una de ellas producía además una TEM-1, mientras las otras 3 producían exclusivamente la BLEE mencionada. Todas ellas, tal como se observa en la figura 57, muestran una estructura similar asociadas a un elemento *ISEcp1*, ubicándose inmediatamente después de su

transposasa. Como es bien sabido, *ISEcpI* es una secuencia de inserción relacionada con la familia *IS1380*, que se describe frecuentemente asociada a las *bla*<sub>CTX-M</sub> pertenecientes a los clusters 1, 2 y 9 (CTX-M-14 pertenece a éste último), y es capaz de movilizar mediante transposición secuencias adyacentes a su extremo 3'. Adicionalmente, esta secuencia proporciona secuencias promotoras -35 y -10, que potencian la expresión del gen. Ello explica que la expresión de las BLEEs movilizadas en asociación con esta secuencia, sea mayor que la que se observa, para las mismas BLEEs, en los microorganismos en los que se cree que se originó, como *Kluyvera*, y en los que esta asociación no se produce. Recientemente se ha descrito una variante de esta secuencia de inserción, ***ISEcpIB***, que presenta la mutación Q379R respecto a su homóloga *ISEcpI* y que se ha descrito en diferentes enterobacterias, asociada a: CTX-M-19 (GenBank *accession* AF458080), CTX-M-24 (GenBank *accession* DQ058149), CTX-M-14 (GenBank *accession* DQ058148 y AB180674), CTX-M-13 (GenBank *accession* DQ058147) de entre las CTX-M pertenecientes al **Cluster 9**, y asociada a CTX-M-3 (GenBank *accession* DQ058145 y EF437434) del **Cluster 1**. Sin embargo, todas las *ISEcpI* halladas en este estudio asociadas a CTX-M-14, carecen de dicha mutación, de modo que se trata de *ISEcpI* convencionales. En estudios previos, CTX-M-14 se describe habitualmente asociada a *ISEcpI* en su extremo 5', tal como aparece en los casos aquí descritos, pero suele estar asociada además una secuencia de inserción **IS903** en su extremo 3' (*Lartigue, 2004; Brasme, 2007*), aunque esta última asociación no tiene poder movilizador, capacidad exclusiva de *ISEcpI*. Esta estructura es similar en otras enzimas pertenecientes también al *Cluster 9*, pero no incluidas en este estudio, como CTX-M-16, entre otras.

En las cuatro cepas estudiadas la secuencia de 42 pb coincide con la que se describe habitualmente separando la bla<sub>CTX-M-14</sub> del IRR de *ISEcp1* (Poirel, 2003; GenBank accession AF458080; otros: AF252622 y GQ385326):

GAATACTGATGTAACACGGATTGACCGTATTGGGAGTTTGAG

Sin embargo, en ninguna de nuestras cepas se encontró el fragmento IS903. Cabe la posibilidad de que este fragmento se haya visto desplazado, en su totalidad o de forma parcial por algún otro elemento insertado inmediatamente después del gen bla<sub>CTX-M-14</sub>. En este sentido, se ha descrito una estructura en la que secuencia típica *IsEcp1* \_ CTX-M-14 \_ IS903 se ve truncada por un integrón de clase I (Bae, 2008), si bien en este caso, la secuencia afectada es la del *ISEcp1* situado por delante del gen bla<sub>CTX-M-14</sub>. El hecho de que IS903 no se localice en ninguna de las 4 cepas portadoras de bla<sub>CTX-M-14</sub> estudiadas, sugiere que pudiera ser una misma estructura común para todas ellas.

Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que una de las cepas portadoras de *E. coli* bla<sub>CTX-M-15</sub>, perteneciente al *Cluster 1*, presenta una estructura similar, precedida por *ISEcp1* y no seguida de IS903. La distancia entre el final de IRR y el inicio de bla<sub>CTX-M-15</sub> es de 48 bases, como se describe habitualmente (Lartigue, 2004; Boyd, 2004 GenBank accession AY458016. Otros: GU479916). Dicha secuencia es:

GACTATTCATGTTGTTGTTATTTTCGTATCTTCCAGAATAAGGAATCCC

Finalmente, el otro aislado de *E. coli* con bla<sub>CTX-M-15</sub> estudiado no fue posible vincularlo a ninguna de las estructuras descritas habitualmente entorno a ella ni se obtuvo para él transconjugante. No obstante, la enzima sigue siendo funcional, con unas CIMs similares a las de otras CTX-M 15 estudiadas. El estudio definitivo de esta secuencia requerirá de su clonación para poder determinar definitivamente en qué consiste.

Las dos CTX-M-15 de este trabajo pertenecían al mismo grupo de incompatibilidad: el inc**F**, así como los *E. coli* CTX-M-14 pertenecían al inc**K**, coincidiendo con datos de otros estudios (*Diestra, 2009; Navarro, 2007A-B; Valverde, 2009*).

Las cepas productoras de **SHV-12** constituían aproximadamente el 7% del total de cepas productoras de BLEEs. Pese a que SHV es una enzima característica fundamentalmente del género *Klebsiella*, se encontró esta enzima tanto en *K. pneumoniae* como en *E. coli*, aunque en entornos no totalmente idénticos entre ellas, y en la mayor parte de los casos asociados asimismo a la producción de enzimas de tipo TEM.

Se ha demostrado que las enzimas SHV están situadas inicialmente en el cromosoma de *Klebsiella*, del que probablemente ha sido movilizado por elementos contenidos dentro del propio cromosoma, a partir de lo cual ha empezado a ser localizada en microorganismos pertenecientes a otros géneros y especies. De hecho, se ha comprobado que SHV-12 muestra con frecuencia un entorno prácticamente idéntico a las SHV cromosómicas, pero flanqueada por dos secuencias de inserción IS26, que son con toda probabilidad las que han permitido su movilización. SHV-12 se describe siempre movilizadora por IS26, y asociada al regulador transcripcional *deoR* y al operon *ygb* formado por: *ygbJ*, que codifica una óxido-reductasa, *ygbK*, una RNA-sintetasa no funcional posiblemente debido a una deleción de 14 pb y *ygbL*, un gen codificador de una fuculasa, conocido también como *fucA*.

Esta estructura, que aparece en las figuras 38 y 58, es la que se encontró en 3 de los 5 aislamientos de *E. coli* **portadores de SHV-12**, tal como aparece descrito para los plásmidos pUMb9 (GenBank *accession* EF370423), y pEC-IMPQ (GeneBank *accession* EU855788). Sin embargo, en los dos aislamientos restantes, se observa una estructura que es idéntica a la referida anteriormente desde IS26 en 5' hasta el gen *deoR*, pero que presenta a partir de la zona no codificante entre *deoR* y *ygbJ*, la inserción de un transposón Tn1721. Esta inserción, no obstante, no afecta a la expresión de la enzima, ya que el promotor se conserva por encima de SHV-12. Una estructura similar

ha sido descrita previamente en *P. aeruginosa*, en el plásmido pPL20, pero asociada a SHV-2a, una enzima de la misma rama evolutiva que SHV-12, y habitualmente vinculada a estructuras similares; y muy recientemente se ha descrito esta estructura en una SHV-12 pero en un aislado de *Salmonella* Typhimurium, incluida en el plásmido p61.9. Sin embargo, ésta estructura no había sido descrita previamente en *E. coli*. Ha de resaltarse además que en este estudio se describe esta estructura, entre las cepas portadoras de una única BLEE, en dos aislamientos de *E. coli* no vinculados en absoluto epidemiológicamente, lo que sugiere que podría tratarse de una estructura relativamente frecuente entre las cepas productoras de SHV-12 en nuestro medio.

