

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

***“Caracterización molecular de integrones clase 1.
Expresión y caracterización funcional de orfs
asociados”***

Lic. Ayelen P. PORTO

Director: Dr. Gabriel Gutkind.

Co-director: Dr. José Di Conza.

Cátedra de Microbiología General-FBCB-UNL

-2012-

A Javi, por su amor y paciencia infinitos...

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi director, Dr Gabriel Gutkind, y a mi co-director, Dr José Di Conza, por darme un lugar en su grupo de trabajo, poner a mi disposición los recursos necesarios para hacer este trabajo de tesis y darme la posibilidad de investigar con libertad, en Santa Fe, Buenos Aires y Madrid. Por compartir conmigo sus conocimientos.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) por haberme aceptado como tesista para llevar a cabo mis estudios de posgrado y realizar el seguimiento académico de mi doctorado.

También quiero agradecer a todos los organismos que financiaron este trabajo: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, el CONICET y la Universidad Nacional del Litoral.

Quiero expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la Beca de Postgrado que me permitió desarrollar este trabajo de tesis.

A todos los integrantes de la cátedra de Microbiología General de la Facultad de Bioquímica y Cs Biológicas, por permitirme desarrollar las actividades correspondientes a mi tesis y por los años compartidos como docente. En particular, gracias Marice, Gabi, Fer, Martín y Marina por brindarme siempre una mano más allá de lo laboral.

A todos los integrantes del Laboratorio de Resistencia Microbiana de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) por recibirme siempre tan cálidamente y hacerme parte del grupo, todo el cariño y momentos compartidos van a acompañarme siempre. Gracias todos mis compañeros, con quienes compartí muchas muchas horas de experimentos y charlas: Noe, Gi, Dani, Lu, Meli, Marian, Sabri, Sil, Barbi, Pablo, Magui, Esteban, Agus, Mary, Flor, Lau, Ceci y Ara, me llevo los mejores recuerdos de cada uno de ustedes. A Marce y Marta, mujeres maravillosas y admirables, gracias por estar siempre dispuestas a ayudarme.

Al Dr. Juan Ayala y todo su grupo del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” debo agradecer gran parte de este trabajo de tesis, además de haberme dado en dos oportunidades la posibilidad de viajar y conocer su hermoso país.

A toda mi familia, por su apoyo incondicional y por sostenerme siempre cuando tambaleo. A mamá, mi ejemplo de vida, por todo su sacrificio y esfuerzo, gracias a ella soy lo que soy. Gracias por entenderme y apoyarme siempre en todas mis decisiones. A mis hermanos: Ane, Cris y Shei, por cuidarme siempre con amor y ser los mejores hermanos que uno pueda tener. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermosos y adorados sobrinos, Martu y Mile, porque con una mirada me llenan de alegría y fuerzas.

A Mirta, Loncho, Germán y Belén, por hacerme parte de su familia y acompañarme siempre.

A todos mis amigos por acompañarme y apoyarme siempre, entiendan o no de que se trata esto, son pilares fundamentales en mi vida. Maru, amiga de mi corazón, porque no hace falta más que una mirada o un tono de voz para entendernos, gracias por estar en todos los momentos y ánimos que una tesis nos hace transitar. Y gracias a Allo por soportarnos juntas! Nico y Ludmi, gracias por sus consejos y apoyo constante. Vicky y Sonia, siento una enorme alegría al tenerlas cerca nuevamente! Negro, la verdad es que no tengo palabras para vos, siempre estás cuando te necesito para ayudarme y brindarme tu apoyo, estoy orgullosa de tener un amigo como vos, gracias! Ara, Ceci, Dani, Gi, Noe y Lau, gracias por su compañía, por escucharme, por brindarme su amistad, las quiero!!!! Un agradecimiento especial a mis locatarios tan generosos y desinteresados, Ara y Ceci y Dani B., que hubiera hecho sin ustedes! A Celi y Andrés por compartir hermosos momentos fuera del ámbito del laboratorio y estar dispuestos a darme una mano siempre. A Hann por aportar a mi vida la cuota bizarra siempre necesaria.

En este último tramo recibí un gran apoyo y comprensión por parte de todos los integrantes de Horian, invaluable para mí. Gracias a Miguel, Santi, Mariano, Jesi, Fer, Lore, Mari y Sonia por bancar mis ansiedades mientras escribía la tesis, la paciencia y la oportunidad que me dan de aprender y crecer día a día. Ser parte de este proyecto me llena de alegría.

A Javi, por cambiar y completar mi vida, hacerme sentir tan querida y valorada, acompañarme todos los días y elegir transitar el mismo camino.

Los resultados del presente trabajo de Tesis han dado lugar a las siguientes presentaciones en congresos y publicaciones:

A novel OXA-10- like β -lactamase is present in different *Enterobacteriaceae*. Porto, A.; Méndez E., Ayala, J.; Gutkind G., Di Conza J. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). 17-20 Septiembre de 2007. Chicago, Illinois, USA.

Localización genética y caracterización bioquímica de OXA-101. Porto A., Gutkind G., Di Conza J. XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Rosario. 9-11 Octubre 2008.

Integrones y determinantes de QnrB en enterobacterias aisladas en el año 2005. Espínola, F; Porto, A; Joris, R; Marchisio, M; Vaccari, M; Di Conza, J. Primer Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe 9, 10 y 11 de junio de 2011.

Integrones en enterobacterias aisladas de pacientes ambulatorios con infecciones del tracto urinario. Autores: Joris, R; Porto, A; Marchisio, M; Espínola, F; Vaccari, M; Fernandez, L; Rico, M; Virgolini, S; Baroni, M; Di Conza, J. Primer Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe 9, 10 y 11 de junio de 2011.

First Evidence of DNA Recombinant Activity of ISCR1. Porto, A.; Ayala, J.; Gutkind, G.; Di Conza, J. 52th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). 5-9 Septiembre de 2012. San Francisco, USA.

A novel OXA-10-like β -lactamase is present in different *Enterobacteriaceae*. Porto A., Ayala J., Gutkind G., Di Conza J. (2009).. *Diagnost. Microb. and Infect. Dis.* 66 (2): 228-9.

Detección de genes *qnr* en aislamientos de enterobacterias con resistencia simultánea a fluorquinolonas y oximinocefalosporinas. Escobar, A; Porto, A; Joris, R; Sansevich, M. E; Gutkind, G; Di Conza, J; Truppia, L. A (2010) *FABICIB*. vol 14: 39 - 45.

Parte de las actividades de este trabajo de tesis se realizaron durante dos estancias de investigación en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España; bajo la dirección del Dr. Juan Ayala.

A Javi, por su amor y paciencia infinitos...

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi director, Dr Gabriel Gutkind, y a mi co-director, Dr José Di Conza, por darme un lugar en su grupo de trabajo, poner a mi disposición los recursos necesarios para hacer este trabajo de tesis y darme la posibilidad de investigar con libertad, en Santa Fe, Buenos Aires y Madrid. Por compartir conmigo sus conocimientos.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) por haberme aceptado como tesista para llevar a cabo mis estudios de posgrado y realizar el seguimiento académico de mi doctorado.

También quiero agradecer a todos los organismos que financiaron este trabajo: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, el CONICET y la Universidad Nacional del Litoral.

Quiero expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la Beca de Postgrado que me permitió desarrollar este trabajo de tesis.

A todos los integrantes de la cátedra de Microbiología General de la Facultad de Bioquímica y Cs Biológicas, por permitirme desarrollar las actividades correspondientes a mi tesis y por los años compartidos como docente. En particular, gracias Marice, Gabi, Fer, Martín y Marina por brindarme siempre una mano más allá de lo laboral.

A todos los integrantes del Laboratorio de Resistencia Microbiana de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) por recibirme siempre tan cálidamente y hacerme parte del grupo, todo el cariño y momentos compartidos van a acompañarme siempre. Gracias todos mis compañeros, con quienes compartí muchas muchas horas de experimentos y charlas: Noe, Gi, Dani, Lu, Meli, Marian, Sabri, Sil, Barbi, Pablo, Magui, Esteban, Agus, Mary, Flor, Lau, Ceci y Ara, me llevo los mejores recuerdos de cada uno de ustedes. A Marce y Marta, mujeres maravillosas y admirables, gracias por estar siempre dispuestas a ayudarme.

Al Dr. Juan Ayala y todo su grupo del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” debo agradecer gran parte de este trabajo de tesis, además de haberme dado en dos oportunidades la posibilidad de viajar y conocer su hermoso país.

A toda mi familia, por su apoyo incondicional y por sostenerme siempre cuando tambaleo. A mamá, mi ejemplo de vida, por todo su sacrificio y esfuerzo, gracias a ella soy lo que soy. Gracias por entenderme y apoyarme siempre en todas mis decisiones. A mis hermanos: Ane, Cris y Shei, por cuidarme siempre con amor y ser los mejores hermanos que uno pueda tener. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermosos y adorados sobrinos, Martu y Mile, porque con una mirada me llenan de alegría y fuerzas.

A Mirta, Loncho, Germán y Belén, por hacerme parte de su familia y acompañarme siempre.

A todos mis amigos por acompañarme y apoyarme siempre, entiendan o no de que se trata esto, son pilares fundamentales en mi vida. Maru, amiga de mi corazón, porque no hace falta más que una mirada o un tono de voz para entendernos, gracias por estar en todos los momentos y ánimos que una tesis nos hace transitar. Y gracias a Allo por soportarnos juntas! Nico y Ludmi, gracias por sus consejos y apoyo constante. Vicky y Sonia, siento una enorme alegría al tenerlas cerca nuevamente! Negro, la verdad es que no tengo palabras para vos, siempre estás cuando te necesito para ayudarme y brindarme tu apoyo, estoy orgullosa de tener un amigo como vos, gracias! Ara, Ceci, Dani, Gi, Noe y Lau, gracias por su compañía, por escucharme, por brindarme su amistad, las quiero!!!! Un agradecimiento especial a mis locatarios tan generosos y desinteresados, Ara y Ceci y Dani B., que hubiera hecho sin ustedes! A Celi y Andrés por compartir hermosos momentos fuera del ámbito del laboratorio y estar dispuestos a darme una mano siempre. A Hann por aportar a mi vida la cuota bizarra siempre necesaria.

En este último tramo recibí un gran apoyo y comprensión por parte de todos los integrantes de Horian, invaluable para mí. Gracias a Miguel, Santi, Mariano, Jesi, Fer, Lore, Mari y Sonia por bancar mis ansiedades mientras escribía la tesis, la paciencia y la oportunidad que me dan de aprender y crecer día a día. Ser parte de este proyecto me llena de alegría.

A Javi, por cambiar y completar mi vida, hacerme sentir tan querida y valorada, acompañarme todos los días y elegir transitar el mismo camino.

Los resultados del presente trabajo de Tesis han dado lugar a las siguientes presentaciones en congresos y publicaciones:

A novel OXA-10- like β -lactamase is present in different *Enterobacteriaceae*. Porto, A.; Méndez E., Ayala, J.; Gutkind G., Di Conza J. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). 17-20 Septiembre de 2007. Chicago, Illinois, USA.

Localización genética y caracterización bioquímica de OXA-101. Porto A., Gutkind G., Di Conza J. XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Rosario. 9-11 Octubre 2008.

Integrones y determinantes de QnrB en enterobacterias aisladas en el año 2005. Espínola, F; Porto, A; Joris, R; Marchisio, M; Vaccari, M; Di Conza, J. Primer Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe 9, 10 y 11 de junio de 2011.

Integrones en enterobacterias aisladas de pacientes ambulatorios con infecciones del tracto urinario. Autores: Joris, R; Porto, A; Marchisio, M; Espínola, F; Vaccari, M; Fernandez, L; Rico, M; Virgolini, S; Baroni, M; Di Conza, J. Primer Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe 9, 10 y 11 de junio de 2011.

First Evidence of DNA Recombinant Activity of ISCRI. Porto, A.; Ayala, J.; Gutkind, G.; Di Conza, J. 52th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). 5-9 Septiembre de 2012. San Francisco, USA.

A novel OXA-10-like β -lactamase is present in different *Enterobacteriaceae*. Porto A., Ayala J., Gutkind G., Di Conza J. (2009).. *Diagnost. Microb. and Infect. Dis.* 66 (2): 228-9.

Detección de genes *qnr* en aislamientos de enterobacterias con resistencia simultánea a fluorquinolonas y oximinocefalosporinas. Escobar, A; Porto, A; Joris, R; Sansevich, M. E; Gutkind, G; Di Conza, J; Trupia, L. A (2010) *FABICIB*. vol 14: 39 - 45.

Parte de las actividades de este trabajo de tesis se realizaron durante dos estancias de investigación en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España; bajo la dirección del Dr. Juan Ayala.

