



003619
**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**“CARACTERIZACION MOLECULAR DE
B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
**BIOL. JESUS ULISES GARZA
RAMOS MARTINEZ**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MOR.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

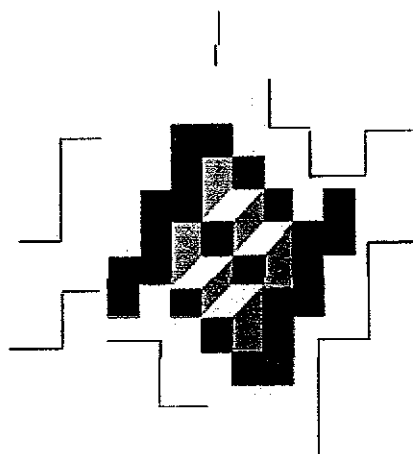


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) ubicado en el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), bajo la dirección y asesoría del Dr. Jesús Silva Sánchez.

El proyecto contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 30938M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A Fátima y Katherine

Porque me inspiran para conseguir mis objetivos en la vida y porque son mis dos grandes amores. Además por sacrificarse a mi lado durante todo este tiempo.

A mis Padres y Hermanos

Por apoyarme en el transcurso de mi vida y nunca olvidare todos los sacrificios que realizaron por mi.

A mis Suegros y Cuñadas

Por considerarme como de su familia y apoyarme desde el momento en que me integre a la suya.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente al Dr. Jesús Silva Sánchez por la asesoría y apoyo brindado desde el momento en que me integre a su laboratorio para formarme dentro de campo de la investigación.

Un especial agradecimiento a la QBP. Berta Carrillo Quiroz, a la Biol. Zita Becerra y a la Sra. Teresa Rojas por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al comité tutorial, Dr. Edmundo Calva, Dr. Joel Osuna y Dr. Jesús Silva por su tiempo y asesoría en el desarrollo del proyecto.

Agradezco al Jurado, Dra. Gloria Soberón, Dr. Jesús Silva, Dr. Guadalupe Espín, Dr. José Luis Puente y al Dr. Lorenzo Segovia por la revisión y consejos en la escritura de la tesis.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca de posgrado de Febrero de 1999 a Enero del 2001.

RESUMEN

Las enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son el principal mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos. Estas enzimas son producidas por bacterias Gram-negativas. Las familias predominantes son la TEM y SHV, estos genes son comúnmente codificados en plásmidos conjugativos de alto peso molecular. En este estudio se seleccionaron 17 aislamientos clínicos productores de BLEEs de Enterobacterias multirresistente (*Klebsiella pneumoniae* (11), *Enterobacter cloacae* (4) y *Escherichia coli* (2)) procedentes de siete hospitales de tres ciudades distintas (Ciudad de México, Tabasco y Cuernavaca) que fueron aisladas entre 1990 y 1998. Los pI de las β -lactamasas codificadas en los plásmidos conjugativos son: 5.4, (7.6), (8.2), 8.1 y (9.0) y de los no conjugativos 5.4, 7.6, (7.6), (8.2), 7.8, (9.0) (Paréntesis BLEE). Se identificó que las β -lactamasas con pI de 5.4, corresponden a la familia TEM y las de pI de (9.0) a TLA-1. La secuencia obtenida de los genes que codifican las β -lactamasas con pI 7.6 correspondió a SHV-1; las de pI de (7.6) a SHV-2 y las de pI de (8.2) a SHV-5. Las principales BLEEs codificadas fueron SHV-2 y SHV-5, y la β -lactamasa tipo TEM está ampliamente distribuida en las cepas.

El análisis de restricción de los plásmidos con las enzimas *NotI*, *DraI* y *PstI* que codifican las β -lactamasas tipo SHV mostró, que los plásmidos comparten diferentes bandas. Mediante la hibridación molecular con la sonda del gen *bla*_{SHV-1} de los patrones de restricción generados con las enzimas *NotI* y *DraI* indicó que los genes de las β -lactamasas tipo SHV están codificados en la región de DNA que comparten los plásmidos, siendo esta de aproximadamente 15 kb. Además se identificó que los plásmidos codifican para la integrasa de clase 1 (16/17), donde seis cepas contienen casetes integrados de 1.0 a 2.1 kb. Las β -lactamasas tipo SHV no fueron identificadas dentro de los casetes amplificados.

INDICE

i. RESUMEN

1. INTRODUCCION

1.1 ANTIBIOTICOS

1.2 PARED CELULAR DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

1.3 INHIBICION DE SINTESIS DE LA PARED POR ANTIBIOTICOS β -LACTAMICOS

1.4 MECANISMO DE ACCION DE ALGUNOS ANTIBIOTICOS NO β -LACTAMICOS

1.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA

1.6 EVOLUCION Y DISEMINACION DE β -LACTAMASAS POR LA GENERACION DE ANTIBIOTICOS β -LACTAMICOS

1.7 MECANISMOS DE TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES POR MEDIO DE CONJUGACION

1.8 β -LACTAMASAS COMO PRINCIPAL MECANISMO DE RESISTENCIA A β -LACTAMICOS EN ENTEROBACTERIAS

1.9 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LAS β -LACTAMASAS

1.10 LA RESISTENCIA A β -LACTAMICOS ESTA MEDIADA POR PLASMIDOS

2. ANTECEDENTES

3. OBJETIVOS

4. MATERIALES Y METODOS

5. RESULTADOS Y DISCUSION

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCION

Durante mucho tiempo han surgido infecciones nosocomiales causadas por microorganismos Gram-negativos, principalmente en la sala de cuidados intensivos, neonatos y quirúrgicas, donde se han aislado diferentes géneros de Enterobacterias multirresistentes a varios antibióticos. Se han identificado la presencia de genes de que codifican β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) causantes de la resistencia a antibióticos β -lactámicos (Sirot y col; 1988).

Las cepas productoras de BLEE pueden circular por largos períodos de tiempo en hospitales y son causantes de brotes intrahospitalarios que se diseminan a diferentes salas e incluso entre diferentes hospitales. Las bacterias Gram-negativas son los agentes etiológicos de estas infecciones en lactantes neonatos y lactantes inmunosuprimidos provocando un alto porcentaje de septicemias con un elevado índice de mortalidad. Las Enterobacterias incluyen las cepas de *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y además *Pseudomonas aeruginosa* (Gouby y col; 1994).

Los estudios epidemiológicos en referencia a los genes que codifican las BLEE producidas por microorganismos muestran que va en aumento en centros de salud en varios países (Liu y col; 1992). Así mismo la presencia de diferentes BLEE en cepas bacterianas han mostrado que los genes que codifican las β -lactamasas TEM y SHV están comúnmente presentes en plásmidos conjugativos de alto peso molecular (Medeiros; 1997). La dispersión de estos genes dentro de plásmidos no relacionados ha sido descrito y con frecuencia los plásmidos contienen además

otros genes de resistencia a antibióticos no β -lactámicos, resultando en un incremento en la prevalencia de organismos resistentes a múltiples drogas (Sirot y col; 1991).

1.1 Antibióticos

Muchos antibióticos son compuestos naturalmente sintetizados por microorganismos, especialmente actinomicetes, que les ayudan a competir con otros microorganismos, ya que son sustancias que bloquean el crecimiento celular. Los antibióticos tienen un amplio espectro de actividad y blancos específicos. Su clasificación se basa en su conformación química y pueden agruparse como: β -lactámicos, actinomicinas, tetraciclinas, macrólidos y aminoglucósidos.

Dentro de los β -lactámicos se encuentran las penicilinas (penicilina G, ampicilina, cabenicilina, etc), las cefalosporinas de primera generación (cefalotina, cefaloridina), las de segunda generación (cefoxitina, cefamandol, cefuroxima), las de tercera generación (cefotaxima, ceftazidima y ceftibutem) y las de cuarta generación (cefpiroma y cefepime). También encontramos a los carbapenems (imipenem) y a los monobactams (aztreonam) (Figura 1A). Dentro de los β -lactámicos tenemos a los inhibidores de β -lactamasas como, el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Figura 1B) (Bennett y Chopra; 1993). Las cefalosporinas se consideran como de primera elección por su acción de espectro extendido tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Dámaso; 1990).

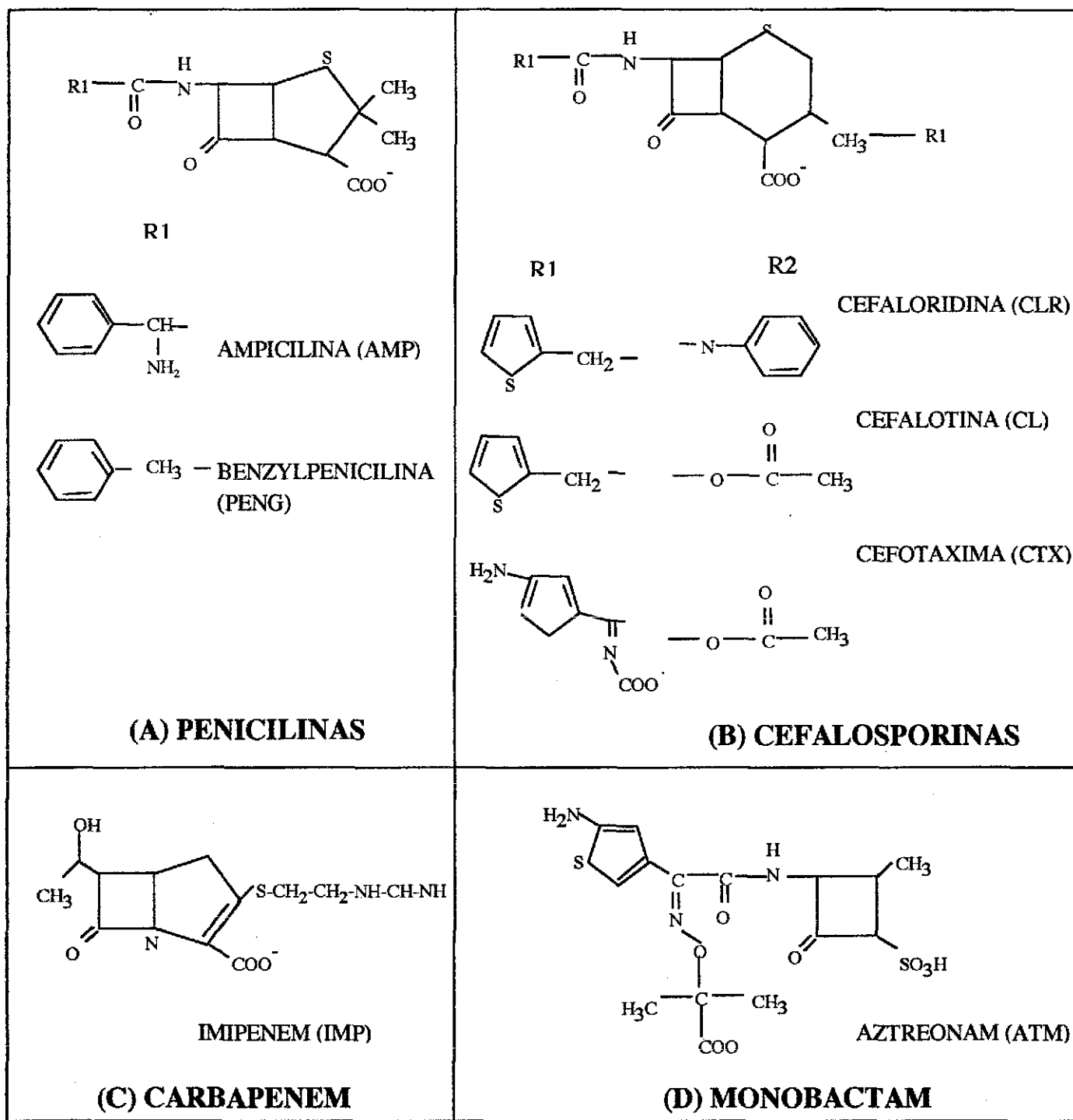


Figura 1A. Estructura de algunos antibióticos β-lactámicos. A) Los sustituyentes del grupo acil unido al amino del ácido 6-aminopenicilánico para originar a AMP y PENG. (C) La similitud de estos substratos se debe al oximino-cefalosporin y debido sus sustituyentes R₁ y R₂ genera cefalosporinas de espectro extendido (CLR, CL, CTX). C y D) el imipenem y el aztreonam son antibióticos β-lactámicos de espectro extendido.

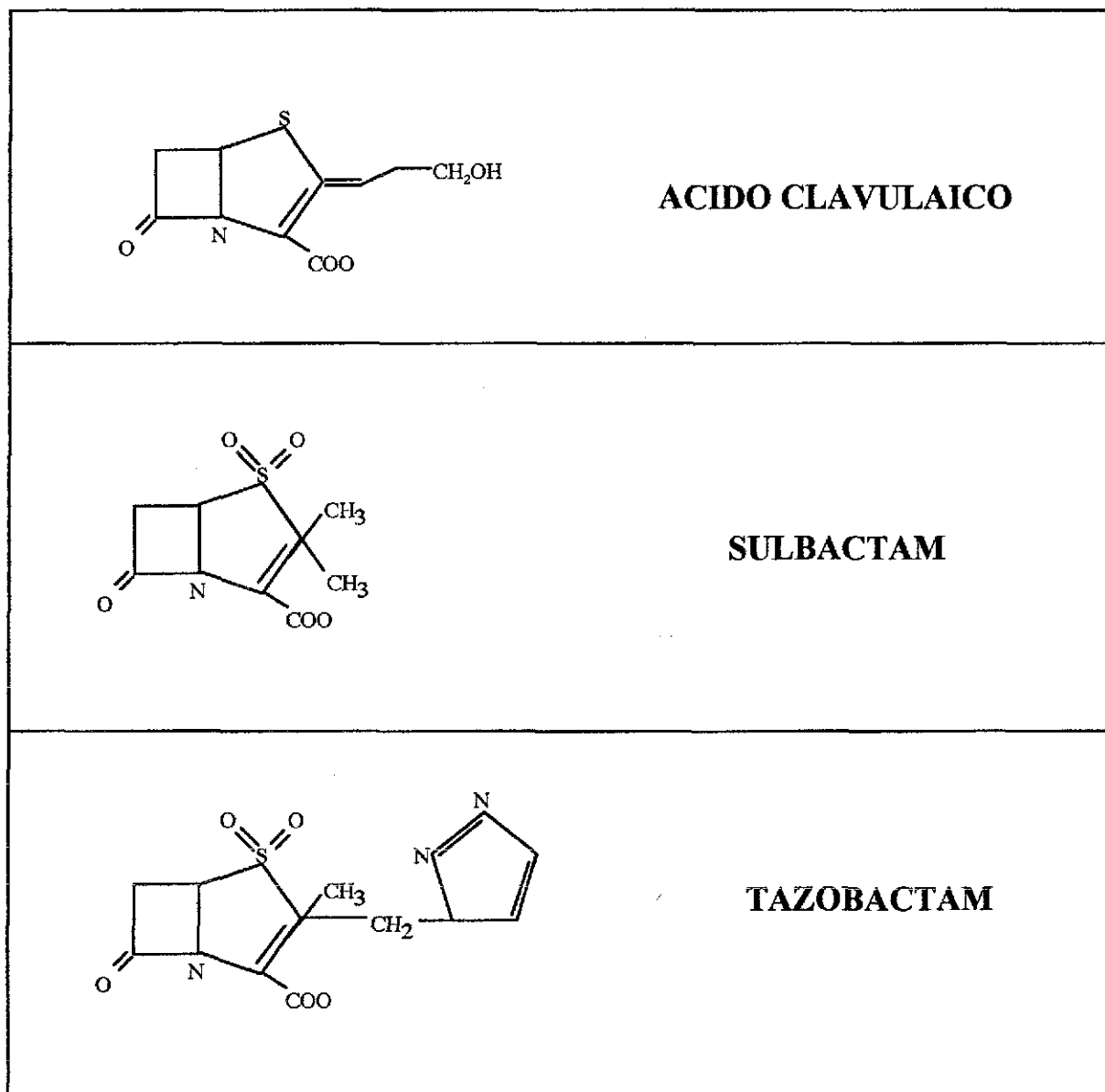


Figura 1B. El ácido clavulánico fue el primer inhibidos de β -lactamasas disponible para el uso clínico (1984) en combinación con una penicilina. El ácido clavulánico es un producto natural de *Streptomyces clavuligerus*. El segundo grupo de inhibidores derivados del ácido penicilánico son el sulbactam y tazobactam. Los inhibidores acilan la enzima e inactiva la serina del sitio activo de las β -lactamasas de clase A, previniendo que las β -lactamasas hidrolicen la penicilina (Medeiros, 1997).

1.2 La Envoltura Celular de Bacterias Gram-negativas

El sitio blanco de los antibióticos β -lactámicos son las DD-peptidasas y también conocidas como proteínas fijadoras de penicilina o PBPs. Este es un grupo de enzimas transmembranales se encuentran ancladas en la membrana interna de las bacterias y son las encargadas de la biosíntesis de la pared celular (Figura 2). Estas enzimas catalizan el paso de transpeptidación uniendo covalentemente ambas hebras de peptidoglicano (D-alanil-D-alanina). El dipéptido forma los extremos de los péptidos de la mureína, un substrato natural de las PBPs (Massova y Mobashery; 1997).

La función del peptidoglicano que forma la pared celular es proveer soporte para el mantenimiento de la morfología bacteriana y soportar cambios en la presión osmótica (Neidhardt; 1987). La región entre la membrana interna y la pared celular es conocido como espacio periplasmático, en esta región se encuentran localizadas las enzimas β -lactamasas que hidrolizan irreversiblemente los antibióticos β -lactámicos impidiendo que actúen sobre las PBPs (Figura 2).

1.3 Inhibición de síntesis de la pared celular por los antibióticos β -lactámicos

Las PBPs son las responsables del ensamble, mantenimiento y regulación de las características de la estructura de peptidoglicano. Estas proteínas transmembranales de la membrana interna, tienen su sitio activo expuesto hacia el espacio periplásmico. El grupo acil de los antibióticos β -lactámicos, como la penicilina, acila el sitio activo de esta proteína, resultando una enzima inactiva y relativamente estable. Por lo tanto la bacteria es privada de la actividad enzimática

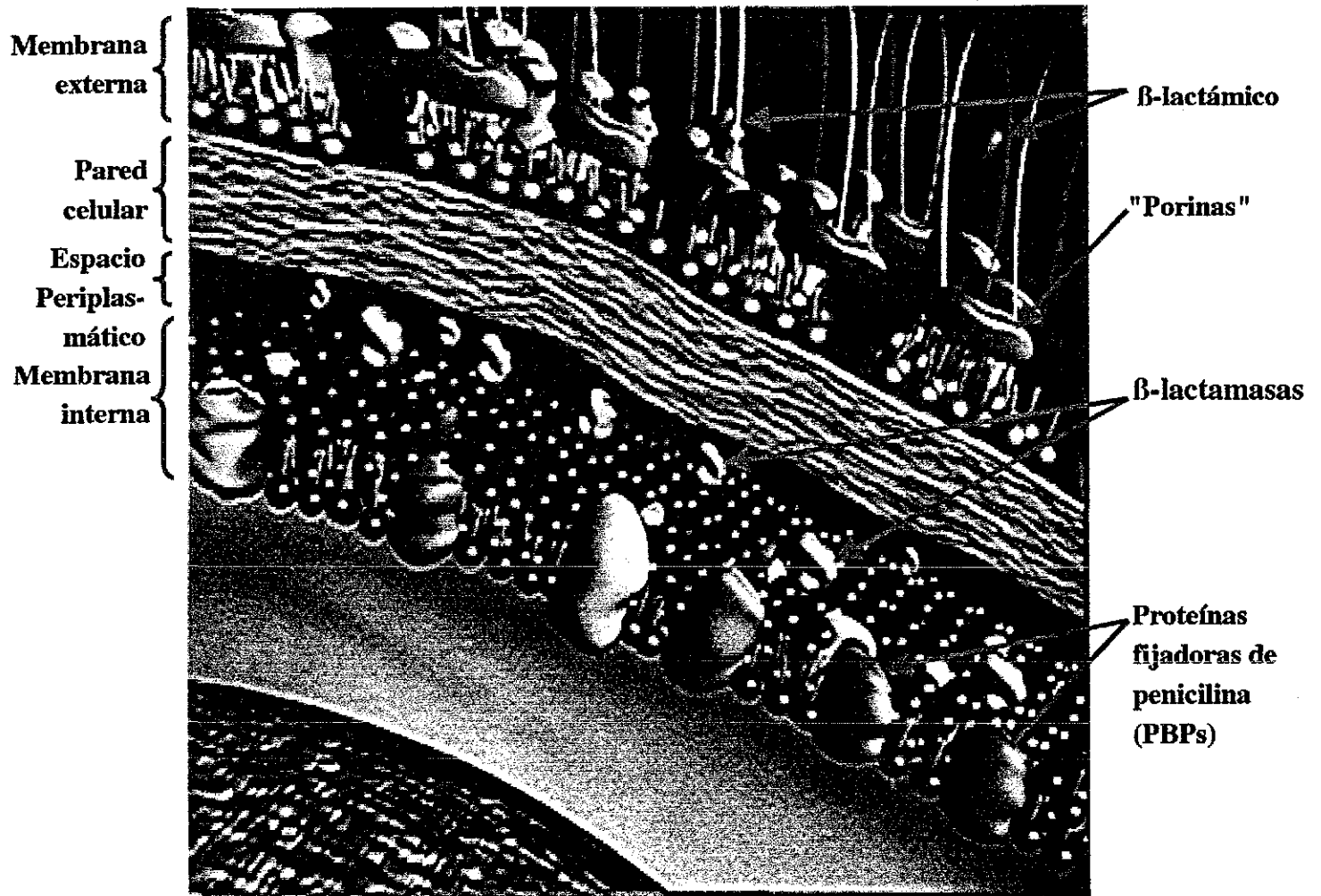


Figura 2. Corte transversal de una bacteria Gram-negativa. Se observa la membrana externa donde se ubican las porinas por donde penetra los antibióticos β -lactámicos y el espacio periplasmático donde se encuentran las β -lactamasas, las cuales hidrolizan los antibióticos β -lactámicos impidiendo que lleguen a las PBPs encargadas de la biosíntesis de la pared celular que se encuentran en la membrana interna.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inhibiendo la síntesis de peptidoglicano, lo cual es letal para las bacterias (Figura 3A) (Massova y Mobashery; 1997).

1.4 Mecanismos de Acción de algunos Antibióticos no β -lactámicos

Las sulfonamidas son un importante inhibidor en la producción de ácido tetrahidrofílico, cofactor importante para la síntesis de ácidos nucleicos y formil metionina, por lo que impide la producción de ácido tetrahidrofílico. Esto impide la producción de macromoléculas esenciales para la bacteria (Figura 3B) (Snyder y Champness; 1996).

Las quinolonas inhiben la replicación del DNA uniéndose a la subunidad β de la DNA girasa, lo que interrumpe la actividad de esta enzima que permite el superenrollamiento del DNA, proceso esencial en la replicación de la célula. Por otra parte la rifampicina inhibe la RNA polimerasa de la bacteria al unirse a la subunidad β (Figura 3C).

Los macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas y lincosamidas, inhiben la síntesis de proteínas. Los aminoglucósidos se unen a la subunidad 30S del ribosoma, impidiendo que esta subunidad se una con la subunidad 50S para formar un ribosoma activo, por lo que no se puede llevar a cabo la síntesis de proteínas. Por otro lado los macrólidos se unen a la subunidad 50S ribosomal, lo que impide la elongación de las proteínas (Figura 3D) (Dever y Dermody, 1991).

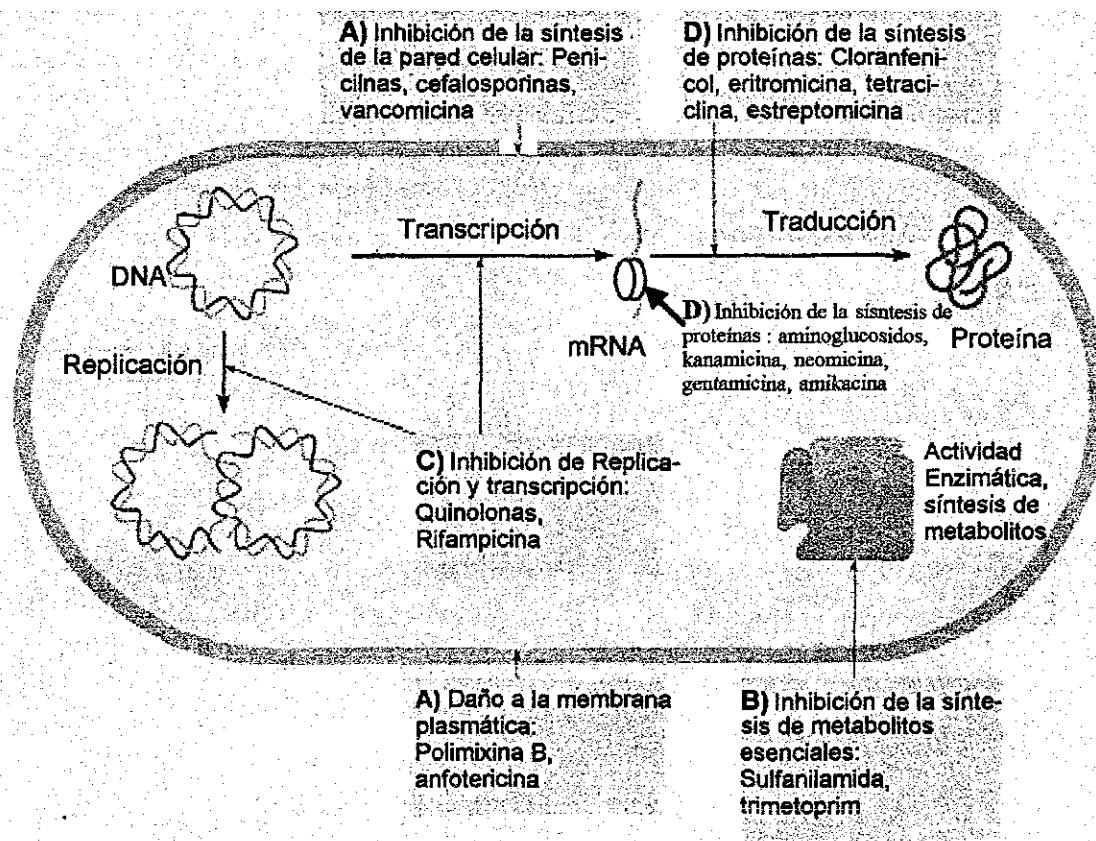


Figura 3. Mecanismos de acción de diferentes antibióticos. A) Inhibición de la síntesis de la pared celular; B) inhibición de la síntesis de metabolitos; C) inhibición de la replicación y transcripción; D) inhibición de la síntesis de proteínas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.5 Mecanismos de Resistencia Bacteriana

Las bacterias resistentes a antibióticos se han seleccionado debido a su uso indiscriminado de los antibióticos. Esto ha generado numerosas estrategias de resistencia a la gran gama de antibióticos previamente mencionados y han reportado varios mecanismos bien identificados para inhibir la actividad de estos antibióticos (Neu, 1992).