En cuanto a las dos cepas de ***Klebsiella pneumoniae* portadoras de SHV-12**, las estructuras que se suelen describir asociadas son las mismas que se describen para *E. coli*. En uno de los casos, aparece la estructura predominante en *E. coli* con el transposón IS26 completo, mientras que en el otro caso no se pudo continuar amplificando la estructura a partir del gen *ygbK*, lo que sugiere que la estructura esté truncada a partir del primer tercio de este gen, eliminando parte de este gen, el fragmento de *ygbL* y el IS26 final.

Se obtuvieron transconjugantes en 4 de los 7 aislamientos productores de SHV-12. Los tres aislamientos en los que no se obtuvo transconjugante (1 *E. coli* y 2 *K. pneumoniae*), poseían los grupos de incompatibilidad N y K, que son al caso los que también se hallan en la mayoría de los transconjugantes con la estructura IS26 completa. Los dos transconjugantes obtenidos a partir de los aislamientos que presentaron la estructura IS26 truncada por el Tn1721, coinciden en ser portadores del grupo I1/I $\gamma$ .

**SHV-2** se detectó solamente en ***K. pneumoniae***, especie en la que constituye uno de los grupos de BLEE más frecuentes en nuestro medio. SHV-2 pertenece al mismo tronco

que SHV-5, y se describe asociada a estructuras similares, ligadas a secuencias de inserción IS26. Las enzimas pertenecientes a esta rama suelen describirse incluidas en estructuras en las que el gen *bla<sub>SHV</sub>* se encuentra seguido de la cadena *deoR\_ygbJ\_ygbK\_ygbL*, o de una parte de la misma, de manera similar a lo que ocurre con la rama que incluye a SHV-12 y SHV-2a, finalizada habitualmente por un IS26. Sin embargo, mientras en esta última rama el gen *bla<sub>SHV</sub>* suele ir precedido inmediatamente por IS26, en el caso de la rama que incluye a SHV-2, suele incorporarse entre medias el gen *recF*, que codifica una proteína perteneciente a un sistema de reparación genómica. No obstante según algunas descripciones de los entornos de SHV-2 (plásmido pK245, GenBank *accession* NC\_010886), este *recF* puede estar incompleto debido a la inserción de diferentes elementos dentro de su secuencia (Chen, 2006), y por tanto hipotéticamente podría ir precedido de IS26, pero desde luego no de forma inmediata. Esta estructura se da en este estudio, y es que la SHV-2 está precedida, en los tres casos estudiados, por un gen *recF* aparentemente también incompleto, ya que de las dos parejas de *primers* disponibles (ver tabla 20 y figura 52) solamente amplificaba aquella pareja que vincula a la BLEE, y la pareja asociada a la TnpA de IS26, donde uno de los *primers* ancla en la posición 118 de *recF* tras el final del transportador de lactosa, no resulta, sugiriendo o bien la carencia de la transposasa, o bien la delección de un fragmento en la secuencia de *recF* adyacente a la permeasa de lactosa *lacY*. Esta estructura se conserva tanto en las tres cepas donadoras como en los dos transconjugante que se obtuvieron. Todas pertenecieron al grupo de incompatibilidad plasmídica A/C, que es el que se describe habitualmente en este grupo de enzimas (Hrabak, 2009).

Uno de los principales hallazgos de este estudio fue el de una enzima del grupo SHV que presenta una mutación significativa no descrita previamente, por lo que constituiría una **nueva enzima del grupo SHV**, catalogada provisionalmente como **SHV-132**. Se trata de una enzima que presenta un cambio de metionina a leucina en la posición 65 (69 según la nomenclatura de la clasificación de Lahey). Cambios en esta posición se han descrito previamente en otras enzimas como SHV-49, SHV-52 y SHV-92, pero en todos los casos a isoleucina, y tanto en el caso de SHV-52 y SHV-92, asociadas a mutaciones en otras posiciones. La enzima más similar, en cuanto que presenta también un solo cambio, y éste aparece en la misma posición, es SHV-49. La enzima descrita aquí muestra un claro comportamiento de BLEE, con CIMs altas tanto de cefalosporinas de 3<sup>a</sup> como de 4<sup>a</sup> generación. En cuanto al entorno genético, muestra un entorno próximo al de las enzimas SHV de la rama de SHV 5 y SHV 2a. De hecho, es una estructura semejante a la descrita para SHV-5 en el plásmido p1658/97 (figura 40), en el que el gen *bla* se encuentra asociado a un IS26 que va seguido de una lactosa-permeasa (*lacY-orf41*), un gen *recF*, la subunidad C de la ATP-asa transportadora de potasio del sistema de alta afinidad KDP (*KdpC-orf43*), y finalmente el gen codificador del enzima SHV, seguido de un regulador transcripcional *deoR*. En el mencionado plásmido, *deoR* va seguido del operon *ygb* y finalmente un segundo IS26 que delimita el transposón compuesto. En el caso de *bla*<sub>SHV-132</sub>, este fragmento final posterior a *deoR* no se ha secuenciado, por lo que no se puede afirmar que sea idéntico al que suele incluir a SHV-5, aunque es probable que sea así ya que se trata de una estructura muy estable entre los IS26 que vehiculan genes *bla*SHV pertenecientes a este grupo. La secuenciación completa de este fragmento y del plásmido requerirá estudios adicionales.

Una de las características que resultaron más sorprendentes entre los estudios previos realizados en nuestra zona en relación con la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEEs, fue la frecuencia relativamente alta de cepas productoras de **dobles BLEEs**. Se trataba de una circunstancia hasta entonces descrita de forma esporádica y muy infrecuente, mientras que en nuestro medio se revelaba como una circunstancia relativamente frecuente. Resultaba de gran interés conocer si los genes *bla* estaban incluidos en los mismos elementos móviles en cuyo caso transferirían siempre de forma conjunta, si se encontraban en plásmidos que cotransferían, o si se trataba de un acúmulo circunstancial en una cepa determinada, que no tenía por qué tener continuidad en otras cepas.