Índice de contenidos

Abreviaturas	A
Resumen	I
1- Introducción	1
1.1. Aspectos generales	1
1.2. La familia <i>Enterobacteriaceae</i>	2
1.3. Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	4
1.3.1. Resistencia a antibióticos β -lactámicos: β -lactamasas.	7
1.3.1.1. β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)	10
1.3.1.2. β -lactamasas de clase D: familia OXA.....	11
1.3.1.2. I. β -lactamasas clase D de espectro ampliado	13
1.3.1.2. II. β -lactamasas clase D de espectro extendido	15
1.3.1.2. III. Carbapenemasas clase D	16
1.3.2. Resistencia a quinolonas.....	17
1.3.2.1. Aminoglucósido acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr.....	19
1.3.2.2. Bombas de Eflujo: QepA y OqxAB	19
1.3.2.3. Proteínas Qnr	20
1.4. Mecanismos de transferencia génica	25
1.5. Integrones	28
1.5.1. Características generales de los integrones.	28
1.5.2. Genes en casete.....	29
1.5.3. Clasificación de integrones.....	31
1.5.4. Integrones clase 1	31
1.5.5. Integrones clase 1 inusuales	34

1.5.6. Dinámica de los integrones.....	40
2- Objetivos	43
3- Materiales y Métodos	46
3.1. Microorganismos empleados.....	46
3.1.1. Aislamientos clínicos.....	46
3.1.2. Estudios moleculares	46
3.2. Plásmidos.....	48
3.3. Oligonucleótidos.....	49
3.4. Medios de cultivo	52
3.5. Conservación de microorganismos.....	53
3.6. Técnicas fenotípicas utilizadas en el estudio de la resistencia a antibióticos.....	53
3.6.1. Antibióticos.	53
3.6.2. Determinación cualitativa de la resistencia de los microorganismos.	54
3.6.3. Determinación cuantitativa de la resistencia de los microorganismos.	54
3.6.4. Metodología para confirmar fenotípicamente la presencia de BLEE.....	54
3.7. Estudio de la localización de genes de resistencia	55
3.7.1. Conjugación en medio sólido.	55
3.8. Ensayos de transformación.....	55
3.8.1. Transformación de bacterias por técnica clásica.	55
3.8.2. Transformación de bacterias por el método de electroporación.....	56
3.8.3. Análisis de colonias bacterianas por la presencia de plásmidos recombinantes.	57
3.9. Técnicas utilizadas para el estudio del ADN.....	58
3.9.1. Extracción de ADN plasmídico.....	58
3.9.1.1. Lisis alcalina.	58
3.9.1.2. Técnica de Hansen-Olsen para plásmidos de alto tamaño molecular.	59

3.9.1.3. Minipreparación de ADN plasmídico.....	60
3.9.2. Amplificación de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	61
3.9.3. Purificación de ADN.	63
3.9.4. Clonado de genes.....	63
3.9.4.1. Digestión enzimática del ADN.....	63
3.9.4.2. Clonado de fragmentos de ADN obtenidos por PCR.	63
3.9.5. Electroforesis en geles de agarosa.	64
3.9.6. Secuenciación de ADN.....	65
3.9.6.1. Análisis de las secuencias.....	65
3.10. Técnicas utilizadas en el estudio de proteínas.....	66
3.10.1. Análisis bioinformáticos.....	66
3.10.2. Obtención de extractos enzimáticos crudos.....	66
3.10.3. Cuantificación de proteínas.	67
3.10.4. Estudio de la actividad de β -lactamasas.	67
3.10.4.1. Método de la cefalosporina cromogénica (Nitrocefín®).....	67
3.10.4.2. Método iodométrico en agar.....	67
3.10.5. Determinación del peso molecular de β -lactamasas.....	68
3.10.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.	69
3.10.6.1. Preparación de los geles.	69
3.10.7. Determinación del punto isoelectrico de β -lactamasas.....	69
3.10.8. Expresión de proteínas recombinantes.	71
3.10.8.1. Análisis de la expresión de proteínas recombinantes.	71
3.10.9. Purificación de proteínas recombinantes.....	74
3.10.9.1. Purificación de Orf513.	74
3.10.9.2. Purificación de la β -lactamasa OXA-101.....	75

3.10.10. Caracterización de las proteínas recombinantes obtenidas.....	77
3.10.11. Ensayos de actividad enzimática.	78
3.10.11.1. Ensayos de retardo en gel (EMSA).	78
3.10.11.2. Determinación de parámetros cinéticos.....	80
4. Resultados y Discusión.....	83
4.1. Capítulo 1: Integrones clase 1 inusuales en aislamientos clínicos de enterobacterias.	83
4.1.1. Aislamientos clínicos.....	83
4.1.2. Análisis de la presencia de integrones clase 1 inusuales.	83
4.1.3. Análisis de la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos.....	86
4.1.4. Regiones variables de integrones clase 1 inusuales.....	94
4.1.4.1. Obtención de las construcciones con las regiones variables de los integrones inusuales.	95
4.1.4.2. Análisis de las secuencias nucleotídicas.....	98
4.2. Capítulo 2: Estudios de ISCR1	104
4.2.1. ISCR1: Generalidades.....	104
4.2.2. Obtención del marco abierto de lectura <i>orf513</i> y clonado del mismo.....	106
4.2.3. Expresión de Orf513 recombinante.....	110
4.2.3.1. Construcción p28ORFA.	110
4.2.3.2. Construcción p22ORF.	113
4.2.3.3. Construcción p28ORFB.	116
4.2.4. Producción y purificación de Orf513 a gran escala.....	120
4.2.4.1. Producción a gran escala.	120
4.2.4.2. Purificación por IMAC.....	120
4.2.5. Identificación de las proteínas utilizando MALDI-TOF.	123
4.2.6. Contenido proteico obtenido.	125

4.2.7. Ensayos de retardo en geles: interacción ADN-Orf513.	125
4.2.7.1. Secuencias de ADN.	125
4.2.7.2. Condiciones de interacción ADN-proteína.....	128
4.2.7.3. Ensayos de interacción ADN-proteína en geles de agarosa.	128
4.2.7.4. Ensayos de interacción ADN-proteína en geles de poliacrilamida.....	131
4.3. Capítulo 3: Estudios sobre una β-lactamasa tipo OXA.....	138
4.3.1. Detección y descripción.....	138
4.3.2. Caracterización del gen en casete <i>bla</i> _{OXA-101}	141
4.3.2.1. Análisis de los sitios <i>attI</i> y <i>attC</i>	142
4.3.2.2. Análisis nucleotídico y aminoacídico de la β -lactamasa OXA-101...	143
4.3.3. OXA-101 y enzimas de la familia de OXA-10.	145
4.3.4. Localización genética de <i>bla</i> _{OXA-101}	151
4.3.4.1. Análisis de la presencia de plásmidos en las enterobacterias.	151
4.3.4.2. Conjugación.....	151
4.3.4.3. Actividad enzimática de los extractos crudos.....	156
4.3.5. Determinación del punto isoelectrico (pI) de OXA-101.	157
4.3.6. Clonado de <i>bla</i> _{OXA-101}	159
4.3.7. Expresión de OXA-101 recombinante.	163
4.3.8. Purificación de la proteína de interés.	164
4.3.9. Determinación de masa molecular de OXA-101.....	167
4.3.10. Medida de la actividad enzimática.....	168
5. Conclusiones.....	171
6. Bibliografía.....	175

Abreviaturas

μ	Micro
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
AMC	Amoxicilina/ácido clavulánico
AMK	Amikacina
AMP	Ampicilina
AMP^R	Resistente a ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
CEF	Cefalotina
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMP	Cloranfenicol
CTX	Cefotaxima
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
EMSA	Ensayos de retardo de movilidad electroforética
FOX	Cefoxitina
GEN	Gentamicina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico.
I	Intermedio
IEF	Isoelectroenfoque
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
KAN	Kanamicina
KAN^R	Resistente a kanamicina
kb	Kilopares de bases (1000 bp)
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-bertani
LBA	Medio Luria-Bertani agarizado
MM	Masa molecular
MOPS	Ácido 4-morfolinpropansulfónico

NAL	Ácido nalidíxico
NAL ^R	Resistente a ácido nalidíxico
ON	<i>Overnight</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
OXA	Oxacilina
p.s.i	<i>Pounds per square inch</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pI	Punto isoeléctrico
R	Resistente
rpm	Revoluciones por minuto
RV	Región variable
S	Sensible
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SIM	Agar sulfuro-indol-movilidad
SMC	Sitio de múltiple clonado
SUL	Sulfizoxasol
TAE	<i>Buffer</i> Tris-ácido acético-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Termophilus aquaticus</i>
TB	Medio <i>Terrific broth</i>
TBS	<i>Buffer</i> Tris-salino
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina
TET	Tetraciclina
TET ^R	Resistente a tetraciclina
TM	Trimetoprima
TMS	Trimetoprima/sulfametoxazol
Tris	N-tris-(hidroximetil)aminometano
TSI	Agar triple azúcar-hierro
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
vol	Volúmenes
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopiranosido.

CÓDIGO DE UNA Y TRES LETRAS PARA AMINOÁCIDOS

Ácido Aspártico	D	Asp
Ácido Glutámico	E	Glu
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Cisteína	C	Cys
Fenilalanina	F	Phe
Glicina	G	Gly
Glutamina	Q	Gln
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Tirosina	Y	Tyr
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Valina	V	Val

Resumen

La diseminación de determinantes de resistencia a antimicrobianos a través del intercambio de material genético entre las poblaciones bacterianas, y la posterior emergencia de microorganismos resistentes es un fenómeno actual y en crecimiento. Uno de los elementos involucrados en la integración y expresión de genes de resistencia a antimicrobianos son los integrones. Estos son elementos genéticos móviles que actúan como vectores naturales de clonado y expresión integrando y expresando genes en casete.

Como parte de un estudio epidemiológico de integrones realizado con anterioridad en nuestra región, se ha detectado en tres aislamientos multiresistentes de enterobacterias un nuevo gen en casete codificante para una β -lactamasa (*bla*_{OXA-101}) derivada de *bla*_{OXA-10} localizado en un integrón clase 1. Las β -lactamasas de tipo OXA han sido descritas en enterobacterias y en otros bacilos gram-negativos no fermentadores de glucosa (principalmente en *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*). Se hallan frecuentemente localizadas en plásmidos e integrones, asiduamente como genes en casete dentro de integrones clase 1.

En relación a este tema, en éste trabajo de tesis se planteó el análisis de la localización y transferibilidad genética de *bla*_{OXA-101}, y el estudio de las características bioquímicas de la β -lactamasa. Los resultados obtenidos permiten afirmar que este gen en casete se encuentra localizado en un plásmido conjugativo de alto peso molecular. Se determinó además, el punto isoeléctrico y masa molecular de la enzima obtenida de forma recombinante. Respecto al espectro de hidrólisis, sólo se observó una disminución de la susceptibilidad a ampicilina y piperacilina netamente debido a OXA-101. Por último, se realizó una breve caracterización cinética de la misma.

Dentro de los integrones clase 1, existen los denominados integrones inusuales. Estos poseen como característica única la presencia de una región común (CR), que contiene el marco abierto de lectura *orf513*, codificante para una posible recombinasa de ADN. Se encuentra postulado que la proteína Orf513 podría estar involucrada tanto en el proceso de integración de genes (mayormente determinantes de resistencia a antibacterianos)

originando los integrones inusuales, como en el de captura de genes cromosomales y posterior propagación de los mismos en elementos móviles. A través del alineamiento de secuencias CR con proteínas del grupo de IS91, fue observado que estas secuencias comparten características y motivos que permiten suponer que las CR son elementos transponibles de la familia de las secuencias de inserción IS91, por lo que se ha propuesto renombrarlas como secuencias de inserción CR (ISCR) y, puntualmente, a la CR asociada a integrones clase 1 inusuales: ISCR1. La característica distintiva de replicación por transposición en *rolling circle* de IS91 podría explicar los cambios estructurales observados en los integrones inusuales, ya que este mecanismo de replicación provee a estos elementos de la capacidad de movilizar secuencias adyacentes. Convenientemente, estos elementos ISCR1 proveen un promotor para la expresión de genes integrados corriente abajo de estos elementos, lo cual enfatiza la importancia de la presencia de estas secuencias en lo que a diseminación de la resistencia comprende.

En relación a este último tema se realizaron dos tipos de estudios:

En uno de ellos se analizó la presencia de integrones inusuales en aislamientos clínicos de enterobacterias recolectados en dos instituciones de salud de la ciudad de Santa Fe. En los integrones inusuales hallados se realizó la detección de determinantes de resistencia a quinolonas (genes *qnr*) y a β -lactámicos (*bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{PER-2}). Finalmente, se efectuó la caracterización de ciertas regiones presentes en los integrones inusuales. La detección de integrones inusuales asociados a diferentes determinantes de resistencia afirma la importancia de la realización de estos estudios de manera periódica.

Por otro lado, se analizó la capacidad de interacción de Orf513 con diferentes secuencias de ADN, de manera de poder estudiar la hipótesis de que esta proteína posee actividad recombinasa y es capaz de movilizar genes contiguos al elemento ISCR1. En primer lugar, se realizaron diferentes estrategias de clonado y expresión con el fin de obtener la proteína Orf513 recombinante convenientemente pura. Posteriormente, se realizaron ensayos de retardo de movilidad electroforética entre el extracto con la proteína en estudio y diferentes secuencias de ADN, obteniéndose evidencias de interacción entre Orf513 y secuencias de

ADN particulares. De nuestro conocimiento, esta es la primera descripción realizada de la actividad enzimática postulada para Orf513.

Abstract

The spread of antibiotic resistance determinants through the exchange of genetic material between bacterial populations and the subsequent emergence of resistant microorganisms is a current and growing phenomenon. One of the elements involved in the integration and expression of antibiotic resistance genes are integrons. These are mobile genetic elements that act as natural cloning vectors integrating and expressing genes cassette.

As part of an epidemiological study previously conducted in our region it has been detected a new gene cassette coding for a β -lactamase ($bla_{OXA-101}$) derived from bla_{OXA-10} , located in a class 1 integron in three multidrug resistant isolates of *Enterobacteriaceae*. OXA type β -lactamases are widely distributed and have been described in *Enterobacteriaceae* and other gram-negative nonfermenting bacilli (mainly *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*). Most of these oxacillinase genes are plasmid and/or integron located, usually as gene cassette in class 1 integrons.

Regarding this issue, in this study, we have characterized the genetic localization and transferability of $bla_{OXA-101}$, and also the biochemical characteristics of this β -lactamase. The obtained results confirm that this gene cassette is located on to a high molecular weight conjugative plasmid. Also, it was determined the isoelectric point and molecular weight of the purified recombinant enzyme. Only a decrease of the susceptibility to ampicillin, piperacillin purely due to OXA-101 was observed. Finally, a brief kinetic characterization was performed.

Within class 1 integrons, there are the so-called complex classes 1 integrons. They possess as an unique characteristic the presence of a common region (CR) containing the open reading frame *orf513*, coding for a potential DNA recombinase. It was postulated that Orf513 may be involved in both the process of integrating genes (mainly antibiotic resistance determinant) constructing the complex class 1 integrons, as in the capture and propagation of chromosomal genes. Sequence alignment of CR elements and IS91-like elements showed that these sequences share features and motifs, suggesting that CR are transposable elements belonging to the family of insertion sequences IS91. Because of that,

CR elements were renamed CR insertion sequences (ISCR) and, specifically, the class 1 complex integron CR-associated: ISCR1. Replication by rolling circle transposition of IS91 could explain the structural changes observed complex integrons, as this mechanism allows co-transposition of adjacent sequences to ISCR1. Suitably, ISCR1 provide a promoter for integrated genes expression downstream of this element, which emphasizes the rol of this sequence as a very powerful mobilization system of any antibiotic resistance determinant.

On this subject two diferent studies were performed:

The presence of complex class 1 integrons in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* collected in two health institutions in Santa Fe city was analyzed. In the complex integrons detected, the existence of quinolone resistance determinants (*qnr* genes) and β -lactams (*bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{PER-2}) was studied. Finally, molecular characterization of certain regions of complex class 1 integrons was carried out. The detection of unusual integrons associated with different resistance determinants confirm the importance of executes these studies periodically.

Furthermore, we examined the occurrence of protein-DNA interaction between Orf513 and different DNA sequences, so as to examine the hypothesis that this protein has recombinase activity and is able to mobilize adjacent genes to ISCR1 element. First, different strategies of cloning and expression were performed in order to obtain the recombinant protein Orf513 properly pure. Subsequently, electrophoresis mobility shifts assays were performed between the protein extract, containing Orf513, and several DNA sequences. The obtained data showed DNA-binding activity for a purified extract of Orf513 on particular DNA sequences. To the best of our knowledge, this is the first experimental description related to the proposed enzymatic activity for this protein.