1.5.1 Inhibición enzimática

El mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos es mediado por enzimas β -lactamasas, las cuales inactivan a la droga hidrolizando la unión amida del anillo β -lactámico, evitando que el antibiótico actúe sobre las PBPs (Ghuysen, J. 1994). Los aminoglucosidos son inactivados por medio de la fosforilación y acetilación, modificando la conformación tridimensional del fármaco lo que impide que se una al sitio blanco (Dever y Dermody; 1991).

1.5.2 Alteración del sitio blanco

Una sobreproducción de las PBPs y mutaciones en estas proteínas hacen que disminuya su afinidad por los β -lactámicos, estos organismos muestran resistencia a múltiples agentes antimicrobianos (Salyers y Whitt, 1994). Por otro lado las bacterias modifican sus ribosomas para presentar resistencia a tetraciclina. De igual manera modifican la subunidad 50S al metilar una adenina en la posición 23S del ribosoma, alterando la sensibilidad a los macrólidos. La resistencia a fluroquinolonas es mediada por la mutación en el aminoácido 84

u 85 de la DNA girasa. Este mecanismo de resistencia es similar para la rifampicina (Nue; 1992).

1.5.3 Cambios en la permeabilidad de la membrana

Las bacterias Gram-negativas presentan porinas en la membrana externa y cuando son expuestas a condiciones de alta osmolaridad las porinas pueden cambiar de OmpF (de mayor diámetro) a OmpC (de menor diámetro), esta substitución previene la entrada de moléculas grandes, tales como la carbenicilina, que está cargada negativamente y tiene una gran hidrofobicidad (Nikaido y col; 1988).

1.5.4 Sistema activo de eflujo

A la fecha, se reconoce que los sistemas de eflujo presentes en procariontes son responsables de la resistencia a una amplia gama de antibióticos y sustancias tóxicas no relacionadas estructuralmente como metales pesados y desinfectantes (Levy; 1992). Algunos compuestos sintetizados químicamente como la tetraciclina son expulsados del interior de la célula por un mecanismo activo de eflujo codificado plasmidicamente por el gen *tet* en *E. coli*. Por otra parte, en *Proteus mirabilis* y aun en algunas cepas de *E. coli* este mecanismo es codificado cromosomalmente (McMurry y col; 1994).

1.6 Evolución y Diseminación de β -lactamasas por la generación de antibióticos β -lactámicos

Las β -lactamasas cromosomales existieron en las bacterias antes del uso de los antibióticos en humanos, quizás para protegerse contra antibióticos β -lactámicos producidos por hongos silvestres. Esto selecciono cepas con enzimas, las cuales han sido usadas para hidrolizar los β -lactámicos usados ahora en humanos. Por lo que favoreció que las bacterias; i) produzcan grandes cantidades de β -lactamasas cromosomales, ii) que tengan enzimas secundarias codificadas en plásmidos y iii) que generen β -lactamasas mutadas con un amplio espectro de antibióticos (Livermore, 1998).

Cuando los β -lactámicos fueron introducidos en 1944, la benzilpenicilina fue activa contra el 95% de los aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus*, pero el resto fue resistentes, ya que presentaron β -lactamasas. Al paso de cinco años la proporción de cepas productoras de estas enzimas creció al 50%, reflejando la transferencia de genes y la selección de aislamientos clínicos (Lacey, 1984). Subsecuentemente esta proporción aumento al 90%. Una dispersión similar de resistencia ocurrió al principio de los 1960's contra organismos Gram-negativos (Matthew, 1979). Algunos organismos heredaron la resistencia a estos antibióticos como resultado de una gran producción de β -lactamasas cromosomales. Por ejemplo ampicilina, amoxicilina y carboxipenicilinas carecen de actividad contra *Klebsiella* spp., las cuales tienen significantes niveles de las β -lactamasas cromosomales como SHV-1 y K1. Así mismo, ampicilina, amoxicilina y las cefalosporinas de primera generación carecen de actividad contra especies con β -lactamasas de clase A inducibles; por ejemplo, enzimas AmpC (clase C) en *P.*

vulgaris, *C. diversus*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia* spp., y *P. aeruginosa*.

Una importante continuación a la introducción de los β -lactámicos fue la dispersión de β -lactamasas codificadas en plásmidos, principalmente TEM-1 en especies que inicialmente eran susceptibles. La enzima TEM-1 fue identificada en una cepa de *E. coli* en el año de 1965 (Matthew, 1979) y desde entonces se ha dispersado del 20-60% de las especies de Enterobacterias, su exacta frecuencia varía entre especies y localidades (Livermore, 1995). Otras β -lactamasas plasmídicas como TEM-2, SHV-1 y OXA-1, se han dispersado ampliamente entre las Enterobacterias, pero TEM-1 es 10 veces más prevalente que las otras enzimas (Sanders y Sanders, 1992; Livermore, 1995). Todas estas enzimas e incluyendo a PSE-1 y PSE-4, confieren resistencias similares, con actividad contra ampicilina, amoxicilina, ticarcilina y carbenicilina (Livermore, 1998).

El desarrollo de cefalosporinas estables a las β -lactamasas TEM-1 y SHV-1 fue debido al sustituyente aximino-aminotiazolil 7-acil (en cefotaxima), el cual fue incorporado a muchas cefalosporinas de tercera generación. Alternativamente, el grupo 7- α -methoxy en ceftioxitin, cefotetan, cefmetazole y latamoxef confieren estabilidad contra la β -lactamasa cromosomal CepA de *Bacteroides fragilis* al igual que a TEM-1 y SHV-1. Esta estabilidad de los β -lactámicos no fue difícil de lograr contra la actividad de las β -lactamasas de organismos Gram-negativos, no obstante fue imposible de mantener. Debido a que las β -lactamasas de especies Gram-negativas son periplasmáticas y protegen a células individuales, por lo que una mutación puede generar una mayor producción de enzima o una “mejor enzima”, y por

consiguiente esta bacteria tiene ventajas individuales y puede ser seleccionada. Los primeros organismos resistentes a cefalosporinas que causaron preocupación fueron *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *Serratia* spp., *M. morgani* y *P. aeruginosa*, las cuales hiperproducían la β -lactamasa inducible AmpC (Sanders y Sanders, 1979; Sanders y Sanders, 1992). Las β -lactamasas AmpC fueron restringidas a las especies donde eran normalmente cromosomales e inducibles. Sin embargo, recientemente, hay varios reportes de enzimas AmpC codificadas en plásmidos de cepas de *E. coli* y *Klebsiella* spp., algunos ejemplos son BIL-1, CMY-1, -2 y -3, FOX-1, LAT-1, MIR-1 y MOX-1 (Bush y col, 1995).

Durante la mitad de los 80's surgieron β -lactamasas con la capacidad de hidrolizar cefalosporinas, así generando la emergencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), muchas de las cuales son mutantes de los tipos TEM-1, TEM-2 y SHV-1 (Philippon y col, 1989; Jacoby y Medeiros, 1991). Estas BLEEs tienen reemplazados de uno a cuatro aminoácidos comparados con la enzima parental. El primer brote intrahospitalario de aislamientos clínicos ocurrió en el Sur de Francia en los años 1985-7, y rápidamente ocurrieron brotes adicionales en diferentes ciudades de Francia (Philippon, 1989).

Las BLEEs son desde entonces las más prevalentes entre *Klebsiella* spp., particularmente por que estos organismos resisten la desecación en piel y fomites, facilitando la infección (Casewell y Desai, 1983). Así una cepa de *K. pneumoniae* serotipo K25 que codificaba la β -lactamasas SHV-4 fue transferida a por lo menos a 14 hospitales de Francia (Arlet, 1994). Cabe mencionar que las cepas se dispersan entre hospitales de tercer nivel y centro de atención que los rodean, con los cuales intercambian pacientes. No obstante, esto no explica porqué

mucho diferentes tipos de BLEEs han sido encontrados en *Klebsiella* spp., ni porqué algunos hospitales tienen registrado la diseminación de una sola BLEE entre diversos serotipos de *Klebsiella* spp.

En algunos casos la dispersión de plásmidos más que la diseminación de cepas ha sido un componente crítico en la diseminación (de Champs y col, 1991), además idénticas BLEEs han evolucionado independientemente en diferentes lugares (Hibbert-Rogers y col, 1994). Ahora las BLEEs ocurren alrededor del 23% en *Klebsiella* spp., aisladas en salas de cuidados intensivos (ICUs) en el Noroeste y Sureste de Europa (Livermore y Yuan, 1996). Por lo que se ha observado un veloz aumento de cepas con β -lactamasas AmpC y de *Klebsiella* spp., con BLEEs tipo TEM y SHV, que pueden dispersar mutantes AmpC no reguladas y variantes de espectro extendido tipo TEM y SHV (Livermore, 1998).

En cuanto al imipenem y el meropenem ambos carbapenems son ampliamente estables a todas las β -lactamasas de las clases A, D y C. No obstante los carbapenems son hidrolizados por las β -lactamasas de clase B. Estas enzimas predominan del 2-3% en *B. fragilis* y siendo un serio problema las β -lactamasas de clase B codificadas en plásmidos en Enterobacterias y Pseudomonas. La primera enzima fue identificada en 1988 en una cepa de *P. aeruginosa*, y un tipo similar llamada IMP-1 encontrada en *Serratia marcescens* y *K. pneumoniae*. Esta enzima confiere resistencia a todos los β -lactámicos excepto a monobactams (aztreonam).

Por otro lado los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam inhibe muchas β -lactamasas de clase A, particularmente enzimas cromosomales de *Bacteroides* spp., *C. diversus*, *klebsiella* spp., *P. vulgaris*, penicilinasas de *staphylococos* y las

clásicas BLEEs tipo TEM y SHV. Algunas β -lactamasas de clase D son inhibidas por ácido clavúlanico y las enzimas de clase B son universalmente resistentes a los inhibidores disponibles actualmente (Livermore, 1988). Actualmente se han identificado 25 β -lactamasas tipo TEM resistente a inhibidores (IRT) sin ser de espectro extendido, solo de estas dos son IRT y BLEE. En la familia SHV solo la SHV-10 es IRT pero no BLEE (Bradford, 2001).

Posteriormente con la mezcla piperacilin/tazobactam, en donde tazobactam es un buen inhibidor de muchas β -lactamasas de clase A y piperacilin es una penicilina de amplio espectro, a la cual muchas β -lactamasas tienen un moderado nivel de resistencia (Fu y Neu, 1978). Así tazobactam extiende la actividad de piperacilin contra los géneros *Bacteroides* y *Klebsiella* spp., las cuales tienen significantes niveles de β -lactamasas de clase A cromosomales. Además tazobactam restaura la actividad de piperacilin contra organismos que han adquirido β -lactamasas de clase A plasmidicas. No obstante piperacilin tiene buena actividad contra *P. aeruginosa*, *streptococci* y *Enterococcus faecalis*, donde la resistencia es rara o desconocida. La resistencia a piperacilin/tazobactam es confinada a mutantes de *Enterobacter* spp., *C. freundii* y *Serratia* spp, las cuales producen grandes cantidades de β -lactamasas AmpC cromosomales y en algunas cepas con β -lactamasas de clase B (Chen y col, 1993).

El incremento en la diversidad de β -lactamasas y en el número de aislamientos clínicos con múltiples enzimas, hace necesario proteger durante las terapias a los antibióticos β -lactámicos con uno o más inhibidores. Así más que otra cosa, las oportunidades de controlar la resistencia yace en el cuidado y uso prudente de los antibióticos poderosos que son disponibles como

piperacilin/tazobactam y los carbapenems, más que generar una siguiente generación de β -lactámicos (Livermore, 1998).

1.7 Mecanismo de transferencia horizontal de genes por medio de conjugación

La conjugación ocurre naturalmente y experimentalmente entre distintas especies de bacterias (Figura 4). Un ejemplo es la transferencia natural del plásmido RSF1010 de *E. coli* a *Streptomyces* y a *Mycobacterium*, en ambos casos el fenotipo de resistencia fue expresado (Gormley and Davies, 1991). Estudios con *Streptococcus* han revelado por lo menos dos interesantes características de este proceso, la existencia de un transposón conjugativo y la secreción de feromonas sexuales por células receptoras. La conjugación no es restringida a las bacterias ya que se ha descrito la transferencia de plásmidos conjugativos de *E. coli* a *S. cerevisiae*; su mecanismo es similar al involucrado en bacterias. La conjugación entre grupos taxonómicos distantes también ocurre, como se ha observado entre bacteria y plantas, como en ciertas especies de *Agrobacterium* que tienen la habilidad de movilizar un segmento de DNA que requiere de contacto célula-célula (Amábile-Cuevas y Chicurel, 1992).

1.7.1 Mecanismo de Transferencia Horizontal de Genes no Conjugativa

Además de la conjugación otros dos mecanismos adicionales en procariontes han sido identificados, la transformación y la transducción (Figura 4). Estos dos mecanismos ocurren naturalmente en células bacterianas y el material genético responsable está disponible solo a pequeños grupos de bacterias. El proceso de transformación natural) y consiste en incorporar

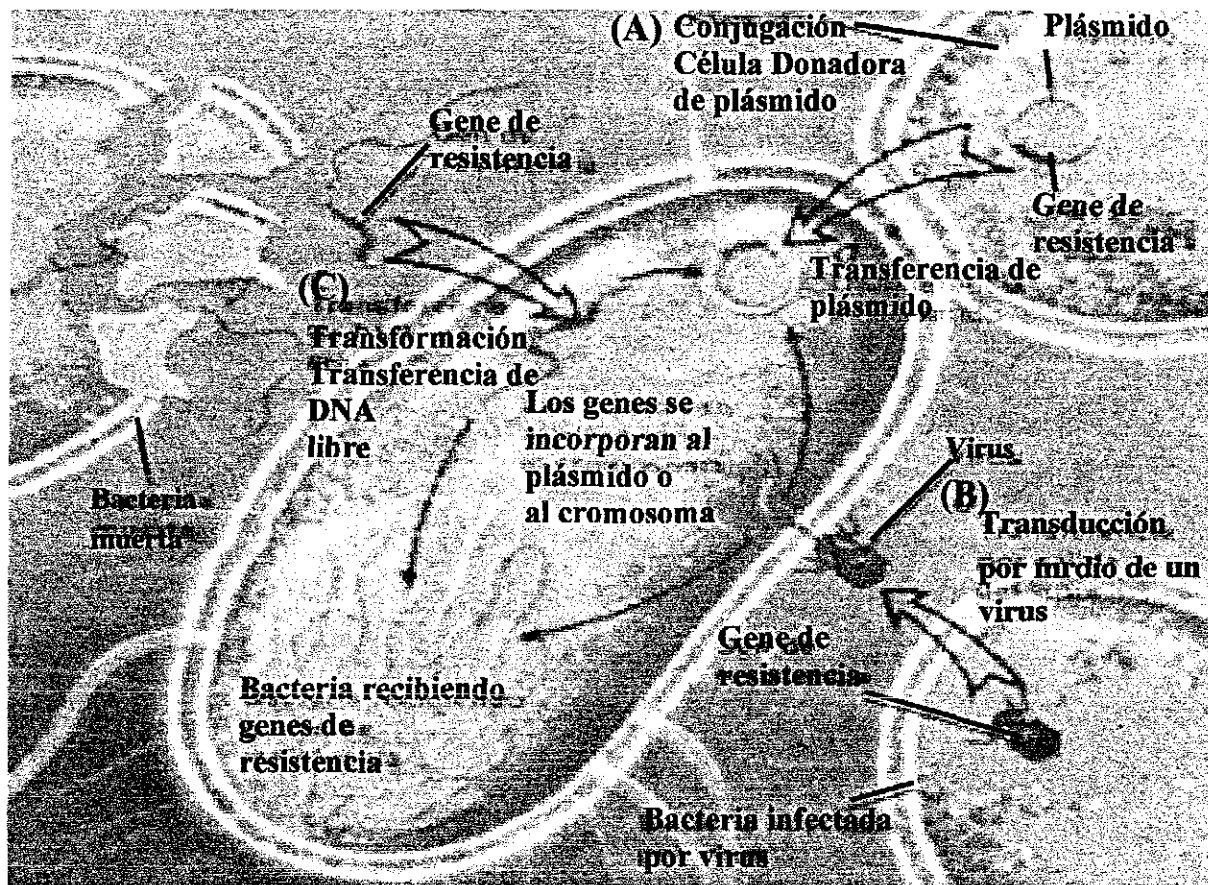


Figura 4. Mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias. A) La conjugación es el principal mecanismo de transferencia horizontal de genes. Es un proceso que consiste en la transferencia de DNA de una célula donadora a una receptora que ocurre durante el contacto célula-célula y está mediada por plásmidos. B) La transducción es la transferencia de genes bacterianos por partículas de fagos, este sistema es relativamente limitado y C) El proceso natural de transformación consiste en incorporar DNA exógeno por la bacteria y es un proceso importante en la movilización de plásmidos no conjugativos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DNA exógeno por la bacteria (se ha observado en 15 géneros de bacterias y es un proceso importante en la movilización de plásmidos no conjugativos comunes en las bacterias.

La transducción es la transferencia de genes bacterianos por partículas de fagos, este sistema tiene un alto grado de especificidad por lo que su rango de transferencia es relativamente limitada (Figura 4). Los bacteriófagos pueden contener información genética que codifica para la resistencia a antibióticos, que pudo haber sido adquirida de transposones o de bacterias previamente infectadas (Amábile-Cuevas y Chicurel; 1992).

1.8 β -Lactamasas como Principal Mecanismo de Resistencia a β -lactámicos en Enterobacterias

Los genes de las β -lactamasas pueden estar codificadas en el cromosoma o en plásmidos y expresarse de una manera constitutiva o inducible. En el caso de las bacterias Gram negativas son secretadas al espacio periplasmático y en Gram-positivas son secretadas al medio exterior.

Las β -lactamasas que hidrolizan cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima y ceftazidima, se les conoce como β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs). Nuevos datos de secuencias nucleotídicas y datos cristalográficos de varias β -lactamasa han provisto la comprensión de la función de estas enzimas y la relación entre ellas mismas (Medeiros; 1997).

Las β -lactamasas catalizan eficientemente la hidrólisis irreversible del enlace amida cíclico del anillo β -lactámico presente en las penicilinas, cefalosporinas y compuestos relacionado. Mediante el ataque del residuo de serina del sitio activo (Ser-70) al carbonilo del carbono del anillo β -lactámico, forma un intermediario acil unido covalentemente. En el paso subsecuente

de hidrólisis, una molécula de agua posicionada dentro del sitio activo actúa como el nucleófilo hidrolizando el intermediario acil y liberando el producto (Figura 5) (Wladkowski y col; 1997).

1.8.1 β -lactamasas

Hasta la fecha se han reportado aproximadamente 200 β -lactamasas que se distinguen por sus características bioquímicas, tales como parámetros cinéticos y su respuesta a inhibidores. Otra clasificación se basa en su secuencia de aminoácidos que comprende las clases A, B, C y D (Bush y col; 1995) (Tabla 1).

Las β -lactamasas de clase B fueron identificadas por primera vez en cepas de *Bacillus cereus* y actualmente se han encontrado en por lo menos 20 cepas incluyendo *Bacteroides fragilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Aeromonas veronii*. Recientemente, un nuevo plásmido que codifica la β -lactamasa de clase B IMP-1, ha sido identificada en *Pseudomonas aeruginosa* y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, que frecuentemente causa brotes nosocomiales. Las β -lactamasas de clase B requieren para su actividad de uno o dos iones Zn^{2+} en su sitio activo y se caracterizan por ser inhibidas por EDTA, más no inhibidas por ácido clavulánico. El imipenem que es el mejor sustrato de las β -lactamasas de clase B, donde en algunos casos son el inactivador clásico de las β -lactamasa de clase A (Wang y col, 1999).

Durante la terapia con un nuevo β -lactámico surgen β -lactamasas de clase C inducibles cromosomalmente (también denominadas AmpC), que surgen en un 10 al 50% de los

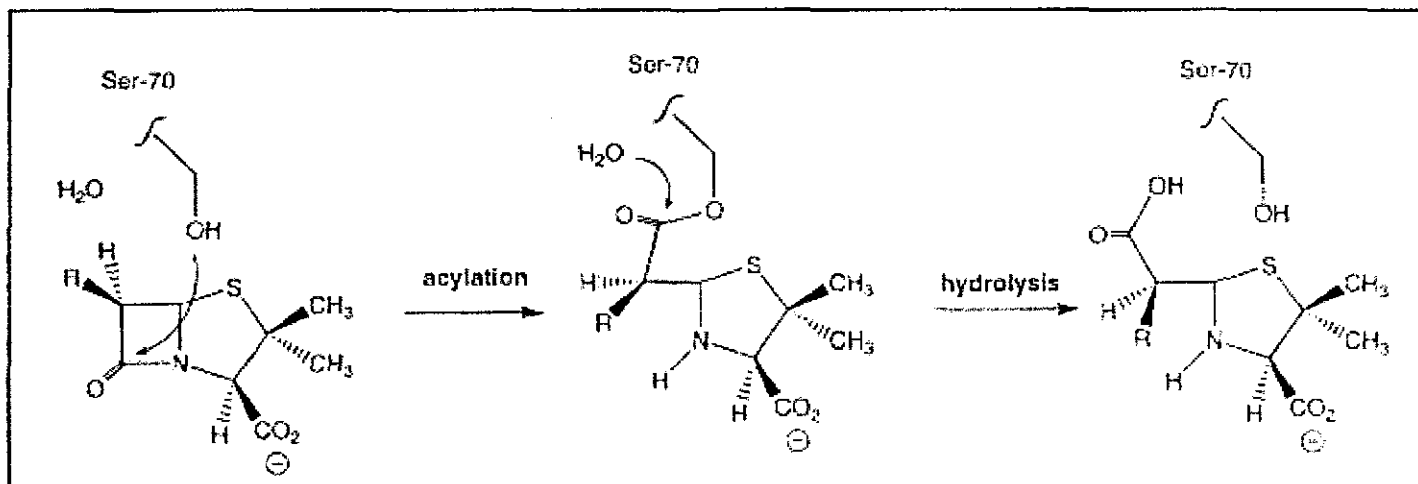


Figura 5. Mecanismo general de la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos por las β -lactamasas de clase A.

Tabla 1. Esquema de clasificación funcional para las β -lactamasas por Bush-Jacoby-Medeiros

Grupo	Tipo de enzima	Inhibida por ácido clavulánico	Clase molecular	Número de enzimas	Ejemplo
1	Cefalosporinasas	NO	C	53	<i>E. Cloacae</i> P99, MIR-1
2a	Penicilinasas	SI	A	20	<i>S. Aureus</i> , <i>S. albus</i>
2b	Penicilinasas	SI	A	16	TEM-1, SHV-1
2be	Penicilinasas	SI	A	38	TEM-3,SHV-2, <i>K. oxytoca</i> K1
Cefalosporinasas de Estrecho y Amplio Espectro y Monobactam					
2br*	Resistente a inhibidores	Disminuida	A	9	TEM-30-41, TEM-45, TRC-1
2c	Carbenicilinasas	SI	A	15	PSE-1, CARB-3, BRO-1
2d	Cloxacilinasas	SI	D o A	18	OXA-1, PSE-2, <i>Streptomyces cacaoi</i>
2e	Cefalosporinasas	SI	A	19	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Bacteroides fragilis</i>
CepA 2f*	Carbapenasas	SI	A	3	<i>E. Cloacae</i> IMI-1, NMC-A
3	Enzimas metálicas	NO	B	15	<i>Xantonomas maltophilia</i> L1
4	Penicilinasas	NO		7	<i>Pseudomona cepacia</i>

Tabla tomada de Medeiros, 1997.

* Nuevos grupos.

pacientes infectados con *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia* y *Pseudomonas aeruginosa*. La distribución de las β -lactamasas de clase C está limitada a bacterias Gram-negativas y se han descrito codificadas en plásmidos de cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Salmonella senftenberg*. Estas β -lactamasas confieren resistencia a antibióticos β -lactámicos de espectro extendido, tales como cefotaxima y ceftazidima, además de cefoxitin, cefotetan y se caracterizan por no ser inhibidas por ácido clavulánico (Medeiros, 1997).

Los genes de las β -lactamasas de clase D están codificados en plásmidos o integrones y son frecuentemente descritas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Usualmente confieren resistencia a amoxicilin, cefalotin y provoca altos niveles de actividad hidrolítica a cloxacilin, oxacilin, meticilin y son pobremente inhibidas por ácido clavulánico (Philippon y col, 1997; Mugnier y col; 1998). La estructura terciaria de enzima OXA-10 fue recientemente determinada y mostró tener significantes diferencias en el plegamiento global de las β -lactamasas de clase A y C, ya que la estructura sugiere una formación de homodímero, siendo ésta la forma de mayor actividad (Paetzel y col; 2000).

1.8.2 β -lactamasas de Clase A

Muchas de las β -lactamasas de clase A se encuentran en elementos móviles (plásmidos, transposones o integrones). Estas β -lactamasas son las más numerosas, ampliamente estudiadas y un gran número de enzimas se han descrito con más de 45 secuencias determinadas (sin considerar las variantes de las familias TEM y SHV). Esta clase de β -

lactamasas tienen un mayor rango de sustratos que incluye a las penicilinas de amplio espectro, cefalosporinas de espectro extendido y carbapenemasas.

La estructura tridimensional de siete enzimas de clase A es conocida y la función de numerosos residuos ha sido estudiado por mutagénesis dirigida. No obstante su mecanismo catalítico es aún controversial y hay problemas para establecer una correlación entre las secuencias y la amplia gama de sustratos variables (Medeiros, 1997).

1.8.3 El gen *bla*_{TLA-1} codifica una nueva β -lactamasa de espectro extendido de clase A

Recientemente se caracterizó en nuestro laboratorio la nueva β -lactamasa de espectro extendido no pertenece a las familias SHV y TEM y mostró estar fielmente relacionada a las β -lactamasas de clase A, a la que se denominó TLA-1 (Silva y col; 2000)

Este gen fue identificado en una cepas de *E. coli* en 1991 de un paciente con infección en vías urinarias en un hospital de la ciudad de México. Esta cepa fue resistente a cefalosporinas, aztreonam y ciprofloxacina. La cepa presentó dos β -lactamasas con pIs de 7.0, 9.0 y tres diferentes plásmidos. La resistencia fue transferida por conjugación a la cepa *E. coli* J53-2, con la enzima de pI de 9.0 en un plásmido de aproximadamente 150 kb.

La secuencia del gen *bla*_{TLA-1} reveló un marco de lectura abierta de 906 pb, que correspondió a 301 aminoácidos, mostrando los motivos conservados en las β -lactamasas de clase A: ⁷⁰SXXK, ¹³⁰SDN y ²³⁴KTG. La secuencia de aminoácidos mostró una identidad del 50% con la β -lactamasa CME-1 de clase A de *Chyseeobacterium*; un 48% con VEB-1 de clase A de *E. coli*;

un 40% con CblA de *Bacteroides uniformis*; un 42% con PER-1 y PER-2 y un 39% con CepA de *Bacteroides fragilis*.