En consecuencia, se incluyeron en el estudio dos aislamientos de *E. coli* productores de CTX-M-14 + SHV-12, uno de *E. coli* productor de CTX-M-15 + SHV-12, otro de *E. coli* productor de CTX-M-9 + SHV-5, otro de *K. pneumoniae* productor de SHV-2 + TEM-4 y un último aislamiento de *K. oxytoca* productor de CTX-M-9 + SHV-12, además de un gen *qnrA1*.

En el caso de las dos cepas productoras de **CTX-M-14 y SHV-12**, una de ellas se encontró asociada además a una TEM-1. En el aislamiento con CTX-M 14 y SHV-12 pero sin TEM-1 no fue posible obtener transconjugante, por lo que se trabajó sobre el aislado original. En la cepa con las tres beta-lactamasas sí se obtuvo transconjugante, pero solamente hubo transmisión eficiente del plásmido portador de SHV-12, ya que no se detectó CTX-M-14 en el transconjugante. La dificultad para obtener transconjugantes a partir de cepas portadoras de CTX-M-14 sugiere que se encuentran asociadas a plásmidos que se transmiten con mucha más dificultad que otros, al contrario de lo que ocurre en general en los portadores de enzimas del grupo SHV. En España, las BLEE

CTX-M-14 se describen asociadas principalmente a plásmidos del grupo de incompatibilidad IncK (Diestra, 2009). En este caso en la cepa donadora se detectaron plásmidos de los grupos de incompatibilidad I1/I $\gamma$ , P, FIA, FIB y K. Por otra parte, el transconjugante, portador solamente de SHV-12, muestra un perfil de CIM claramente diferente, con CIMs algo inferiores a la cepa donadora frente a ceftazidima, y claramente inferiores frente a cefotaxima y cefepima. Si se comparan estos datos con las CIMs de cepas portadoras solamente de CTX-M-14, se puede afirmar que, en estos casos, la resistencia a ceftazidima deriva principalmente de la acción de los enzimas del grupo SHV, mientras CTX-M-14 muestra una actividad claramente superior frente a cefotaxima y cefepima. En ambos aislamientos originales, la CTX-M-14 se detectó asociada a un *ISEcp1*, de forma similar a lo que se ha referido en las cepas portadoras de CTX-M-14 de manera aislada. *ISEcp1* se describe habitualmente asociado a enzimas CTX-M de los clusters 1, 2 y 9, que incluyen a las CTX-M más frecuentes en España. Como se ha referido ya previamente, el proceso de transposición que condiciona esta secuencia de inserción implica que este elemento es suficiente para dar lugar a la movilización del gen, proporcionando además secuencias promotoras para el mismo. Las secuencias que puedan encontrarse en el extremo 3' son poco trascendentes tanto para la movilización como para la expresión de la beta-lactamasa. No obstante, al igual también que en otras cepas productoras de CTX-M-14 descritas en este estudio, la secuencia *IS903* que se describe en la mayor parte de los casos en el extremo 3' de CTX-M 14 no aparece. No fue posible determinar la secuencia que continúa a CTX-M-14 para esta cepa, ya que probablemente se trate de un realineamiento de genes no descrito, que deberá estudiarse en el futuro mediante clonación.

El gen **bla<sub>SHV-12</sub>** presente en el transconjugante que nos ocupa, muestra un entorno genético ya descrito en otros dos *E. coli* de este trabajo portadores sólo de SHV-12. Se

trata de una SHV-12 asociada a una secuencia de inserción IS26 en 5', en la que la cadena de genes *deoR-ygbJ-ygbK-ygbL* asociada de forma característica a este transposón compuesto, se encuentra truncada a la altura de *deoR* por un Tn1721. Tal y como se ha referido previamente, se ha descrito sólo muy recientemente en enterobacterias, concretamente en *Salmonella*, y no estaba descrita previamente en *E. coli*. Pese a ello, parece tratarse de una estructura frecuente en nuestro medio, ya que aparece en varias cepas de este trabajo. Por otra parte, la transferencia aislada de esta BLEE en la cepa doble demuestra que se encuentra en un plásmido distinto de CTX-M-14. Todos los transconjugantes obtenidos de las cepas con un IS26 truncado por un Tn1721 (tres en total en este trabajo) mostraban un plásmido perteneciente al grupo de incompatibilidad **I1/Iy**.

En cuanto a la segunda cepa portadora de estas dos BLEE, mientras CTX-M-14 se encuentra en una estructura idéntica a la anterior, SHV-12 se localiza en un transposón compuesto con un IS26 en su extremo 5', pero que muestra, aparentemente, una interrupción, aunque mucho más desviada hacia el extremo 3', al final del gen *ygbK*, tal como se describió anteriormente en una *K. pneumoniae* de este trabajo, portadora solamente de SHV-12, de modo que el gen *ygbL* y el extremo 3' del transposón probablemente estén alejados por la inserción de algún otro fragmento. En este caso no se obtuvieron transconjugantes, como es habitual en las cepas portadoras de CTX-M-14 en nuestro medio, y como ocurría también en la otra cepa descrita con un IS26 similar. Como en el caso anterior, pese a tratarse de estructuras de entorno genético no conocidas previamente, parecen no ser infrecuentes en nuestro medio, ya que aparecen en varias cepas, tanto productoras sólo de SHV-12 como de combinaciones de varias BLEEs.

En el caso de la cepa doble estudiada portadora de **SHV-12 y CTX-M-15**, los entornos genéticos observados fueron semejantes a los de la primera cepa portadora de SHV-12 y CTX-M 14, aunque con alguna diferencia llamativa. Como en el caso de las cepas portadoras de SHV-12 y CTX-M 14, el transconjugante adquirió solamente la SHV-12, lo que confirma la mayor transferibilidad de los plásmidos que vehiculan enzimas de este tipo, así como su mayor vinculación a la resistencia a ceftazidima, mientras, la resistencia a cefotaxima y cefepima se vincula más al grupo CTX-M. Pese a que la cepa donadora portaba plásmidos pertenecientes a grupos diversos (I1/I $\gamma$ , FIB, F, K, N), la receptora mostró solamente plásmidos del grupo N, lo que demuestra que SHV-12 va, en este caso, vehiculada por plásmidos de este grupo.

El entorno genético observado para CTX-M-15 en la cepa donadora mostró una estructura similar a la demostrada para otras CTX-M-14 y -15 descritas en el estudio, asociadas a un *ISEcp1* en 5', sin que sea posible localizar en el extremo 3' la secuencia de inserción *IS903* que se suele describir asociada a estas estructuras. Ello no quiere decir necesariamente que esta secuencia de inserción haya desaparecido, sino que puede simplemente haber sido desplazada por otra inserción que la haya alejado del gen *bla*.