1. Introducción

1- Introducción

1.1. Aspectos generales

Las enfermedades infecciosas afectan a la humanidad desde sus comienzos, siendo inmanejables terapéuticamente especialmente desde el uso de las penicilinas en la década de 1940. La introducción de los antibacterianos ha reducido en gran medida las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas, siendo beneficiosos y, cuando se prescribe y se administran correctamente, su valor en la atención al paciente es enorme. Sin embargo, estos fármacos se han utilizado tan ampliamente, y por tanto tiempo, que los organismos infecciosos se han adaptado a ellos, haciendo que los medicamentos sean menos efectivos hasta el punto de alcanzar la panresistencia que actualmente amenaza con el inicio de la era “post-antibiótica”. La resistencia a antimicrobianos representa uno de los principales problemas de la población en lo referente a salud pública y a la práctica clínica.

Es importante señalar que desde su introducción, los antimicrobianos participan activamente en la selección de bacterias resistentes, sin olvidar que la rápida aparición y reclutamiento de nuevos genes (o mecanismos) de resistencia también contribuye a dicho problema. La selección de microorganismos resistentes puede ocurrir durante o después de tratamientos con antimicrobianos, ya que los residuos de antibacterianos pueden permanecer en el ambiente durante períodos de tiempo considerables posterior al tratamiento. De forma paralela al uso de los antimicrobianos se presenta el empleo de otros agentes que se proponen para eliminar bacterias, como es el uso de bactericidas ahora disponibles en algunos productos domésticos. Estos últimos también tienen la capacidad de permanecer en el ambiente, participando en la dinámica de la ecología microbiana, en lo referente a resistencia y en la supervivencia de diversos grupos de microorganismos.

La transferencia horizontal de genes (THG) que confieren resistencia a determinados antimicrobianos entre diferentes especies bacterianas, especialmente en enterobacterias, es una dificultad siempre creciente en el ámbito de las enfermedades infecciosas, y más aún en infecciones nosocomiales. Muchos de estos genes de resistencia se localizan en

elementos extracromosomales móviles de forma que se pueden transferir fácilmente entre diferentes cepas y especies de bacterias (Ochman y col, 2000).

Algunos microorganismos pueden desarrollar resistencia a un único agente antimicrobiano (o clase relacionada de agente), mientras que otros desarrollan resistencia a varios agentes antimicrobianos o clases. Estos organismos se refieren a menudo como cepas resistentes a múltiples fármacos o MDR (*Multiple Drug Resistance*). En algunos casos, los microorganismos se han hecho tan resistentes que no hay antibacterianos clínicamente eficaces contra ellos.

Entre los patógenos que actualmente representan el mayor desafío terapéutico se encuentran *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente y *Enterococcus* spp. vancomicina-resistente dentro de las bacterias gram-positivas, mientras que entre las bacterias gram-negativas el problema se ve representado principalmente por *Acinetobacter baumannii* multi-resistente, *Klebsiella pneumoniae*, y *Escherichia coli* resistentes a los β -lactámicos, en particular carbapenemes, y *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistentes (Livermore y col, 2009).

1.2. La familia *Enterobacteriaceae*

Las enterobacterias son un gran grupo de bacilos gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no formadores de esporos, quimiorganotrofos, con metabolismo respiratorio y fermentativo (Brenner, 1984). Por definición, son fermentadores de glucosa con producción de ácido y/o gas, reductores de nitrato (exceptuando algunas especies de *Erwinia* y *Yersinia*), en general oxidasa negativos y en su mayoría móviles. Comúnmente son catalasa positivos. Las distintas especies difieren en los hidratos de carbono que fermentan, y estas diferencias, junto con las variaciones en el producto terminal y en la utilización del sustrato, constituyen la base para la determinación de especies en esta familia.

Los miembros de esta familia se encuentran ampliamente distribuidos de manera cosmopolita. Son hallados en suelo, agua, frutas, vegetales, plantas y árboles, y animales -desde insectos al hombre- (ej.: *Erwinia amylovora* causa enfermedad en manzanas, maíz, papas, piñas), *Yersinia ruckeri* y algunas especies de *Edwardsiella* afectan la industria pesquera, *Salmonella* spp.– uno de los agentes etiológico más frecuentemente asociado a enfermedades causada por ingestión de alimentos- a la

industria de carnes de ave y caza, *Klebsiella* spp. y *Citrobacter freundii* causan mastitis bovina). En humanos, numerosas infecciones son causadas por enterobacterias: *Salmonella*, *Shigella* y algunas cepas de *E. coli* son patógenos gastrointestinales que causan diarreas en infantes y adultos, cepas invasivas y enterotoxigénicas de *Yersinia enterocolitica* causan diarreas e infección de los nódulos linfáticos del mesenterio (*mesentery lymphadenitis*), cepas enterotoxigénicas de *K. pneumoniae* han sido frecuentemente aisladas de pacientes con síndrome de mala absorción de alimentos (*tropical sprue*), entre otras (Brenner, 1984). Especies de enterobacterias no asociadas a procesos diarreicos son definidas frecuentemente como patógenos oportunistas. Muchas de estas especies pueden causar enfermedades extra intestinales. Individuos comprometidos (quemados, diabéticos, inmunosuprimidos, cateterizados, pacientes con cáncer, enfermedades respiratorias o de edad avanzada) son vulnerables a infecciones nosocomiales producidas por patógenos oportunistas. Es por esto que la familia *Enterobacteriaceae* es la mayor responsable de las infecciones nosocomiales, causadas frecuentemente por *E. coli*, distintas especies de *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, y *Serratia marcescens* (Brenner, 1984).

Actualmente, un gran porcentaje de las infecciones hospitalarias y/o adquiridas en la comunidad son causadas por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Se encuentra reportado ampliamente en la bibliografía el hallazgo de enterobacterias resistentes y multiresistentes a una o múltiples familias de antibacterianos, como ser β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, entre otros (Márquez y col, 2008; Livermore, 2009; Escobar y col, 2010; Martínez-Martínez y Calvo, 2010).

Como se dijo anteriormente, la transferencia horizontal de genes (THG) contribuye de manera considerable a este fenómeno. Otro factor importante reportado recientemente es el rol del turismo internacional en la diseminación de enterobacterias resistentes. La emergencia de bacterias productoras de ciertas β -lactamasas (CTX-M-, KPC- y NDM-) es un claro ejemplo del rol que la globalización juega en la rápida diseminación de nuevos mecanismos de resistencia a antibacterianos (van der Bij y Pitout, 2012).

1.3. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos

Las bacterias pueden ser resistentes a los fármacos antibacterianos a través de una variedad de mecanismos: una bacteria puede tener resistencia a varios antimicrobianos y distintas formas de resistencia para un mismo antimicrobiano.

Algunas especies de bacterias son naturalmente resistentes a una clase de agentes antimicrobianos. En tales casos, todos los integrantes de esa especie bacteriana son igualmente resistentes a todos los miembros de esa clase de antibacterianos. De una mayor preocupación son los casos de resistencia adquirida, donde poblaciones inicialmente sensibles de bacterias se vuelven resistentes a un agente antibacteriano y proliferan bajo la presión selectiva del uso de dicho agente.

Los mecanismos utilizados por las bacterias para protegerse de la acción de los antimicrobianos pueden ser clasificados en 4 tipos distintos (Hawkey, 1998; Tenover, 2006):

I. Alteración del antibacteriano: El organismo produce enzimas que modifican o inactivan antibacterianos, impidiendo el reconocimiento del sitio diana antes de que pueda tener un efecto. Un ejemplo de este mecanismo son las enzimas β -lactamasas, que clivan el anillo β -lactámico de los antibacterianos β -lactámicos dejándolos inactivos. Asimismo, las bacterias pueden producir enzimas específicas que realicen la acetilación, adenilación y/o fosforilación de aminoglucósidos, impidiendo que estos ejerzan su acción.

II. Disminución de la permeabilidad celular o imposibilidad de alcanzar el sitio de acción: Consiste en impedir que el antimicrobiano se acumule en cantidades suficientes dentro de la célula como para que pueda producir la muerte del microorganismo, mediante diferentes mecanismos, como por ejemplo:

II.a- Pérdida o disminución en la expresión de una o más porinas en bacilos gram negativos, como en el caso de ciertos aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes al antibacteriano β -lactámico imipenem, en los cuales la falta de la porina específica D2 impide que este penetre a la célula y ejerza su acción.

II.b- Alterando y creando mecanismos de transporte que eliminen el antimicrobiano del interior de la célula. En bacilos gram negativos han sido descritos múltiples bombas o

sistemas multicomponentes que efluyen antimicrobianos (bombas de eflujo de aquí en adelante). Citando algunos ejemplos: en *P. aeruginosa*, el operón *mexXY* codifica para un sistema de eflujo con una amplia variedad de sustratos: fluoroquinolonas, β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos y en *E. coli*, el sistema AcrAB-TolC es capaz de transportar un amplio rango de compuestos no relacionados estructuralmente, como por ejemplo oxacilina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, ácido nalidíxico, norfloxacin, novobiocina, rifampicina y trimetoprima. La poli-especificidad de las bombas de eflujo confiere a la célula de una disminución de la sensibilidad “general” frente a distintos antimicrobianos que puede reforzar el efecto, y/o favorecer la adquisición de otros mecanismos de resistencia, otorgando un perfil de multiresistencia a antimicrobianos (Nikaido y Pagès, 2012).

III. Alteración del sitio diana: En este caso, el antibacteriano penetra la célula pero es incapaz de actuar debido a cambios estructurales en la molécula blanco. Entre otros ejemplos, la resistencia a quinolonas se produce fundamentalmente por mutaciones, principalmente en la subunidad *gyrA* de la ADN girasa y en la subunidad *parC* de la topoisomerasa IV, y la resistencia a eritromicina puede deberse a la modificación del ribosoma 50S (sendos sitios blanco).

IV. Producción de un sitio blanco alternativo: La bacteria se protege de la acción del antibacteriano produciendo un *target* alternativo, en general una enzima, resistente a la inhibición por el antibacteriano; a la vez que el blanco original sensible sigue produciéndose. Esto permite a la bacteria sobrevivir mediante el *bypass* del efecto del antibacteriano. Un ejemplo es la resistencia a sulfonamidas y trimetoprima, la cual se produce gracias a la producción de enzimas similares (codificadas en plásmidos) a las blanco pero relativamente refractarias al antibacteriano en cuestión, por lo cual se elude la acción del mismo.

En la siguiente figura (Figura 1.1) se muestran esquematizados cada uno de los mecanismos antes mencionados.

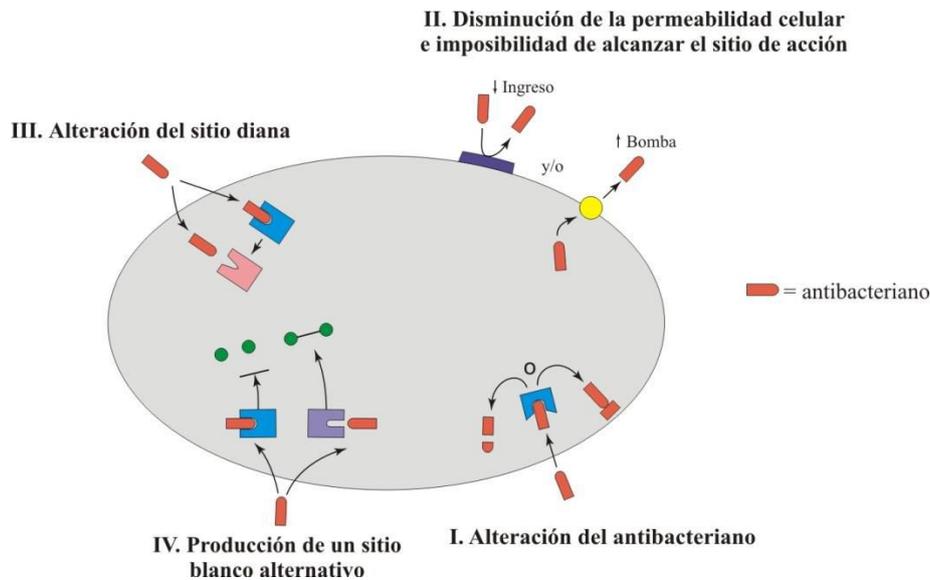


Figura 1.1. Mecanismos de resistencia a antibacterianos. (Esquema adaptado de Hawkey, 1998).

Las poblaciones de bacterias normalmente sensibles se vuelven resistentes a agentes antimicrobianos a través de la mutación y la selección, o mediante la adquisición de de la información genética que codifica la resistencia de otras bacterias. De esta manera, muchas especies de bacterias se adaptan rápidamente a la introducción de agentes antibacterianos en su medio ambiente.

Mutaciones espontáneas pueden originar resistencia a antimicrobianos. En todos estos casos, las células bacterianas portadoras de mutaciones que confieren resistencia son seleccionadas por el uso de antimicrobianos, ya que estos inhiben o producen la muerte de bacterias sensibles pero permiten a las células resistentes sobrevivir y desarrollarse. Aunque una sola mutación en un gen bacteriano sólo puede reducir ligeramente la susceptibilidad de la bacteria al agente antibacteriano, puede ser suficiente para permitir su supervivencia inicial hasta que adquiera nuevas mutaciones o información genética adicional que le confiera resistencia plena al antibacteriano. En raros casos, una única mutación puede ser suficiente para conferir de alto nivel de resistencia clínicamente significativa sobre un organismo (Por ejemplo, el alto nivel de resistencia a rifampicina en *S. aureus* o a fluoroquinolonas en *Campylobacter jejuni*). La resistencia adquirida que se desarrolla debido a la mutación cromosómica y la selección se denomina evolución vertical (Tenover, 2006).

Como se dijo anteriormente, las bacterias también desarrollan resistencia a través de la adquisición de nuevo material genético de otros organismos portadores de determinantes de resistencia. Este fenómeno se denomina evolución horizontal, y puede ocurrir entre las bacterias de la misma especie o entre bacterias de diferentes especies a través de los mecanismos de intercambio genético descritos en células procariontas: conjugación, transducción, y transformación. En cada uno de estos procesos, los transposones pueden facilitar la incorporación y diseminación de los genes de resistencia adquiridos en el genoma anfitrión o en plásmidos (Tenover, 2006).

Debido a que en el presente estudio se analizaron mecanismos de resistencia a β -lactámicos y quinolonas, en los siguientes párrafos se realizará una descripción de los mismos.

1.3.1. Resistencia a β -lactámicos: β -lactamasas.

La hidrólisis de β -lactámicos mediada por β -lactamasas es el mecanismo más común de resistencia a este tipo de antibacterianos en bacterias gram-negativas clínicamente relevantes (Bush y Jacoby, 2010). La clasificación de β -lactamasas ha sido realizada tradicionalmente en base a las características funcionales de las enzimas (Bush y col, 1995) o su estructura primaria (Ambler, 1980) (Tabla 1.1).