La proteína parcialmente purificada tuvo una masa molecular de 31.4 kDa y correspondió a la β -lactamasa con pI de 9.0 e hidroliza preferentemente cefaloridina, cefotaxima, cefalotina, benzilpenicilina y ceftazidima. La enzima fue inhibida por sulbactam, tazobactam y ácido clavulánico (Silva y col; 2000). Que son las características comunes de las β -lactamasas de clase A (Bush y col; 1995).

1.8.4 Las β -lactamasas de Espectro Extendido de las Familias TEM y SHV

Las β -lactamasas de las familias TEM y SHV pertenecen a la clase A y son las más frecuentemente identificadas en Enterobacterias. Las enzimas silvestres TEM-1, TEM-2 y SHV-1 comparten estructuras primarias y bioquímicas muy similares. A partir de estas enzimas han surgido mutantes por cambios en el gen estructural que involucra sustituciones de aminoácidos responsables en la resistencia a antibióticos de espectro extendido (cefalosporinas de tercera generación) (Jacoby y Sutton; 1991 y Medeiros, 1989). En base a sus propiedades bioquímicas y análisis de sus secuencias, hasta la fecha se han descrito 90 variantes de los genes *bla*_{TEM-1/2}, y por lo menos 27 de ellos codifican β -lactamasas son de espectro extendido. En el caso del gen *bla*_{SHV-1} se han descrito 24 variantes en su mayoría con actividad de espectro extendido, no obstante George Jacoby y Karen Bush reportan hasta 34 β -lactamasas donde algunas secuencias no han sido reportadas (Tabla 2), esta información se

Tabla 2. β -Lactamasas tipo SHV de espectro extendido y resistente a inhibidores

β -lactamasa	Posición de los Aminoácidos ^a																				pI	CMI (μ g/mL)					
	7	8	35	43	48	54	75	80	89	122	129	130	140	156	158	173	179	187	188	192		193	205	238	240	CTX	CAZ
SHV-1	F	I	L	R	E	G	V	V	E	L	M	S	A	G	N	N	D	A	A	K	L	R	G	E	7.6	0.01	0.2
SHV-2																							S	7.6	4	2	
SHV-2a			Q																				S	7.6	4	2	
SHV-3																						L	S	7.0	2	2	
SHV-4																						L	S	K	7.8	4	64
SHV-5																							S	K	8.2	4	64
SHV-6																	A								7.6	0.5	32
SHV-7		F		S																			S	K	7.6	32	128
SHV-8																N									7.6	16	128
SHV-9 (SHV-5 ^a)							Del ^b						R							N	V	S	K	8.2	64	128	
SHV-10 ^d							Del				G	R								N	V	S	K	8.2	0.06	0.5	
SHV-11 (SHV-1-2 ^a)			Q																						7.6	0.025	0.125
SHV-12 (SHV-5-2 ^a)			Q																				S	K	8.2	256	128
SHV-13			Q																				A		7.6	4	64
SHV-14		F		S																			S	K	7.0		
SHV-15			Q	K			MM	K															S	K	Child, J. GENBANK. AJ011428 ^c		
SHV-16																									Arpin, C, 1998 ^c		
SHV-17																									Bradford, P, 1998 ^c		
SHV-18		F		S																			A	K	7.8	1	8
SHV-19																F									7.6		
SHV-20																F							S		7.6		
SHV-21									F							F							S		7.6		
SHV-22															K								D	K	7.6		
SHV-23																									Essack, S, D. Livermore; 1999 ^c		
SHV-24																	G								7.5	1	64
SHV-25			Q							V															Siu, L. GenBank AF208796 ^c		
SHV-26																									Siu, L. GenBank AF208796 ^c		
SHV-27													D												8.2		
SHV-28																									Zhou, Weilin; 2000 ^c		
SHV-29																									Yigit, H. 2000 ^c		
SHV-30																									Rasheed, K. 2001 ^c		
SHV-31																									Chia, J.-H. 2001 ^c		
SHV-32																									Ladona; 2001 ^c		

SHV-33
SHV-34
SHV-35
SHV-36
SHV-37

Ladona; 2001^c
Heritage, J; 2001^c
Alobwedw, J; 2001^c
Alobwedw, J; 2001^c
Alobwedw, J; 2001^c

Abreviaciones: A, alanina; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; N, asparagina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; M, metionina.

^a Número del aminoácido de acuerdo a Ambler, (1991).

^b Del, delección.

^c George Jacoby y Karen Bush (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

^d β -lactamasa resistente a ácido clavulánico y tazobactam, ambos inhibidores de β -lactamasas.

17-8

encuentra disponible en Internet (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) fecha de la última consulta 5/Septiembre/2001.

1.8.5 SHV-1 en comparación con TEM-1

La β -lactamasa TEM-1 es una proteína de dos dominios, un dominio consiste en cinco capas- β y tres α -hélices (dominio α/β), mientras el segundo está compuesto por ocho α -hélices (Figura 6) (Jelsch y col; 1992). La β -lactamasa SHV-1, al igual que la TEM-1, tiene dos dominios, de igual manera consiste en cinco capas- β antiparalelas rodeadas en ambos lados por α -hélices y el segundo es totalmente de α -hélices. En general el plegamiento de la enzima se asemeja al de otras estructuras de β -lactamasas de clase A. La homología de aminoácidos de las enzima SHV-1 y TEM-1 es del 68% y tienen una especificidad similar a los substratos. No obstante, en la respuesta a la introducción de nuevos β -lactámicos e inhibidores, los genes de ambas β -lactamasas han evolucionando rápidamente por vías separadas (Kuzin y col; 1999). La homología de nucleótidos de los genes *bla*_{SHV-1} y *bla*_{TEM-1} es del 60%, no obstante el contenido de G-C de los genes *bla*_{SHV} es del 63%, a diferencia del gen *bla*_{TEM-1} con un 49% (Bradford; 1999).

Los seis residuos importantes en catálisis de las β -lactamasas SHV-1 y TEM-1 son los Ser70, Lis73, Ser130, Glu166, Asn170 y Lis234, los cuales están conservados en ambas β -lactamasas y al sobreponer las estructuras se encuentran muy cercanos con una desviación de 0.23 Å. Sin embargo, la mayor desviación ocurre en la pequeña α -hélice del dominio α/β en los residuos. La diferencia del residuo Glu104 en TEM-1 por Asp104 en SHV-1 provoca una cavidad del

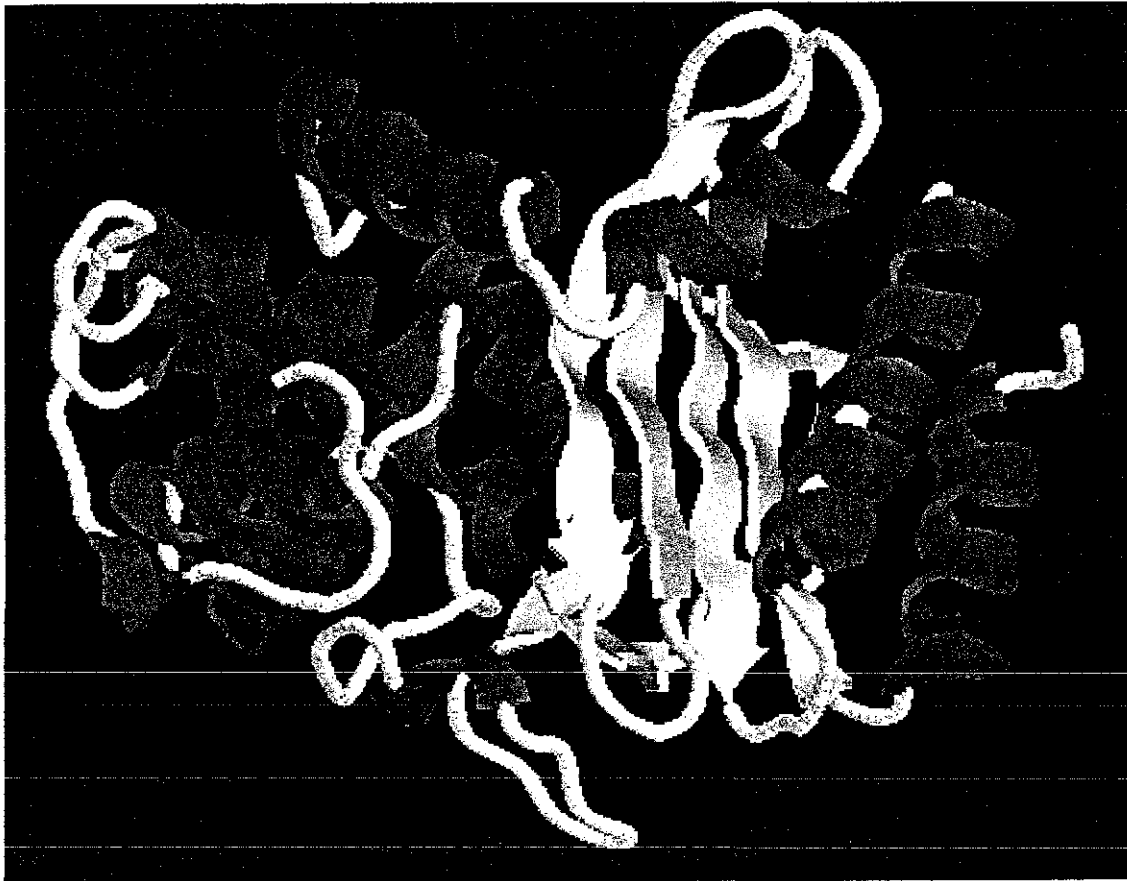


Figura 6. Estructura terciaria de la β -lactamasa SHV-1 de clase de A que predomina en *K. pneumoniae*. Es una proteína de dos dominios, un dominio consiste en cinco capas- β antiparalelas y tres α -hélices (dominio α/β), mientras el segundo dominio está compuesto por ocho α -hélices (Kuzin y col, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sitio catalítico mayor en SHV-1 y podría ser determinante en las muy ligeras diferencias en perfil de sustratos entre ambas enzimas. La β -lactamasa SHV-1 contiene cinco moléculas de agua ordenadas y al igual que en todas las β -lactamasas de clase A, una molécula de agua forma puentes de hidrógeno con el Glu166 en el ω -loop y puentes de hidrógeno adicionales con el Asn170 y la Ser70 (Kuzin y col; 1999).

Las variantes descritas de estas familias de proteínas tienen de una a cuatro sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la enzima original y las mutaciones que causan nuevos perfiles de actividad son el Glu-104 (TEM-1), Arg-164 (TEM-1), Asp-179 (SHV-1), Ala-237 (TEM-1) y Gli-238 y Glu-240 en ambas familias. Muchos residuos involucrados en las propiedades de espectro extendido de estas enzimas se localizan cerca de la cavidad del sitio activo. Ninguna de las cadenas laterales de los aminoácidos modificadas parecen estar involucradas en el mecanismo catalítico de las β -lactamasas de clase A, no obstante estas mutaciones amplían su perfil de sustratos de las variantes. Sin embargo, los residuos Leu-35 (SHV-1), Val-42 (TEM-1) y Arg-205 (SHV-1) se localizan distantes del sitio activo y se han identificado en variantes de espectro extendido y aun tiene que ser establecida su importancia en estas variantes (Medeiros, 1997).

1.8.6 β -lactamasas tipo SHV

La β -lactamasa SHV-1 fue primero identificada por Pitton en cepas de *Klebsiella* y fue nombrada β -lactamasa Pitton tipo 2 (PIT-2) (Pitton, 1972). Subsecuentes características bioquímicas establecieron a PIT-2 como una distinta penicilinasas que mostró similitudes con

TEM-1 (Matthew, 1979). El nombre SHV fue designado por Matthew y colaboradores (1979), y denota “ sulfidril variable. Al final de los 70’s, SHV-1 fue detectada en cepas de *Klebsiella*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* y otras especies de Enterobacterias a nivel mundial (Matthew y col, 1979).

La β -lactamasa SHV-1 es menos frecuente que la TEM-1 en *E. coli* y otras especies de Enterobacterias. La frecuencia de SHV-1 en cepas de *E. coli* es de 1-10%, mostrando una gran variabilidad, no obstante SHV-1 en *K. pneumoniae* es mayor del 20% (Tzouvelekis y Bonomo, 1999). *K. pneumoniae* es considerado como un reservorio del gen bla_{SHV-1} tanto en el cromosoma como en plasmidos. Por otro lado, en Europa determinaron que los genes derivados del gen bla_{SHV-1} se encuentran ampliamente distribuidas en cepas de *K. pneumoniae* (Livermore, 2000).

Actualmente las BLEEs tipo SHV expandieron su espectro de hidrólisis de antibióticos a las nuevas cefalosporinas y aztreonam, debido a las substituciones de uno a tres residuos en la cavidad del sitio activo de la enzima (Tzouvelekis y Bonomo; 1999).

1.8.6.1 Mutaciones en las β -lactamasa tipo SHV-2

En la β -lactamasa SHV-2 la Gli-238 que se encuentra en la capa β -3, es remplazada por una serina. Esta mutación le proporciona las características de espectro extendido y ha sido considerada el cambio crítico inicial que ha permitido el surgimiento de enzimas SHV más complejas (Tabla 2) (Du Bios y col; 1995).

Huletsky y colaboradores (1993), proponen que el grupo hidroxilo de la serina 238, en conjunto con la cadena lateral de la metionina 69 y el residuo aspártico 170 del ω -loop, causan una expansión de la cavidad del sitio activo, permitiendo que se oriente el sustituyente amido-acil de las cefalosporinas. Esta interacción de la cadena lateral de la serina 238 con la metionina 69 obliga la parte inferior de la capa β -3 a reubicarse hacia la hélice-4 (Figura 7). No obstante el impedimento estérico causado por la cadena lateral de la serina 238 puede ser liberado por un movimiento del ω -loop (Saves y col; 1995).

1.8.6.2 Mutaciones en la β -lactamasa tipo SHV-5

La β -lactamasa SHV-5 es afectada por la serina-238 en complemento con la lisina-240, la cual reemplaza al ácido glutámico (Tabla 2). La enzima SHV-5 comparada con la SHV-2, hidroliza ceftazidima y aztreonam más eficientemente, al mismo tiempo éstas confieren niveles de resistencia similares a cefotaxima y ceftriaxone. La actividad contra ceftazidima y aztreonam parece ser por la formación de una unión electrostática fuerte entre la cadena lateral de la lisina 240 y el sustituto carboxilo de la ceftazidima (Figura 7) (Knox, 1995). La SHV-5 parece ser la variante de espectro extendido más eficiente (Tzouveleakis y Bonomo; 1999).

1.9 Estructura Molecular de las β -lactamasas

Estudios de difracción de rayos X han mostrado analogías entre las familias DD-peptidasas y entre β -lactamasas de clase A y C. Todas son proteínas monoméricas de 29 a 39 kDa para las de clase A y C y 37.5 kDa para DD-peptidasas. Los residuos vecinos de la serina del sitio

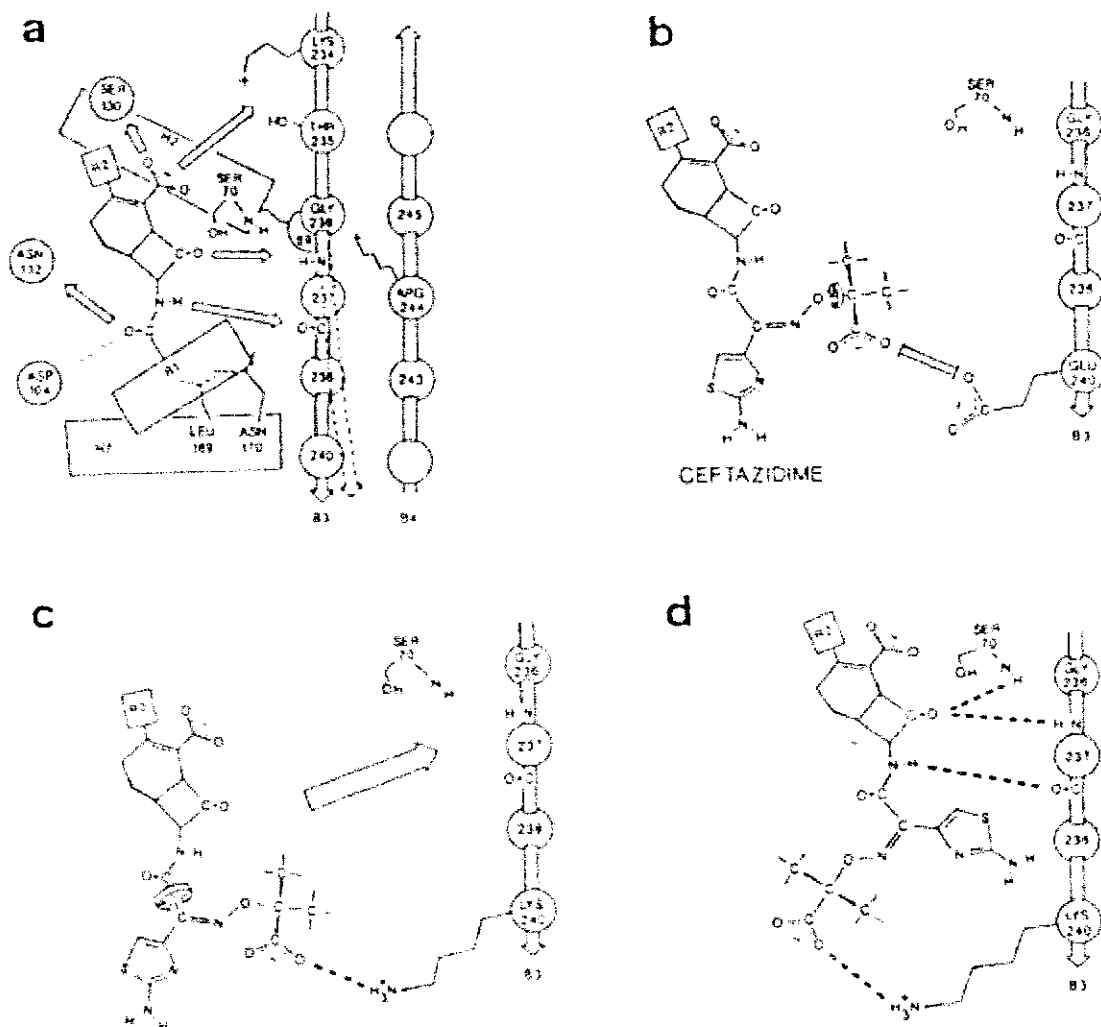


Figura 7. Diagrama esquemático de los sitios de unión de los antibióticos β -lactámicos en las β -lactamasas tipo SHV. Este diagrama está basado en la estructura de la β -lactamasa 749/C de *Bacillus licheniformis*. a, Las flechas indican las interacciones electrostáticas y de puentes de hidrógeno que pueden unir al β -lactámico. Las líneas punteadas en la capa- β -3 indica el movimiento hacia fuera cuando el residuo 238 es mayor que Ala. b, representa la repulsión electrostática de ceftazidima cuando Glu se encuentra en la posición 240. c, representa la unión de ceftazidima en la β -lactamasa SHV con Ser-238/Lis-240. La fuerte unión electrostática entre Lis-240 y el grupo ácido carboxílico asegura una amplia rotación del grupo oxime-aminothiazole de la droga, así la parte superior de la droga interactúa con cavidad oxianion (formado por la Ser-70 y la Tre-237). d, ceftazidima unida a la enzima SHV Ser-238/Lis-240. Abreviaciones: Ala, alanina; Glu, ácido glutámico; Ser, serina; Tre, Treonina; Lis, lisina.

activo de las DD-peptidasas y β -lactamasas han permitido identificar varios elementos conservados que parecen estar directamente involucrados en el reconocimiento del sustrato y en el proceso de catálisis. Comparaciones de la estructura primaria y terciaria han permitido la identificación de los mismos elementos estructurales y funcionales de las enzimas que reconocen penicilina y tienen serina en el sitio activo (Tabla 3) (Figura 8A).

El primer elemento contiene la serina catalítica y un residuo de lisina cuyas cadenas laterales apuntan dentro del sitio activo (secuencia Ser-Xaa-Xaa-Lis), la cercanía de sus cadenas laterales forman puentes de hidrógeno. El segundo elemento está situado en un loop corto en el dominio α , forma una pared de la cavidad catalítica, que consiste en la secuencia de aminoácidos Tir-Xaa-Asn para β -lactamasas de clase C, D y algunas PBPs, o Ser-Xaa-Asn para β -lactamasas de clase A y la mayoría de PBPs. Las cadenas laterales del primer y tercer residuo apuntan dentro del sitio activo, mientras el segundo residuo apunta hacia el centro de la proteína. En las β -lactamasas de clase A este segundo elemento es conocido como loop SDN. El tercer elemento está en una capa β del dominio α/β y forma una pared opuesta de la cavidad catalítica, tiene una secuencia generalmente Lis-Thr-Gli; pero la Lis está reemplazada por His o Arg en pocos casos excepcionales y Thr por Ser en varias β -lactamasas de clase A, este elemento es conocido como KTG. La cadena lateral del residuo de Lis forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo del residuo de Ser/Tir del segundo elemento. El cuarto elemento usualmente referido como el ω -loop, en muchos casos contiene la secuencia Glu166-Xaa-Glu-Leu-Asn170 donde los residuos Glu166-Asn170 parecen ser esenciales en posicionar la molécula de agua conservada que se encuentra muy cercana al sitio activo (Figura 8A)

Tabla 3. Elementos estructurales que limitan al sitio activo de las enzimas que reconocen penicilina.

Clase	Elemento 1	Elemento 2	Elemento 3	Elemento 4
	<i>70^a</i>	<i>130</i>	<i>234</i>	<i>166</i>
Clase A	S-X-X-K	S-D-N ^d	K-T-G ^e	E-X-E-L-N
	S-T-F-K ^b	S-D-S	K-S-G ^f	E-P-E-L-N ^f
	S-T-Y-K ^c		R-S-G	E-T-E-L-N ^g
			R-T-G	E-T-E-L-N ^c
	<i>64</i>	<i>150</i>	<i>314</i>	<i>217</i>
Clase C	S-X-X-K	Y-A-N	K-T-G	D-A-E-A-Y
	<i>70</i>	<i>144</i>	<i>214</i>	<i>175</i>
Clase D	S-X-X-K	Y-G-N	K-T-G	E-X-X-L-X
	<i>62</i>	<i>159</i>	<i>298</i>	<i>225</i>
DD-peptidasa	S-X-X-K	Y-S-N	H-T-G	D-S-T-E-Q
		S-X-N	K-T-G	

^a Número estándar de aminoácidos para estas proteínas.

^b Presentes en TEM-1 y SHV-1

^c Presente en TLA-1

^d Presente en TEM-1, SHV-1 y TLA-1

^e Presente en SHV-1 y TLA-1

^f Presente en TEM-1

^g Presente en SHV-1

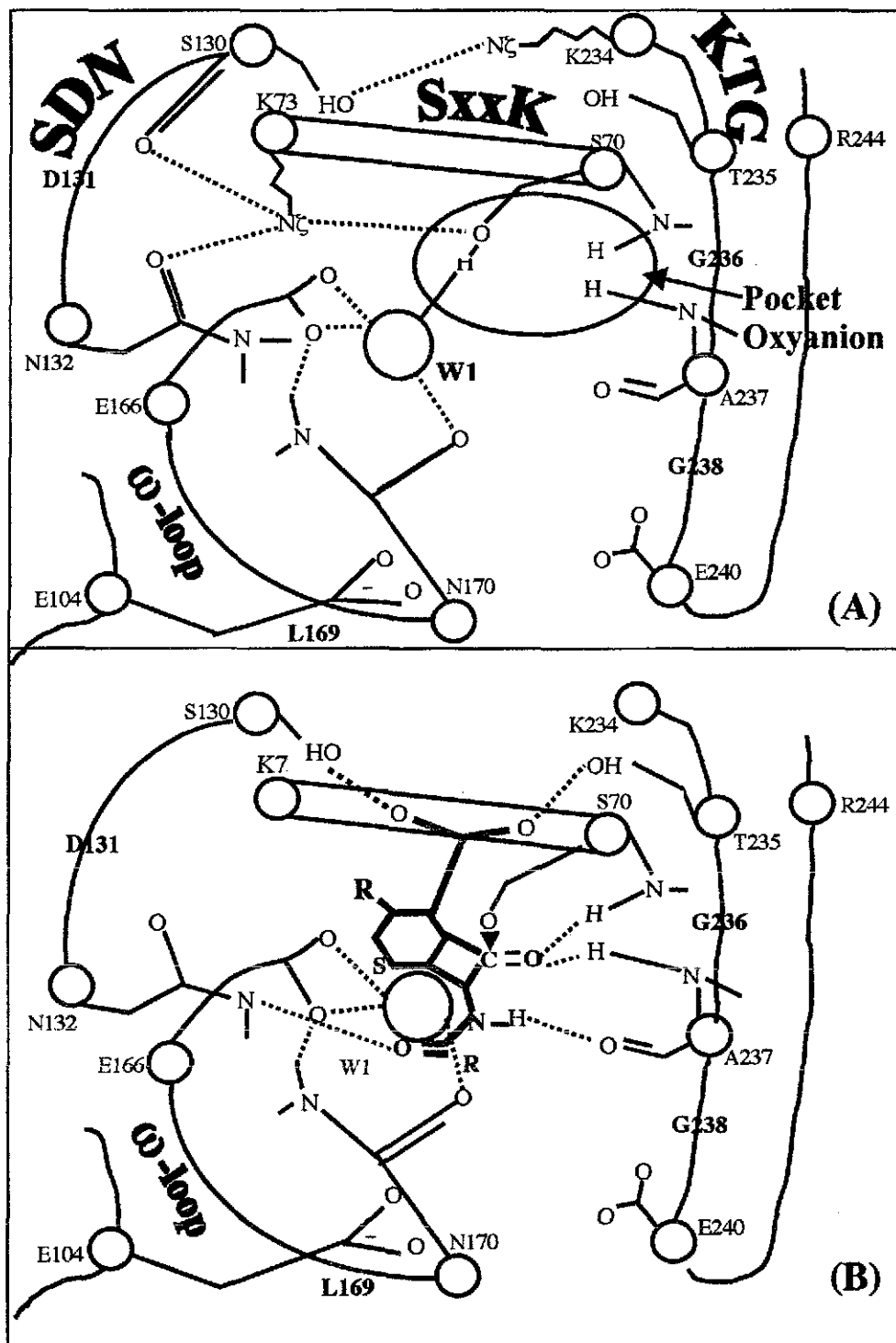
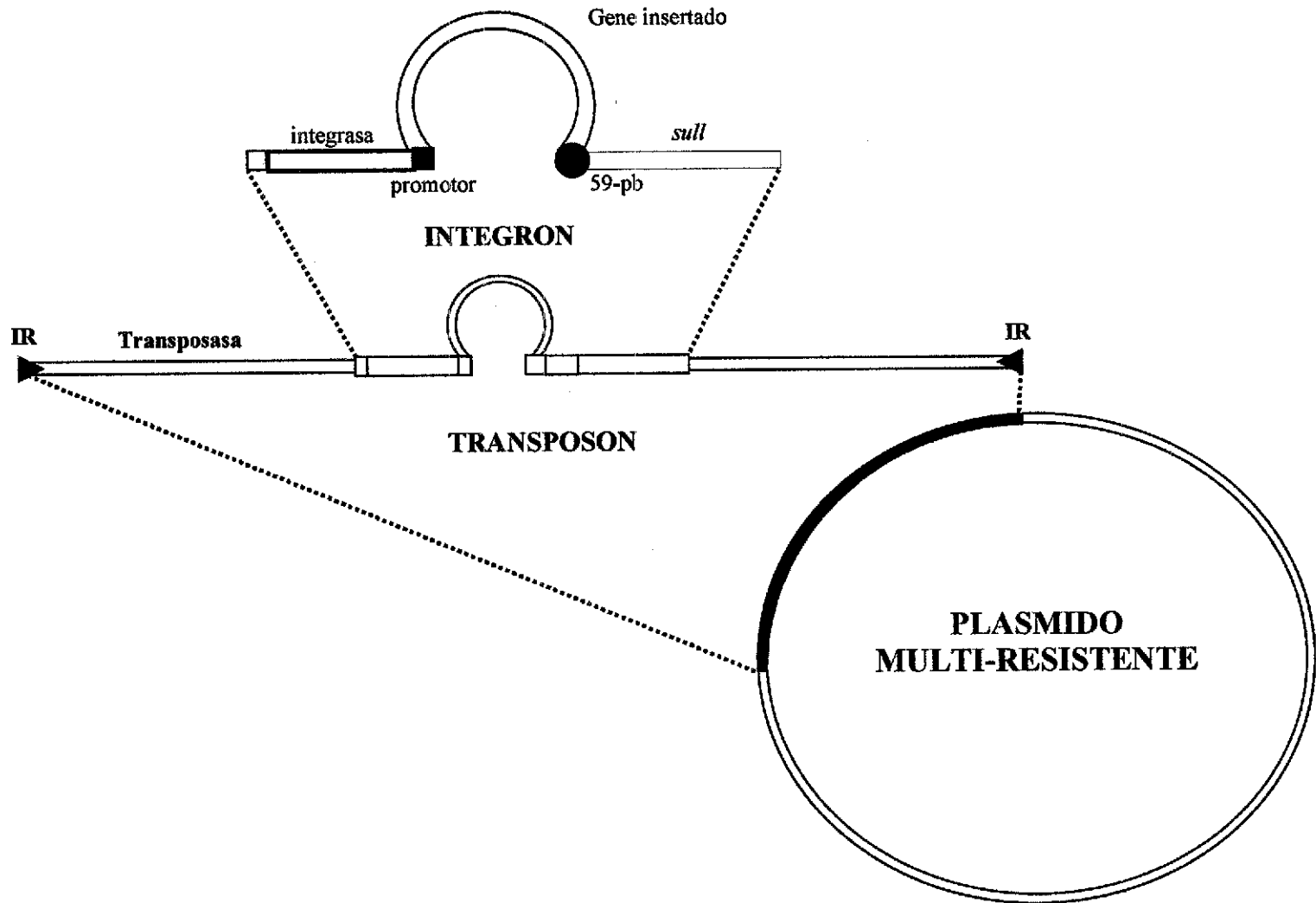


Figura 8. A) Esquema que muestra la red de puentes de hidrógeno y los residuos de aminoácidos de los motivos de las β -lactamasas de clase A. SxxK representan los aminoácidos, serina-x-x-lisina, donde x es cualquier aminoácido. SDN y KTG representa los aminoácidos serina-ácido aspártico-asparagina y lisina-treonina-ácido glutámico, respectivamente. W1 indica una molécula de agua. Las letras de los códigos de los aminoácidos son los siguientes: A=alanina; D=ácido aspártico; E=ácido glutámico; G=glicina; K=lisina; L=leucina; N=asparagina; R=arginina; S=serina y T=treonina. B) La interacción de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de las cefalosporinas y los diferentes elementos estructurales de las β -lactamasas de clase A que delimitan el sitio catalítico (Medeiros, 1997).