Como en la práctica totalidad de los casos previamente estudiados, SHV-12 se asocia de nuevo a un transposón compuesto acotado por *IS26*. La estructura conservada de este transposón, descrita en la figura 58, parece sin embargo ser una estructura genéticamente poco estable, ya que en algunas cepas estudiadas ha sido frecuente encontrarla interrumpida a diferentes niveles dentro del operón *ygb* (inserción de *Tn1721*, interrupción a nivel de *ygbK*). En este caso aparece, truncando el gen *deoR*, el IRR y la transposasa de un *IS26*, de modo que se genera un *deoR* incompleto y un transposón compuesto nuevo con sus dos extremos *IS26*, pero conteniendo solamente

SHV-12 y un fragmento de *deoR*. Esta estructura no había sido descrita previamente, y ha sido depositada en GenBank con el nºxxxxx.

En el caso de la cepa portadora de **CTX-M-9** y **SHV-5**, que además era portadora de una TEM-1, se obtuvo un transconjugante portador de ambas BLEE, situación como se ha venido viendo poco frecuente, debido a la mayor dificultad para transferirse el grupo CTX-M. Ello justifica que las CIMs de la cepa donadora y del transconjugante muestren CIMs similares.

En este caso, de los numerosos grupos de incompatibilidad presente en la cepa donadora, el transconjugante adquiere sólo uno, el **HI2**, lo que sugiere la posibilidad de que ambas enzimas vayan vehiculadas en el mismo plásmido.

La estructura que alberga a CTX-M-9 es la característica asociada a un integrón de clase I (figura 79), descrita previamente y referida por otros autores como la habitual para esta enzima.

En cuanto a SHV-5, es cierto que se asocia a una estructura semejante a las descritas habitualmente para su cluster, pero se trata aparentemente, una vez más, de una estructura interrumpida (figura 81). Las estructuras descritas habitualmente para este *cluster* presentan, en el extremo 5' de RecF, una permeasa *lacY* y una IS26 como inicio del transposón. Sin embargo, en este caso fue imposible amplificar esta región, lo que sugiere que IS26 se encuentre probablemente desplazado por la inserción de alguna otra estructura. En este caso, esta modificación podría eventualmente afectar a la posibilidad de que esta estructura se transfiriese entre elementos genéticos mayores, de encontrarse afectado o alterado el IS26, pero al encontrarse ya incluida en un plásmido, no afecta a la posibilidad de transmisión horizontal de esta resistencia a través de este plásmido.

Otra de las cepas dobles portadoras de BLEE estudiada, se sale un poco de las enzimas más frecuentes. Se trata de una *K. pneumoniae* portadora de una **TEM-4** y una **SHV-2**,

BLEE por cierto ya descrita en otras *K. pneumoniae* de este trabajo, portadoras únicamente de SHV-2. El transconjugante obtenido, que adquiere únicamente la TEM-4, muestra un perfil de CIM idéntico para cefotaxima, muy similar para ceftazidima pero menor para cefepime, corroborando la transferencia de una única BLEE. El plásmido detectado en la cepa original, fue al igual que para las cepas únicas portadoras, un A/C, no hallándose ninguno en el transconjugante, lo cual apoya la idea de que la SHV-2 va vehiculada en plásmidos A/C (Hrabak, 2009) y que en este caso, la TEM-4 se moviliza en algún plásmido de grupo de incompatibilidad diferente a los estudiados.

Finalmente, la última de las cepas incluidas en el estudio de entorno genético era una cepa portadora de **CTX-M-9**, de una **SHV-12** y de un gen *qnr* de resistencia a quinolonas de codificación plasmídica. Se trata de la primera ocasión en que describe un acúmulo de determinantes de resistencia de este tipo en una enterobacteria. En este caso sí se obtuvo transconjugante, y se trataba además de un transconjugante que adquiriría el mismo perfil de resistencia que la cepa original, y en la que **se encontraron los tres genes de resistencia**. Se encontró **un solo grupo de incompatibilidad plasmídica**, el **HI2**, lo que sugiere que los tres genes vayan incorporados en un solo plásmido.

Las características de los entornos genéticos son, en algunos casos, las que eran de esperar en función del determinante de resistencia. Así, SHV-12 se encuentra asociada a una estructura idéntica a la encontrada en el resto de las SHV-12 descritas en este estudio (figura 58), y que es por otra parte la estructura más conservada en la que se encuentran habitualmente estos genes, es decir, una estructura contenida entre dos IS26, que incorpora, de forma inmediata al IS26 inicial, la enzima SHV, seguida del regulador

transcripcional *deoR* y de los genes pertenecientes al operón *ygb* hasta *ygbL*, donde queda interrumpido por el segundo IS26.

La **CTX-M-9** presente en esta cepa se encuentra asimismo en una estructura similar a estructuras previamente conocidas, en este caso al integrón **In60** (figura 85). Se trata, como en este caso, de un integrón de clase 1, en el cual, la beta-lactamasa se encuentra asociada a un *ISCR1*, junto con varios genes cassette que les preceden (en este caso, *dfrA16*, *aad-A2*, *qacEA* y *sul1*). La única diferencia es que, en este caso, la estructura sólo se conserva hasta la *orf3*, secuenciándose 530 de sus 630 pb. Pero no fue posible detectar el IS3000 que se describe en el extremo 3' de esta estructura. Probablemente se haya producido una delección, o una inserción de otros fragmentos desconocidos que alejen esta secuencia de inserción. Esta secuencia IS3000 sí es hallada en el entorno genético de la CTX-M-9 estudiada en uno de los *E. coli* portadores de única BLEE y de una TEM-1. En este caso no se obtenía transconjugante y la BLEE se hallaba en una típica estructura In60 (figura 69) precedida por un *ISCR1*.

En cuanto al gen *qnrA1*, se encuentra asimismo incluido en una estructura semejante a las estructuras en que se ha venido describiendo este grupo de genes, pero con alguna diferencia significativa. Al igual que en los casos descritos inicialmente en China (Wang, 2003) y en otros descritos con posterioridad (Nordmann, 2005), *qnr* se encuentra incluido en un integrón complejo de la familia In4, adyacente a *ISCR1*. A diferencia del plásmido descrito originalmente, pMG252, y al igual que en **In36** e **In37**, *qnr* va seguido de un gen *ampR*. Sin embargo, la estructura encontrada en este estudio, presenta dos diferencias fundamentales: por una parte, el extremo 3' no finaliza de forma inmediata en un IS6100, sino que parece estar interrumpida al final de *orf6* por alguna otra estructura que elimina o aleja a esta secuencia de inserción. Por otra parte, y con mayor importancia, la secuencia se encuentra interrumpida hacia el extremo 5' por