Basándose en datos de secuencia de las β -lactamasas, Ambler propone clasificarlas en cuatro clases: A, B, C y D. Las clases A, C y D incluyen enzimas que hidrolizan el sustrato a través de la formación de un complejo acil-enzima mediado por una serina del sitio activo. Las enzimas clase B son denominadas metalo β -lactamasas, ya que requieren al menos un átomo de zinc en su sitio activo para realizar la hidrólisis de β -lactámicos. Las enzimas de clase A, cuyo prototipo es la enzima TEM-1, están codificadas en plásmidos y su peso molecular oscila entre 25 y 30 kDa, al igual que las de clase B y D. Las enzimas de clase C, están generalmente codificadas en el cromosoma bacteriano y son típicamente inducibles por β -lactámicos. Se trata de proteínas que presentan unos 100 aminoácidos más que la de los otros grupos, por lo que su peso molecular suele rondar los 40 kDa o más. En algunas especies, la región reguladora del gen ha desaparecido, y en consecuencia la enzima se expresa constitutivamente. Las enzimas de clase B, fundamentalmente las de relevancia clínica, son plasmídicas, inhibibles por EDTA, incluyéndose aquí las enzimas que confieren

resistencia a los carbapenemes. Las enzimas de clase D constituyen un grupo de enzimas cromosómicas y plasmídicas, con actividad incrementada sobre oxacilina, inhibibles por iones cloruros y de forma variable por inhibidores del tipo ácido clavulánico o sulbactam. Estas enzimas, al igual que lo observado en las enzimas de clase A, han ampliado su espectro de acción mediante mutaciones puntuales a partir de enzimas con actividad reducida a penicilinas como es el caso de las enzimas derivadas de OXA-1/-2/-10.

Bush, Jacob y Medeiros proponen una clasificación funcional para las β -lactamasas basada en el peso molecular de la enzima, su punto isoeléctrico (pI), el perfil de sustrato y la propiedad de ser inhibidas por la presencia de ácido clavulánico o EDTA. En base a este esquema surgen cuatro grupos funcionales que se correlacionan bien con la clasificación de Ambler, denominándose: 1, 2, 3 y 4. Las del grupo 1 corresponden a enzimas con acción cefalosporinasa, no inhibibles por ácido clavulánico ni por EDTA, y que se correlacionan con las enzimas cromosómicas de bacilos gram negativos de clase C. Las del grupo 2 están constituidas por penicilinasas y cefalosporinasas inhibibles por ácido clavulánico, y coinciden con el tipo A y D de Ambler. El subgrupo 2d incluye las β -lactamasas miembros de la familia OXA (ver más adelante “ β -lactamasas: familia OXA). Las del grupo 3 son inhibibles por EDTA pero no por ácido clavulánico, se corresponden con las metaloenzimas de tipo B (Bush y col, 1995; Bush y Jacoby, 2010).

Tabla 1.1. Clasificación de β -lactamasas.

Grupo ^a	Clase molecular ^b	Sustrato característico	Inhibición por		Enzimas representativas
			Á. clavulánico	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	No	No	CMY-2, FOX-1, ACT-1, MIR-1
2a	A	Penicilinas	Si	No	PC1
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	Si	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactam	Si	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
2br	A	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
2c	A	Carbenicilina	Si	No	PSE-1, CARB-3
2d	D	Cloxacilina	variable	No	OXA-1, OXA-10
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No	CepA
2f	A	Carbapenemes	variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
3	B	Carbapenemes	No	Si	IMP-1, VIM-1, IND-1

^a Clasificación de acuerdo a Bush y col, 1995 - Bush y Jacoby, 2010. ^b Clasificación de acuerdo a su secuencia aminoacídica por Ambler, 1980; Jaurin y Gundstrom, 1981 y Huovinen y col, 1988.

Las β -lactamasas son proteínas globulares que presentan una masa 100 veces superior a su sustrato. En este contexto, una vez que el antimicrobiano ingresa al sitio activo, son muchas las interacciones químicas que se producen entre ambas moléculas. En primer lugar se realiza la formación de un complejo no covalente (ES), limitado por un equilibrio termodinámico entre las especies E, S y ES. k_{+1} representa la velocidad de formación de este complejo a partir de enzima libre y sustrato, mientras que k_{-1} es la

constante de velocidad de descomposición de ES en enzima y sustrato. En las serino β -lactamasas (clases A, C y D), el oxígeno con carga negativa del grupo carbonilo de los β -lactámicos es atacado por los grupos hidroxilo de la serina 70 y alanina 273 de la enzima. Se forma así mediante un enlace covalente irreversible, un complejo acilenzima (acilación) gobernado por la constante de velocidad de acilación k_{+2} . Estas interacciones generan un efecto de “tensión” sobre el grupo carbonilo, que tiende a romper el grupo amida del anillo β -lactámico. La íntima proximidad que se genera entre el grupo hidroxilo de la serina 70 y el grupo amida del anillo culmina la acción, generando la hidrólisis del β -lactámico. La presencia de una molécula de agua en el sitio activo de estas enzimas produce la liberación del antibacteriano hidrolizado (P), devolviendo la actividad enzimática a la β -lactamasa. Esta etapa está caracterizada por la constante de deacilación k_{+3} . (Figura 1.2).

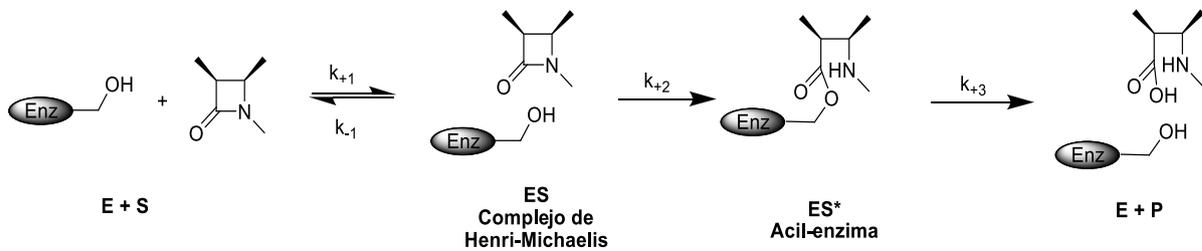


Figura 1.2. Modelo cinético de β -lactamasas clase A, C y D. E, S, ES, ES* y P representan, respectivamente, enzima, sustrato, complejo no covalente, acil-enzima y producto. k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} y k_{+3} son las constantes cinéticas individuales de cada reacción.

A continuación se describirá con mayor detalle a los grupos de β -lactamasas que han sido estudiadas durante este trabajo de tesis.

1.3.1.1. β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Estas enzimas pertenecen al grupo funcional 2be o clase molecular A, retienen la actividad frente a penicilinas y cefalosporinas y además poseen la capacidad de hidrolizar uno o más oximino- β -lactámicos, como cefotaxima y/o ceftazidima y a algunos monobactámicos como el aztreonam. Esta última actividad es la que les da el nombre de “espectro extendido”.

Las β -lactamasas de espectro extendido fueron detectadas luego de la incorporación de las llamadas cefalosporinas de tercera generación y aztreonam al uso clínico e inicialmente se identificaron como variantes de las β -lactamasas SHV-1, TEM-1 y TEM-2. A partir de su reconocimiento en Europa (Sirot y col, 1988) y USA (Jacoby y

col, 1988; Quinn y col, 1989), fueron en principio asociadas a la aparición de grandes brotes de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas, por ser estas productoras de BLEE (Sirot y col, 1988; Meyer y col, 2003). Los genes codificantes para estas enzimas generalmente se localizan en plásmidos que además albergan múltiples determinantes de resistencia y son transferibles entre especies de enterobacterias (Sirot y col, 1987). Debido a esto, ya en los primeros reportes, otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (*C. freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *S. marcescens*, entre otros) fueron identificados como productores de BLEE (Kitzis y col, 1988).

Actualmente, las BLEE siguen siendo asociadas a grandes brotes de resistencia a β -lactámicos. Sin embargo, las variantes de SHV y TEM han sido ampliamente reemplazadas por la familia de β -lactamasas de espectro extendido CTX-M. Las primeras enzimas de esta familia fueron descubiertas a principios de los años 90 simultáneamente en Europa occidental y Sudamérica (Bauernfeind y col, 1990; Bauernfeind y col, 1996). Las enzimas de la familia PER también presentan un comportamiento característico de BLEE. PER-1 fue detectada por primera vez en un aislamiento de *P. aeruginosa* en Turquía (Danel y col, 1995), mientras que PER-2 fue identificada en un aislamiento de *Salmonella enterica* en Argentina (Bauernfeind y col, 1996).

En nuestro país, las BLEE predominantes pertenecen a la familia de CTX-M y PER. En numerosos estudios epidemiológicos, realizados desde el año 1989, se observa la presencia de estas enzimas. CTX-M-2 ha sido la variante alélica absolutamente prevalente en los aislamientos clínicos de enterobacterias durante mucho tiempo (Bertona y col, 2005; Quinteros y col, 2003; Quinteros y col, 1999; Power y col, 1999; Radice y col, 2002), sin embargo, en relevamientos recientes se observó la emergencia y diseminación de otras enzimas de la familia CTX-M, predominantemente CTX-M-15 (Sennati y col, 2012).

1.3.1.2. β -lactamasas de clase D: familia OXA

Las β -lactamasas de tipo OXA se encuentran ampliamente distribuidas, y han sido descritas en enterobacterias y en otros bacilos gram negativos no fermentadores de glucosa (principalmente en *A. baumannii* y *P. aeruginosa*). Usualmente, confieren resistencia a ampicilina y a las cefalosporinas de primera generación siendo la hidrólisis a las demás cefalosporinas débil. Aunque las primeras enzimas de esta familia fueron

detectadas como genes adquiridos, localizados en plásmidos e integrones clase 1, luego fue demostrado que en muchas especies de bacterias gram-negativas los genes *bla*_{OXA} su localización es cromosómica, como en el caso de *A. baumannii*) (Naas y Nordmann, 1999).

Como se mencionó anteriormente, son serino-enzimas que pertenecen a la clase D de Ambler, y la mayoría al grupo 2d según clasificación de Bush. En un principio, fueron llamadas oxacilinasas debido a que una gran mayoría hidroliza eficientemente isoxacilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina) (Bush y col, 1989; Ledent y col, 1993a). Esta definición ya no es absoluta debido a que enzimas descriptas recientemente hidrolizan pobremente estos antibacterianos. Si bien no son eficientemente inhibidas por ácido clavulánico (exceptuando OXA-18) (Philippon y col, 1997), tazobactam y sulbactam; muchas enzimas de esta familia son inhibidas por iones cloruro (Naas y col, 1999). Otra característica de algunas β -lactamasas clase D es la capacidad de formar dímeros, algunos ejemplos son: OXA-2 (Ledent y col, 1993b), OXA-10 (Danel y col, 2001a; Danel y col, 2001b), OXA-29 (Franceschini y col, 2001), OXA-48 (Doquier y col, 2009).

Las β -lactamasas que forman parte de esta clase son el grupo más diverso en cuanto a secuencia aminoacídica, de hecho, entre algunos miembros de esta familia hay sólo un 20% de identidad aminoacídica. Esta diversidad también se observa en el comportamiento bioquímico de estas enzimas, mientras que algunos miembros poseen un espectro reducido de hidrólisis otros tienen un espectro extendido, incluso de hidrólisis de carbapenemes. A pesar de esto, la mayoría de las nuevas enzimas de tipo OXA que se detectan son asociadas a uno o más miembros pre-existentes de esta familia (Poirel y col, 2010).

Esta familia de enzimas pueden ser clasificadas (de acuerdo a su espectro de acción) en: β -lactamasas de espectro ampliado, β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas.

1.3.1.2.1. β -lactamasas clase D de espectro ampliado

Dentro de las enzimas de espectro ampliado se incluyen: el subgrupo¹ de OXA-1, OXA-2 y OXA-10.

- Subgrupo OXA-1: El gen *bla*_{OXA-1} ha sido detectado en plásmidos y formando parte de integrones en una amplia variedad de organismos gram negativos. Una característica a destacar de OXA-1 (también denominada OXA-30) es que, a pesar de hidrolizar cefalosporinas de cuarta generación posee limitada actividad frente a ceftazidima (Aubert y col, 2001). En la siguiente tabla (Tabla 1.2) se muestran algunas características de las enzimas de este grupo.

Tabla 1.2. Subgrupo OXA-1.

Enzima	Aislamiento	Asociación con brotes	Entorno genético	Referencia
OXA-1/30	Eco*, Shi, Sal	Si (CTX-M-15)	P, I, GC,	Boyd y Mulvey, 2006; Nakazawa y Mitsuhashi, 1983; Siu y col, 2000
OXA-31	Pae	No	P, I, GC,	Aubert y col, 2001
OXA-47	Kpn	No	P, I, GC,	Poirel y col, 2004

*Corresponde a la primera descripción. P = plásmido, I = integrón, GC = gen en casete. Eco: *E. coli*; Pae: *P. aeruginosa*; Kpn: *K. pneumoniae*, Shi: *Shigella*, Sal: *Salmonella*.

- Subgrupo OXA-2: OXA-2 comparte 30% de identidad con OXA-1 (Kratz y col, 1983). Como se muestra en la tabla 1.3, el gen *bla*_{OXA-2} y sus derivados se han detectado en múltiples bacterias gram negativas, localizados en entornos genéticos que favorecen su diseminación, y en algunos casos asociados BLEE y metalo- β -lactamasas.

¹ Dentro del subgrupo se incluye tanto a la β -lactamasa representativa del mismo como a enzimas relacionadas.

Tabla 1.3. Subgrupo OXA-2.

Enzima	Aislamiento	Asociación con brotes	Entorno genético	Referencia
OXA-2	<i>S.Typhimurium</i> *, Pae, Aba	Si (PER-1, MBL, CTX-M-2)	P	Power y col, 2005; Kratz y col, 1983; Empel y col, 2007; Sung y col, 2008.
OXA-3	Pae*, Kpn	No	P, I, GC	Sanschagrin y col, 1995
OXA-21	Aba*, Pae	No	P, I, GC	Vila y col, 1997
OXA-34	Pae	No	?	AF350424.1
OXA-36	Pae	No	?	AF300985
OXA-46/- 81*	Pae	No	Cr, I, GC	Giuliani y col, 2005
OXA-53	Sal	No	P, I, GC	Mulvey y col, 2004
OXA-56	Pae	Si (SPM-1)	P, I, GC	Carvalho y col, 2006

*Corresponde a la primera descripción. P = plásmido, I = integrón, GC = gen en casete, Tn = Transposon, ? = no determinado, ent: enterobacteria, Pae: *P. aeruginosa*, Aba: *A. baumannii*, Sal: *Salmonella*.