(Matagne y col, 1998; Frere y col, 1991; Frere, 1995; Medeiros; 1997). En la figura 8B se muestra la interacción de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de las cefalosporinas y las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos de los cuatros elementos que residen en el sitio activo de una β -lactamasa de clase A (Medeiros; 1997).

1.10 La Resistencia a β -lactamasas está Mediada por Plásmidos

Los plásmidos existen desde la era pre-antibiótica, pero emergieron en un tiempo relativamente corto después de la introducción de los agentes terapéuticos (Davies, 1994). La bacteria reclutó elementos genéticos que codifican mecanismos especiales de resistencia e incorporó éstos dentro de los plásmidos y se han transferido rápidamente de una bacteria a otra (Amábile-Cuevas y Chicurel; 1992). La mayoría de las bacterias resistentes a drogas deben su resistencia a plásmidos R, así llamados porque éstos contienen uno o más genes de resistencia a antibióticos. La transferencia horizontal de genes es un fenómeno en el reino protista, en donde los plásmidos R a menudo expresan mecanismos moleculares para su autotransferencia por medio de conjugación bacteriana, siendo ésta la ruta primaria para la diseminación de resistencia a antibióticos (Bastarrachea, 1998). La acumulación de varios genes de resistencia en un solo plásmido lo hace multirresistente (MR) (Figura 9), ésta es una consecuencia de la transferencia horizontal de genes. Estos plásmidos MR pueden acarrear determinantes de resistencia que son homólogos a determinantes encontrados en plásmidos no relacionados o evolutivamente distantes, además determinantes de resistencia en plásmidos MR pueden ser



23-A

Figura 9. Plásmido multirresistente que actúa como coleccionista de transposones, tal como del grupo Tn21, junto a un elemento llamado integrón que permite la integración de casetes de genes. Este transposón que tiene dentro el integrón puede ser intercambiado entre diferentes moléculas de DNA (Tomado de Amábile-Cuevas y Chicurel; 1992).

asociados con otros determinantes genéticos tales como virulencia (Amábile-Cuevas y Chicurel; 1992).

Los plásmidos difieren en el rango de hospederos que pueden colonizar. Algunos plásmidos tienen un rango muy restringido que incluye sólo pocas especies relacionadas y existen otros con una amplia variedad de tipos celulares (Szpirer y col, 1999).

1.10.1 Transposones

En base a su estructura fundamental los transposones procariotas han sido clasificados en dos grupos: los transposones de clase I incluyen las secuencias de inserción (IS), las cuales son elementos que sólo codifican la maquinaria enzimática requerida para la transposición y el transposón completo incluye los genes atrapados entre las dos secuencias idénticas IS. Los integrones de clase II son secuencias de DNA flanqueadas por secuencias repetidas invertidas (IR) que contienen genes que codifican enzimas de transposición y resolución en asociación con otros genes (Figura 9). En ambos la naturaleza de los genes asociados es generalmente irrelevante al proceso de transposición, sugiriendo que la prevalencia de estos genes asociados es debido a la ventaja selectiva que confiere a su propio hospedero.

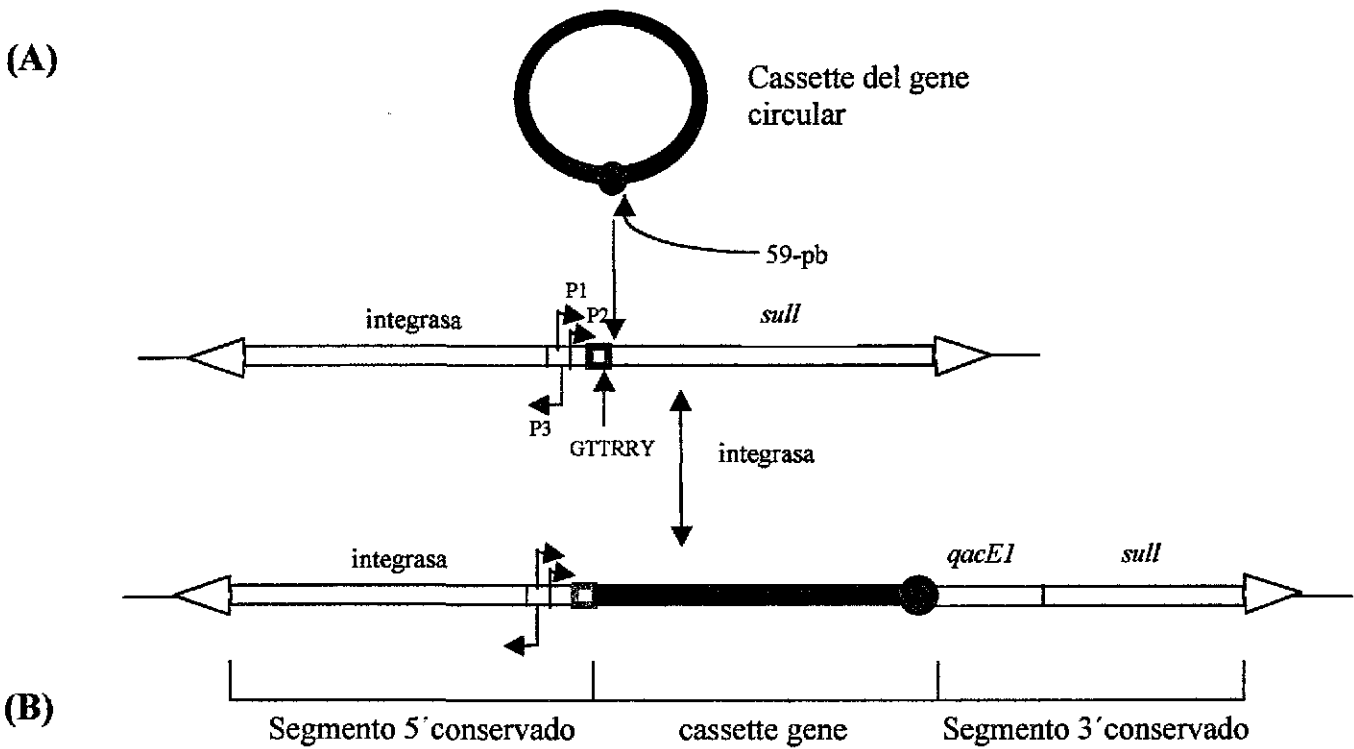
La transposición *per se* no está directamente involucrada en la transferencia horizontal de genes, su habilidad de incorporarse dentro de plásmidos autotransmisible resulta de un potencial para alguno de los genes que acarrea a contribuir a la expansión del pool genético involucrado en el flujo de genes entre organismos (Amábile-Cuevas y Chicurel; 1992).

1.10.2 Integrones de Clase 1

La captura de genes es el componente más significativo en el proceso de flujo de resistencia a antibióticos, el cual es ampliamente estudiado por Hall y Stokes, en donde plantean por qué los elementos transponibles acarrean múltiples genes de resistencia a antibióticos. De sus estudios en la organización del elemento transponible han identificado un constituyente estructural de una clase de transposición que ellos nombran “integrón” (Figura 9 y 10A) (Hall y col, 1991; Davies, 1994).

Tres distintas clases de integrones se conocen que codifican integrasas relacionadas, donde los integrones más estudiados y que se encuentran con mayor frecuencia en cepas de bacterias resistentes a antibióticos son los de la clase 1 (Colli y col 1998). El integrón de la clase 1 es un elemento de DNA móvil con una estructura específica que constituye dos segmentos conservados nombrados 5'CS y 3'CS. En todos los casos los genes están en la misma orientación y son transcritos por uno promotor (P_{ant}) en el segmento conservado 5'CS. Además este segmento codifica una integrasa (Int1) específica, la cual es responsable de la inserción de los genes de resistencia a antibióticos río abajo del promotor. El segmento 3' conservado codifica un gen de resistencia a sulfonamida (sul) y dos marcos de lectura abierta de función desconocida (Figura 10A). El integrón actúa como un casete de expresión para los genes insertados y por lo general más de un gen es frecuentemente encontrado (Figura 10B) (Hall y col, 1991; Recchia y Hall, 1995).

Los integrones de clase 1 contienen un sitio de recombinación designado *attI* en el cual los genes son integrados o deletados por la integrasa mediante una recombinación sitio específica.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

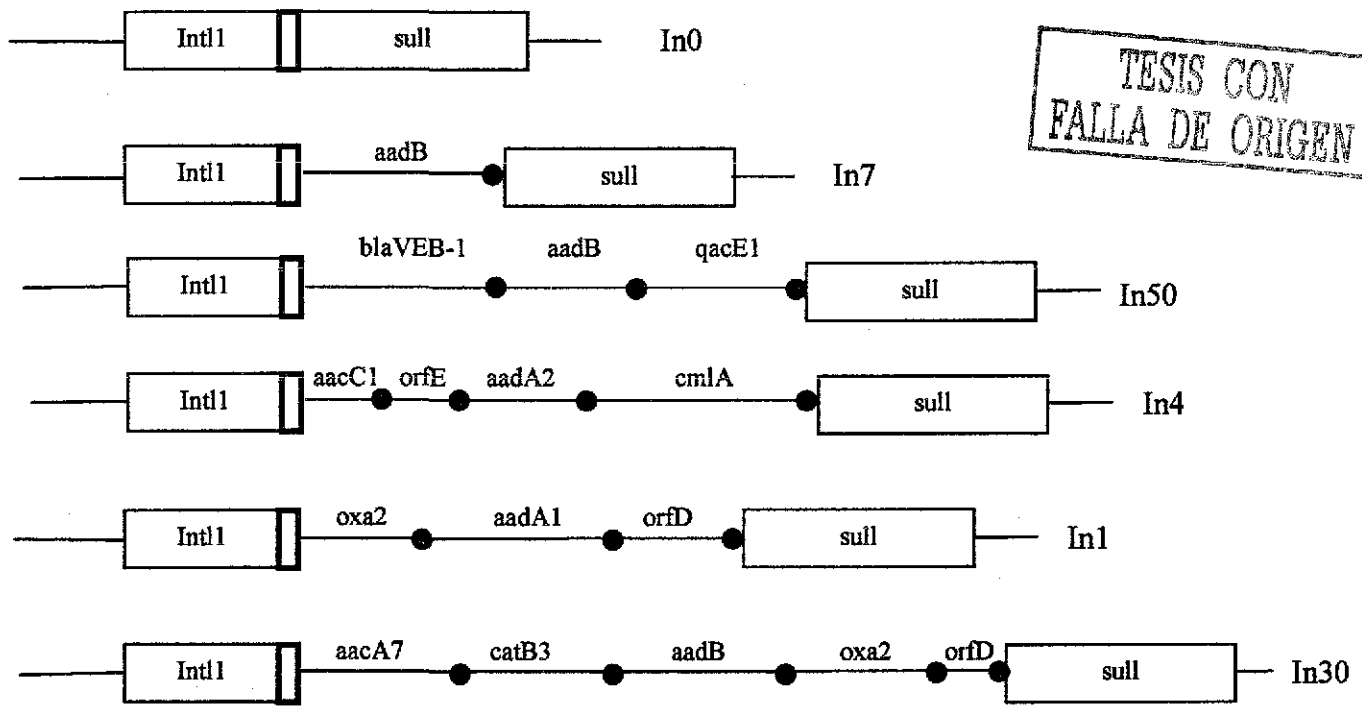


Figura 10. A) La estructura general de un integrón de clase 1, consiste de un segmento 5' conservado que codifica una integrasa (Int1), bajo el control del promotor P3 y un segmento conservado 3' que codifica los genes de resistencia antisépticos y desinfectantes (qacE1) a sulfonamida (sull). Los promotores P1 y P2 dirigen la transcripción de los cassettes que son integrados entre los dos segmentos en el sitio de inserción GTTRRY del integrón y el elemento de 59-pb que recombina específicamente con el sitio attI del integrón (Hall y col, 1991). B) Estructuras de integrones con diferentes genes insertados. In0, representa el origen de los integrones. aadB, aacC1, aadA2, aadA1 y aacA7 genes de resistencia a aminoglucósidos; cmlA y catB3, genes de resistencia a cloranfenicol; qacE1, gen de resistencia a antisépticos y desinfectantes; oxa2, β -lactamasas de clase D (Recchia y Hall; 1995; Hall y col;1991); blaVEB-1 β -lactamasa de amplio espectro de clase A (Naas y col; 1999).

La estructura de *attI*, que es el sitio receptor de los integrones de clase 1, contiene una región conservada de por lo menos 40 pb y no más de 70 pb y es requerida para la actividad del sitio *attI*, el cual está localizada río arriba del primer casete integrado en la región 5'CS (Recchia y col, 1994). Otro sitio de recombinación asociado al casete es conocido como el elemento de 59 pares de bases (59-pb) y está localizado río abajo del gen. Cada uno de los genes conocidos incluyen un elemento de 59-pb y estos elementos son identificados como una secuencia de repetidos invertidos imperfectos que son relacionados al consenso de 59-pb, aunque varios son considerablemente mayores hasta de 141 pb (Stokes y col, 1997).

El movimiento de los casetes es catalizado por la integrasa y puede sacar o integrar genes, así su movilidad resulta en la diseminación de genes de resistencia; esta flexibilidad genética ha generado numerosos rearrreglos de casetes bajo presión selectiva de antibióticos generando por lo menos más de 50 casetes descritos en bacterias Gram-negativas (Marie-Cécile y col; 2000).

Se han descrito varios genes de las β -lactamasas de las clases A, B y D contenidos formando integrones de clase 1. Por mencionar algunas β -lactamasas de clase A, la *bla*_{VEB-1} (Naas y col, 1999; Girlich y col; 2001); *bla*_{P1}, *bla*_{P2} y *bla*_{P3} (Recchia y Hall, 1995); *bla*_{GES-1} (Piorel y col; 2000) y *bla*_{IBC-1} (Giakkoupi y col; 2000). Dentro de las β -lactamasas de clase B se encuentra la *bla*_{IMP} (Arakawa y col, 1995) y de las de clase D encontramos las *bla*_{OXA-1, 2, 3, 5, 7, 9 Y 10}, además de un gran número de genes resistentes a aminoglucósidos, cloranfenicol, trimetropim, estreptomicina, antisépticos y desinfectantes (Figura 10B) (Rechia y Hall, 1995).

La plataforma de los integrones esta asociada con transposones y/o plásmidos conjugativos que puedan servir como vehículo para la transmisión intra e ínter específica de material

genético. La estructura de los transposones que codifican los integrones de clase 1 están rodeados por invertidos repetidos (IR) de 25 pb, no obstante los reportes hasta la fecha, indican que han perdido una parte o todo el modulo *tni* y siendo ahora defectivos en la auto transposición, ya que muchos han perdido una región de 2.3 kb debido a la inserción de la región IS1326 en los integrones de los grupos In4 y In5.

Se ha identificado en el grupo de los integrones In4, que contienen una IS6100 y una copia parcial en la misma orientación, por lo que los integrones que pertenecen a los grupos In4 y In5 son incapaces de movilizarse por ellos mismos, ya que han perdido uno o todos los genes del modulo *tni*, no obstante se mueven rápidamente, ya que las secuencias que los rodean son diversas indicando un movimiento anteriormente; lo que indica que si sus dos extremos están intactos y en la orientación correcta el movimiento es presumiblemente acompañado de genes *tni* que están presentes en la misma célula a completar el defecto (Partridge; 2001; B).

Los Tn1696 (In4) y Tn21 (In2), tienen un tamaño de 16.2 y 19.7 kb respectivamente. El Tn1696 confiere resistencia a iones mercurio, determinantes de resistencia a sulfonamidas (*sulI*) y a estreptomicina (*aadA1*); en Tn21 los genes de resistencia a antibióticos están localizados entre el modulo de transposición (*tnpA* y *tnpR*) y el modulo de resistencia a mercurio; la región central contiene los genes de resistencia a sulfonamimda (*sulI*), gentamicina (*aacC1*) y cloranfenicol (*aadA2* y *cmlA1*), esta última denominada ahora como integron de clase 1 (Partridge, 2001; A).

Es claro que los integrones con estructuras In4 y In5 son ampliamente distribuidos y han sido encontrados desde los primeros aislamientos clínicos multirresistentes en diferentes especies

de bacterias como resultado de su asociación con plásmidos y transposones (Partridge, 2001; B).

De igual manera la familia de transposones Tn21 y Tn7 se han identificado en una gran variedad de contextos genéticos y entre muchos aislamientos clínicos de bacterias gram-negativas filogenéticamente diversas (Rowe-Magnus y Mazel, 2001).

El intregón In53 recientemente descrito codifica ocho genes de resistencia a antibióticos funcionales, como VEB-1, gen de resistencia a β -lactámicos; *aadB*, gen de resistencia a aminoglucósidos; *arr-2*, genes de resistencia a rifampicina; *cmlA*, gen de resistencia a cloranfenicol; *qac*, codifica una proteína que genera resistencia a antisépticos y desinfectantes; *aacA1/orfG* que codifica a 6'-N-acetyltransferasa, que confiere resistencia a aminoglucósidos; *oxa10/aadA1* genes que confieren resistencia a oxacilina y aminoglucósidos, respectivamente. El gen de la integrasa fue interrumpido por la secuencia IS26, la cual también estuvo presente en el extremo 3' conservado, así el integrón In53 es un integrón truncado localizado en un transposón funcional llamado Tn2000, localizado en un plásmido conjugativo de 160 kb (pNLT-1). Sus resultados además indican que las regiones codificantes *qacl*, *cmlA*, *oxa10/aadA1*, *qacE* y *orf5* contienen un promotor putativo. No habían sido identificadas secuencias promotoras anteriormente, lo cual representa una nueva estructura de integrón de clase 1 (Naas y col; 2001).

Las β -lactamasas tipo TEM y SHV no han sido localizadas en estructuras de al integrón de clase 1, no obstante en el plásmido conjugativo pSEM de un aislamiento clínico de *Salmonella enterica* que confiere resistencia a gentamicina, amikacina, kanamicina, sulfonamidas y

cefalosporinas de amplio espectro fue localizada la β -lactamasa SHV-5 a 3.5 kb del gen de la integrasa de clase 1. Este integrón (In-T3) contiene cinco genes, tres de resistencia a antibióticos; como *aacA4* que confiere resistencia a amikacina, *aacCI* a gentamicina y *aadA* a estreptomycinina y dos marcos de lectura abiertos sin homología a secuencias publicadas (Villa y col; 2000). Hasta la fecha es el único reporte que relaciona a una β -lactamasa tipo SHV con un integrón y que los dos genes estén en el mismo plásmido.

2. ANTECEDENTES

La β -lactamasa SHV-2 que hidroliza cefalosporinas de espectro extendido fue identificada por primera vez en Alemania, cuando en 1983 una serie de cepas de *Klebsiella* y *Serratia spp* transfirieron la resistencia a cefotaxima. Este plásmido que codifica la β -lactamasa se describió como una variante de la SHV-1 (Knothe y col, 1983). A partir de la identificación de esta β -lactamasa de espectro extendido, surgieron una serie de reportes de SHV-2 en varias partes del mundo, como en Francia, Alemania, Grecia, España, Suiza, y Corea ; se reportó una variante de SHV-2 en Suiza (SHV-2a), Corea (SHV-2a) y Alemania (SHV-2a); y más variantes derivadas de SHV-1, como la SHV-3 en Francia ; SHV-4 en Grecia y Francia ; SHV-5 en Suiza, Grecia, Polonia, Australia y Chile; SHV-6 en Francia; SHV-7 y SHV-8 en Estados Unidos; SHV-9 y SHV-10 en Grecia y las SHV-11 y SHV-12 en Suiza. Cada una de estas β -lactamasas tiene diferentes concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) a cefotaxima y ceftazidima. Las SHV-10 y 11 no hidrolizan cefalosporinas, no obstante la SHV-10 es

resistente a ácido clavulánico. Esta es la única variante descrita de la familia de las β -lactamas tipo SHV que es resistente a inhibidores.

En México no existen estudios donde se haya identificado el tipo de β -lactamasa que está presente en aislamientos clínicos de hospitales y existen pocos reportes que reflejan la situación actual en nuestro país. Sin embargo algunos autores han reportado los perfiles de sensibilidad o resistencia de cepas de diferentes Institutos de Salud (Fragoso-Veloz y Arredondo, 1995). En 1992 en Guadalajara un estudio realizado con Enterobacterias, mostró que *Escherichia coli*, *Klebsiella ssp.* y *Enterobacter spp* presentaron porcentajes de resistencia desde el 58% hasta el 100% a penicilina y presentaron sensibilidad a cefotaxima, ceftazidima e imipenem, además mostraron que la resistencia se debe a la producción de β -lactamasas, siendo común en cepas de nuestro país ya que de 2058 cepas, el 82% de los gérmenes fueron productores de estas enzimas (Rodríguez-Noriega y col, 1992).

En 1993 se estudiaron 68 cepas de Enterobacterias multirresistentes originadas de infecciones nosocomiales, las cuales presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación colectadas en diferentes hospitales de la Ciudad de México (Silva y col. 1993).

Por otra parte Silva y col, (1999) determinaron por hibridación con la sonda del gen SHV-1 y de TEM-1 que de las cepas estudiadas 2/3 codificaban para β -lactamasa tipo SHV y una tercera parte no pertenecieron a SHV ni a TEM. Recientemente se caracterizó una nueva β -lactamasa de espectro extendido para México denominada TLA-1, que no pertenece a las familias TEM y SHV. El análisis de secuencia de aminoácidos mostró que está fielmente relacionada a la clase A de β -lactamasas (Silva y col, 2000). Más recientemente se identificó la

β -lactamasa SHV-5 contenida en un plásmido de aproximadamente 150 kb de un brote intrahospitalario de *Klebsiella pneumoniae*. El estudio se realizó en 21 cepas resistentes a ampicilina, cefotaxima, tetraciclina y gentamicina y susceptibles a ciprofloxacina, imipenem y ceftazidim. Los pI determinados fueron 5.4, 7.6 y 8.2, donde 5.4 correspondió a TEM (mediante PCR) y 8.2 a SHV-5 (mediante análisis de secuencia) (Silva y col; 2001).

3. OBJETIVO GENERAL :

Identificar Molecularmente las β -lactamasas de espectro extendido tipo SHV.

Objetivos particulares:

Amplificar mediante la técnica de PCR los genes de las β -lactamasas *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} y *bla*_{TLA-1} contenidos en las cepas.

Secuenciar los productos de PCR que codifican las β -lactamasas tipo SHV.

Realizar análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

Objetivos adicionales:

Identificar si están relacionados los aislamientos clínicos por medio de PFGE.

Identificar si están relacionados los plásmidos que codifican los genes de las β -lactamasas tipo SHV.

Amplificar mediante la técnica de PCR el gen de la integrasa y el casete que forma el integrón de clase 1 en las diferentes cepas.

4. MATERIALES Y METODOS

Cepas Bacterianas

Se seleccionaron 17 aislamientos clínicos de Enterobacterias multirresistentes productoras de BLEEs tomando como criterio los pIs (puntos isoeléctricos) de las β -lactamasas y los pesos moleculares de los plásmidos contenidos. Las cepas proceden de diferentes hospitales de la ciudad de México, Tabasco y Cuernavaca, que fueron aisladas entre 1990 y 1998. Estas 17 cepas provienen de un banco de 375 cepas multirresistentes.

Conjugación Bacteriana.