el IRR de un IS26 seguido de su transposasa (figura 86), lo que produce una delección en *ISCR1*, y probablemente una introducción en esta posición de otra estructura que aleja el extremo 5' del integrón, incluyendo la integrasa y los diferentes genes *cassette* que se suelen encontrar por encima de *ISCR1*. Se trata por tanto de un fragmento interrumpido en comparación con los que se conocen como portadores de *qnr*, y que sin embargo parece conservar su capacidad de inducir un nivel moderado de resistencia a fluoroquinolonas, ya que la transferencia del plásmido origina unos niveles de resistencia a ácido nalidíxico (no a fluoroquinolonas) semejante a los de la cepa original.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. Las cepas aisladas en nuestro medio portadoras de enzimas del grupo SHV, tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*, se encuentran sistemáticamente asociadas a secuencias de inserción IS26. En la mayor parte de los casos SHV-12 se encontró formando parte de un transposón compuesto por dos IS26, pero en algunos casos esta estructura se encuentra interrumpida a diferentes niveles del operón *ygb*.
2. Dentro de las CTX-M, la CTX-M-9 se encuentra asociada a elementos ISCR1, tal como se describe habitualmente (Eckert, 2006; Novais 2006).
3. CTX-M-14 y CTX-M-15 se suelen asociar a elementos ISEcp1, pero no a IS903, como se describe con frecuencia en otros estudios (Eckert, 2006; Diestra 2009).
4. En el presente estudio se ha descrito una nueva enzima del grupo SHV, que presenta una mutación de metionina a leucina en la posición 69 como único cambio respecto a SHV-1, que mantiene un claro fenotipo de beta-lactamasa de espectro extendido, y que se encuentra vinculada a un entorno genético similar a los que se suelen describir para el *cluster* de SHV-5, al que con toda probabilidad pertenece.
5. La presencia de varias enzimas de la misma o de distintas familias no parece modificar los entornos genéticos, que se mantienen semejantes a los que aparecen en cepas productoras de una sola enzima.
6. Algunos entornos previamente no descritos, las interrupciones a diferentes niveles del operon *ygb* en los transpososnes compuestos IS26, se encuentran con frecuencia tanto en cepas productoras de una como de varias enzimas, y con

secuencias idénticas, lo que sugiere que se trata de estructuras que, aunque no descritas hasta el momento, son frecuentes en nuestro entorno.

7. Se describe asimismo una cepa con un acúmulo de genes de resistencia no descrito hasta el momento, que incluye enzimas de las clases SHV y CTX-M, y un gen *qnr* de resistencia a fluoroquinolonas. En esta cepa, los tres mecanismos de resistencia aparecen asociados en un solo plásmido de gran tamaño.
8. Esta resistencia aparece asociada tanto a estructuras típicas, como es el caso de IS26 para SHV-12, como a estructuras aparentemente alteradas o incompletas, como es el caso de la estructura semejante a In60 para CTX-M-9, y sobre todo la estructura semejante a In36/In37, pero alterada por la inserción de un IS26 en el extremo 5' de ISCR1, en el caso del entorno genético de *qnr*.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. **Actis LA**, Tolmasky ME, Crosa HS. *Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds*. *Front Biosci* **1999**; 3: d43-62.
2. **Alekshun MN**, Levy SB. *Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance*. *Cell* **2007**;128:1037-1050.
3. **Ambler RP**, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M *et al*. *A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases*. *Biochem J* **1991**;276;269-270.
4. **Arakawa Y**, Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R *et al*. *A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene  $bla_{imp}$* . *Antimicrob Agents Chemother* **1995**;39(7):1612-1615.
5. **Babini GS**, Livermore DM. *Letters to the Editor: Are SHV  $\beta$ -Lactamases Universal in Klebsiella pneumoniae?* *Antimicrob Agents Chemother* **2000**;44(8):2230.
6. **Bae IK**, Lee YN, Gyo Lee W *et al*. *Novel complex class 1 integron bearing an ISCR1 element in a Escherichia coli isolate carrying the  $bla_{CTX-M-14}$  gene*. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**;51(8):3017-19.
7. **Bae IK**, Lee YH, Jeong HJ, Hong SG, Lee SH, Jeong SH. *A novel  $bla_{CTX-M-14}$  gene-harboring complex class 1 integron with an *In4*-like backbone structure from a clinical isolate of Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2008**;62:340-342.
8. **Baquero F**. *From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens*. *Nat Rev Microbiol* **2004**;2:510-518.
9. **Bennett PM**. *Integrans and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria*. *J Antimicrob Chemother* **1999**;43:1-4.
10. **Bennett PM**. *Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria*. *Br J Pharmacol* **2008**:1-11.
11. **Bischerour J**, Chalmers R. *Base flipping in Tn10 transposition: an active flip and capture mechanism*. *PLoS ONE* **2009**;4(7):e6201.
12. **Bouet JY**, Nordström K, Lane D. *Plasmid partition and incompatibility – the focus shifts*. *Mol Microbiol* **2007**;65(6):1405-1414.
13. **Boyd DA**, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM *et al*. *Complete Nucleotide Sequence of a 92-Kilobase Plasmid Harboring the CTX-M-15 Extended-Spectrum Beta-Lactamase Involved in an*

- Outbreak in Long-Term-Care Facilities in Toronto, Canada.* Antimicrob Agents Chemother **2004**;48(10):3758-64.
14. **Brantl S**, Wagner EG. *Antisense RNA-mediated transcriptional attenuation: an in vitro study of plasmid pT181.* Mol Microbiol **2000**;35(6):1469-1482.
  15. **Brasme L**, Nordmann P, Fidel F, Lartigue MF, Bajolet O, Poirel L, et al. *Incidence of class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Champagne-Ardenne (France): a 1 year prospective study.* J Antimicrob Chemother **2007**; 60: 956–964
  16. **Brizio A**, Vasco S, Gonçalves AR, Lito LM, Cristino JM, Salgado MJ et al. *Survey of extended-spectrum-lactamases in Escherichia coli isolates from a Portuguese hospital and characterisation of a novel class 1 integron (In60A) carrying the blaCTX-M-9 gene.* Int J Antimicrob Agents **2006**;28: 320–324
  17. **Burrus V**, Pavlovic G, Decaris B, Guèdon G. *Conjugative transposón: the tip of the iceberg.* Mol Microbiol **2002**;43(6):601-610.
  18. **Bush K**, Jacoby GA, Medeiros AA. *A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure.* Antimicrob Agents Chemother **1995**;39(6):1211-1233.
  19. **Cantón R**, Coque TM, Baquero F. *Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics.* Curr Opin Infect Diss **2003**;16:315-325.
  20. **Cantón R**, Coque TM. *The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic.* Curr Opin Microbiol **2006**;9:466-475.
  21. **Cantón R**, Valverde A, Novais A, Baquero F, Coque T. *Evolución y panorama actual de las BLEE.* Enferm Infecc Microbiol Clin **2007**;25(supl.2):2-10.
  22. **Cantón R**. *Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting.* Clin Microbiol Infect **2009**;15(supl.1):20-25.
  23. **Carattoli A**, Bertini A, VillaA, et al. *Identification of plasmids by PCR-based replicon-typing.* J Microbiol Methods **2005**;65:219-228.
  24. **Cattoir V**, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. *Unexpected Occurrence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance Determinants in Environmental Aeromonas spp.* Emerg Infect Dis **2008A**; 14(2):231-237.
  25. **Cattoir V**, Nordmann P, Silva-Sanchez J, Espinal P, Poirel L. *ISEcp1-Mediated Transposition of qnrB-Like Gene in Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother **2008B**;52(8):2929-2932.