- Subgrupo OXA-10: La β -lactamasa OXA-10 (denominada inicialmente PSE-2) (Huovinen y col, 1988) y enzimas relacionadas poseen un perfil de hidrólisis de β -lactámicos variable (Naas y Nordmann, 1999). Esta enzima posee un espectro más amplio de la hidrólisis que otras β -lactamasas de clase D, ya que, además de hidrolizar ureido y aminopenicilinas puede hidrolizar cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam (Aubert y col, 2001b; Mugnier y col, 1998). El gen *bla*_{OXA-10} ha sido detectado en una amplia variedad de bacterias gram negativas, siendo *P. aeruginosa* la especie en donde el gen *bla*_{OXA} es detectado con mayor frecuencia (Aubert y col, 2001b; Carvalho y col, 2006; Danel y col, 1999; Danel y col, 1998; Empel y col, 2007). En algunas de las enzimas derivadas por mutaciones puntuales de OXA-10 se ha observado un incremento de actividad frente a cefalosporinas de tercera generación, como por ejemplo en OXA-11, OXA-13, OXA-16, OXA-28, OXA-35 y OXA-74 (Poirel y col, 2010).

Muy pocas enzimas derivadas de OXA-10 poseen un espectro de hidrólisis a β -lactámicos restringido, siendo un ejemplo OXA-7 (presenta 95% de identidad con OXA-10), cuyo gen codificante se localiza en un plásmido de *E. coli* (Scoulica y col, 1995).

Por otro lado, existen β -lactamasas de espectro ampliado que debido al poco grado de identidad con OXA-1, OXA-2 y OXA-10 no forman parte de ningún subgrupo. El gen *bla*_{OXA-5} fue detectado como gen en casete formando parte de un integrón de clase 1, y también se lo descubrió en asociación con el gen *bla*_{GES-2} durante un brote de aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes en África del Sur (Poirel y col, 2002). *bla*_{OXA-9} se identificó por primera vez como parte de Tn1331 en un plásmido de un aislamiento de *K. pneumoniae* (Tolmasky y Crosa, 1993). Por lo tanto, no es sorprendente que *bla*_{OXA-9} haya sido descrito en varias especies, incluyendo *Salmonella* spp. (Orman y col, 2002) y *P. putida*, donde se asoció con la metalo- β -lactamasa VIM-2 (Poirel y Nordmann, 2006). OXA-9 presenta una característica diferente, ya que es inhibida por ácido clavulánico y cloxacilina y la presencia de NaCl no afecta su actividad. (Bojorquez y col, 1998). OXA-20 y OXA-46 comparten entre 75 a 78% de identidad con su relativo más cercano, OXA-2. *bla*_{OXA-20} y *bla*_{OXA-46} fueron detectados insertos en integrones en aislamientos de *P. aeruginosa* (Giuliani y col, 2005; Naas y col, 1998).

1.3.1.2.II. β -lactamasas clase D de espectro extendido

La mayoría de las BLEE de la familia OXA identificadas hasta el momento fueron detectadas en aislamientos de *P. aeruginosa*. Estas BLEE pueden estar relacionadas con las β -lactamasas de espectro ampliado antes mencionadas o no presentar similitudes en su estructura.

Las variantes de OXA-2 tal como OXA-15 tienen una mutación puntual en comparación con la secuencia nucleotídica de OXA-2 (Asp150Gly). OXA-15 tiene una mayor capacidad de hidrolizar ceftazidima, y en menor grado cefepime y aztreonam. OXA-32 difiere de OXA-2 mediante la sustitución aminoacídica Leu169Ile, la cual es responsable de la resistencia a ceftazidima (no así a cefotaxima) cuando está presente en *P. aeruginosa* (Poirel y col, 2002). En cambio, serían necesarios dos cambios de aminoácidos (Asn73Ser, Gly157Asp) en las BLEE derivadas de OXA-10 u OXA 7 para extender su perfil de sustrato (Aubert y col, 2001; Mugnier y col, 1998).

Si bien las BLEE de tipo OXA confieren resistencia predominantemente a la ceftazidima, se han obtenido evidencias de que OXA-17 (prevalente en Taiwán (Yan y col, 2006)) aumenta la CIM de cefotaxima y cefepime cuando el gen es clonado y expresado en *E. coli*. (Danel y col, 1999).

Dentro de las enzimas de espectro extendido no relacionadas estructuralmente se encuentra OXA-18 (la primera detectada de este tipo). Confiere altos niveles de resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (no hidroliza cefamicinas y carbapenemes) y su actividad es completamente inhibida por ácido clavulánico (Philippon y col, 1997). Esta enzima ha sido detectada solamente en *P. aeruginosa* (Philippon y col, 1997; Naas y col, 2008). OXA-45 comparte 66% de identidad con OXA-18, posee un perfil de hidrólisis similar ya que hidroliza ceftazidima, cefotaxima y aztreonam, a la vez que también es inhibida por ácido clavulánico (Toleman y col, 2003).

Todas las BLEE de esta familia de enzimas se han asociado con genes en casetes. El gen *bla*_{OXA-15} fue identificado como gen en casete dentro de la región variable de un integrón de clase 1 en *P. aeruginosa* (Danel y col, 1997). *bla*_{OXA-18} posee localización cromosómica, rodeado por dos secuencias duplicadas que contienen *ISCR19* (Naas y col, 2008). El gen *bla*_{OXA-45} fue descrito en *P. aeruginosa*, en un plásmido de 24 kb, no como gen en casete, sino asociado a 2 copias de *ISCR5* (Toleman y col, 2003).

1.3.1.2.III. Carbapenemasas clase D

La mayoría de las enzimas de la clase D que hidrolizan carbapenemes se han encontrado en *Acinetobacter* spp. Ninguna de las carbapenemasas clase D detectadas pueden hidrolizar de manera simultánea cefalosporinas de espectro extendido y carbapenemes, lo que podría indicar que en esta clase de β -lactamasas no se combinan de manera efectiva estas propiedades (Poirel y Nordmann, 2006; Poirel y col, 2007b).

El nivel de hidrólisis de carbapenemes de estas enzimas es pobre, probablemente debido al pobre recambio de estos antibacterianos (Queenan y Bush, 2007). En general, la hidrólisis de imipenem (si bien es lenta) tiene una mayor velocidad que la de meropenem. Usualmente, los valores de Km para imipenem son bajos, indicando que estas carbapenemasas tienen alta afinidad por ese sustrato (Heritier y col, 2003; Poirel y

col, 2005). Debido a estas propiedades peculiares, la contribución exacta de estas carbapenemasas a la resistencia fenotípica se encuentra en debate.

1.3.2. Resistencia a quinolonas

La primera quinolona, el ácido nalidíxico, se introdujo en el uso clínico en el año 1962 (Ball, 2000). Una breve descripción del mecanismo de acción de las quinolonas se muestra en la figura 1.3. En 1980, comenzó la utilización de la ciprofloxacina, una fluoroquinolona (FQ) con un amplio espectro de actividad antibacteriana *in vitro*, en particular contra bacterias gram negativas (Paton y Reeves, 1988). En las décadas siguientes, la resistencia a quinolonas en enterobacterias se ha convertido en un hecho común, generalizado, y en general, sin relación clonal. Esto último implicaría que la resistencia a estos antimicrobianos ha emergido de manera independiente en diversas ocasiones (Garau y col, 1999; Neuhauser y col, 2003; Ling y col, 2006).

El principal mecanismo de resistencia a quinolonas es la acumulación de mutaciones en las enzimas blanco de las fluoroquinolonas: ADN girasa y ADN topoisomerasa IV, principalmente en las subunidades *gyrA* y *parC*, respectivamente. (Hooper y Wolfson, 1993). Para que la resistencia adquirida sea clínicamente relevante, es necesario que se produzcan múltiples mutaciones (Hooper, 1998), y como las mutaciones dobles espontáneas son raros eventos genéticos (inferior a 10^{-14} para fluoroquinolonas) (Zhao y col, 1997), la explicación de la resistencia a quinolonas como un fenómeno mutacional no proporciona una explicación completamente satisfactoria para la frecuencia con la que ha surgido.

Tal fenómeno podría ser mejor explicado al tener en cuenta la transferencia horizontal de elementos que proporcionan un grado de disminución de susceptibilidad a quinolonas. El descubrimiento de la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (*plasmid mediated quinolone resistance* -PMQR) ha esclarecido en parte la emergencia de esta resistencia (Martínez-Martínez y col, 1998). Hasta el momento, se han descrito tres mecanismos diferentes que confieren resistencia a quinolonas localizados en plásmidos.

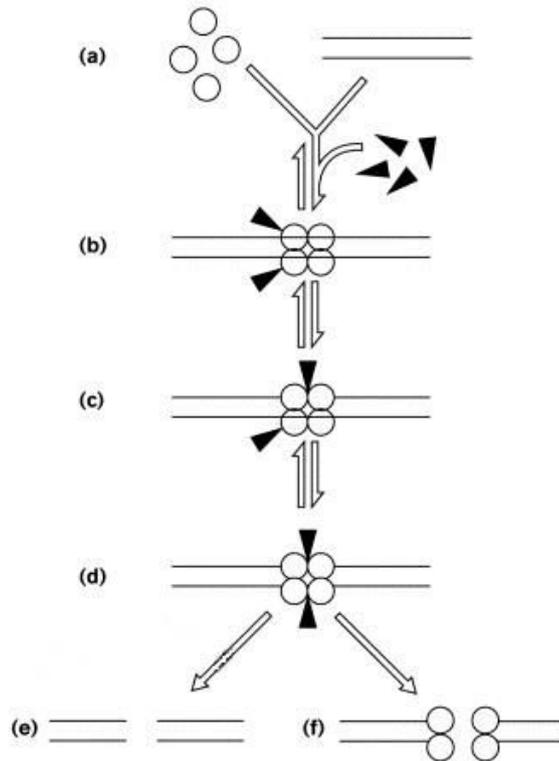


Figura 1.3. Esquema de acción intracelular de quinolonas sobre las enzimas girasa y topoisomerasa IV. A) Se forma un complejo ternario entre la enzima girasa/topoisomerasa IV (círculos), el ADN (líneas paralelas) y la quinolona (triángulos negros). B) La quinolona se une a la subunidad GyrA (girasa) o ParC (topoisomerasa IV). Este complejo es el responsable de la inhibición del crecimiento bacteriano (efecto bacteriostático). C y D) ruptura de las hebras de ADN. E y F) La liberación de las doble hebras de ADN clivadas conduce a la muerte celular (efecto bactericida). (Modificado del esquema de Drlica, 1999).

En 1998, se realizó el reporte de un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* (Martínez-Martínez y col, 1998) poseedor de un plásmido que portaba un determinante que incrementaba la CIM frente a quinolonas. El gen que confería esta resistencia fue identificado, y se denominó Qnr (*quinolone resistance*) a la proteína codificada en ese gen. Luego, esta proteína fue renombrada como QnrA1, debido al descubrimiento de proteínas relacionadas: QnrS (Hata y col, 2005), QnrB (Jacoby y col, 2006), QnrVC (Fonseca y col, 2008), QnrC (Wang y col, 2009) y QnrD (Cavaco y col, 2009). Posteriormente, dos mecanismos adicionales fueron descubiertos. Por un lado, se descubrió la enzima AAC (6')-Ib-cr, una variante de la enzima aminoglucósido acetiltransferasa AAC (6')-Ib que posee la capacidad de reducir la actividad de ciprofloxacina y norfloxacina (Robicsek y col, 2006). El otro mecanismo es el eflujo de

quinolonas, si bien en general este mecanismo se encuentra codificados en cromosoma, han sido detectados en plásmidos, mediado por las bombas de eflujo QepA (Perichon y col, 2007; Yamane y col, 2007) y OqxAB (Hansen y col, 2004; Hansen y col, 2007).

Los mecanismos anteriormente mencionados proporcionan bajo nivel de resistencia a quinolonas, necesario para facilitar la emergencia de altos niveles de resistencia en presencia de quinolonas a niveles terapéuticos. A continuación se realizará la descripción de estos determinantes, y debido a que en este trabajo de tesis se ha estudiado la presencia de genes *qnr*, este será descrito en último lugar con mayor profundidad.

1.3.2.1. Aminoglucósido acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr

La enzima AAC(6')-Ib-cr fue detectada por primera vez en aislamientos de *E. coli qnrA* positivos en Shanghai, China (Robicsek y col, 2006). Como se dijo anteriormente, el gen *aac(6')-Ib-cr* (cr: *ciprofloxacin resistance*) codifica una variante de la aminoglucósido acetiltransferasa AAC(6')-Ib, en general responsable de la resistencia a la kanamicina, tobramicina y ampicacina (Strahilevitz et al., 2009). Esta variante posee dos sustituciones aminoacídicas localizadas en los codones 102 (Trp → Arg) y 179 (Asp → Tyr) en comparación con AAC(6')-Ib, ambas mutaciones parecen ser necesarias para conferir susceptibilidad reducida a diferentes fluoroquinolonas (Robicsek et al., 2006). La proteína AAC(6')-Ib-cr es capaz de acetilar ciprofloxacina y norfloxacina, incrementando los valores de CIM de dos a cuatro veces. Dado que la acetilación se produce en el nitrógeno del grupo amino del sustituyente piperazinilo, sólo las fluoroquinolonas que contengan un grupo piperazinilo sustituido (como ser ciprofloxacina y norfloxacina) son sustratos de AAC(6')-Ib-Cr (Robicsek et al., 2006).

El gen *aac(6')-Ib-cr* ha sido identificado como gen en casete formando parte de integrones clase 1, tanto en cepas de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y como en bacterias BLEE negativas (Cattoir y Nordmann, 2009).

1.3.2.2. Bombas de Eflujo: QepA y OqxAB

El gen *qepA* (*quinolone efflux pump*), se ha identificado en aislamientos clínicos de *E. coli* procedentes de Japón y Bélgica (Perichon y col, 2007; Yamane y col, 2007). Este gen codifica una proteína deducida de 511 aminoácidos (53kDa) que posee identidad

significativa con una bomba de eflujo hipotética que pertenece al grupo de los transportadores protones-dependientes *major facilitator superfamily* (MFS) (Perichon y col, 2007; Yamane y col, 2007). Si bien el origen natural de *qepA* es desconocido, se ha formulado la hipótesis de que el reservorio de este gen podrían ser *Actinomycetales* (tales como *Streptomyces globisporus*, *Streptomyces coelicolor*, *Nocardia farcinica*, o *Polaromonas* spp.), debido a la identidad de la proteína con transportadores de membrana propios de actinomices y su alto contenido en% GC (72%).

Esta proteína confiere una disminución significativa de la susceptibilidad a las quinolonas hidrófilas (por ejemplo, norfloxacin, ciprofloxacina y enrofloxacin) con un incremento de 8 a 32 veces de la CIM, en comparación con el perfil de susceptibilidad de bacterias no poseedoras de *qepA* (Yamane y col, 2007). Por el contrario, la proteína QepA no modifica significativamente los valores de CIM de quinolonas moderadamente hidrofílicas (por ejemplo, pefloxacina, esparfloxacina, levofloxacina, moxifloxacina) e hidrofóbicas (por ejemplo, ácido nalidíxico) (Perichon y col, 2007; Yamane y col, 2007).