La resistencia a cefotaxima de las cepas se transfirió por conjugación a la cepa receptora *E. coli* J53-2 (F-, Pro-, Met-, Rifr). La cepa donadora (aislamiento clínico) y receptora *E. coli* J53-2 se crecieron a una densidad óptica de 0.5 (600 nm). Se mezclaron en una relación 1:10 (donadora-receptora) y se prepararon tres tubos por cruza con 5 ml de medio LB líquido, se incubaron sin agitación a 30°C. Los tiempos de incubación fueron de 24, 48 y 72 hrs. En cada uno de estos tiempos se espatularon 100 μ l en cajas de Petri con medio LB sólido suplementado con rifampicina-cefotaxima (100 μ g/ml y 1 μ g/ml, respectivamente) y rifampicina-ampicilina (100 μ g/ml y 100 μ g/ml, respectivamente). Posteriormente se replicaron por picadura con palillos en medios mínimos, para identificar por auxotrofia las transconjugantes identificadas con una X (Miller, 1972). Las conjugaciones se repitieron en medio sólido para aquellas cepas que no conjugaron en

líquido. El procedimiento fue básicamente el mismo, con la diferencia que después de hacer la mezcla de células donadora-receptora, se filtró la mezcla (en filtros de 45 μ m) e incubó la membrana en cajas de petri con medio LB sólido. La selección se realizó bajo las mismas condiciones que en las conjugaciones en líquido.

Es importante mencionar que para los análisis posteriores a la conjugación se utilizaron con las cepas transconjugantes y con los aislamientos clínicos para aquellas cepas que no conjugaron.

Visualización de Plásmidos de los aislamientos clínicos y las transconjugantes

La extracción de plásmidos se realizó utilizando un kit marca QIAGEN (Plasmid mini kit) mediante columnas de intercambio iónico para 5 ml de cultivo. La extracción se realizó de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes. Se analizaron 5 μ l del eluyente (50 μ l) y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% con un voltaje de 100 volts durante 6 horas a una temperatura de 4°C. Al término del corrimiento, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml). Los plásmidos R6K (40 kb), RP4 (54 kb), R1 (92 kb) y S4 (170 kb) fueron utilizados como marcadores de peso molecular.

Isoelectroenfoque/Bioensayo

La determinación de los pI de las β -lactamasas se realizó de la siguiente manera. Se crecieron las cepas en 5 ml de medio LB por 16 horas y se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de fosfatos (pH 7.4), se sonicaron (3 ciclos de 15 pulsos) y se eliminaron los restos celulares por centrifugación. Del sobrenadante se

tomaron 10 μ l y se colocaron en un gel prefabricados de acrilamida con un gradiente de pH de 3-9 (Fast System). El corrimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del equipo. El patrón de β -lactamasas se hizo evidente mediante el revelado del gel con un papel Whatman humedecido con la mezcla nitrocefina-cefotaxima (500 μ g/ml y 1 μ g/ml respectivamente) dejándolo varios segundos hasta la aparición de bandas rojizas y posteriormente se retiró el papel Whatman. La nitrocefina es un reactivo que la ser hidrolizado por las β -lactamsas cambia de color amarillo a rojo en pocos segundos lo que permite identificar a las β -lactamasas. El gel fue fotografiado en un transiluminador de luz blanca con una cámara Polaroid.

La identificación de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se realizó mediante el bioensayo, el cual consistió en colocar el gel (una vez revelado con nitrocefina) en una caja Petri estéril y se incubó por 20 min a 37°C; posteriormente se colocó una capa de agar suave que contiene la cepa sensible E. coli J53-2 y se incubó por 16 horas a 37°C. Se fotografió en un transiluminador de luz blanca con un fondo negro (Silva y Aguilar; 1997).

Amplificación por PCR de los genes de las β -lactamasas

La obtención de DNA de los cepas para los diferentes ensayos de PCR se realizó mediante las siguientes condiciones: Las bacterias se crecieron en una caja Petri con medio LB sólido con cefotaxima (1 μ g/ml) a 37°C por 16 horas. Se tomaron 3 colonias y se resuspendieron en 50 μ l de agua estéril desionizada en un tubo eppendorf y se colocaron en un baño María con agua en ebullición por 10 min. Posteriormente se

colocaron en hielo por 5 min, repitiendo este paso dos veces más. Se centrifugaron las muestras por 2 min y se realizó una dilución 10-1 (Silva y col, 2001).

Se amplificó el gen completo de las β -lactamasas tipo SHV (861 nucleótidos), con los oligonucleótidos SE5 (5'-GGT CGG AAT TCA GGA GGT TGA CTA TGC GTT ATA TTC GCC TG-3') y SB3 (5'-GGT GCG GAT CCT TAT TAG CGT TGC CAG TGC TC-3') (Figura 11). En base a que los genes de las β -lactamasas tipo SHV son ricos en su contenido de G-C (63%), se utilizó un kit para amplificar por PCR secuencias ricas en GC (PCRx Enhancer System, GIBCO BRL). La reacción se realizó en un volumen de 50 μ l que contenía 2.5 U de Taq PCRx DNA polimerasa Recombinant; 1X de Buffer de amplificación; 3X de buffer Enhancer (GIBCO BRL); 200 μ M de MgSO₂, 200 μ M de cada deoxinucleótido trifosfato, 30pm de cada oligonucleótido, 300ng de DNA. Para amplificar el DNA se utilizó un termociclador (ERICOM, PowerBlockTM System), con el siguiente programa: 5 min, 94°C; 30 ciclos de 30 seg, 94°C; 30 seg, 58°C; 2 min, 72°C; y una extensión final de 15 min, 72°C. El procedimiento se modificó de acuerdo al artículo de Silva y col (2001).

Los productos de PCR fueron purificados usando el High PureTM PCR Purification Kit (Boheringer) de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes. La cuantificación de los productos de PCR se realizó en un espectrofotómetro Beckman DU-7 a 260 y 280 nm, tomando como referencia que una densidad óptica equivale a 50ng/ μ l.

Para amplificar por PCR los genes de las β -lactamasas tipo TEM y TLA-1 se realizó mediante los oligonucleótidos OT-1 (5'-TTG GGT GCA CGA GTG GGT TA-3') y OT-2 (5'-TTA TTG TTG CCG GGA AGG TA-3') (Arlet y Phillipon, 1991) y INSP-01 (5'-

GGTGCgaattcAGGAGCTTGACTATGCGTtatattcgcctgtgtattatctccctgtagccacc
Oligo SE5 Oligo Sec5' Sitio *EcoRI* Sitio RBS Y I R L C I I S L L A T
ctgccgctggcggtagcacgccagcccgcagccgcttgagcaaataaactaagcgaaagccagctg
L P L A V H A S P Q P L E Q I K L S E S Q L
Sitio *NotI*
tcgggcccgcgtaggcatgatagaaatggatctggccagcggccgcacgctgaccgcctggcgcgcc
S G R V G M I E M D L A S G R T L T A W R A
Sitio *DraI*
gatgaacgctttcccatgatgagcacctttaaagtagtgctctgcggcgcagtgctggcgcgggtg
D E R F P M M S T F K V V L C G A V L A R V
gatgccggtgacgaacagctggagcgaagatccactatcgccagcaggatctgggtggactactcg
D A G D E Q L E R K I H Y R Q Q D L V D Y S
ccggtcagcgaaaaacaccttgccgacggcatgacggctcggcgaactctgcgcccgcgccattacc
P V S E K H L A D G M T V G E L C A A A I T
atgagcgataacagcgcgcccaatctgctactggccaccgctcggcggccccgcaggattgactgcc
M S D N S A A N L L L A T V G G P A G L T A
tttttgcgccagatcggcgacaacgtcacccgccttgaccgctgggaaacggaactgaatgagggcg
F L R Q I G D N V T R L D R W E T E L N E A
Oligo P1
cttcggcgacgcccgcgacaccactaccccgccagcatggccgcgaccctgcgcaagctgctg
L P G D A R D T T T P A S M A A T L R K L L
Sitio *PstI*
accagccagcgtctgagcgcgccggttcgcaacggcagctgctgcagtggtggatggtggacgatcgggtc
T S Q R L S A R S Q R Q L L Q W M V D D R V
gccggaccggtgatccgctccgtgctgccggcgggctggtttatcgccgataagaccggagctggc
A G P L I R S V L P A G W F I A D K T G A G
gagcgggggtgcgcgcgggattgtcgccctgcttggcccgaataacaaagcagagcgcattgtgggtg
E R G A R G I V A L L G P N N K A E R I V V
atztatctgcgggataccccggcgagcatggccgagcgaatcagcaaatacggcgggatcggcgcg
I Y L R D T P A S M A E R N Q Q I A G I G A
Oligo P2
gcgctgatcgagcactggcaacgctaaATTcctaggcGTGG Sitio *BamHI*
A L I E H W Q R - Oligo SB3

Figura 11. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la β -lactamasas SHV-1. Se muestran los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR (SE5 y SB3), para amplificar el gen completo de las β -lactamasas tipo SHV; así con las características que cada uno tiene, como sitios de restricción y sitio de unión a ribosoma (Silva y col; 2001). Además se indican los oligonucleótidos (Sec5' y P1) utilizados para secuenciar los productos de PCR de los genes *bla*_{SHV}. En la secuencia se indican los sitios de restricción únicos de las enzimas *NotI*, *DraI* y *PstI*, utilizadas en los análisis de los plásmidos. Se indican los producto de PCR con los oligonucleótidos P1-P2 y SE5-SB3 que generan los productos de 261 y 898 respectivamente, los cuales fueron utilizados como sondas en los ensayos de hibridación tipo Southern.

TTC CAG CGC AAA TCC GCG-3') y BCR (5'-CTA GTT AAG GAT GGG AAA TAG-3') (Silva y col, 2000), respectivamente. Las condiciones empleadas son las mismas para amplificar los genes blaSHV.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (ERICOM, PowerBlock™ System), con el siguiente programa: 5 min, 94°C; 30 ciclos de 30 seg, 94°C; 30 seg, 58°C; 1.40 min, 72°C; y una extensión final de 10 min, 72°C. Todos los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

Secuenciación de los Productos de PCR y Análisis de la Secuencia

La preparación de las muestras se realizó de acuerdo a las indicaciones de la Unidad de Secuencia del Instituto de Biotecnología, así como la secuenciación de los productos de PCR. Se realizaron en un equipo ABI PRISM 377-18, mediante el kit EL:Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación fueron el Sec5' (5'-TCA GGAGGT TGA CTA TGC GT-3') (este estudio) y P1 (5'-ATC GAA TGA GGC GCT TCC-3') (Prodinger y col; 1996) (Figura 11). Los productos de PCR secuenciados fueron aquellos en donde se obtuvo un producto amplificado mediante los oligonucleótidos SE5 y SB3 específicos para las β-lactamasas tipo SHV.

La conversión de la secuencia de nucleótidos obtenida a aminoácidos se realizó mediante el programa Translate tool disponible en el sitio Web Pedro's Biomolecular Research Tools en Internet (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). Los alineamientos múltiples de secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos se realizaron mediante el programa

ClustalW del paquete GCG (Genetics Computer Group), usando como secuencia de referencia la SHV-1 (Número de Acceso a GENBANK AF148850).

Detección de Integrones de Clase 1.

La detección del gen de la integrasa se realizó utilizando como control positivo el plásmido pEC (Bluescript) que tiene insertado el gen de la integrasa de clase 1 (1086 pb). Por otra parte la determinación del casete o de los genes integrados se realizó utilizando el plásmido pACYC184::Tn21 que contiene el transposón Tn21, el gen de la integrasa de clase 1 y un casete de 1.0 kb (Casalino y col; 1988). Ambos plásmidos fueron proporcionados por Tosini F. y Carattoli A. de Roma, Italia. El DNA proporcionado se transformó en células competentes de *E. coli* DH5- α para su uso.

Se utilizaron los oligonucleótidos Int1 (5'-CGT TCC ATA CAG AAG CTG G-3') y Int2 (5'-CGT TCG GTC AAG GTT CTG G-3') (Adrian y col; 2000), para determinar por PCR en las cepas el gen de la integrasa de clase 1. Las reacciones se realizaron en un volumen de 50 μ l que contenía 2.5 U de *Taq* PCRx DNA polimerasa Recombinant; 1X de Buffer de amplificación; 200 μ M de MgSO₂, 200 μ M de cada deoxinucleótido trifosfato, 30pm de cada oligonucleótido, 300ng de DNA (GIBCO BRL), mediante el siguiente programa: 5 min, 94°C; 30 ciclos de 30 seg, 94°C; 30 seg, 58°C; 2 min, 72°C; y una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml).

La determinación del casete o fragmento de DNA insertado en el integron de clase 1 se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 5'CS (5'-GGC ATC CAA GCA

GCA AG-3') y 3'CS (5'-AAG CAG ACT TGA CCT GA-3') (Levesque y col; 1995) (Figura 11) y la combinación Intl1-3'CS. Las condiciones fueron las mismas que se utilizaron para amplificar el gen de la integrasa de clase 1. Para amplificar el DNA se utilizó un termociclador (ERICOM, PowerBlock™ System), con el siguiente programa de amplificación: 5 min, 94°C; 30 ciclos de 30 seg, 94°C; 25 seg, 58°C; 2 min, 72°C; y una extensión final de 7 min a 72°C, modificado de Roy y col (1995).

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). El gel fue transferido a una membrana de nylon mediante las condiciones abajo citadas.

Determinación del Origen Clonal por medio de Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE)

Con el propósito de determinar el origen clonal de los aislamientos clínicos se empleó la metodología descrita por Soares y col; (1993). Para el análisis de Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE) se crecieron los cultivos en 5 ml de LB a 37°C por 16 horas. Las bacterias se concentraron por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de PIV y se adicionó la agarosa al 1.5% (SeaPlaque GTG Agarose, FMC) a 42°C. Se colocaron 20 µl para conformar los discos, para posteriormente incubarlos 3 hrs a 37°C en EC con RNAsa (50µg/ml) y lisozima (100 µg/ml). Pasado el tiempo se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de EC con proteinsas K (1µg/ml) y se incubaron a 50°C toda la noche. Previo a la restricción se incubaron los discos con amortiguador de la enzima durante 30

min a 25°C. La restricción se realizó utilizando la enzima de restricción *XbaI* (25U), en un volumen de 45 µl, durante 18 hrs. Los discos se colocaron en los pozos del gel al 1.0% de agarosa (SeaKem LE Agarose, FMC). Las condiciones de electroforesis fueron, tiempo inicial 1 seg, tiempo final 30 seg, tiempo de corrida 23 hrs a un voltaje de 6 V. Posteriormente se tiñó el gel en bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml por 30 min. El análisis de restricción se realizó de acuerdo a los criterios descritos por Tenover y col (1995), que indica que de 1 a 3 bandas diferentes las cepas están estrechamente relacionadas (subtipo A1); de 4 a 6 diferencias, posiblemente relacionadas (subtipo A2) y de 7 o más diferencias son cepas diferentes (clona B).

Restricción de los Plásmidos

Los plásmidos obtenidos por la extracción con las columnas de intercambio iónico, se restringieron bajo las siguientes condiciones; con *NotI* (5'-GC/GGCC GC-3') se restringieron en un volumen de 20µl que contenía 400ng de DNA, 1X de buffer de la enzima, 2µg de BSA, se mezcló y se adicionaron 10U de enzima. Las reacciones de restricción con *DraI* se realizaron en un volumen de 20µl que contenía 400ng de DNA, 1 X de buffer de la enzima, se mezcló y se adicionó 10U de enzima. Las digestiones se incubaron 4 hrs a 37°C. El análisis de las restricciones se realizaron en un gel de agarosa al 2.0 % con un corrimiento electroforetico de 6 hrs a 80 volts en buffer TBE 1X a 4°C. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

El sitio de restricción de *NotI* se encuentra en el nucleótido 147 de los genes *bla_{SHV}* (861 pb), generando dos fragmentos de 147 y 714 pb (Figura 11). En el caso de *PstI* (5'-C TGCA/G-3') los genes *bla_{SHV}* tienen un sitio en la posición 617, generando dos fragmentos de 249 y 617 pb (Figura 11) y para *DraI* también tiene un sitio en la posición 204 en los genes *bla_{SHV}* generando dos fragmentos de 204 y 662 pb (Figura 11).

Transferencia del DNA del gel de agarosa a la membrana de nylon.

La transferencia de DNA de los geles de agarosa de la extracción de plásmidos, restricción de los plásmidos de las tres enzimas y el gel de la amplificación por PCR de integrones de clase I se transfirió a una membrana de nylon mediante un proceso alcalino, usando el equipo VacuGene XL (Pharmacia). Este proceso consiste en un sistema de transferencia de baja presión. Se colocó la membrana de nylon debajo del gel de agarosa y se adicionó la solución I (0.2 N HCL), hasta que cubriera el gel y hasta que el azul de bromofenol se torne amarillo (aproximadamente 20 min), a una presión de 50 mbar. Se retira la solución I y se colocó 1M NaOH hasta cubrir dos veces el espesor del gel, manejando una presión de 50 mbar de 1 a 1.5 horas. Posteriormente se neutralizaron las membranas con SSC 2X por 10 min. Las membranas se secaron a 80°C por 1.5 horas y se almacenaron a 4°C envuelta en papel aluminio hasta su uso.

Hibridación tipo Southern con la sonda del gen SHV-1

Las sondas de DNA del gen *bla_{SHV-1}* empleadas en las hibridación tipo Southern se obtuvieron amplificando por PCR un fragmento y el gene completo de la β -lactamasa

SHV-1 con los oligonucleótidos, SE5-SB3 y P1-P2 que generan un fragmento de 961 y 261 pb respectivamente. Los productos de amplificación se purificaron usando el High Pure™ PCR Purification Kit de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes (Boehringer).

Se hibridaron mediante quimioluminiscencia las membranas de los plásmidos restringido con la enzima *NotI* y los productos de PCR de los integrones. Mediante radioactividad con Fosforo 32 (³²P) las membranas de los plásmidos restringido con la enzima *DraI* y los plásmidos de las transconjugantes y aislamientos clínicos.

Los ensayos de hibridación mediante quimioluminiscencia se realizaron mediante el kit de DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche), el cual usa digoxigenina (DIG) un hapteno esteroideal para marcar las sondas de DNA que subsecuente se detecta por inmunoensayo enzimático. Los ensayos se realizaron de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes que consistieron en: 1) Se diluyó 1 µg de DNA en 16 µl de agua destilada estéril, se desnaturalizó el DNA en baño maría 10 min y posteriormente se colocó en agua hielo, a la cual se le adicionó 4 µl de DIG-High Prime, donde se incubó por 20 horas a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 2 µl de EDTA 0.2 M (pH 8.0) y se calentó a 65°C por 10 min. 2) La membrana se pre-hibridó en 15 ml de DIG Easy Hyb a 42°C por 30 min. Posteriormente se adicionaron 6 ml de DIG Easy Hyb con la sonda desnaturalizada y se incubó 20 hrs a 42°C. Posteriormente se realizaron los lavados en 2X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente con agitación por 5 min y en 0.5X SSC, 0.1% SDS a 65°C por 15 min. 3) La detección inmunológica se realizó a temperatura ambiente con suave agitación como a continuación se describe: se incubó la

membrana 5 min en Buffer de lavado, 30 min en 100 ml de solución de bloqueo, 30 min en 20 ml de solución de anticuerpo, 15 min en buffer de lavado, 5 min en 20 ml de buffer de detección. Posteriormente se colocó la membrana en un acetato y se adicionó 1 ml de CSPD y se colocó otro acetato cubriendo la membrana, se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó 10 min a 37°C. La membrana de nylon se colocó entre dos placas de rayos X (Hyperfilm, Amersham) dentro de un casete de autorradiografía por 30 min, para posteriormente revelar con revelador y fijador.

En los ensayos de radioactividad se marco la sonda utilizando 25 ng de DNA mediante el Kit rediprime II (Amersham) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes, utilizando [α -³²P] dCTP. La membrana se pre-hibridó en buffer Rapid-hyb (Amersham) por 30 min a 65°C, se adicionó la sonda radioactiva e hibridó 2.5 horas a 65°C. Posteriormente se lavaron las membranas en buffer 0.1X SSC y 0.5% SDS por 15 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados posteriores a 65°C en buffer 0.1X SSC y 0.5% SDS, cada uno de 15 min. Posteriormente se colocó la membrana de nylon cubierta por acetatos entre dos placas de rayos X dentro de un casete de autorradiografía por 24 horas para posteriormente revelarse.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamientos Clínicos

A partir de un banco de 375 aislamientos clínicos de Enterobacterias productoras de BLEE, el criterio utilizado de las 17 cepas seleccionadas comprendieron a tres especies, *K. pneumoniae* (11), *E. cloacae* (4) y *E. coli* (2) que provienen de siete hospitales diferentes, de tres ciudades distintas (Distrito Federal, Cuernavaca y Tabasco) y de un periodo de ocho años (1990-1998).

El año 1990 predominó con número de cepas (4 cepas), seguido por 1996 (3 cepas) (Tabla 4). Los años 1993 y 1994 no están representados por ningún cepa. El género de las cepas no fue un criterio de selección no obstante comprenden en su mayoría a *K. pneumoniae*. Todas las cepas tienen como antecedente que son resistentes a cefalosporinas de tercera generación y a otros antibióticos no β -lactámico, como aminoglucósidos, tetraciclina y cloranfenicol.

El origen de las muestras predominan de hemocultivo (6/15), seguido de secreción (4/15), y en menor número de sangre, catéter, coprocultivo. No contamos con el origen de la muestra de las cepas 55 y 65 (Tabla 4).

Susceptibilidad.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) determinada a las 17 cepas para ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX) mostró que las cepas de *K. pneumoniae* presenta CMI

Tabla 4. Características de los Aislamientos Clínicos productores de BLEEs

Aislamiento Clínico	Especie	Origen de la muestra ^a	Hospital		CMI ($\mu\text{g/ml}$)		Transferencia de la Resistencia a CTX por Conjugación
			de Origen ^b	Año de Aislamiento	CTX	CAZ	
55	<i>K. pneumoniae</i>	NI	I.N.N.N.Z	1990	16	64	+
65	<i>K. pneumoniae</i>	NI	I.N.N.N.Z	1990	128	128	+
86	<i>E. coli</i>	Sangre	H.I.M	1990	32	32	+
96	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	I.N.N.N.Z	1990	64	64	+
97	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	H.I.M	1991	64	64	+
102	<i>K. pneumoniae</i>	Catéter	H.I.M	1991	32	64	+
128	<i>E. coli</i>	Hemocultivo	H.R	1992	32	64	+
132	<i>E. cloacae</i>	Secreción	H.R	1992	64	32	+
1335	<i>K. pneumoniae</i>	Coprocultivo	H.I.M	1995	32	64	-
806	<i>K. pneumoniae</i>	Hemocultivo	H.N.T	1996	32	64	-
819	<i>E. cloacae</i>	Secreción	H.N.T	1996	64	32	-
827	<i>E. cloacae</i>	Hemocultivo	H.N.T	1996	32	64	-
910	<i>K. pneumoniae</i>	Hemocultivo	H.C.C	1996	32	264	-
1333	<i>K. pneumoniae</i>	Secreción	H.I.M	1996	64	256	-
1319	<i>K. pneumoniae</i>	Hemocultivo	H.I.M	1997	32	64	-
1509	<i>K. pneumoniae</i>	Hemocultivo	H.P.IMSS	1997	32	16	-
1177	<i>E. cloacae</i>	Secreción	H.N.M	1998	64	32	+

Abreviaturas: CMI, Concentración Mínima Inhibitoria; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima.

^a NI, no identificado.

^b Hospitales de la ciudad de México. I.N.N.S.Z, Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubiran; H.I.M, Hospital infantil de México; H.R, Hospital de la Raza; H.N.T, Hospital del Niño de Tabasco; H.C.C, Hospital Civil de Cuernavaca; H.P.IMSS, Hospital de Pediatría del IMSS; Hospital del Niño Morelense.

diferentes entre CAZ y CTX, con valores superiores en la mayoría de los casos para CAZ. En *E. cloacae* la mayoría de las cepas tienen CMI iguales, no obstante la cepa 827 presenta una CMI mayor para CAZ y menor para CTX. La CMI entre las cepas de *E. coli* es también muy similar, siendo mayor en una de ellas para CAZ. En general las CMI fueron mayores para CAZ en comparación con CTX (Tabla 4).

Transferencia de la Resistencia por Conjugación.

Con la intención de determinar la habilidad de las 17 cepas para transferir la resistencia a CTX se realizaron los ensayos de conjugación bacteriana correspondientes. En 9/17 (52.9%) cepas se obtuvieron transconjugantes resistentes a CTX (Tabla 4). Los porcentajes de transconjugantes por géneros corresponden a *K. pneumoniae* 5/11 (45.5%), *E. coli* 2/2 (100%) y *E. cloacae* 2/4 (50%). El grupo de transconjugantes de *K. pneumoniae* 6/11 (56%) comprenden preferentemente los años 1990 al 1993. En el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubiran se obtuvieron transconjugantes en 3/3 (100%); en las cepas del Hospital Infantil de México un 3/6 (50%) y el Hospital del Niño de Tabasco, Hospital Civil de Cuernavaca y Hospital de Pediatría del IMSS no se obtuvieron transconjugantes (Tabla 5).

Hughes y Datta (1983) reportaron que los plásmidos conjugativos existen desde antes de la era pre-antibiótica, ya que un estudio realizado en 433 cepas de cinco géneros distintos colectadas de 1917 a 1954 provenientes de diferentes laboratorios, principalmente de Europa, Rusia, India y Norte América, mostró que un 24% (104/433) transfirieron un plásmido a la cepa receptora *E. coli* K12 J53-2. Además se identificó la resistencia a

Tabla 5. Características Moleculares de los Aislamientos Clínicos

Cepa	Transferencia de la resistencia a CTX por Conjugación ^a	Plásmidos ^b (Kb)	pI de las β-lactamasas ^c	β-lactamasa ^d			
				TEM	TLA-1	SHV	Genes Codificados
55	+	<u>170</u> , 90	<u>(7.6)</u> ^{a, b}	-	ND	+	SHV-2
65	+	<u>80</u> , 70, 60	<u>5.4, (7.6), 8.1</u>	+	-	+	TEM/SHV-2
86	+	<u>130</u> , 120	<u>5.4, 7.6, (8.2)</u>	+	ND	+	TEM/SHV-5
96	+	<u>150</u> , 90	<u>5.4, (7.6)</u>	+	ND	+	TEM/SHV-2
97	+	<u>150</u> , 90, 50	<u>(8.2)</u>	-	ND	+	SHV-5
102	+	<u>130</u> , 70	<u>5.4, (8.2)</u>	+	ND	+	TEM/SHV-5
128	+	<u>130</u> , 90, 70	<u>5.4, (7.6)</u>	+	ND	+	TEM/SHV-2
132	+	<u>170</u> , 50	<u>(9.0)</u>	-	+	-	TLA-1
1335	-	<u>160</u> , 110	5.4, 7.6, (8.2)	+	ND	+	TEM/SHV-1/SHV-5
806	-	<u>110</u> , 65, 50	5.4, (7.6)	+	ND	+	TEM/SHV-2
819	-	<u>80</u> , 35	5.4, 7.8, (9.0)	+	+	-	TEM/TLA-1
827	-	<u>70</u> , 50	5.4, 8.1, (9.0)	+	+	-	TEM/TLA-1
910	-	135, 105, 80	5.4, 7.6, (8.2)	+	ND	+	TEM/SHV-1/SHV-5
1333	-	116, 60	5.4, 7.6, (8.2)	+	ND	+	TEM/SHV-1/SHV-5
1319	-	116, 60	5.4, 7.6, (8.2)	+	ND	+	TEM/SHV-1/SHV-5
1509	-	170, 54, 40	5.4, (8.2)	+	ND	+	TEM/SHV-5
1177	+	<u>90</u> , 40	<u>5.4, (8.2)</u>	+	ND	+	TEM/SHV-5

Abreviaciones: pI, punto isoeléctrico; ND, no determinado.