26. **Chattoraj DK.** *Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical.* Mol Microbiol **2000**;37(3):467-476.
27. **Chen I, Christie PJ, Dubnau D.** *The ins and outs of DNA transfer in bacteria.* Science **2005**;310:1456-1460.
28. **Chen YT, Shu HY, Li LH, Liao TL, Wu KM, Shiau YR et al** Complete Nucleotide Sequence of pK245, a 98-Kilobase Plasmid Conferring Quinolone Resistance and Extended-Spectrum-Lactamase Activity in a Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolate. Antimicrob Agents Chemother **2006**; 50(11):3861-66.
29. **Chen YT, Liao TL, Liu YM, Lauderdale TL, Yan JJ, Tsai SF.** *Mobilization of qnrB2 and ISCR1 in Plasmids.* Antimicrob Agents Chemother **2009**; 53(3):1235–1237.
30. **Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Ma CH, Hung Yung RW, Kam KM.** *Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of Salmonella enterica serotype Enteritidis in Hong Kong.* J Antimicrob Chemother **2005**;56, 586–589.
31. **Churchward G.** *Back to the future: the new ICE age.* Mol Microbiol **2008**;70(3):554-556.
32. **Clewell DB.** *Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus Streptococcus.* Microbiol Rev. 1981 Sep;45(3):409-36.
33. **Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK.** *Identification and classification of bacterial plasmid.* Microbiol Rev **1988**;52(3):375-395.
34. **Dahmen S, Poirel L, Mansour W, Bouallègue O, Nordmann P.** *Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae from Tunisia.* Clin Microbiol Infect **2009** Jul 24. [Epub ahead of print]
35. **Das N, Chattoraj DK.** *Origin pairing (“handcuffing”) and unpairing in the control of P1 plasmid replication.* Mol Microbiol **2004**;54(3):836-849.
36. **De Palmenaer D, Vermeiren C, Mahillon J.** *IS231-MIC231 elements from Bacillus cereus sensu lato are modular.* Mol Microbiol **2004**;53(2):457-67.
37. **del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R.** *Replication and control of circular bacterial plasmids.* Microbiol Mol Biol Rev **1998**;62(2):434-464.
38. **del Solar G, Espinosa M.** *Plasmid copy number control: an ever-growing history.* Mol Microbiol **2000**;37(3):492-500.

39. **Diestra K**, Juan C, Curiao T, Moyá, Miró E, Oteo J *et al.* *Characterization of plasmids encoding blaESBL and surrounding genes in Spanish clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae.* J Antimicrob Chemother **2009**;63:60–66.
40. **Dionisi AM**, Lucarelli C, Owczarek S, Luzzi I, Villa L. *Characterization of the Plasmid-Borne Quinolone Resistance Gene qnrB19 in Salmonella enterica Serovar Typhimurium.* Antimicrob Agents Chemother **2009**;53(9): 4019–4021.
41. **Dobrindt U**, Hacker J. *Whole genome plasticity in pathogenic bacteria.* Curr Opin Infect Diss **2001**;4:550-557.
42. **Doloy A**, Verdet C, Gautier V, Decré D, Ronco E, Hammami A *et al.* *Genetic Environment of Acquired blaACC-1 b-Lactamase Gene in Enterobacteriaceae Isolates.* Antimicrob Agents Chemother **2006**;50(12):4177-4181.
43. **Eckert C**, Gautier V, Arlet G. *DNA sequence analysis of the genetic environment of various bla<sub>CTX-M</sub> genes.* J Antimicrob Chemother **2006**;57:14-23.
44. **Ensor VM**, Shahid M, Evans JT, Hawkey PM. *Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M beta-lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals.* J Antimicrob Chemother **2006**;58(6):1260-3.
45. **Fernández A**, Gil E, Cartelle M, Pérez A, Becerro A, Mallo S *et al.* *Interspecies spread of CTX-M-32 extended-spectrum b-lactamase and the role of the insertion sequence IS1 in down-regulating bla<sub>CTX-M</sub> gene expression.* J Antimicrob Chemother **2007**;59, 841–847.
46. **Fluit AC**, Schmitz FJ. *Resistance integrones and superintegrons.* Clin Microbiol Infect **2004**;10:272-288.
47. **Ford PJ**, Avison MB. *Evolutionary mapping of the SHV b-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the Klebsiella pneumoniae chromosome.* J Antimicrob Chemother **2004**;54: 69–75.
48. **Frost LS**, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. *Mobile genetic elements: the agents of open source evolution.* Nat Rev Microbiol **2005**;3:722-732.
49. **Funnell BE. *Partition-mediated plasmid pairing.* Plasmid **2005**;53:119–125.**
50. **García A**, Navarro F, Miró E, Mirelis B, Campoy S, Coll P. *Characterization of the highly variable region surrounding the bla<sub>CTX-M-9</sub> gene in non-related Escherichia coli from Barcelona.* J Antimicrob Chemother **2005**;56:819–826

51. **García-Rodríguez JA.** Antimicrobianos en Medicina 2ª ed. Sociedad Española de Quimioterapia **2006**. Cantón R, M.I. Morosini, S. Valdezate. *Resistencia bacteriana a los antimicrobianos*. ISBN 978-84-8124-240-9.
52. **Garcillán-Barcia MP,** Francia MV, de la Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microb Rev* **2009**;33(3):657-87.
53. **Garnier F,** Raked N, Gassama A, Denis F, Ploy MC. *Genetic Environment of Quinolone Resistance Gene qnrB2 in a Complex sul1-Type Integron in the Newly Described Salmonella enterica Serovar Keurmassar*. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**;50(9):3200–3202.
54. **Garza-Ramos U,** Davila G, Gonzalez V, Alpuche-Aranda C, López-Collada VR, Alcantar-Curiel D, *et al.* *The blaSHV-5 gene is encoded in a compound transposon duplicated in tandem in Enterobacter cloacae*. *Clin Microbiol Infect* **2009**;15:878-800.
55. **Gerdes K,** Moller-Jensen J, Jensen RB. *Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny*. *Mol Microbiol* **2000**;37(3):455-466.
56. **Golebiewski M,** Kern-Zdanowicz I, Zienkiewicz M, Adamczyk M, Z'lyli`nska J, Baraniak A *et al.* *Complete Nucleotide Sequence of the pCTX-M3 Plasmid and Its Involvement in Spread of the Extended-Spectrum-Lactamase Gene bla<sub>CTX-M-3</sub>*. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**;51(11): 3789–3795.
57. **Gutiérrez B,** Herrera-León S, Escudero JA, Hidalgo L, González-Sanz R, Arroyo M *et al.* *Novel genetic environment of qnrB2 associated with TEM-1 and SHV-12 on pB1004, an IncHI2 plasmid, in Salmonella Bredeney BB1047 from Spain*. *J Antimicrob Chemother* **2009**. [Epub ahead of print]
58. **Hansson K,** Sundström L, Pelletier A, Roy PH. *IntI2 integron integrase in Tn7*. *J Bacteriol* **2002**;1184(6):1712-1721.
59. **Hrabak J,** Empel J, Bergerova T, Fajfrlík K, Urbaskova P, Kern-Zdanowicz I *et al.* *International Clones of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli with Extended-Spectrum-Lactamases in a Czech Hospital*. *J Clin Microbiol* **2009**;47(10): 3353–3357.
60. **Jacoby GA,** Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**;35(1):164.
61. **Jacoby GA,** Han P. *Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **1996**;34:908-911.
62. **Jacoby GA,** Muñoz-Price LS. *The new beta-lactamases*. *N Engl J Med* **2005**;352:380-91.