El mecanismo de resistencia a múltiples fármacos OqxAB se identificó inicialmente a partir de aislamientos de *E. coli* recuperadas de estiércol de cerdo (Hansen y col, 2004). El plásmido identificado albergaba los genes *oqxA* y *oqxB*, codificantes para un sistema de eflujo multidrogas. Este mecanismo confiere resistencia al antimicrobiano olaquinox (derivado de la quinoxalina como promotor de crecimiento veterinario). En estudios posteriores, fue demostrado que OqxAB confiere resistencia a otras moléculas, tales como cloranfenicol, ácido nalidíxico y ciprofloxacina (Hansen y col, 2007).

1.3.2.3. Proteínas Qnr

Los determinantes *qnr* codifican proteínas que consisten en repeticiones pentapeptídicas de aminoácidos con una secuencia de consenso [S, T, A, o V] [D o N] [L o F] [S, T, o R] [G] (Vetting y col, 2006).

Como se mencionó anteriormente, en enterobacterias se han detectado actualmente 5 variantes génicas de *qnr*: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS*. Las proteínas codificadas por estos genes presentan entre el 40 y 65% de identidad aminoacídica (Wang y col, 2003). Hasta el momento se encuentran descritas 7 variantes alélicas de *qnrA*, 59 de *qnrB*, 1

de *qnrC*, 1 de *qnrD* y 8 de *qnrS*, cada una de ellas comparten un alto porcentaje de similitud (<http://www.lahey.org/qnrstudies/>).

En *Vibrio cholerae* se ha identificado a la variante *qnrVC*, que comparte 57% de identidad aminoacídica con QnrA1. *qnrVC* ha sido detectado como gen en casete formando parte de un integrón clase 1 localizado en el cromosoma de *V. cholerae* (Fonseca y col, 2008). Debido a que la localización genética de esta variante no es plasmídica no es considerada como un determinante PMQR (Poirel y col, 2012).

El mecanismo de acción de los determinantes Qnr no ha sido dilucidado en detalle, se han establecido algunas hipótesis y obtenido evidencias experimentales a través del estudio de pentapéptidos repetidos análogos que confieren resistencia a quinolonas. QnrA1 comparte 20% y 19% de identidad aminoacídica con McbG y MfpA, respectivamente, dos miembros de la familia de pentapéptidos repetidos, involucrados también en resistencia a inhibidores de girasa, inclusive quinolonas (Zamble y col, 2001; Heddle y col, 2001; Montero y col, 2001; Hedge y col, 2005). Se ha demostrado que QnrA1 puede unirse a el complejo ADN girasa, tanto como a sus subunidades GyrA y GyrB. Esta unión no requiere la presencia del complejo ternario: girasa-quinolona-ADN (Tran y col, 2005a). Resultados similares se obtuvieron para la enzima topoisomerasa IV (Tran y col, 2005b). También se ha determinado que la unión del ADN a la girasa disminuye en presencia de Qnr (Tran y col, 2005a). Entonces, se hipotetiza que QnrA se une a la girasa o topoisomerasa IV en el mismo sitio de unión del ADN, y al disminuir la unión del ADN a la girasa/topoisomerasa IV se reduce el número de complejos enzima-ADN, blanco molecular de las quinolonas.

Las formas génicas de los determinantes *qnr* se han identificado en todo el mundo en muchas especies diferentes de enterobacterias, pero sobre todo en *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *E. coli* y *Salmonella* aisladas de la comunidad y en nosocomios (Rodríguez-Martínez y col, 2011). Su prevalencia puede variar entre 0,2 y hasta 94% dependiendo de los criterios de selección de las bacterias estudiadas (resistencia a la ceftazidima, ácido nalidíxico, fluoroquinolonas) (Strahilevitz y col, 2009; Rodríguez-Martínez y col, 2011). En general, la prevalencia de los genes *qnrB* es superior a la de los otros genes *qnr*. Los genes *qnrS* son frecuentemente identificados en *Salmonella* spp.: en un reciente estudio internacional (13 países europeos) se ha identificado a *qnrS* en el 10% de la colección de *Salmonella* spp. estudiada (Veldman y col, 2011). Muy

pocos estudios se han realizado para evaluar la prevalencia de los genes *qnrC* y *qnrD*. El gen *qnrC* ha sido detectado en un aislamiento de *Proteus mirabilis* en China, y su prevalencia parece ser muy baja, por lo menos en China (Wang y col., 2009). El gen *qnrD* ha sido identificado en 22 de los 1.215 aislamientos de *Salmonella* estudiados provenientes de diferentes países europeos (Veldman y col, 2011).

Todos los genes *qnr* han sido identificados en plásmidos que varían en tamaño (7 a 320 kb) y grupo de incompatibilidad, lo que indicaría que la propagación de múltiples plásmidos es responsable de la diseminación de estos genes de resistencia en todo el mundo (Cattoir y Nordmann, 2009; Strahilevitz y col, 2009). Estos plásmidos, en especial los *qnrA* y *qnrB*-positivos, frecuentemente albergan otros genes de resistencia que confieren resistencia a antimicrobianos β -lactámicos (por ej.: *bla*_{PSE-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-4}, *bla*_{IMP-4}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{LAP-2}), aminoglucósidos (*aadA2*, *aacA4*, *aadB*, *aac6'Ib*, *aac3*, entre otros), cloranfenicol (*cmlA1*, *catB2*, *catB3*), tetraciclina, sulfonamidas (*sul1*), trimetoprima (*dhfr*, *dfrA3b*, *dfrA19*), y estreptomicina (*ereA2*). Es importante destacar que existe una relación estadísticamente significativa entre la presencia de los determinantes *qnr* y la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), demostrada en diversos estudios epidemiológicos (Cattoir y Nordmann, 2009).

Los genes *qnrA* suelen ser identificados formando parte de integrones clase 1 inusuales, portadores de *ISCR1*, codificante para una potencial recombinasa (Ver "Integrones" de esta misma sección). El gen *qnrB1* ha sido asociado con el gen *orf1005* que codifica para una transposasa hipotética (Jacoby y col, 2006), los genes *qnrB2* (Garnier y col, 2006; Jacoby y col, 2006; Minarini y col, 2008), *qnrB4* (Cattoir y col, 2007b; Hu y col, 2008), *qnrB10* (Quiroga y col, 2007), y *qnrB12* (Kehrenberg y col, 2008), han sido coligados a *ISCR1*, mientras que *qnrB19* al elemento de *ISEcp1* (Cattoir y col, 2008a). Los genes *qnrS* no están integrados en integrones inusuales, dos ambientes genéticos diferentes han sido descritos; *qnrS1* en asociación con estructuras similares al transposón Tn3 o con la secuencia de inserción *ISEcl2* (Poirel y col, 2007a), y *qnrS2* formando parte de una estructura similar a un transposón, llamado casete de inserción móvil (*mobile insertion cassette* - MIC), o inserto en un marco abierto de lectura que codifica para una zinc metaloproteasa en *Aeromonas* spp. (Cattoir y col, 2008b; Sánchez-Céspedes y col, 2008) (Figura 1.4).

Mediante el estudio de una colección de 48 bacterias gram negativas provenientes de aislamientos clínicos y ambientales (*Enterobacteriaceae*, *Aeromonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Moraxellaceae*, y *Shewanellaceae*), el origen del gen *qnrA* fue identificado en el cromosoma de *Shewanella algae* (Poirel y col, 2005). De hecho, tres determinantes QnrA (QnrA3, QnrA4, y QnrA5) han sido identificados en *S. algae*, los cuales difieren en pocas sustituciones de aminoácidos con QnrA1. *S. algae* está ampliamente distribuido en ambientes acuáticos y rara vez involucrado en infecciones humanas. A diferencia de lo que se ha descrito para el gen *qnrA1* de localización plasmídica, los genes *qnrA* cromosómicos no se encuentran asociados al elemento *ISCR1* en el cromosoma de *S. algae* (Poirel y col, 2005). Concordantemente, el contenido de G + C (52%) de *qnrA* detectado en el cromosoma *S. algae* coincide exactamente con el porcentaje de su genoma (Poirel y col, 2005).

Recientemente, se determinó como progenitor de los genes *qnrB* a *Citrobacter* spp., enterobacterias ampliamente presentes en el medio acuático, pudiendo ser bacterias comensales o patógenos oportunistas, dependiendo de la especie (Jacoby y col, 2011).

Por último, se ha demostrado que *Vibrio splendidus* es una fuente de determinantes QnrS, ya que las proteínas Qnr codificadas en su cromosoma comparten el 84 y el 88% de identidad de aminoácidos con los determinantes plasmídicos QnrS1 y QnrS2, respectivamente. Además, el contenido G + C de los genes *qnrS* de *V. splendidus* (45%) son similares a los de *qnrS1* y *qnrS2* (44%). Aunque la especie progenitora del determinante QnrS codificado en plásmidos sigue siendo desconocido, probablemente está estrechamente relacionada con *V. splendidus*. (Cattoir y col., 2007a)

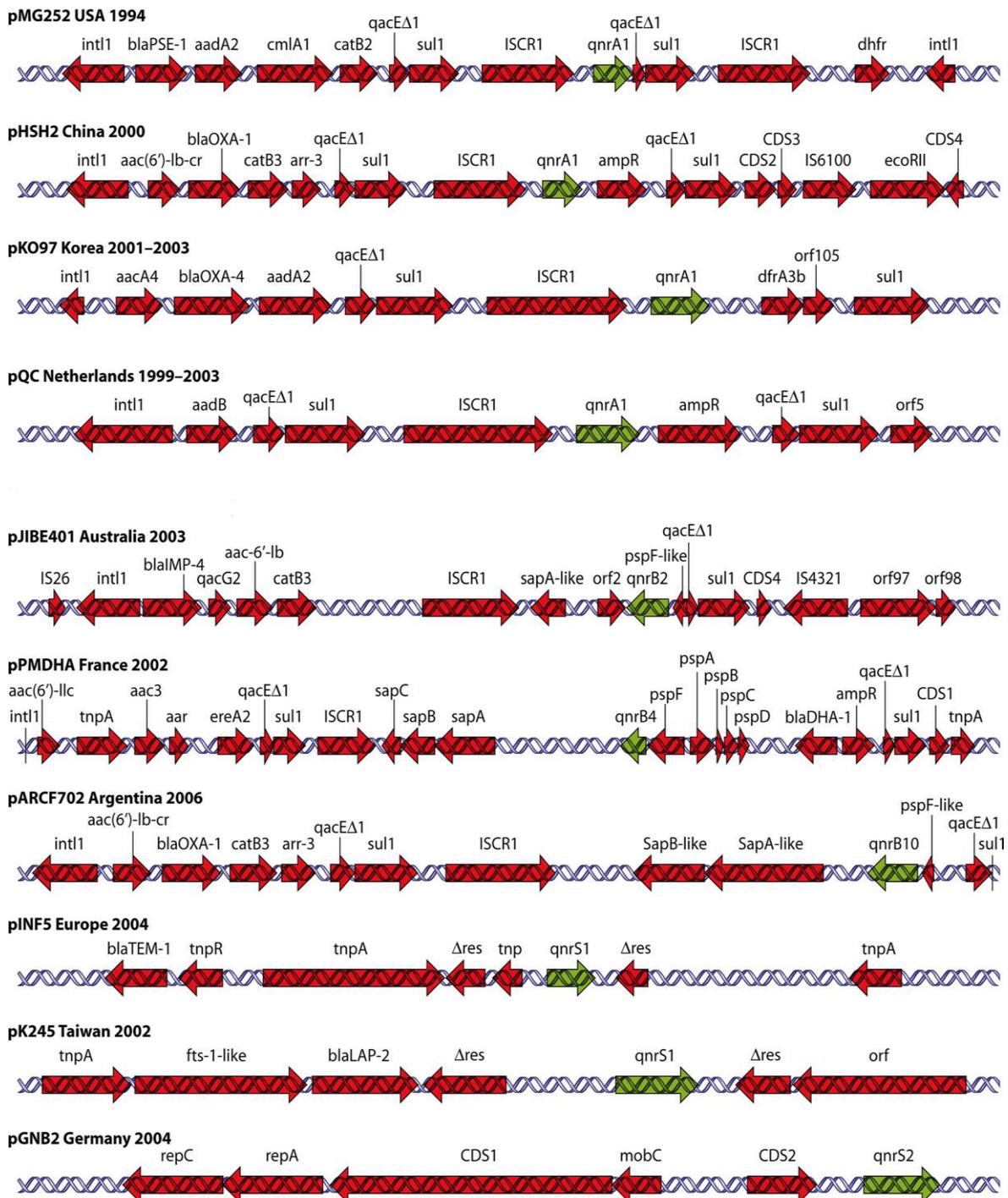


Figura 1.4. Entorno genético de alelos *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* localizados en plásmidos. Referencias: *pMG252*: Martínez-Martínez y col, 1998; *pSH2*: Wang y col, 2003; *pK097*: Jeong y col, 2005.; *pQC*: Paauw y col, 2006; Paauw y col, 2007; *pJIBE401*: Espedido y col, 2005; Espedido y col, 2008; *pPMDHA*: Verdet y col, 2006; *pARCF702*: Quiroga y col, 2007; *pINF5*: Kehrenberg y col, 2006; *pK245*: Chen y col, 2006; *pGNB2*: Böneman y col, 2006. (Tomado de Strahilevitz y col, 2009).

1.4. Mecanismos de transferencia génica

En procariotas, los elementos genéticos involucrados en la transferencia de genes son: plásmidos (conjugativos o autotransferibles) (Amabile-Cuevas y Chicurel, 1992), elementos transponibles conjugativos y no conjugativos (Salyers y col, 1995) y bacteriófagos. Dos décadas atrás, se han descrito elementos que participan en la adquisición y expresión de genes, inclusive de genes de resistencia, denominados integrones (Stokes y Hall, 1989).

Tres mecanismos de transferencia de genes están involucrados en el intercambio genético de una célula (dadora) a otra (receptora): la transformación, la conjugación, y la transducción (Cohen y col, 1972; Zatyka y Thomas, 1998).

I- Transformación: El ADN libre en el medio se incorpora en una célula receptora y puede integrarse en el cromosoma de esta, o en el caso de ser ADN plasmídico permanecer como un replicón independiente, lo que origina un cambio genético. Una célula que es capaz de tomar una molécula de ADN y ser transformada se dice que es *competente*. Si bien los detalles del proceso varían entre especies, es posible realizar generalizaciones, en primer lugar la célula une mediante un receptor que se encuentra en su superficie ADN doble cadena, aunque solo una de las hebras ingresa en la célula. La especificidad del ADN que la célula puede unir varía con la especie bacteriana. La unión del ADN transformante involucra una primera fijación reversible que luego se transforma en irreversible. Durante la fijación de tipo irreversible el ADN no puede soltarse ni reemplazarse.