^a Aislamiento clínico que conjugaron con la cepas E. coli J53-2 seleccionadas en cefotaxima.

^b Los plásmidos subrayados corresponden al que se transfirió durante la conjugación

^c pI subrayados identificados en las transconjugantes. (), β-lactamasa de espectro extendido.

^d Genes de las *bla*_{TEM}, *bla*_{TLA-1}, *bla*_{SHV} determinadas por PCR. Genes de las β-lactamasas *bla*_{SHV} determinadas por secuencia.

ampicilina y tetraciclina en un 2.5% (11/433) y un 33% (138/433) a metales pesados. Actualmente los plásmidos conjugativos son identificados en una gran cantidad de aislamientos clínicos en diversas partes del mundo, los cuales confieren resistencia a múltiples antibióticos (Nicolas y col; 1989; Gniadkowski y col; 1998; Siu y col; 1999; Silva y col; 2000). No obstante se han descrito con menor frecuencia cepas multirresistentes que contienen plásmidos no conjugativos (Silva y col; 2001).

Plásmidos de los Aislamientos Clínicos y de las Transconjugantes.

Las cepas que no conjugaron (7/17) contienen varios plásmidos (de uno hasta cinco) con diferentes pesos moleculares, que comprenden de <40 kb hasta >100 kb. Las cepas que conjugaron (9/17) transfirieron un sólo plásmido a la célula receptora (transconjugante), siendo el de más alto peso molecular en todos los casos, que comprenden de 80 kb hasta 170 kb (Tabla 5).

La figura 12 muestra una electroforesis en agarosa de los plásmidos obtenidos de los aislamientos clínicos y transconjugantes, se observa una banda común que corresponde al DNA cromosomal en cada una de las extracciones de los plásmidos, con excepción de la transconjugante X1177, que no muestra restos de DNA cromosomal. La cepa J53-2 *E. coli* (carril 8) corresponde al fondo genético de las transconjugantes.

Los plásmidos conjugativos descritos de cepas multirresistentes por lo general tienen pesos moleculares que oscilan las 100 kb (Nicolas y col; 1989; Siu y col; 1999; Silva y col; 2000). No obstante se han descrito plásmidos conjugativos de menor tamaño (<100 kb) (Gniadkowski y col; 1998). También se han descrito plásmidos >100 kb no conjugativos

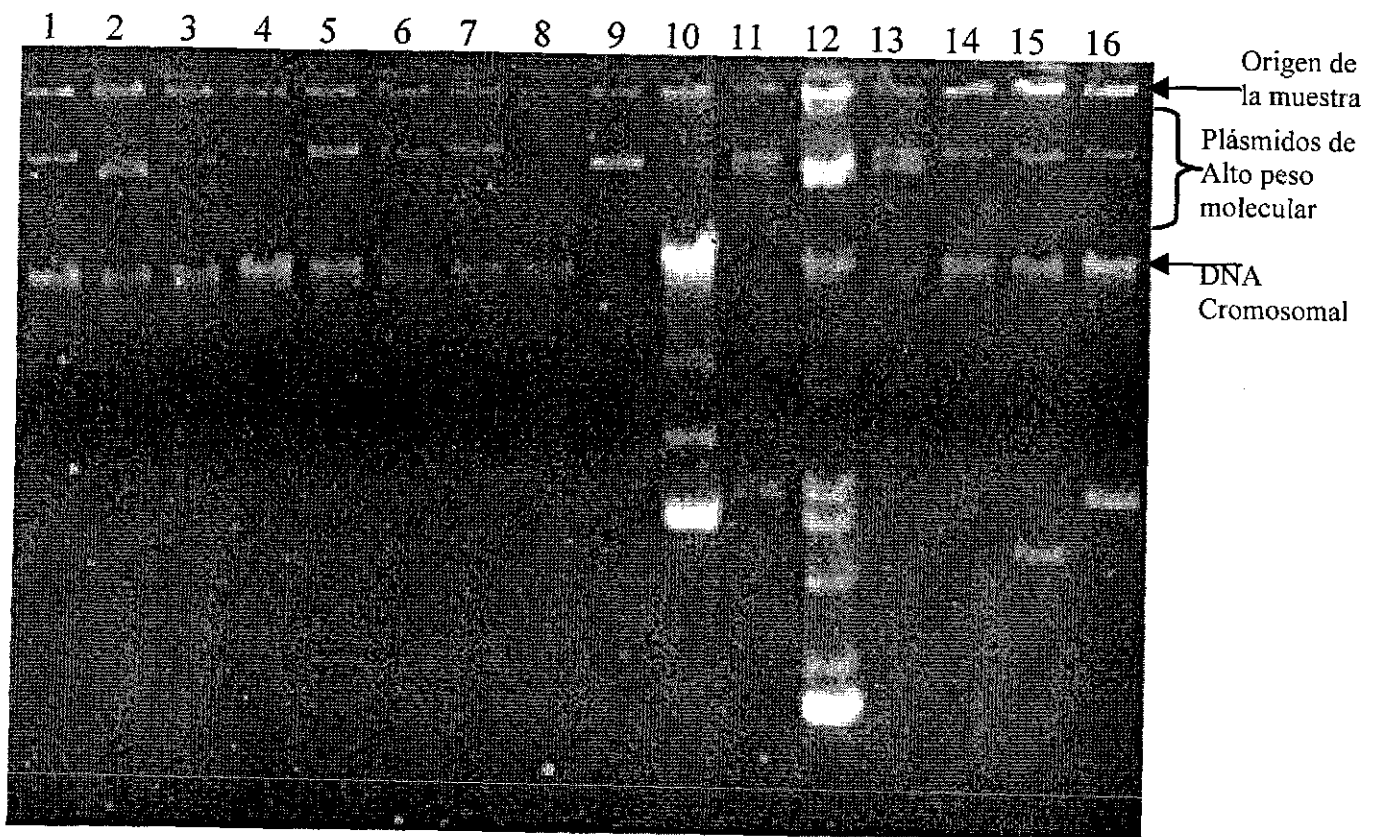


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de los plásmidos extraídos por medio de columnas de intercambio iónico. Se muestra el origen de la muestra, plásmidos de alto peso molecular y plásmidos pequeños. Transconjugantes del carril 1 al 9; 1, X55; 2, X65; 3, X86; 4, X96; 5, X97; 6, X102; 7, X128; 8, J53-2 *E. coli*; 9, X1177. Aislamientos clínicos que no conjugaron del carril 10 al 16. 10, 806; 11, 910; 12, 819; 13, 1319; 14, 1333; 15, 1335; 16, 1509.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(Silva y col; 2001) por lo que al parecer el tamaño molecular de los plásmidos no determina si tienen la capacidad de transferirse por conjugación, si no más bien que contengan la maquinaria molecular necesaria para que se lleve a cabo.

Puntos isoelectrico de las β -lactamasas (pI) Codificadas en los Aislamientos Clínicos.

En la Tabla 5 se observan los pI determinados en las diferentes cepas (Figura 13). El número de β -lactamasas codificadas en las cepas varían desde una hasta tres, siendo los pIs similares en las 17 cepas seleccionados. El grupo de β -lactamasas que predominó fue con pIs de 5.4, 7.6 y (8.2) en 4/17 cepas. Los pIs de las β -lactamasas señaladas entre paréntesis corresponden a la β -lactamasas determinadas por bioensayo. Los siguientes grupos corresponden al de 5.4, (7.6) y 5.4, (8.2) predominando 3/17 ambos grupos (Tabla 5).

La β -lactamasa de pI con 5.4 predominó en 15/17 de las cepas; la BLEE con pI de (9.0) predominó en 3/17; la BLEE con (8.2) en 9/17; la BLEE con (7.6) en 5/17; la β -lactamasa con 7.6 en 4/17; la β -lactamasa con 8.1 en 2/17; la β -lactamasa con 7.8 en 1/17.

En el género de *K. pneumoniae* (11) predominó la β -lactamasa con pI de 5.4 en 9/11, seguida por la de (8.2) en 7/11. La de pI de 7.6 y (7.6) en 4/11 en ambos casos. En *E. cloacae* (4) la única BLEE es la de pI de (9.0) con 3/3 y la de pI de 5.4 con 2/3. Entre *E. coli* y *K. pneumonieae* presentan pIs de β -lactamasas similares como las de 5.4, (7.6) y (8.2). La β -lactamasa con pI de 7.6 se presentó solo en cuatro cepas de *K. pneumonieae*, las cuales no transfirieron ningún plásmido durante la conjugación (Tabla 5).

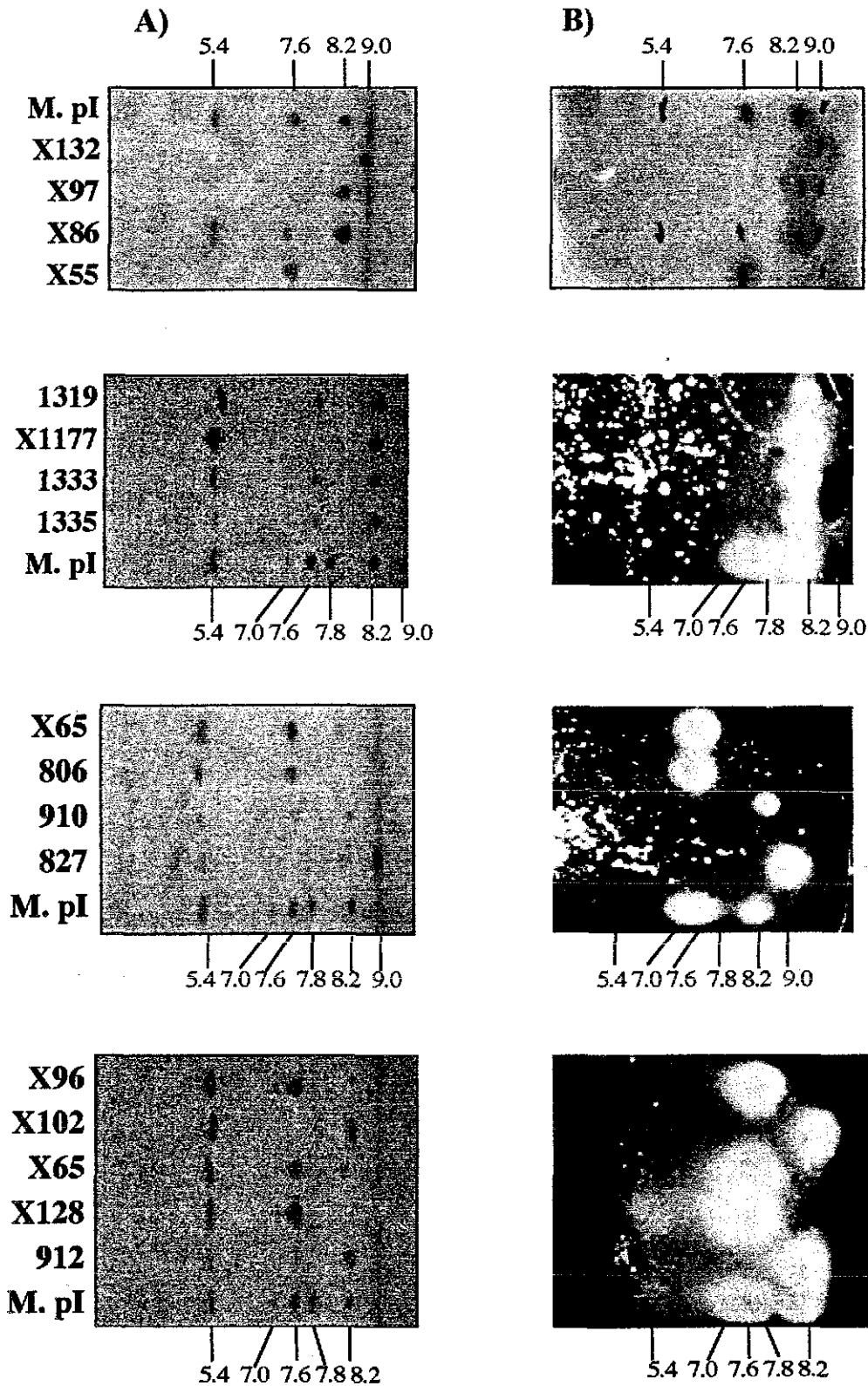


Figura 13. A) Isoelectroénfoque del extracto crudo en un gel de poliacrilamida con un gradiente de pH de 3 a 9. B) Bioensayo utilizando como cepa sensible la *E. coli* J53-2. Marcadores de pI (M. pI); 5.4 (TEM-1), 7.0 (SHV-3), 7.6 (SHV-2), 7.8 (SHV-4), 8.2 (SHV-5) y 9.0 (TLA-1). X-Corresponde a la transconjugante.

Los pIs de las β -lactamasas codificadas son muy similares entre los diferentes plásmidos conjugativos y así mismo entre los aislamientos clínicos que no conjugaron. Estos pIs representan a las familias de β -lactamasas tipo TEM con pIs entre 5.4-6.5; a las β -lactamasas tipo SHV con 7.0-8.2 (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) y a la β -lactamasa de clase A TLA-1 con pI 9.0 descrita en México (Silva y col; 2000). El pI de esta enzimas permiten identificar a que posible familia de β -lactamasas podrían corresponder, no obstante los pIs de las β -lactamasas de la familia OXA oscila entre 5.5-9.0. Algunas de estas enzimas tienen pIs idénticos a las β -lactamasas tipo TEM, SHV y TLA-1; como la OXA-18 con pI 5.5; OXA-5, 19 con 7.6 y OXA-24 con 9.0. Además de otros pI muy similares como OXA-1 con 7.4; OXA-2, 6, 7 con 7.7; OXA-26 con 7.9 y OXA-28 con 8.1. Lo que descarta que solo por el pI de la β -lactamasa se puedan determinar a cual familia podría corresponder.

Identificación por PCR de los Genes que codifican las β -lactamasas en los Aislamientos Clínicos

Las β -lactamasas con pI de 7.6 y 8.6 codificadas en las cepas corresponden a los pI de las β -lactamasas tipo SHV, la de pI de 5.4 a la familia TEM y la de pI de 9.0 a TLA-1. Por lo que mediante la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos se realizó la amplificación de los genes que codifican para estas β -lactamasas.

Mediante los oligonucleótidos SE5 y SB3 (Figura 11) (Silva y col; 2001) se amplificaron los productos esperados de 870 pb en todas las cepas que expresaban por lo menos una β -

lactamasa con pI de (7.6) u (8.2) (14/14) (Tabla 5). Este producto de PCR incluye el péptido líder y el gen completo de la β -lactamasa tipo SHV (Figura 11).

Las 3 cepas que expresaron una BLEE con pI de (9.0), se obtuvo una banda con el peso molecular esperado de 956 pb que corresponde al gen completo (906) y 50 pb del promotor. Por otro lado se determinó de igual manera con los oligonucleótidos OT-1 y OT-2 (Arlet y Philippon; 1991), se obtuvo en todas las cepas que contienen una β -lactamasa con pI de 5.4 (14/14) el producto del tamaño esperado de 503 pb, que corresponde solo a un fragmento del gen *bla*_{TEM} (Tabla 5).

Mediante PCR determinamos que las β -lactamasas con pI de 5.4 no BLEE (determinado por bioensayo) corresponde a una β -lactamasa tipo TEM y al analizar las más de 100 variantes, encontramos que hay 11 β -lactamasas con pI de 5.4. Una corresponde a la TEM-1 no de espectro extendido y 10 enzimas corresponden a β -lactamasas resistentes a inhibidores β -lactámicos (TEM IRT). Por lo que consideramos que la β -lactamasa con pI de 5.4 identificada en las cepas de este estudio es la TEM-1 ya que no es de espectro extendido y además no es resistente a inhibidores.

Las β -lactamasas identificadas en las diferentes cepas de este estudio no tienen alguna relación con el origen de las muestras, ya que no hay un patrón de β -lactamasas que relacione con los diferentes orígenes de las muestras.

Secuenciación de los productos de PCR y análisis de las Secuencias de los genes *bla*_{SHV}.

Los 14 productos de PCR obtenidos de las cepas que amplificaron los genes de las β -lactamasas tipo SHV se sometidos a secuenciación nucleotídica utilizando los oligonucleótidos Sec5' (este estudio) y P1 (Prodinger y col; 1996) (Figura 11). Las secuencias nucleotídicas obtenidas con estos oligonucleótidos se complementaron para obtener la secuencia completa del gen. Estas secuencias se tradujeron a aminoácidos y mediante alineamientos múltiples se identificaron los siguientes cambios de aminoácidos. En 5/14 genes se identificó el cambio del aminoácido Ser/Gli (G697/A) en la posición 238; en 9/14 genes se identificaron dos cambios de aminoácidos Ser/Gli (G697/A) y Lis/Glu (G680/A) en las posiciones 238 y 240 respectivamente. Los genes con el cambio Ser238Gli corresponde a la BLEE SHV-2 con un pI de 7.6 (Bradford, 1999) y los cambios Ser238Gli y Lis240Glu correspondió a la BLEE SHV-5 con un pI de 8.2 (Billot-Klein y col; 1990) (Tabla 6).

El cambio de Ser por Gli en la posición del aminoácido 238 de la BLEE SHV-2 causa las propiedades de espectro extendido de la enzima, permitiendo el desarrollo de una β -lactamasa más compleja. En la β -lactamasa SHV-5 las mutaciones identificadas Ser238Gli y Lis240Glu han generado una enzima más eficiente en la hidrólisis de ceftazidima y cefotaxima (Bush y col; 1995).

El análisis de las secuencias de nucleótidos no mostró mutaciones silenciosas en los genes, sólo presentaron los cambios de nucleótidos en las mismas posiciones que se han

Tabla 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos de las β -lactamasas tipo SHV

β -lactamasa	Posición de los Aminoácidos ^a		pI	Referencia ^b
	238	240		
SHV-1	Gli	Glu	7.6	Bradford, 1999
SHV-2	Ser		7.6	Bradford, 1999
SHV-5	Ser	Lis	8.2	Billot-Klein, 1990
SHV-1	Gli	Glu	7.6	Este estudio
SHV-2	Ser		7.6	Este estudio
SHV-5	Ser	Lis	8.2	Este estudio

Abreviaciones: Gli, glicina; Glu, ácido glutámico; Ser, serina; Lis, lisina.

^a Posición del aminoácido de acuerdo a Ambler, (1991).

^b Gorge Jacoby y Karen Bush (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

descrito previamente que involucra a los cambios de aminoácidos que generan las BLEE SHV-2 y SHV-5 previamente reportadas.

Por otro lado el electroferograma de las secuencias obtenidas de las cepas 910, 1319, 1333 y 1335 (cepas que no conjugaron) con el oligonucleótido P1 mostraron dos picos de nucleótidos en las posiciones de los aminoácidos 238 y 240. Específicamente en la cepa 1335 la primera base del codón 238 un pico corresponde a guanina (G) y en la misma posición el otro pico a adenina (A), teniendo G/AGC. Realizando las combinaciones de nucleótidos en base al código genético correspondieron a Glicina (GGC) y a Serina (AGC) (Figura 14). De la misma forma los dos picos en la primera (G/A) y tercera base (G/A) del codón del aminoácido 240, correspondieron a ácido glutámico (GAG/GAA) y a lisina (AAG/AAA) (Figura 14). En las cepas 910, 1319 y 1333 no se observan dos picos en la tercera posición del codón del aminoácido 240.

Lo anterior nos indica que se encuentra codificadas en una misma cepa las β -lactamasas SHV-1 que corresponde a la β -lactamasas con pI de 7.6 y SHV-5 que corresponde a la BLEE con pI de (8.2).

Esto no indica que ambas β -lactamasas estén codificadas en el mismo plásmido, ya que la SHV-1 se ha descrito que esta codificada principalmente en el cromosoma de *K. pneumoniae* (Chaves y col; 2001), aunque también ha sido reportada en plásmidos (Bush y col; 1995). No obstante sólo algunos reportes han descrito dos β -lactamasas tipo SHV en un mismo aislamiento clínico (Essack y col; 2001).

Al inicio de este estudio se habían descrito 12 β -lactamasas tipo SHV y hasta la fecha del 16 de Octubre del 2001 se han descrito 25 β -lactamasas más de la familia SHV (hasta la

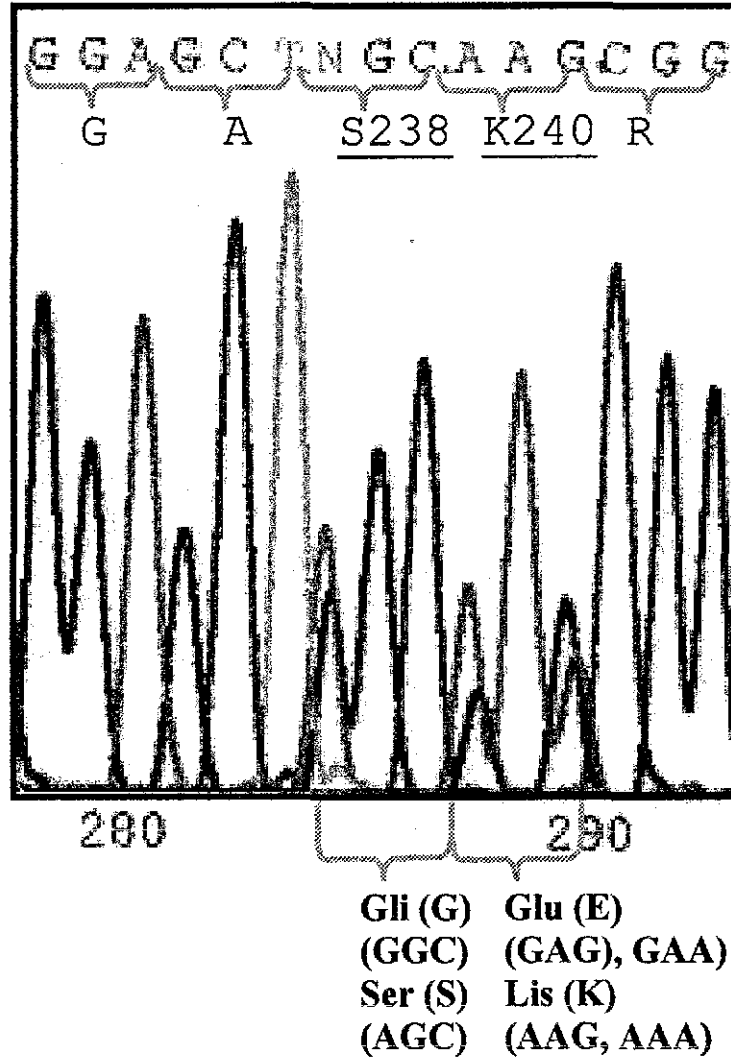


Figura 14. Histograma de la secuencia nucleotídica del aislamiento clínico 1335, donde se observan un doble pico en la primera base del codón del aminoácido 238 (G/S); y dobles picos en la primera y tercera base del codón del aminoácido 240 (E/K). Realizando las posibles combinaciones de codones en la posición 238 obtenemos los aminoácidos G o S y en la posición 240 a E o K. Estos aminoácidos corresponde a las β -lactamasa Tipo SHV-1 (G (238) y E (240)) y SHV-5 (S (238) y K (240)). Se observa lo mismo en los aislamientos clínicos 910, 1319, 1333. Abreviaturas: G, Gli, Glicina; S, Ser, Serina; E, Glu, Acido Glutámico; K, Lis, Lisina; A, Adenina; T, Tiamina; C, Citosina; G, Guanina. N, nucleótido inespecífico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

37). Como pudimos observar hasta ahora no se encontró ninguna mutante nueva de la familia SHV. Por lo que se consideró realizar estudios adicionales como la determinación del origen clonal entre los aislamientos clínico; identificar la relación entre los plásmidos que codifican las BLEE tipo SHV e identificar la presencia de integrones de clase 1.

Epidemiología de las β -lactamasas

La β -lactamasa TEM con pI de 5.4 esta ampliamente distribuida en las cepas de este estudio (14/17). Esta enzima ha sido reportada ampliamente en diversas partes de mundo (Gniadkowski y col; 1998; Szabó y col; 1999; Siu y col; 1999; Essack y col; 2001; Silva y col; 2001) y a su vez ha sido identificado como un reservorio genético para la generación de nuevas mutantes tipo TEM de espectro extendido y resistentes a inhibidores (IRTs) las cuales han sido seleccionadas mediante el uso indiscriminado de los antibióticos (Thomson y col; 1994).

Las β -lactamasas SHV-2 y SHV-5 se encuentra codificada en la mayoría de los casos con la β -lactamasa tipo TEM. Esta β -lactamasa tipo TEM hidroliza preferentemente penicilinas (penicilinasas, Bush y col; 1995) y las β -lactamasas SHV-2 y SHV-5 hidrolizan preferente cefalosporinas (cefalosporinasas, Bush y col; 1995), lo que le permite a la bacteria tener ambas enzimas para hidrolizar tanto penicilinas (penicilina G, ampicilina) como cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y cefotaxima).

En tres cepas del H. I. México de diferentes años (1319, 1333 y 1335) y en una cepas de H. C. Cuernavaca (910), está codificada la β -lactamasa SHV-1 no BLAE junto con la β -lactamasa tipo TEM no BLAE y la SHV-5 BLAE, la bacteria presenta dos penicilinasas,

TEM y SHV-1, la primera por ser más eficiente contra las penicilinas y una cefalosporinasa.

La presencia de ambas enzimas tipo TEM y SHV en un aislamiento clínico han sido reportado en plásmidos conjugativos en varias partes del mundo (Gniadkowski y col; 1998; Szabó y col; 1999; Siu y col; 1999 y Essack y col; 2001).

Las BLEEs SHV-2 y SHV-5 de las variantes tipo SHV son las que principalmente se han reportado en varios países como las responsables de la resistencia en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* (Hammami y col; 1991; Podbielski y col; 1991; Prodinger y col; 1996; Gniadkowski y col; 1998; Tzouvelekis y Bonomo; 1999; Szabó y col; 1999; Siu y col; 1999). México no es la excepción ya que se reportó recientemente la SHV-5 en un brote intrahospitalario de *Klebsiella pneumoniae* en 1996 del Hospital Civil de Cuernavaca (Silva y col; 2001).