63. Jeong JY, Yoon HJ, Kim ES, Lee Y, Choi SH, Kim NJ *et al.* Detection of *qnr* in Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49(6):2522–2524.
64. Jouini A, Vinué L, Slama KB, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, *et al.* Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum *b*-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 60: 1137–1141.
65. Khan SA. Plasmid rolling-circle replication: recent developments. *Mol Microbiol* **2000**;37(3):477-484.
66. Kim J, Shin HS, Seol SY, Cho DT. Relationship between blaSHV-12 and blaSHV2a in Korea. *J Antimicrob Chemother* **2002**;49:261-267.
67. Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. Diversity of genetic environment of bla<sub>CTX-M</sub> genes. *FEMS Microbiol Letters* **2004**; 234:201-07.
68. Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. *In Vitro* Analysis of ISEcp1B-Mediated Mobilization of Naturally Occurring-Lactamase Gene bla<sub>CTX-M</sub> of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**;50(4):1282-1286.
69. Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, García-Fernández A, Larrosa MN, Bartolomé RM *et al.* Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* **2008**;61(2):291-5.
70. Llanes C, Gabant P, Couturie M, Bayer L, Plesiat T. Molecular analysis of the replication elements of the broad-host-range repA/C replicon. *Plasmid* **1996**;36:26-35.
71. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **1998**;62(3):725-774.
72. Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49(1):71-76.
73. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **1998**;351:797.
74. Mazel D, Dychico B, Webb VA, Davies J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* **1998**;280(5363):605-8.
75. Meijer WJ, de Boer AJ, van Tongeren S, Venema G, Bron S. Characterization of the replication region of the *Bacillus subtilis* plasmid pLS20: a novel type of replicon. *Nucleic Acids Res.* **1995**; 23:3214–3223.
76. Mollet B, Clerget M, Meyer J, Iida S. Organization of the Tn6-Related Kanamycin Resistance Transposon Tn2680 Carrying Two Copies of IS26 and an IS903 Variant, IS903. *J Bacteriol* **1985**;163(1):55-60.

77. Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. An *SHV*-derived extended-spectrum *b*-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**;43(5):1281-4.
78. Naumann TA, Reznikoff WS. *Tn5* transposase with an altered specificity for transposon ends. *J Bacteriol* **2002**;148(1):233-240.
79. Navarro F, Miró E. Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2007**;25(supl.2):11-7 (A)
80. Navarro F, Mesa RJ, Miró E, Gómez L, Mirelis B, Coll P. Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence. *FEMS Microbiol Lett* **2007** (273):120-123 (B)
81. Novais Â, Cantón R, Valverde A, Machado E, Galán JC, Peixe L et al. Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from *Tn402* located in early antibiotic resistance plasmids of *IncHI2*, *IncP1-α*, and *IncFI* groups. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50 (8):2741-2750.
82. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* **2005**;56:463-469.
83. Novick RP. Plasmid Incompatibility. *Microbiol Rev* **1987**;51(4):381-395.
84. Ohta S, Tsuchida K, Choi S, Sekine Y, Shiga Y, Ohtsubo E. Presence of a characteristic DDE motif in *IS1* transposase. *J Bacteriol* **2002**;184(22):6146-6154.
85. Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vázquez M et al. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother* **2009**; 64:524–528.
86. Pai H, Seo MR, Choi TY. Association of *QnrB* Determinants and Production of Extended-Spectrum-Lactamases or Plasmid-Mediated AmpC-Lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**;51(1):366-368.
87. Parks AR, Li Z, Shi Q, Owens RM, Jin MM, Peters JE. Transposition into replication DNA through interaction with the processivity factor. *Cell* **2009**;138(4):685-695.
88. Partridge SR, Hall RM. Complex Multiple Antibiotic and Mercury Resistance Region Derived from the *r-det* of *NR1* (*R100*). *Antimicrob Agents Chemother* **2004**;48(11):4250-4255.
89. Partridge SR, Hall RM. Evolution of transposon containing *bla*<sub>TEM</sub> genes. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**;49(3):1267-1268.

90. Paterson DL, Bonomo RA. *Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update*. Clin Microbiol Rev **2005**;18(4):657-686.
91. Paulsson J, Chattoraj DK. *Origin inactivation in bacterial DNA replication control*. Mol Microbiol **2006**;61(1):9-15.
92. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. *Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related  $\beta$ -lactamase CTX-M-3*. J Antimicrob Chemother **2002**;50:1031–1034.
93. Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. *Insertion Sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a blaCTX-M beta-lactamase gene*. Antimicrob Agents Chemother **2003**;47(9):2938-2945.
94. Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P. *ISEcp1B-Mediated Transposition of blaCTX-M in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother **2005**;49(1):447-550.
95. Poirel L, Pitout JDD, Calvo L, Rodriguez-Martinez JM, Church D, Nordmann P. *In Vivo Selection of Fluoroquinolone-Resistant Escherichia coli Isolates Expressing Plasmid-Mediated Quinolone Resistance and Expanded-Spectrum  $\beta$ -Lactamase*. Antimicrob Agents Chemother **2006**;50(4):1525-27.
96. Poirel L, Naas T, Nordmann P. *Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases*. Clin Microbiol Infect **2008**;14(Supl.1):75-81.
97. Preston KE, Venezia RA. *Chromosomal sequences from Klebsiella pneumoniae flank the SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase gene in pACM1*. Plasmid **2002**;48(1):73-6.
98. Preston KE, Venezia RA, Stellrecht KA. *The SHV-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene of pACM1 is located on the remnant of a compound transposon*. Plasmid **2004**;51:48-53.
99. Reznikoff WS. *Tn5 as a model for understanding DNA transposition*. Mol Microbiol **2003**;47(5):1199-1206.
100. Rice LB. *Bacterial monopolist: the bundling and dissemination of antimicrobial resistance genes in gram-positive bacteria*. Clin Infect Dis **2000**;31:762-769.
101. Robicsek A, Sahm DF, Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC. *Broader distribution of plasmid-mediated quinolone resistance in the United States*. Antimicrob Agents Chemother **2005**;49(7):3001-3.
102. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. *The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance*. Lancet Infect Dis **2006**;6(10):629-40.