El modelo postulado para las bacterias gram positivas establece que tras la incorporación, el ADN se asocia con una proteína específica de competencia que permanece unida al ADN, posiblemente para protegerlo de ataques por endonucleasas, hasta que alcanza el cromosoma, donde es sustituida por la proteína RecA. El ADN puede alinearse con una región homóloga en el genoma del receptor e integrarse en el mismo por un mecanismo de recombinación general no recíproco. Si el fragmento transformante no se integra en el cromosoma es degradado por endonucleasas de restricción, exceptuando el caso en que el fragmento sea un elemento autoreplicativo.

La transformación natural se ha descrito para algunos géneros, como por ejemplo: *Streptococcus*, *Bacillus*, *Thermoactinomyces*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Moraxella*,

Acinetobacter, *Azotobacter* y *Pseudomonas*. Este proceso constituye un mecanismo de transferencia génica muy común entre procariotas, necesario para la evolución frente a presiones selectivas del ambiente, y produce una mayor diversidad genética, lo que juega un rol muy importante en la dinámica de las poblaciones.

II- Conjugación: La conjugación bacteriana es un proceso de transferencia genética que requiere el contacto célula a célula, y este mecanismo está codificado en un plásmido conjugativo. Este tipo de plásmido utiliza la conjugación para transferir una copia de sí mismo al nuevo hospedador. Sin embargo, otros elementos genéticos pueden ser movilizados durante la conjugación, como ser otros plásmidos o parte del cromosoma del hospedador. Los mecanismos de transferencia por conjugación pueden ser diferentes dependiendo del plásmido concreto, pero la mayoría de los plásmidos de bacterias gram negativas parecen utilizar un mecanismo similar al usado por el plásmido F.

A grandes rasgos, la conjugación requiere de una célula donadora (macho, F^+), que contiene un tipo particular de plásmido conjugativo, y una célula receptora (hembra, F^-) que carece de él. El proceso de conjugación es controlado por genes ubicados en la región *tra* del plásmido F^+ . Muchos de los genes de esta región están relacionados con la síntesis de una estructura denominada pelo sexual. Plásmidos conjugativos diferentes pueden tener regiones *tra* disímiles, y, en algunos casos, los pelos pueden ser distintos. Estos permiten el apareamiento específico entre la célula donadora y la receptora, luego se retraen acercando las células. Posteriormente, los contactos entre las células donadora y receptora se estabilizan, probablemente por fusión de las membranas externas, y el DNA se transfiere de una célula a otra, resultando en dos células que poseen el plásmido F^+ .

III- Transducción: Permite la transferencia de genes cromosómicos y extracromosómicos en forma accidental, lo que tiene lugar cuando se reproduce alguno de los virus que infectan bacterias, denominados bacteriófagos o fagos. Durante su ciclo reproductivo, estos fagos encapsidan material genético de la célula hospedadora, y pueden luego transferirlo en futuras infecciones a otras células bacterianas. De acuerdo a su modo de reproducción, los fagos pueden clasificarse en virulentos (que matan al hospedador) o atemperados (que pueden ser llevados por el hospedador en forma pasiva sin causarle daño). Dependiendo del tipo de fago involucrado en el proceso de transducción, la transferencia de genes de la bacteria huésped por virus puede realizarse

de dos maneras: a través de la transducción generalizada (se transfiere prácticamente cualquier marcador genético) o la transducción especializada (se acarrean porciones específicas del genoma bacteriano). Los virus que contienen estos genes pueden infectar otras bacterias, completando la transferencia.

En la figura 1.5 se esquematizan los procesos mediante los cuales una célula puede incorporar nuevos genes, entre ellos los determinantes de resistencia, o adquirirla por mutaciones sobre genes preexistentes.

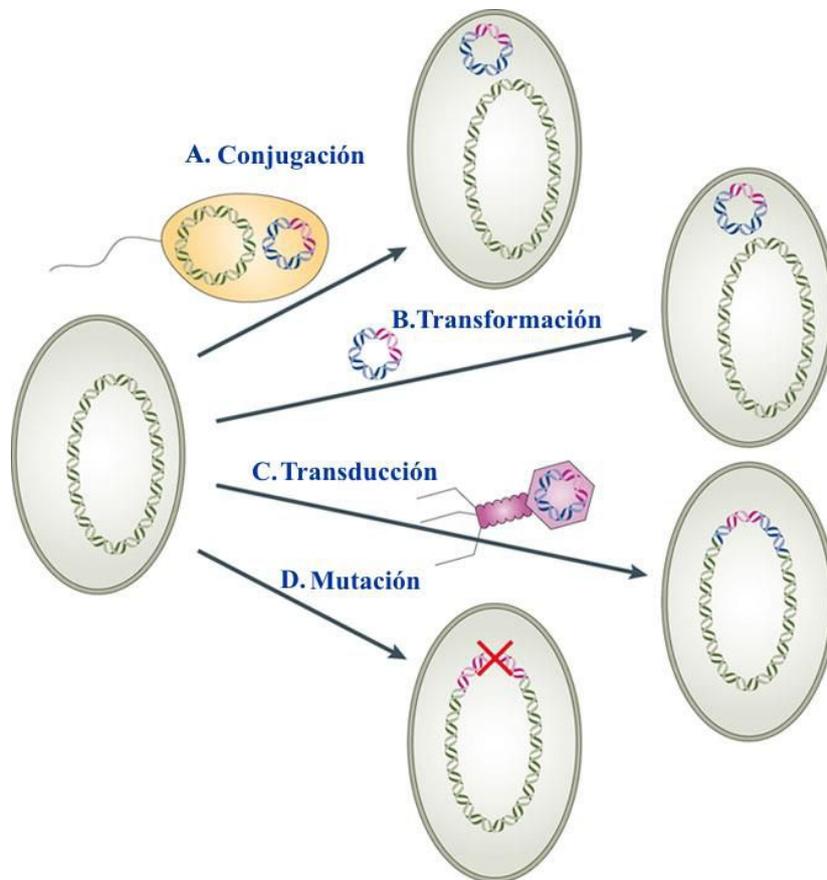


Figura 1.5. Mecanismos de adquisición de genes de resistencia a antibióticos. Un gen de resistencia a antibióticos (rosa) puede ser transferido a una célula receptora por varios caminos: a-Conjugación (contacto célula a célula), b-Transformación (plásmidos o ADN lineal), o c-Transducción (mediada por fagos). La resistencia también puede surgir por d-mutaciones en determinados genes (indicado con una cruz roja). (Esquema adaptado de Andersson y Hughes, 2010)

1.5. Integrones

1.5.1. Características generales de los integrones.

Los integrones constituyen un mecanismo de captura y diseminación de genes de resistencia entre bacilos gram negativos. Se definen como elementos genéticos potencialmente móviles capaces de integrar y expresar genes en casete, actuando así como vectores naturales de clonado y expresión (Hall y Collis, 1995).

La estructura básica de los integrones presenta una región 5' conservada (5' CS) que se compone básicamente de: a) el gen *intI* codificante para una integrasa (proteína con actividad tirosina-recombinasa específica de sitio); b) un sitio de recombinación, *attI*, en el que se integra el casete genético adyacente a *intI*. (Hall y Collis, 1995); y c) se encuentran al menos dos promotores divergentes, P_{int} para la expresión de *intI*; P_c y P_2 , para la expresión de los casetes genéticos insertos río abajo, puesto que la mayoría de éstos no tienen promotor propio (Recchia y Sherrat, 2002) (Figura 1.6).

Los sitios de recombinación *attI* de las diferentes integrasas no están relacionados entre sí y no poseen muchas secuencias consenso. El sitio *attII* (perteneciente a integrones clase 1 es el más estudiado en detalle y contiene un único sitio simple que incluye dos dominios de unión a la integrasa (sitios *core* 1 y 2) separados por un espaciador (Collis y col, 2001). La secuencia consenso del sitio *core* 1 es GTTAGGC o GTTRRRY (R=purina –A o G-, Y= pirimidina –C o T-); en cambio, no existe un consenso para la secuencia del sitio *core* 2 (Partridge y col, 2000). El sitio de recombinación *attII* presenta dos dominios adicionales de unión a la integrasa (uno fuerte y otro débil), los cuales se superponen con dos regiones directas repetidas: DR1 y DR2 (Partridge y col, 2000).

La región variable (RV) (Figura 1.6) particular de cada integrón está formada de acuerdo al número y disposición de genes en casetes integrados (Hall y Collis, 1995). Genes en casete preexistentes pueden servir como fuente de genes para posteriores arreglos (Hall y col, 1991; Recchia y Hall, 1994). De esta manera, nuevos integrones pueden ser generados por la inserción de nuevos genes en casete (principalmente en el sitio *attI*), o delección de uno o más casetes de un integrón existente (Collis y Hall, 1992).

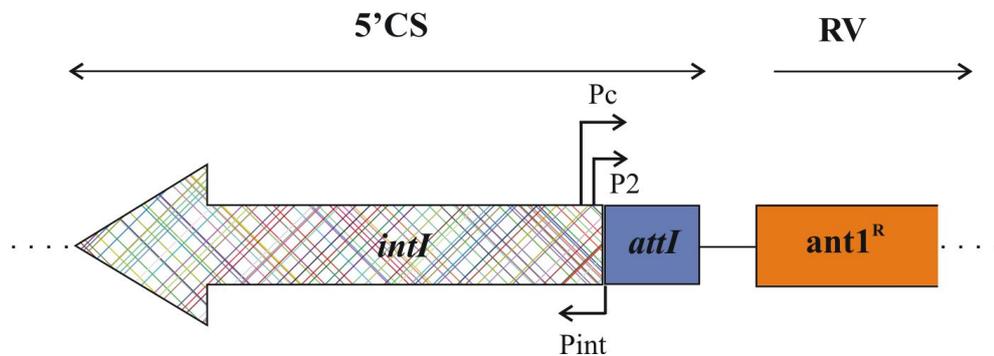


Figura 1.6. Estructura general de la región 5'CS de un integrón de resistencia. *intI*: gen codificante para la integrasa, *attI*: sitio de recombinación específico, P_c/P_2 : promotor de los genes integrados, P_{int} : promotor de la integrasa, $antI^R$: gene codificante para un determinante de resistencia a antibióticos, RV: región variable.

1.5.2. Genes en casete

Los genes en casete son moléculas de ADN circulares (cuando están libres) o lineales (cuando están integrados), no replicativas; en general poseen un solo gen (el cual puede codificar determinantes de resistencia a antimicrobianos) y un sitio de recombinación específico denominado *attC* o elemento de 59 -bases (59-be) (Hall y Stokes, 1991).

Los sitios *attC* difieren en tamaño (51-141 pb) y secuencia entre los diferentes casetes (Recchia y Hall, 1995). Sin embargo, comparten ciertas secuencias consenso de aproximadamente 25 pb a cada extremo (LH *-left hand-* y RH *-right hand-*), las que se encuentran repetidas e invertidas en forma imperfecta una respecto de otra (Collis y Hall, 1992; Stokes y col, 1997), y cada una de ellas comprende un par de dominios de unión a la integrasa (1L-2L y 1R-2R) orientados inversamente y separados entre sí por 7-8 pb (Stokes y col, 1997). En la figura 1.7 se muestran las estructuras mencionadas.

Las secuencias más conservadas entre los *attC* son las 7 pb que constituyen los sitios *core* (1L y 1R), los cuales se muestran como secuencias palindrómicas. La secuencia consenso de 1R es GTTAGGC o GTTRRRY (R = purina, Y = pirimidina) y está localizado *upstream* del gen de un casete integrado, y el sitio *core* inverso 1L, que se lo identifica con la secuencia consenso GCCTAAC o RYYAAC, queda ubicado

downstream del gen (Collis y Hall, 1992; Recchia y col, 1991). Las diferencias entre ambas regiones aseguran que los casetes se inserten en la orientación que permite su expresión (Collis y Hall, 1995; Stokes y col, 1997).

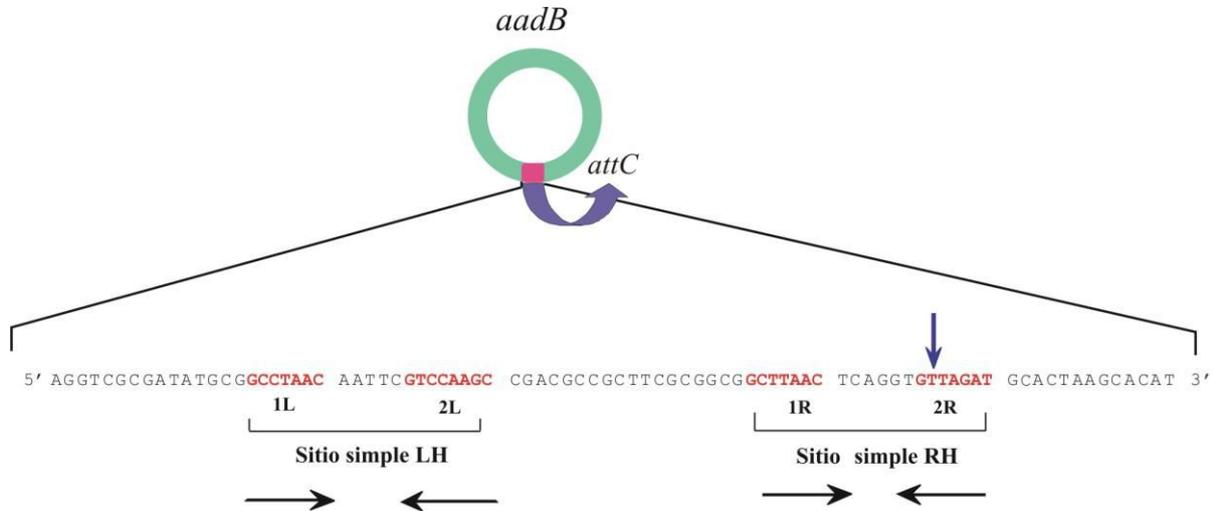


Figura 1.7. Estructura del sitio *attC* del gen en casete *aadB*. Se encuentran resaltados en color los posibles sitios core relacionados con las regiones de unión de la integrasa, y su orientación se indica debajo con flechas. También se muestran los potenciales sitios LH y RH. La flecha vertical indica el punto de recombinación. (Collis y col, 2001)

Los casetes génicos son identificados en general por el gen que codifican, o en el caso de contener marcos abiertos de lectura (ORF -*open reading frame*-) de función desconocida se asignan letras y números para identificarlos (Fluit y Schmitz, 2004; Hall y Collis, 1995). El tamaño de los casetes depende de la proteína para la cual codifique (Bennet, 1999; Fluit y Schmitz, 1999; Hall y Collis, 1995, Recchia y Hall, 1995). Los más de 100 casetes descritos confieren resistencia a casi todas las familias de antibacterianos (β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima, sulfamidas, cloranfenicol, rifampicina, lincosaminas, macrólidos, quinolonas) y además, a desinfectantes y antisépticos, según el trabajo de revisión realizado por Di Conza y Gutkind (Di Conza y Gutkind, 2010). Entre otras funciones, las proteínas codificadas por estos elementos pueden conferir resistencia a antibacterianos a través de diversos mecanismos: inactivación de enzimas (aminoglucósidos, cloranfenicol y β -lactámicos), desvío metabólico (trimetoprima), eflujo (cloranfenicol) (Recchia y Hall, 1995).