La β -lactamasa TLA-1 fue identificada en un aislamiento clínico de la ciudad de México y se identificó ahora en el Hospital del Niño de Tabasco (cepas 819 y 827). Esto con la posibilidad que se encuentre distribuida en varios estados de la República. Las tres cepas que expresan la β -lactamasa TLA-1 presentan perfiles de plásmidos y β -lactamasas diferentes de no ser por la TEM que está presente en dos casos y son del mismo género las tres (*E. cloacae*). Las dos cepas que codifican la β -lactamasa tipo TEM muestran nuevamente que tienen a una penicilinas (TEM) y a una cefalosporinasa (TLA-1) en la misma cepa; al igual que el grupo de cepas que presentan la TEM y a una BLEE SHV.

No se determinó a que β -lactamasas corresponden las que presentaron los pI de 7.4, 7.8 y 8.1. No obstante existen β -lactamasas descritas con esos pIs como la OXA-1 de 7.4; la SHV-4 con 7.8 y algunas OXAs con pI similares 8.1.

Origen Clonal de los Aislamientos Clínicos.

Con la intención de identificar un posible origen clonal en las diferentes cepas se realizó el ensayo de Electroforesis en Campos Pulsados (PFGE) a los tres grupos de cepas mediante la restricción del DNA total con la enzima *XbaI*. El patrón de bandas fue visualizado y se identificó que no existe una relación de bandas de DNA entre las cepas del mismo género (Figura 15), por consiguiente no existe una relación clonal entre las diferentes cepas, en base a los criterios descritos por Tenover y col (1995). Esta técnica se ha descrito como el estandar de oro para la determinación del origen clonal entre cepas del mismo género y ha sido ampliamente utilizada (Gniadkowski y col; 1998; Siu y col; 1999; Silva y col; 2001).

Identificación del gen *bla*_{SHV} en los Plásmidos de Alto Peso Molecular que Codifican las BLEE.

En la electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos tanto de las transconjugantes (carriles 1 al 9) como de las cepas que no conjugaron (carriles 10 al 16) (Figura 16A). Se observa en las transconjugantes un solo plásmido que fue el que se transfirió y varios en las cepas que no conjugaron. La banda que tiene una migración idéntica en todos las muestras corresponde al DNA cromosomal de la bacteria (Figura 16A). La Hibridación

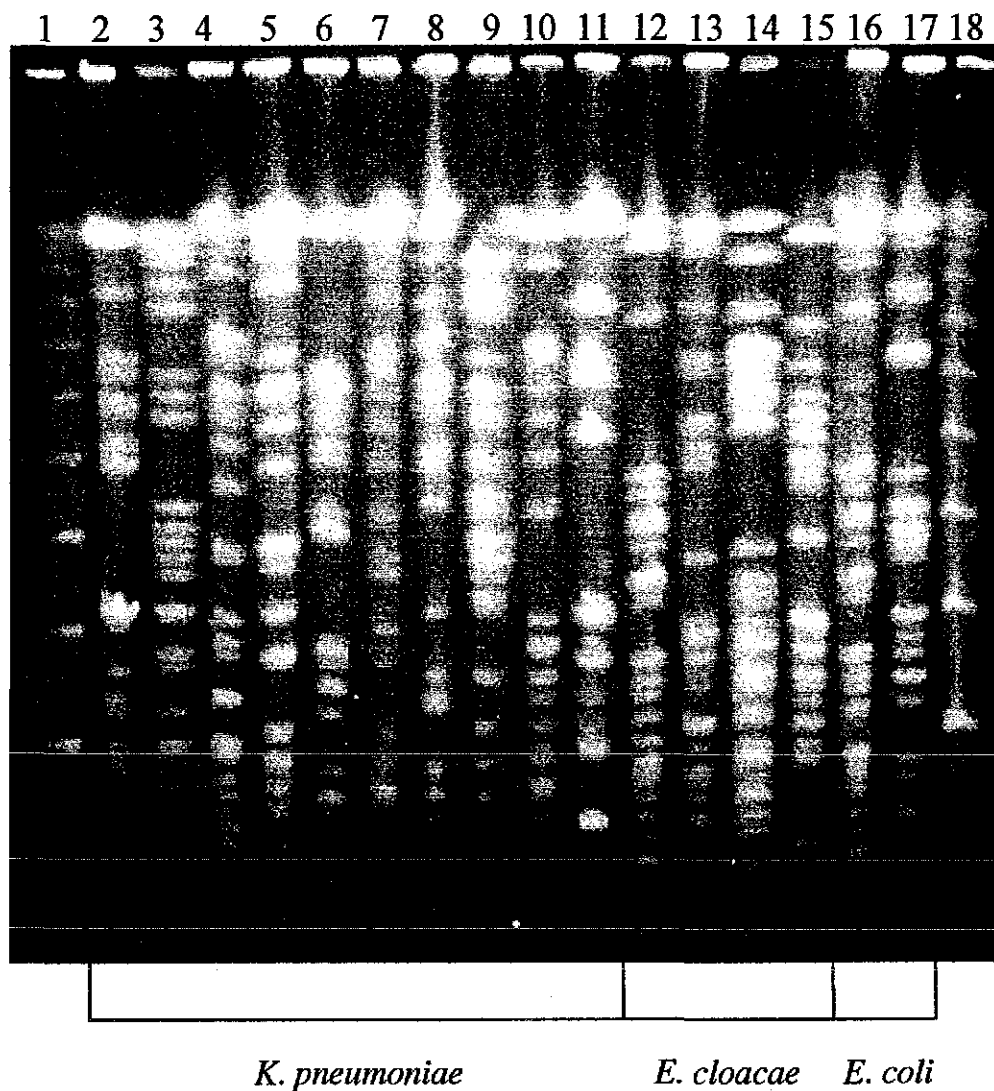


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de Campos Pulsados de los aislamientos clínicos, restringidos con la enzima *Xba*I. Se encuentran separados las tres especies para su comparación. *K. pneumoniae* carriles de 2 al 11; 2, 55; 3, 65; 4, 96; 5, 102; 6, 1335; 7, 806; 8, 910; 9, 1333; 10, 1319; 11, 1509; *E. cloacae* carriles 12 al 15; 12, 132; 13, 819; 14, 827; 15, 1177; *E. coli* carriles 16 y 17; 16, 86; 17, 128. Carriles 1 y 18, λ marcador de peso molecular.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

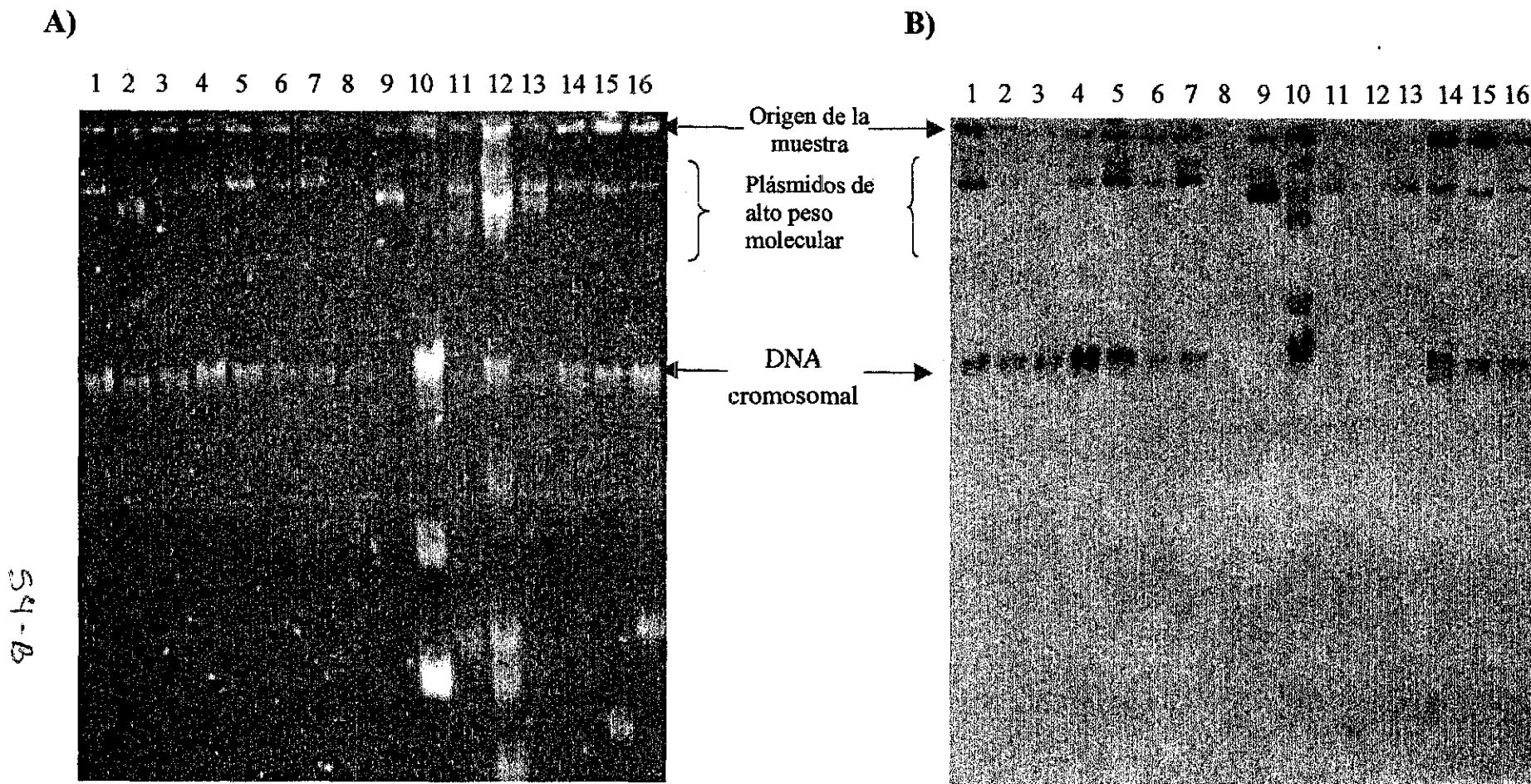


Figura 16. A) Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos extraídos por medio de columnas de intercambio iónico. B) Hibridación tipo Southern con la sonda *bla*_{SHV-1}. 1, X55; 2, X65; 3, X86; 4, X96; 5, X97; 6, X102; 7, X128; 8, J53-2 *E.coli*; 9, X1177; 10, 806; 11, 819; 12, 827; 13, 910; 14; 1319; 15; 1333; 16, 1335; 17, 1509. X, Corresponde a las transconjugantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tipo Southern con la sonda del gen *bla*_{SHV-1} mostró que los genes de las β -lactamasas tipo SHV están codificadas en los plásmidos de alto peso molecular en todos los casos (carriles del 10 al 16). En los carriles 10 y 14 se observan algunas bandas adicionales que podrían corresponder a copias adicionales del gen de la β -lactamasa tipo SHV o que correspondan a formas replicativas del plásmido. El carril 9 no se observan restos de DNA cromosomal que se confirma al realizar la hibridación.

En la banda que corresponde al DNA cromosomal hay señal de hibridación que correspondería a DNA plásmidico degradado que migra junto con el cromosomal. Ya que el carril 8 que corresponde al fondo genético de las transconjugantes no hay señal por lo que se descarta que la sonda hibride con DNA cromosomal de las bacterias.

Se han descrito que los plásmidos que codifican las β -lactamasas tipo SHV son un medio importante para la dispersión de BLEE tipo SHV y a su vez, en Australia y Grecia la dispersión de plásmidos relacionados que codifican la BLEE SHV-5 ha sido documentada (Prodinger y col;1996; Legakis y col; 1995).

Actualmente se han descrito BLEE tipo SHV en una gran cantidad de plásmidos conjugativos de alto peso molecular (>100 kb) en diferentes géneros de Enterobacterias y entre las BLEE tipo SHV, SHV5 fue identificada en cepas responsables de brotes intrahospitalarios de infecciones nosocomiales en varias partes del mundo (Tzouveleki L. Y Bonomo R;1999; Bradford; 2001).

Restricción de los Plásmidos e Hibridación tipo Southern

Los plásmidos que codifican los genes de las β -lactamasas *bla*_{SHV} se restringieron mediante las enzimas de restricción *NotI*, *DraI* y *PstI*. La restricción de los plásmidos con la enzima *NotI* reveló dos bandas que comparten los plásmidos, una banda de 2.1 kb y otra de 12.0 kb aproximadamente, además de otras bandas que no se comparten entre los plásmidos (Figura 17A). El ensayo de hibridación reveló que un fragmento del gen de la β -lactamasa tipo SHV se encuentra en la banda de 2.1 kb y el otro fragmento en la banda de 12.0 kb. En el caso de la cepa 806 se observó la banda de 2.1 que comparten todos los plásmidos además otra banda a 2.5 kb que no se encuentra en ningún otro plásmido y no presenta la banda de 12.0 kb. Las cepas X55 presenta otras bandas adicionales mayores a la de 12 kb en el ensayo de hibridación y la X97 una banda mayor de las 12 kb (Figura 17B). Esta hibridación se realizó con la sonda de 898pb del gen *bla*_{SHV-1} (Figura 11). El patrón de restricción generadó por *NotI*, una enzima que reconoce ocho pares de bases (GC/GGCC GC), limita el número de sitios posibles en los plásmidos, por lo que son pocas las bandas observadas. No obstante se observan dos bandas que comparten tanto los plásmidos conjugativos como en la mayoría de los plásmidos que no conjugaron.

La restricción de los plásmidos con *PstI*, incluye también los plásmidos de las cepas X132, 819 y 827 las cuales codifican a la BLEE TLA-1. Con esta enzima se observan un gran número de bandas, donde por lo menos siete bandas se comparten claramente entre los plásmidos de las diferentes cepas que codifican las β -lactamasas tipo SHV, que van de 0.5 a 1.8 kb (Figura 18). Algunas bandas se observan con mayor intensidad que otras, lo

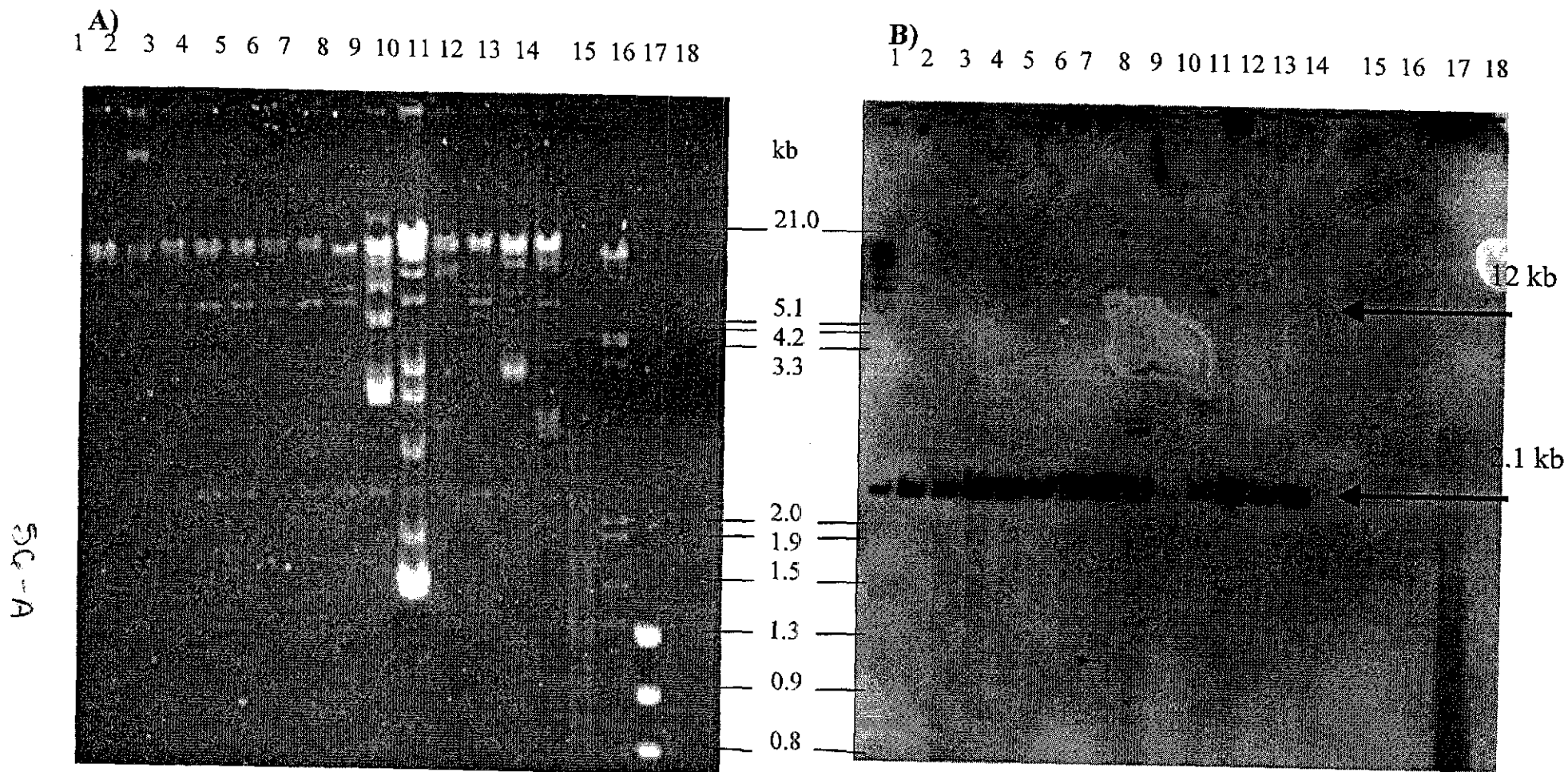


Figura 17. A) Electroforesis de la restricción de los plásmidos con la enzima de *NotI*. B) Hibridación tipo Southern con la sonda *bla*_{SHV-1}. Los carriles con X, corresponde a la transconjugante y R al aislamiento clínico. 1, X55; 2, X65; 3, X86; 4, X96; 5, X97; 6, X102; 7, X128; 8, X1177; 9, R806; 10, R910, 11; R1319; 12, R1333; 13, R1335; 14, R1509; 15, $\lambda^{E/H}$; 16, PhiX174; 17, SHV-1; 18, TEM-1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

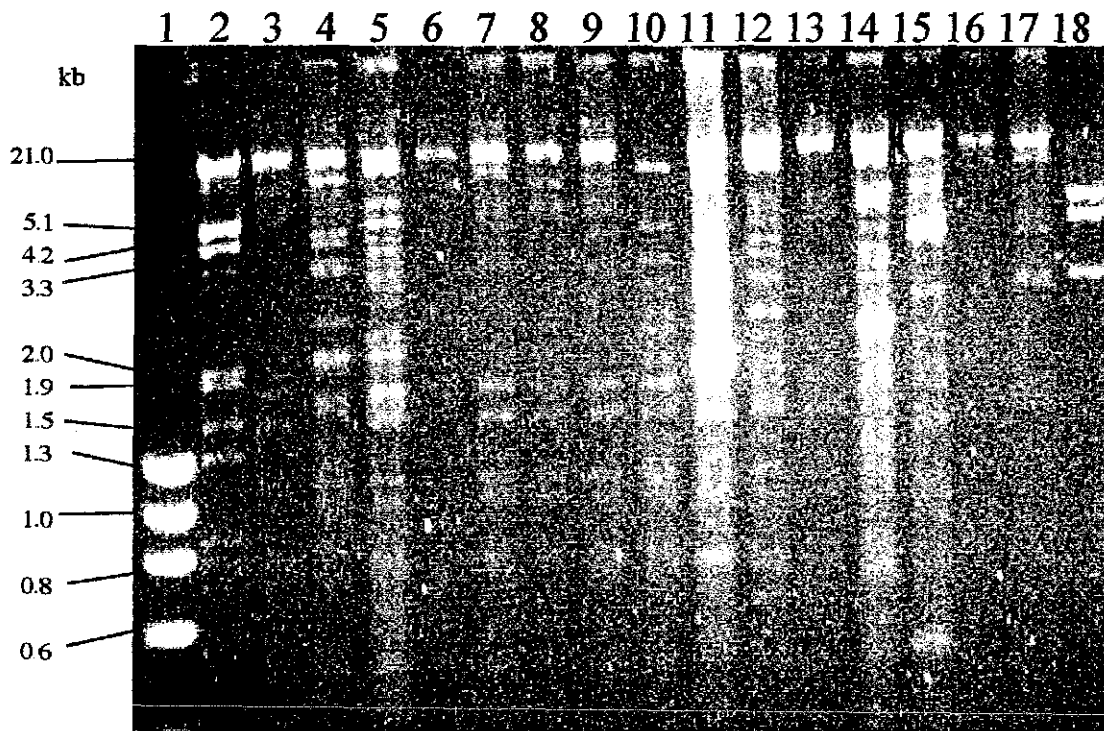


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de la restricción de los plásmidos obtenida mediante la enzima *Pst*I. 1, PhiX174; 2, λ^E/H ; 2, 3, X55; 4, X65; 5, X86; 6, X96; 7, X97; 8, X102; 9, X128; 10, X1177; 11, R910; 12, R1319; 13, R1333; 14, R1335; 15, R1509; 16, X132; 17, R819; 18, R827. X-Corresponde a las transconjugantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

que podría corresponder a duplicaciones del fragmento en el plásmido. También hay una región que no se observan claramente las bandas. La restricción de los plásmidos de las cepas X321, 819 y 827 no se observo bandas que se compartan entre los plásmidos (Figura 18).

Por último los plásmidos restringidos con la enzima *DraI* se observan un gran número de bandas en todos los plásmidos, donde por los tres bandas se comparten claramente entre todos los plásmidos. Estas tres bandas son de 8.0, 2.2 y 1.3 kb aproximadamente. Se observa que hay bandas que se comparten entre uno y otro plásmido pero no se observa que estén presentes en todos (Figura 19A). La hibridación con la sonda *bla_{SHV-1}* reveló que el gen de la β -lactamasa SHV se encuentra en la banda de 8.0 kb (Figura 19B). Además se observan bandas adicionales al mismo nivel en todos los plásmidos de 1.1 y 2.1 kb en las cepas X55, X128, X1177, 1319, 1333 y 1335.

Las restricciones de los plásmidos nos indicó la posible relación entre estos plásmidos ya que comparten por lo menos un fragmento de 15 kb. Con las enzimas *DraI* y *PstI* los patrones de bandas es mayor, ya que estas enzimas reconocen seis pares de bases entre purinas y pirimidinas lo que permite encontrar un mayor número de sitios de restricción en los plásmidos. La suma de las bandas que comparten claramente todos los plásmidos suma las 8,000 pb con *PstI* y 9,800 pb aproximadamente con *DraI*.

Los plásmidos son de diferentes tamaños que pudiera deberse a que han adquirido DNA y/o perdido fragmentos del plásmido en el caso de los más pequeños, aun así esto indica que un inserto o fragmento de DNA se ha mantenido entre los diferentes plásmidos al paso de ocho años (1990- 1998) en diferentes géneros de bacterias (*K. pneumoniae*, *E.*

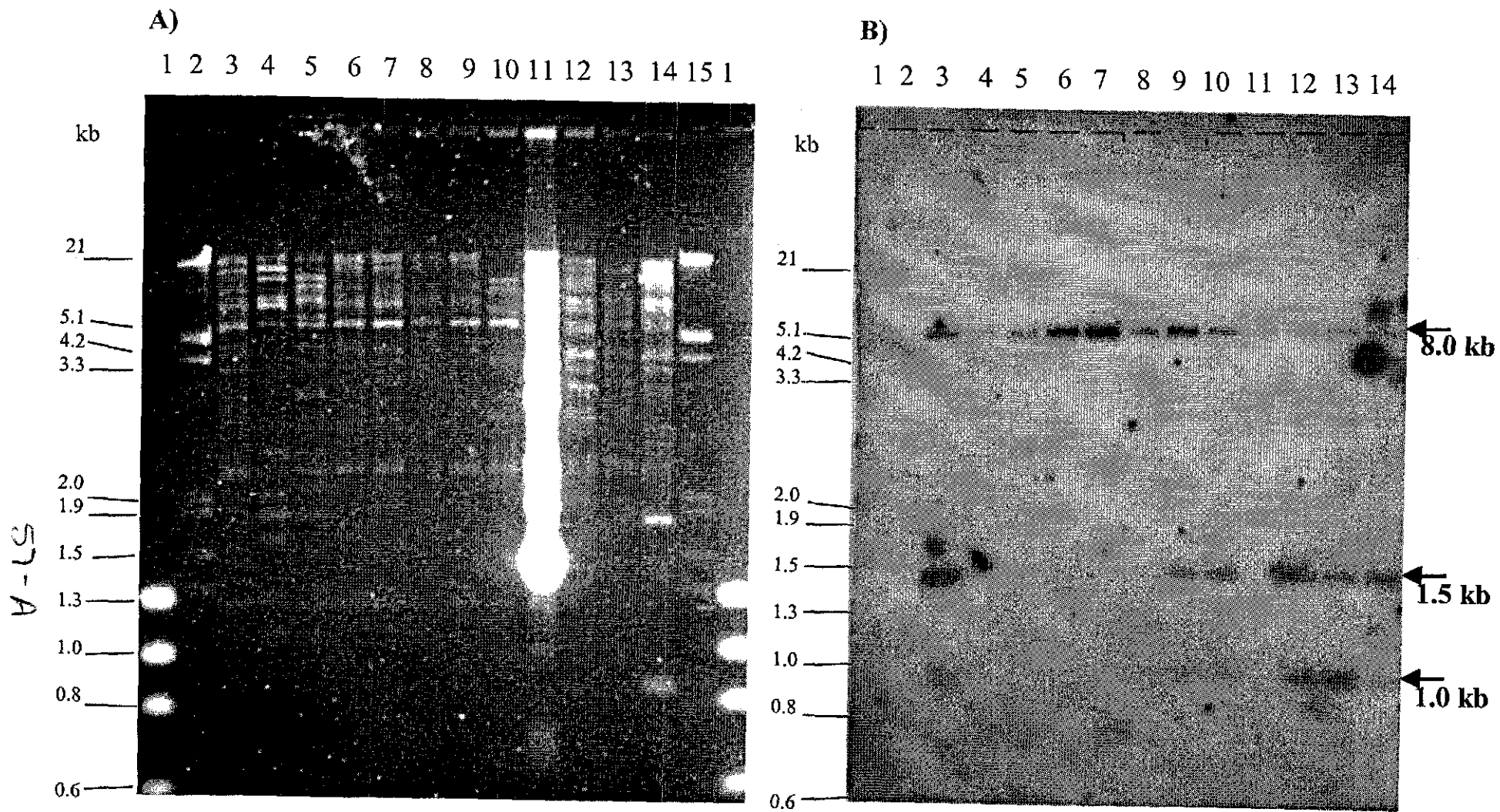


Figura 19. A) Electroforesis de la restricción obtenida de los plásmidos mediante la enzima de restricción *Dra*I. B) Hibridación tipo Southern utilizando como sonda *bla*_{SHV-1}. 1 y 16, PhiX174; $\lambda^{E/H}$; 2 y 15, 3, X55; 4, X65; 5, X86; 6, X96; 7, X97; 8, X102; 9, X128; 10, X1177; 11, R910; 12, R1319; 13, R1333; 14, R1335. X-Corresponde a las transconjugantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cloacae y *E. coli*) que provienen de siete hospitales distintos de tres ciudades diferentes (Ciudad de México, Tabasco y Cuernavaca), que codifican cuatro β -lactamasas; SHV-1, SHV-2, SHV-5 y TEM.