- 103. Rodríguez I**, Martín MC, Mendoza MC, Rodicio MR. *Class 1 and class 2 integrons in non-prevalent serovars of Salmonella enterica: structure and association with transposons and plasmids.* J Antimicrob Chemother **2006**;58(6):1124-1132.
- 104. Rodríguez-Martínez JM**, Poirel L, Cantón R, Nordmann P. *Common region CR1 for expression of antibiotic resistance genes.* Antimicrob Agents Chemother **2006**;50(7):2544-2546.
- 105. Rodríguez-Martínez JM**, Velasco C, García I, Cano ME, Martínez-Martínez L, Pascual A. *Characterisation of integrons containing the plasmid-mediated quinolone resistance gene qnrA1 in Klebsiella pneumoniae.* Int J Antimicrob Agents **2007**;29(6):705-9.
- 106. Rowe-Magnus DA**, Mazel D. *Resistente gene capture.* Curr Opin Microbiol **1999**;2:483-488.
- 107. Rowe-Magnus DA**, Guerout AM, Plondcard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D. *The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for mutiresistant integrons.* PNAS **2001**;98(2):652-657. (A)
- 108. Rowe-Magnus DA**, Mazel D. *Integrons: natural tools for bacterial genome evolution.* Curr Opin Microbiol **2001**;4:565-569. (B)
- 109. Rowe-Magnus DA**, Guerout AM, Mazel D. *Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integrons gene cassettes.* Mol Microbiol **2002**;43(6):1657-1669. (A)
- 110. Rowe-Magnus DA**, Mazel D. *The role of integrons in antibiotic resistance gene capturing.* I J Med Microbiol **2002**;292:115-125. (B)
- 111. Sabaté M**, Navarro F, Miró E et al. *Novel complex sul1-type integron in Escherichia coli carrying bla<sub>CTX-M-9</sub>.* Antimicrob Agents Chemother **2002**;46(8):2656-2661. (A)
- 112. Sabaté M**, Prats G. *Estructura y función de los integrones.* Enferm Infecc Microbiol Clin **2002**;20(7):341-5. (B)
- 113. Senda K**, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S et al. *PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (bla<sub>IMP</sub>) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams.* J Clin Microbiol **1996**;34(12):2909-2913.
- 114. Shen P**, Jiang Y, Zhou Z, Zhang J, Yu Y, Li L. *Complete nucleotide sequence of pKP96, a 67 850 bp multiresistance plasmid encoding qnrA1, aac(60)-Ib-cr and bla<sub>CTX-M-24</sub> from Klebsiella pneumoniae* J Antimicrob Chemother **2008**;62:1252–1256.
- 115. Snyder L**, Champness W. *Molecular genetics of bacteria.* ASM Press: 1<sup>a</sup> ed. 1997; 3<sup>a</sup> ed. 2007. ISBN: 978-1-55581-399-4.

- 116. Su Z**, Dai X, Chen J, Kong F, Wang H, Li Y *et al.* The *bla*CTX-M-1 gene located in a novel complex class I integron bearing an ISCR1 element in *Escherichia coli* isolates from Zhenjiang, China. *J Antimicrob Chemother* **2008**;62: 1150–1164.
- 117. Thomas CM**, Nielsen KM. Mechanism of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2005**;3:711-721.
- 118. Toleman MA**, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21<sup>st</sup> century? *Microbiol Mol Biol Rev* **2006**;70(2):296-316.
- 119. Torres C**, Zarazaga M. BLEE en animals y su importancia en la transmisión a humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2007**;25(supl.2):29-37.
- 120. Turner MS**, Andersson P, Bell JM, Turnidge JD, Harris T, Giffard PM. Plasmid-borne *bla*SHV genes in *Klebsiella pneumoniae* are associated with strong promoters. *J Antimicrob Chemother* **2009**;64:960-4.
- 121. Valverde A**, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, Novais A, Galán JC, Alvarado A *et al.* Spread of *bla*CTX-M-14 is mainly driven by *IncK* Plasmids Disseminated Among A (ST10), B1 (ST155 /ST359) and D *Escherichia coli* Phylogroups in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*; September **2009** [Epub ahead of print].
- 122. Valverde Romero ED**, Parras Padilla T, Herrero Hernández A, Pérez Grande R, Fernández Vázquez M, García García I *et al.* Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Diagnos Microbiol Infect Dis* **2007**;59:433–437.
- 123. Valverde Romero ED**, García García I, Parras Padilla T, Herrero Hernández A, Fernández Vázquez M, Pérez Grande R *et al.* Epidemiology of CTX-M beta-lactamases in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(Suppl.2): P458
- 124. Villa L**, Pezzella C, Tosini F, Visca P, Petrucca A, Carattoli A. Multiple-Antibiotic Resistance Mediated by Structurally Related *IncL/M* Plasmids Carrying an Extended-Spectrum *b*-Lactamase Gene and a Class 1 Integron. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44(10):2911-14.
- 125. Vinué L**, Sáenz Y, Martínez S, Somalo S, Moreno MA, Torres C *et al.* Prevalence and diversity of extended spectrum *b*-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. *Clin Microbiol Infect* **2009**;15:954-957.
- 126. Wang M**, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**;47(7):2242-2247.

- 127. Wang M, Sahm DF, Jacoby GA et al.** *Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in Klebsiella pneumoniae clinical isolates in the United States.* Antimicrob Agents Chemother **2004**; 48(4):1295-1299.
- 128. Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S et al.** *New Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene, qnrC, Found in a Clinical Isolate of Proteus mirabilis.* Antimicrob Agents Chemother **2009**;53(5):1892-1897.
- 129. Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M, Wang H.** *High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes qnr and aac(6)-Ib-cr in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae from Nine Teaching Hospitals in China.* Antimicrob Agents Chemother **2008**;52(12):4268-4273.
- 130. Yu WL, Chen SC, Hung SW, Chuang YC, Chung JG, Chen IC et al.** *Genetic association of blaSHV-5 with transposable elements IS26 and IS5 in Klebsiella pneumoniae from Taiwan.* Clin Microbiol Infect **2006**;12(8):806-809.
- 131. Zechner EL, Bailey MJ.** *The horizontal gene pool: an ESF workshop summary.* Plasmid **2004**;51:67-74.
- 132. Zienkiewicz M, Kern-Zdanowicz I, Golebiewski M, Zzylińska J, Mieczkowski P, M. Gniadkowski et al.** *Mosaic Structure of p1658/97, a 125-Kilobase Plasmid Harboring an Active Amplicon with the Extended-Spectrum-Lactamase Gene blaSHV-5.* Antimicrob Agents Chemother **2007**;51(4):1164-1171.

VNiVERSITAS  
STVDII  
SALAMANTIiNI

A decorative flourish consisting of several overlapping loops and swirls, rendered in a dark red color, positioned below the text.