La extracción de plásmidos trae consigo restos de DNA cromosomal, no obstante en la cepas X1177 al ser un plásmido de los más pequeños no se obtiene DNA cromosomal en la extracción, esto indica que los patrones obtenidos se debe exclusivamente al DNA plásmidico en el caso de las transconjugantes y al plásmido de alto peso molecular en las que no conjugaron.

Identificación de Integrones de Clase 1.

Mediante los oligonucleótidos específicos de la integrasa de clase 1 (Intl-1 y Intl-2), se obtuvo el producto amplificación esperado de 325 pb del gen de la integrasa, tanto en las cepas control pACYC184::Tn21 y pEC, como en las cepas de este estudio a excepción de la X1177 (Tabla 7). Teniendo como antecedente que el gen de la integrasa se encuentra codificado en la mayoría de las cepas, se utilizaron los oligonucleótidos 5'CS y 3'CS, para amplificar el casete integrado en integrones de clase 1.

En la cepa control pACYC184::Tn21 se obtuvo un producto amplificado de 0.9 y en las cepas X86 (1.9 kb), X97 (2.1 kb), X132 (1.0 kb), 806 (2.1 kb), 819 (1.0 kb) y 827 (1.0 kb). Se realizó la combinación de los oligonucleótidos Intl-1-3'CS en las cepas pACYC184::Tn21 y X55, se obtuvieron los producto de 1.35 y 1.6 kb respectivamente (Figura 20A) (Tabla 7). Cabe mencionar que en la cepa X55 solo se obtuvo amplificación

58-9

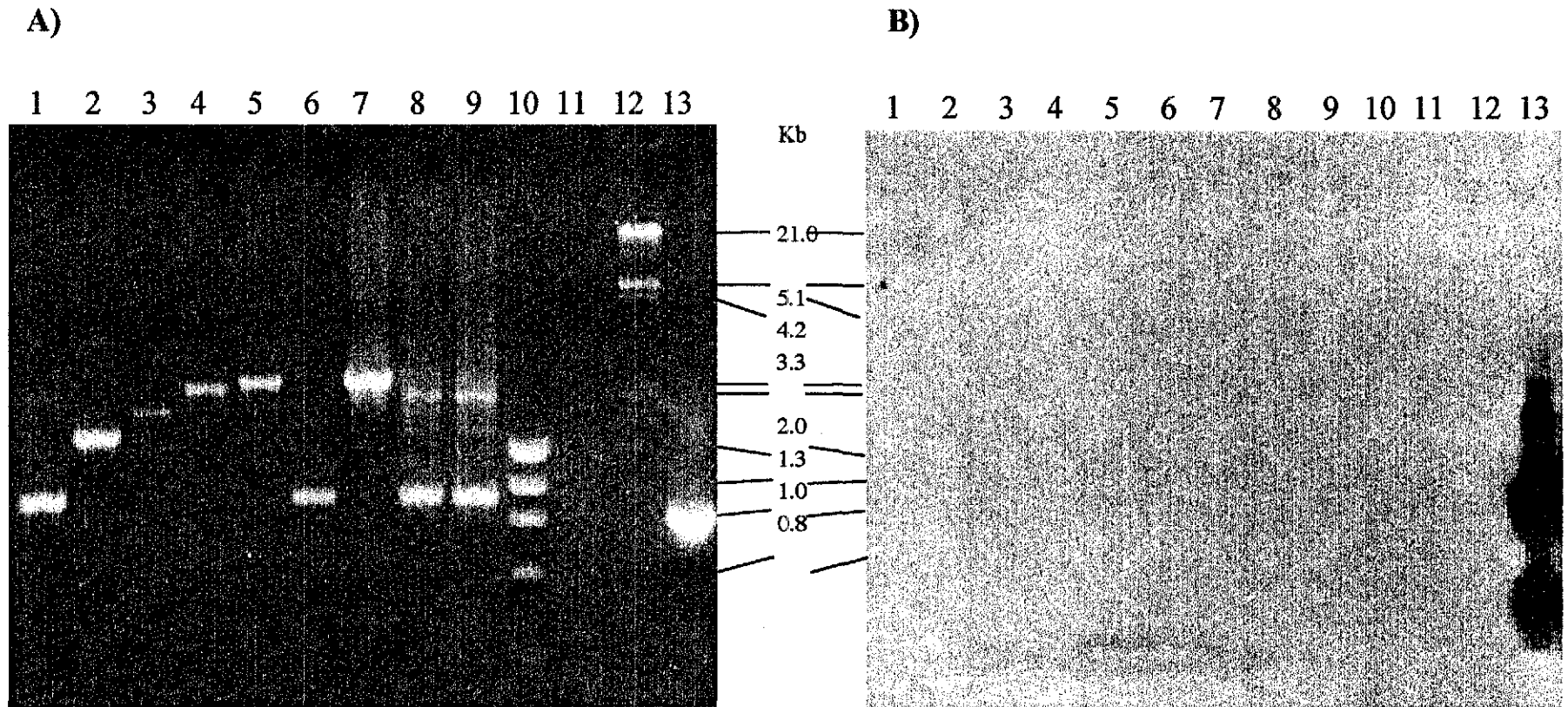


Figura 20. A) Electroforesis de integrones de clase 1, utilizando dos combinaciones de oligonucleótidos. B) Hibridación tipo Southern mediante la sonda *bla*_{SHV-1}. 1, Tn21 (3'CS-5'CS); 2, Tn21(Int1-3'CS); 3, X55 (3'CS-5'CS); 4, X86 (5'CS-3'CS); 5, X97 (5'CS-3'CS); 6, X132 (5'CS-3'CS); 7, R806 (5'CS-3'CS); 8, R819 (5'CS-3'CS); 9, R827 (5'CS-3'CS); 10, PhiX170; 11, λ^E/H ; 12, SHV-1. X Corresponden a las transconjugantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 7. Amplificación del gen de la Integrasa y el casete contenido en integrones de clase 1

Cepa ^a	Intl1-Intl2 ^b	5'CS-3'CS ^c	Intl1-3'CS	Tamaño (kb)	
				5'CS-3'CS	Intl1-3'CS
X55	+	-	+		1.6
X65	+	-	-		
X86	+	+	ND	1.9	
X96	+	-	-		
X97	+	+	ND	2.1	
X102	+	-	-		
X128	+	-	-		
X132	+	+	ND	1.0	
1335	+	-	-		
806	+	+	ND	2.1	
819	+	+	ND	1.0	
827	+	+	ND	1.0	
910	+	-	-		
1333	+	-	-		
1319	+	-	-		
1509	+	-	-		
X1177	-	-	-		

^a X-Transconjugante *E. coli* J53-2

^b oligonucleótidos descritos por Adrian y col; 2000.

^c oligonucleótidos descritos por Levesque y col; 1995.

58-B

mediante la combinación Intl-1-3'CS y en las demás cepas no se obtuvo producto amplificado en ninguna de las dos combinaciones de oligonucleótidos (Tabla 7).

En el ensayo de hibridación de los integrones de clase 1 con la sonda del gen *bla*_{SHV-1}, ésta solo hibridó con el control positivo (un producto de PCR del gen SHV-1 con los oligonucleótidos P1-P2 de 261pb), pero fue negativo en todos los casetes amplificados en las diferentes cepas.

Mediante la técnica de PCR se identificó que el gen de la integrasa de clase 1 en 16/17 (94.1%) de las cepas. Estos datos son similares a la frecuencia obtenida por Levesque y col (1995) mediante ensayos de hibridación con las sondas específicas de las regiones conservadas (5'CS y 3'CS) con un 92% y de este el 100% mostró que codifican el gen de resistencia a sulfonamida y el gen de la integrasa de clase 1.

En cuanto a la amplificación de los casetes nuestros resultados indican una prevalencia del 42% (7/17) y los productos obtenidos fueron de aproximadamente de 1 a 2.1 kb, no obstante son semejantes a los obtenidos en Europa por Martínez-Freijo y col (1998), con un 43.0% (70/163) de casetes con diferentes tamaños que van de 0.45 a 3.0 kb, identificados en 10 géneros de Enterobacterias no relacionadas predominado *E. coli* (71/163) y *K.pneumoniae* (26/163) que provinieron de catorce hospitales de nueve países europeos.

Las cepas que amplificaron por PCR al gen de la integrasa y que no amplificaron un casete, podría deberse a que las condiciones de amplificación utilizadas no amplifican fragmentos mayores a las 3 o 4 kb. Por lo que el porcentaje podría aumentar en ensayos de hibridación o utilizando las condiciones apropiadas para amplificar fragmentos >4 kb,

ya que sean reportado integrones con varios genes insertados. Como es el caso del integron In53 localizado en plásmido 160 kb en *E. coli* con 10 genes insertados, con promotores internos putativos (Nass y col; 2001).

Se han descrito varias β -lactamsas de clase A dentro de integrones, como la VEB-1 (Piorel y col; 1999; Nass y col; 2001), GES-1 (Piorel y col; 2000), BES-1 (Bonnet y col; 2000) y IBC-1 (Giakkoupi y col; 2000) sin embargo, no existen evidencias de que los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} estén localizados en estos elementos genéticos (Tzouvelekis y Bonomo; 1999).

En resumen se determinó que en estos plásmidos codifican las β -lactamasas TEM no BLEE, BLEEs tipo SHV y un integrón de clase 1; de igual manera para la β -lactamasas BLEE TLA-1, junto con la TEM no BLAE y un integrón de clase 1. Esto con la posibilidad que este codificado en los casetes otro gen de resistencia a antibióticos como aminoglucósidos, cloranfenicol, trimetropim, antisépticos, desinfectantes y oxacilina (Recchia y Hall; 1995).

Comentarios Finales

El reporte de las β -lactamasas de amplio espectro de clase A y las tipo SHV va en aumento para una gran variedad de Enterobacterias, siendo éstas dispersadas vía plásmidos transmisibles multirresistentes de mayor importancia clínica. La reciente determinación de la estructura de la β -lactamasa SHV-1 permitirá una mejor comprensión de la propiedades catalíticas de las mutantes de SHV-1 y proveerá algunos datos sobre su habilidad para evolucionar. Así como el comprender el mecanismo de dispersión y las

características epidemiológicas de las β -lactamasas tipo SHV ayudará a establecer políticas de prevención de brotes intrahospitalarios y políticas del uso de antibióticos (Tzouvelekis y Bonomo; 1999). Por lo que este estudio pone de manifiesto que las β -lactamasas de espectro extendido son las responsables de altos niveles de resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Además que existe una estrecha relación entre los plásmidos que podrían estar involucrados en mantener los perfiles de β -lactamasas similares entre los aislamientos clínicos de la misma y de diferente especie que provienen de diferentes hospitales, años y ciudades.

EL propósito de caracterizar molecularmente los diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos que han sido seleccionados *in vivo*, son de gran ayuda ya que permitirán el diseño de nuevas drogas en forma más racional y en menor tiempo, para que en un futuro se combata en forma más eficiente las infecciones producidas por bacterias multirresistentes que es un grave problema de morbi-mortalidad en el mundo.

6. CONCLUSIONES

- La β -lactamasa tipo TEM está ampliamente distribuida en los aislamientos clínicos en combinación con una BLEE ya sea SHV-2, SHV-5 o TLA-1.
- La β -lactamasa SHV-1 esta contenida en combinación con la β -lactamasa tipo TEM y con la BLEE SHV-5.
- Al igual que en otros países las β -lactamasas SHV-2 y SHV-5 se han seleccionado preferentemente en los aislamientos clínicos de México, mostrando altos niveles de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, siendo la SHV-5 la más abundante.
- La β -lactamasa TLA-1 está contenida en cepas de Tabasco, con la posibilidad que se encuentre en otras ciudades de la República Mexicana.
- Los plásmidos comparten un fragmento de DNA en el cuál está codificada alguna de las BLEE SHV-2 o SHV-5.
- Los plásmidos contienen el gen de la integrasa de clase 1 y algunos de ellos contienen inetgrados casetes con la posibilidad que contenga uno o dos genes de resistencia a antibióticos no β -lactámidos adicionales .
- Los genes de las β -lactamasas tipo SHV no se encuentran integrados en los casetes de los integrones de clase 1 identificados en este estudio.

7. BIBIOGRAFIA

1. **Amabile-Cuevas CF, Chicurel ME.** 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell*;70(2):189-99.
2. **Ambler R, Coulson F, frère J, Ghuysen J, Joris B, forsman M, Levesque C, Tiraby G, Waley G.** 1991. A standard numbering scheme for the class A β -lactamase. *Biochem. J.* 276:269-270.
3. **Andrade, V.** 1999. Caracterización Molecular de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, aislada en el Hospital Infantil de México. Tesis de Licenciatura. U.A.E.M.
4. **Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M.** 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(7):1612-5
5. **Arlet G, Philippon A.** 1991. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM, SHV, CARB) *FEMS Microbiol Lett.* 15;66(1):19-25.
6. **Arlet G, Rouveau M, Casini I, Bouvet P, Lagrange P, y Philippon A.** 1994. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 β -lactamase and which werw isolatef in 14 French hospital. *Journal of Clinical Microbiology.* 32: 2553-8.
7. **Bastarrachea F.** 1998. On the origin of plasmid-borne, extended-spectrum, antibiotic resistance mutations in bacteria. *J Theor Biol*; 190:379-387.
8. **Bennet, P y Chopra, I.** 1993. Molecular basis of β -lactamase induction in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:153-158.
9. **de Champs C, Sirot C, Chanal C, Poupart M, Dumas M y Sirot J.** 1991. Concomitant dissemination of three extended-spectrum β -lactamases among differents *Enterobacteriaceae* isolated in French hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 27: 441-57.

10. **Billot-Klein, D., L. Gutmann, and E. Collatz.** 1990. Nucleotide sequence of the SHV-5 β -lactamase gene of a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:2439-2441.
11. **Bradford, P.A.** 1999. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla*_{SHV} genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2960-2963.
12. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(6):1211-33.
13. **Casewell M y Desai N.** 1983. Survival of multiply-resistance *Klebsiella aerogenes* and other Gram-negative bacteria on finger-tips. *Journal of Hospital Infection.* 4: 350-60.
14. **Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM** (1998) Binding of the purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol Microbiol*;29(2):477-90.
15. **Chen H, Bonfiglio G, Allen M, Edwardson T, y McVey D.** 1993. Multicenter survey of the comparative in-vitro activity of piperacillin/tazobactam against bacteria from hospitalized patients in the British Isles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 32: 247-52.
16. **Damaso, L.** 1990. *Antimicrobianos.* De. Marketing Pharm. Madrid España. Pag.13-23.
17. **Davies J.** 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 1994;264(5157):375-82.
18. **Dever L.A y Dermody T.S.** 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch Internal Med.* 152: 886-95.
19. **Du Bois S.K Marriott M.S, Amyes S.G.** 1995. TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J. Antimicrob. Chemother.* 35:7-22.

20. **Essack S. Y., Hall L, Pillay D. G, McFadyen M. L, Livermore D. M.** 2001. Complexity and Diversity of *Klebsiella pneumoniae* Strains with Extended-Spectrum β -Lactamases Isolated in 1994 and 1996 at a Teaching Hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 88-95.
21. **Phillippon A, Labia R y Jacoby G.** 1989. Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 35:765-73.
22. **Fragozo-Veloz y Arredondo, MT.** 1995. Resistencia Bacteriana. Actualidad y Perspectivas. Diplomado en Farmacología Clínica. UNAM.
23. **Frere J. M.** 1995. β -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology.* 16(3), 385-395.
24. **Frere J. M; Joris B; Ledent P; Dideberg O; Fonze E; Lamotte-Brasseur J; Kelly J. M y Ghuysen J. M.** 1991. Comparison of the Sequences of Class A β -lactamases and of the Secondary Structure Elements of Penicillin-Recognizing Proteins. *Antimicrob Agents and Chemother.* 35(11): 2994-2301.
25. **Fu K, y Neu, H.** 1978. Piperacillin, a new penicillin active against many bacteria resistant to other penicillins. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 13:358-67.
26. **Ghuysen, J.** 1994. Molecular structures of penicillin-binding protein and β -lactamases. *Trend in Microbiology.* 2(10):371-379.
27. **Giakkoupi, P; Tzouvelikis, L; Tsakris, A; Loukova, V; Sofianou, y Tzelepi, E.** 2000. IBC-1, a Novel Integron-Associated Class A β -lactamase with Extended-Spectrum Properties Produced by an *Enterobacter cloacae* Clinical Strain. 2000. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 44:2247-2253.
28. **Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, Nordmann P.** 2001. Molecular Epidemiology of the Integron-Located VEB-1 Extended-Spectrum β -Lactamase in Nosocomial Enterobacterial Isolates in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 39: 175-182.
29. **Gouby A, Neuwirth C, Bourg G, Bouziges N, Carles-Nurit MJ, Despaux E, Ramuz M.** 1994. Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an

- outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. *J Clin Microbiol.* 32(2):301-5.
30. **Hall RM, Brookes DE, Stokes HW.** 1991. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol*;5(8):1941-59.
31. **Hibbert-Rogers L, Heritage J, Todd N, y Hawkey P.** 1994. Convergent evolution of TEM-26, a β -lactamase with extended-spectrum activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 33: 707-20.
32. **Huletsky A, Knox JR, Levesque RC.** 1993. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type β -lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *J Biol Chem.* 15;268(5):3690-3697.
33. **Jacoby GA, Sutton L.** 1991. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases *Antimicrob Agents Chemother.* 35(1):164-169.
34. **Jelssch C, Lenfant F, Masson J.M Samama J.P.** 1992. β -lactamase TEM-1 de *E. coli*. *FEMS.* 299(2):135-142.
35. **Kieser, T.** 1984. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid.* 12:19-36.
36. **Knox J. R.** 1995. Extended-Spectrum and Inhibitor-Resistant TEM-Type β -lactamases: Mutations, Specificity, and Three-Dimensional Structure. *Antimicrob Agents and Chemotherapy.* 39(12). 2593-2601.
37. **Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S.** 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 11(6):315-7
38. **Kuzin P.A, Nukaga M.N, Nukaga Y, Hujer M.A, Bonomo R.A, Knox J.R.** 1999. Structure of the SHV-1 β -lactamase. *Biochemistry.* 38:5720-5727.
39. **Lacey, R.** 1984. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and streptococci. *British Medical Bulletin.* 40:77-83.

40. **Liu PY, Gur D, Hall LM, and Livermore DM.** 1992. Survey of the prevalence of β -lactamases among 1000 gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 30: 429-447.
41. **Livermore D.M.** 1987. Clinical significance of β -lactamase induction and stable derepression in Gram-negative reeds. *European Journal of Clinical Microbiology.* 6:439-45.
42. **Livermore D.M. y Yuan M.** 1996. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum β -lactamases amongst *Klebsiella* spp. From intensive care units in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 38. 409-24.
43. **Livermore D.M.** 1998. β -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J. Antimicrob. Chemother.* 41 Suppl. D:25-41.
44. **Livermore D.M.** 2000. Are SHV β -lactamase Universal in *Klebsiella pneumoniae*?. *Antimicrob Agents and Chemotherapy.* 44(8):2230.
45. **Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, pp 9.52-9.55. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
46. **Marie-Cécile, P; Denis F; Courvalin, P y Lambert, T.** 2000. Molecular Characterization of Integrons in *Acinetobacter baumannii*: Description of a Hybrid Class 2 Integron. *Antimicrob Agents and Chemotherapy.* 44: 2684-2688.
47. **Matagne A; Lamotte-Brasseur J y Frere J. M.** 1998. Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J.* 330. 581-598.
48. **Matthew M J.** 1979. Plasmid-mediated β -lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. *J. Antimicrob Chemother.* 5(4):349-58.
49. **Massova I, Mobashery S.** 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(1):1-17
50. **Medeiros, A.** 1989. Plasmid-determined β -lactamases. In : Bryan, L. De. *Microbial Resistance to Drugs. Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin-verlag. 101-127.

51. **Medeiros AA.** 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis.* 24 Suppl 1:S19-45.
52. **Miller, J.** 1992. Experiments in molecular genetics, p.82-85. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
53. **Mugnier, P, I. Casin, A.T. Bouthors, E. Collatz.** 1998. Novel OXA-10-derived extended-spectrum β -lactamase selected *in vivo* or *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:3113-3116.
54. **Naas T, Poirel L, Karim A, Nordmann P.** 1999. Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*;176(2):411-9.
55. **Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P.** 2001. Characterization of In53, a Class 1 Plasmid and Composite Transposon-Located Integron of *Escherichia coli* Which Carries an Unusual Array of Gene Cassettes. *Journal of Bacteriology.* 183(1):235-249.
56. **Nikaido, H.** 1988. Bacterial resistance to antibiotics as a function of outer membrane permeability. *J. Antimicrob. Chemother.* 22:17-22.
57. **Nue, H.** 1992. The crisis antibiotic resistance. *Science.* 257:1064-1073.
58. **Nuesch-Inderbinnen MT, Hachler H, Kayser FH.** 1995. New system based on site-directed mutagenesis for highly accurate comparison of resistance levels conferred by SHV β -lactamases *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1726-1730.
59. **A; Partridge S. R. Recchia G. D. Stokes H. W. Hall R. M.** 2001. Family of Class 1 Integrons Related to In4 from Tn1696. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3014-3020.

60. **B; Partridge S. R., Brown H. J, Stokes H. W, Hall R. M.** 2001. Transposons Tn1696 and Tn21 and Their Integrons In4 and In2 Have Independent Origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1263-1270.
61. **Paetzel M, Danel F, Liza de Castro, Mosimann S, Page M.** 2000. Crystal structure of the class D β -lactamase OXA-10. *Nature Structural Biology.* 7(10):910-925.
62. **Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordman.** 1997. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginos*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(10):2188-95.
63. **Poirel L, Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P.** 2000. Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 622-632.
64. **Prinarakis, E. E., V. Miriagou, E. Tzelepi, M. Gazouli, and L. S. Tzouvelekis.** 1997. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:838-840.
65. **Rasheed J. K, Anderson G. J, Yigit H, Queenan A. M, Doménech-Sánchez A, Swenson J. M. Biddle J. W. Ferraro M. J. Jacoby G, Tenover F. C.** 2000. Characterization of the Extended-Spectrum β -Lactamase Reference Strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), Which Produces the Novel Enzyme SHV-18. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2382-2388.
66. **Recchia G. D, Hall R. M.** 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology.* 141:3015-3027.
67. **Rodriguez-Noriega, E ; Morfia-Otero, R ; Atalino-Duran, G ; Rodriguez-Chagollan, J ; Esperanza-Ahumada, S.** 1992. Bacterial Resistance to antimicrobial agents in México. *Drug. Inv.* 4:2-8.

68. **Rowe-Magnus DA, Mazel D.** 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol.* 4(5):565-9.
69. **Salyer A.A y Whitt D.D.** 1994. *Bacterial Pathogenesis. A molecular approach.* ASM Press, Whashington DC. pp 418.
70. **Sanders C, y Sanders W.** 1979. Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chmotherapy.* 15:792-7.
71. **Sanders C, y Sanders W.** 1992. β -lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases.* 15:824-39.
72. **Saves I, Burlet-Schiltz O, Maveyraud L, Samama JP, Prome JC, Masson JM.** 1995. Mass spectral kinetic study of acylation and deacylation during the hydrolysis of penicillins and cefotaxime by β -lactamase TEM-1 and the G238S mutant. *Biochemistry.* 19;34(37):11660-7
73. **Silva, J ; Aguilar, C ; Becerra, Z ; Conde, C ; Garcia, R y Fuch, Y.** 1993. Resistance to Briads. Spectrum cephalosporins harbored in plasmid among clinical isolates of Enterobacteria. *Recent Advances in Chemotherapy. Proceeding of the 10th. Intenational Congres of Chemotherapy Stockholm. Swedwn.pag. 505.*
74. **Silva J, Aguilar C.** 1997. β -lactamase Bioassay: A Simplified Method to Determine Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) in Enterobacteria. *Archves of Medical Research.* 28(2): 285-287.
75. **Silva J, Aguilar C, Becerra Z, Lépez-Antuñano F, Garcia R.** 1999. Extended-Spectrum β -lactamase in Clinical Isolates of Enterobacteria in México. *Microbial Drug Resistance.* 5(3): 189-193.
76. **Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, Ledezma L.** 2000. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(4):997-1003.

77. **Sirot, J., Chanal, C., Petit, A., Sirot, D., Labias, R y Gerbaud, G.** 1988. *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae producing novel plasmid-medated β -lactamases markedely active against third-generation cefhalosporins. Epidemiologic Studies. Rev. Infec. Dis. 4:850-859.
78. **Sirot D, De Champs C, Chanal C, Labia R, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Sirot J.** 1991. Translocation of antibiotic resistance determinants including an extended-spectrum β -lactamase between conjugative plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 35(8):1576-81.
79. **Soares, S., K. G. Kristinsson, J. M. Musser, and A. Tomas.** 1993. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. J.Infect.Dis. 168:158-163.
80. **Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM.** 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. Mol Microbiol. 26(4):731-45.
81. **Szpirer C, Top E, Couturier M, Mergeay.** 1999. Retrotransfer or gene capture: a feature of conjugative plasmids, with ecological and evolutionary significance. Microbiology;145 (Pt 12):3321-9.
82. **Tenover F, Arbeit R, Goering V, Mickelsen A, Murray B, Persing D, Swaminathan B.** 1995. Interpreting Chomosomal DNA Restriction Patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial strain Typing. J. Clinical. Microbiology. 33(9): 2233-2239.
83. **Thomson CJ, Shanahan PM, Amyes SG.** 1994. TEM-1 plasmids in the community. Lancet. 343(8902):921.
84. **Tosini, F; Visca, P; Luzzi, I; Dionisi, A, M; pezzella, C; Petrucca, A; Carattoli, A.** Class 1 Integron-Borne Multiple-Antibiotic Resistance Carried by IncFI and IncL/M Plasmid in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. . Antimicrobial Agents and Chemother. 42: 3053-3058.

85. **Villa, L; Pezzella, C; Tosini, F; Visca, P; Petrucca, A; carattoli, A.** 2000. Multiple-Antibiotic resistance mediated by Structural related IncL/M Plasmid carrying an Extended-Spectrum β -lactamase Gene and a Class 1 Integron. . Antimicrobial Agents and Chemother. 44: 2911-2914.
86. **Wang Z, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ.** 1999. Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. Curr Opin Chem Biol. 3(5):614-22.
87. **Wladkowski B.D, Chenosweth S.A, Sanders J.N, Krauss M y Stevens W. N.** 1997. Acylation of β -lactam by Class A β -lactamase: An ab Initio Theoretical Study on thr Effects ofOxy-Anion Hole. J. Am. Che. Soc. 119. 6423-6431.
88. **Yuan M, Hall L., Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, Livermore D.** 2000. SHV-13, a Novel Extended-Spectrum β -Lactamase, in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Patients in an Intensive Care Unit in Amsterdam. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 1081-1084.
89. **Yuan M, Hall L, Hoogkamp-Korstanje J, Livermore D.** 2001. SHV-14, a Novel β -lactamase Variant in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Nijmegen, The Netherlands. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 309-311.