1.5.3. Clasificación de integrones

En un principio, la clasificación de estos elementos fue realizada en base a la secuencia nucleotídica del gen *intI*. Sin embargo, la descripción de una amplia variedad de integrasas en los más diversos organismos ha llevado a una nueva y más práctica forma de clasificación basada en una variedad de criterios, según la cual los integrones pueden agruparse en 2 grandes grupos (Di Conza y Gutkind, 2010):

I- Integrones de resistencia a antimicrobianos (también denominados integrones móviles): Generalmente, estos integrones presentan genes en casete de resistencia a antimicrobianos agrupados en la región variable del mismo. Dentro de esta clasificación se encuentran los integrones clase 1, 2 y 3. Por la característica antes mencionada, son los que presentan mayor relevancia clínica.

II- Integrones presentes en el cromosoma bacteriano (o superintegrones): Estos integrones fueron inicialmente descubiertos en el cromosoma de *V. cholerae*, y están formados por grandes arreglos de genes en casete (en general no relacionados a la resistencia a antimicrobianos, por ejemplo: genes codificantes para factores de virulencia).

Debido a la temática de esta tesis, se realizará una descripción más detallada de los integrones clase 1.

1.5.4. Integrones clase 1

Los integrones clase 1 son prevalentes entre bacterias provenientes de aislamientos clínicos y se hallan altamente asociados con bacilos gram negativos multirresistentes (Porto y col, 2005; Márquez y col, 2008).

En la región 5' conservada (5'CS) se encuentra el gen *intI1*, codificante para la integrasa de clase 1 y el sitio adyacente de recombinación *attI1*. Dentro de este segmento se encuentran uno o más promotores de la expresión de genes. Esta clase de integrones suele contener una región 3' conservada (3'CS) distintiva que comprende, en general, un gen que codifica resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔ1*), otro de resistencia a sulfonamidas (*sulI*), y un marco de lectura abierto de función desconocida (*orf5*) (Paulsen y col., 1993). Como se dijo anteriormente, la región variable (RV) de estos integrones esta conformada por los diferentes arreglos de genes

en casete integrados. Si bien se han descrito integrones sin genes en casete (región variable nula - In0) (Bissonnette y Roy, 1992) y con más de siete genes integrados en la RV (Laraki y col, 1999; Levesque y col, 1995; Naas y col, 2001; Poirel y col, 2001); la presencia de dos o tres genes en casete es lo observado con mayor frecuencia depositado en las bases de datos. La estructura típica de un integrón clase 1 se muestra en la figura 1.8.

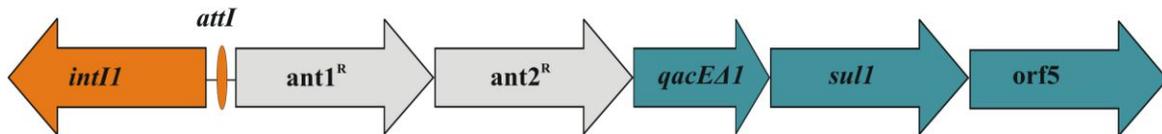


Figura 1.8. Esquema de un integrón clase 1. La región 5'CS se encuentra señalada en naranja, y en azul la región 3'CS. En color gris se muestra la región variable compuesta por los genes en casete de resistencia a antibióticos *ant1R* y *ant2R*.

De la definición de integrón se desprende que este elemento genético no posee movilidad propia. Por lo tanto, su amplia diseminación se debe a la asociación con elementos móviles, como secuencias de inserción, transposones y plásmidos conjugativos. Muchos de los integrones clase 1 se han localizado en elementos transponibles. El Tn402 es uno de los pocos transposones activos que lleva un integrón clase 1 típico, exceptuando el gen *sul1* en su región 3'CS. Además posee un módulo de transposición *tni* completo, y secuencias invertidas repetidas flanqueando toda la estructura. Por analogía de secuencia entre Tn402 y las regiones 3'CS atípicas detectadas en integrones clase 1 de aislamientos clínicos (Paulsen y col, 1993; Hall y col, 1994), se considera que este transposón sería un importante partícipe en la evolución hacia la estructura actual de los integrones clase 1 (Brown y col, 1996; Gillings y col, 2008). Otros transposones que se encuentran asociados a integrones clase 1 son Tn1404, Tn1696 y Tn21 (Partridge y col, 2001a; Partridge y col, 2001b; Partridge y col, 2002; Villa y col, 2002).

Como se muestra en la tabla 1.4, en nuestro país se han descrito un vasto número de integrones clase 1 con una gran variedad de genes en casete conformando distintas regiones variables en cada uno.

Tabla 1.4. Arreglos de genes en casete que codifican mecanismos de resistencia descritos en integrones clase 1 presentes en aislamientos clínicos de Argentina (Material extraído de Di Conza y Gutkind, 2010).

Arreglos de genes en casete	Especie bacteriana	Región	Referencia
<i>aadA1</i> -orfP-orfQ- <i>aadA1</i>	<i>S. maltophilia</i>	BA	Barbolla y col, 2004
<i>aacA7</i> - <i>bla</i> _{GES-1} - <i>aac(6)-Ib</i> -X- <i>bla</i> _{OXA-2}	<i>P. aeruginosa</i>	NE	Faccione y col, 2008
<i>aac(6)-Ib-cr</i> - <i>bla</i> _{OXA-30} - <i>catB3</i> - <i>arr-3</i>	<i>K. pneumoniae</i>	BA	Quiroga y col, 2007
<i>aac(6)-Ib</i> - <i>bla</i> _{OXA-2} -orfD	<i>S. Infantis</i> y otras	SF	Di Conza y col, 2002; Orman y col, 2002
	<i>P. mirabilis</i>	BA	Arduino y col, 2002
	<i>M. morgani</i>	BA	Power y col, 2005
	<i>V. cholerae</i>	SA	Soler Bistue y col, 2006
<i>ant(2'')-Ia-ant(3'')-Ia</i> -orfD	<i>Salmonella</i> spp.	NE	Orman y col, 2002
<i>aac(6)-Ib</i> - <i>aacA7</i> - <i>bla</i> _{GES-1}	<i>P. aeruginosa</i>	NE	Faccione y col, 2008
<i>bla</i> _{OXA-101} - <i>aac(6)-Ib</i>	<i>E. coli</i>	SF	Porto y col, 2010.
	<i>E. cloacae</i>	SF	Porto y col, 2010.
	<i>C. freundii</i>	SF	Porto y col, 2010.
<i>bla</i> _{VIM-2} - <i>aac(6)-Ib</i>	<i>P. putida</i>	BA	Almuzara y col, 2007
	<i>P. aeruginosa</i>	BA	Pagniez y col, 2006
<i>bla</i> _{VIM-11} - <i>aac(6)-Ib</i>	<i>P. aeruginosa</i>	BA	Pagniez y col, 2006
<i>bla</i> _{GES-1} - <i>aac(6)-Ib</i>	<i>P. aeruginosa</i>	BA y NE	Faccione y col, 2008; 86
<i>aac(6)-IIId</i> - <i>aadA1a</i>	<i>E. cloacae</i>	BA	Quiroga y col, 2007
	<i>E. aerogenes</i>	BA	Quiroga y col, 2007
	<i>C. freundii</i>	BA	Quiroga y col, 2007
<i>bla</i> _{IMP-13} - <i>aac(6)-Ib</i>	<i>P. aeruginosa</i>	BA	Cuirolo y col, 2006
<i>dfrA17</i> - <i>aadA5</i>	<i>E. coli</i>	SF	Porto, 2006
<i>aac(6)-Ib</i> - <i>aadA1</i>	<i>C. freundii</i>	SF y BA	Porto, 2006; Quiroga y col, 2007
	<i>E. cloacae</i>	BA	Quiroga y col, 2007
	NE	BA	Arduino y col, 2003
	<i>S. maltophilia</i>	BA	Barbolla y col, 2004
<i>aac(6)-Iq</i> - <i>aadA1</i>	<i>K. pneumoniae</i>	BA	Centron y Roy, 1998
<i>aadB</i> - <i>aadA1</i>	NE	BA	Arduino y col, 2003
<i>aacA4</i> - <i>bla</i> _{OXA-4}	<i>C. freundii</i>	BA	Arduino y col, 2003
<i>aadA1a</i>	<i>S. Typhimurium</i>	SF y NE	Di Conza y col, 2005; Orman y col, 2002
<i>catB2</i>	<i>S. maltophilia</i>	BA	Barbolla y col, 2004
<i>aacA4</i>	NE	BA	Arduino y col, 2003
orfD	NE	BA	Arduino y col, 2003

NE: no especificado, BA: Buenos Aires, SA: Salta, SF: Santa Fe. X: casete 4 de función desconocida. Algunos genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos presentan nomenclatura alternativa; de los casetes descritos, *aacA4* = *aac(6)-Ib*; *aadA* = *ant(3'')-Ia*; y que *aadB* = *ant(2'')-Ia*.

1.5.5. Integrones clase 1 inusuales

En 1990, un nuevo grupo de integrones clase 1 –denominados integrones clase 1 inusuales- fue descrito por primera vez por Hall (Hall y col, 1990). Estos integrones comienzan con las regiones típicas de los integrones de clase 1: contienen la región 5'CS y parte de la región 3'CS (3'CS1), sólo las primeras 1355 pb, flanqueando uno o más genes (Hall y col, 1990). A continuación de 3'CS1 se encuentra una región de 2154 pb idéntica entre esta clase de integrones. En esta región idéntica se encuentra el marco de lectura abierto *orf513* (*GenBank* L06418) y, en el extremo derecho del mismo un posible sitio de recombinación de 33 pb (*RCS-recombination crossover site*) seguidos por una región única en cada integrón que difiere en largo y secuencia de acuerdo a los genes que se encuentren insertos en la misma (Partridge y col, 2003), por ej.: *qnrB10* (In37) (Quiroga y col, 2007), *dfrA3b* (Arduino y col, 2003), *dfrA10* (In7), *catI* (In6) (Stokes y col, 1993), *bla_{DHA-1}* (pSAL-1) (Verdet y col, 2006), *bla_{CTX-M-9}* (In60) (Sabaté y col, 2002), *bla_{CTX-M-2}* (In35, InS21 e In116) (Arduino y col, 2002; Di Conza y col, 2002; Power y col, 2005). Estos genes sin embargo, no son genes en casete, ya que no poseen el sitio *attC* de recombinación. Adyacente a estas regiones únicas se encuentra la segunda región 3'CS (3'CS2) con diferentes deleciones en el extremo 5' (Partridge y col, 2003) (Figura 1.9).

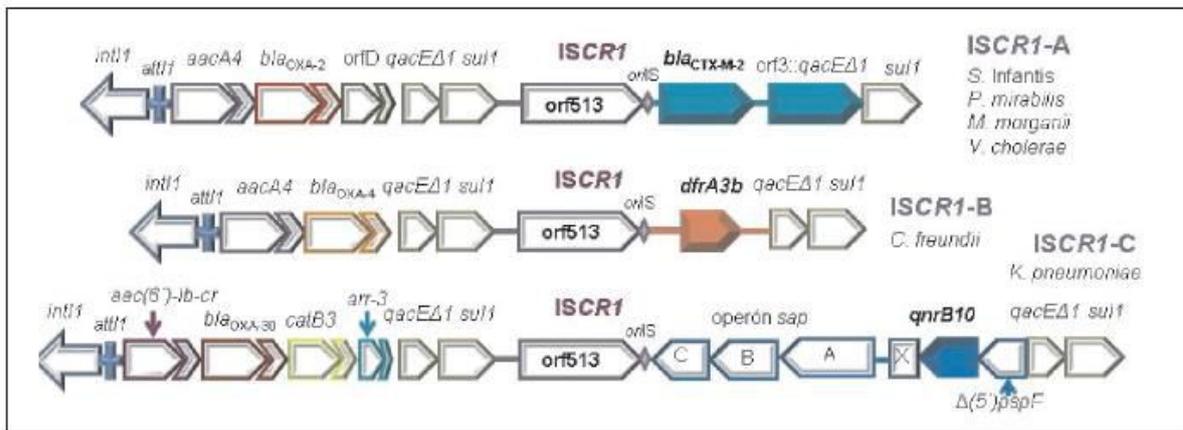


Figura 1.9. Integrones clase 1 inusuales: Algunas estructuras descritas en Argentina. En cada esquema se destaca en letra violeta el elemento ISCR1 (región conservada de 2,1 kb, incluye el *orf513*) que se halla estrechamente asociado a estos integrones clase 1 (110, 111). ISCR1-A, -B y -C corresponden a distintos ejemplos de ISCR1 descritos en Argentina, los que se han asociado con alelos que confieren resistencia a cefotaxima (Arduino y col, 2002; Di Conza y col, 2002; Power y col, 2005), a trimetoprima (Arduino y col, 2003) y a ciprofloxacina (Quiroga y col, 2007), respectivamente. En el gráfico se indican las especies bacterianas donde fueron descritos. (Extraído de Di Conza y Gutkind, 2010).

Se encuentra postulado que la proteína Orf513 podría estar involucrada tanto en el proceso de integración de genes (mayormente determinantes de resistencia a antimicrobianos) (Partridge y col, 2003) originando los integrones inusuales o complejos (Toleman y col, 2006a) como en el de captura de genes cromosomales y posterior propagación de los mismos en elementos móviles, como en el caso de el gen *bla_{KLUA-1}* de *Kluyvera ascorbata* (Arduino y col, 2003). La región donde se encuentra codificado *orf513* posee los componentes típicos de un elemento CR (región común). Pertenece a una familia de regiones comunes relacionadas entre sí, encontradas cercanas al extremo 3'CS de los integrones de clase 1. El análisis de la secuencia de estas regiones demostró que estas comparten características y motivos que permiten suponer que son elementos transponibles de la familia de las secuencias de inserción (IS) inusuales *IS91*. Por lo anterior, se ha propuesto denominar a estas regiones como secuencias de inserción CR (ISCR). Cada uno de estos elementos posee un único gen codificante para una posible transposasa. Si bien estas proteínas tienen identidad de secuencia aminoacídica variable entre ellas (53-95%), todas carecen del motivo DDE típico de la mayoría de las transposasas (Toleman y col, 2006b). Estas regiones se encuentran asociadas íntimamente con distintos genes de resistencia, aunque no necesariamente en integrones (Toleman y col, 2006a). Los elementos ISCR han sido clasificados teniendo en cuenta múltiples características, y a aquellos asociados a genes de resistencia (no como genes en casete) que forman parte de integrones clase 1 inusuales se los denominó *ISCR1* (Toleman y col, 2006a). Se encuentra reportado también que estos elementos *ISCR1* proveen un promotor (P_{CR1-1}) para la expresión de genes (no relacionados) integrados *downstream* de estos elementos (Rodríguez-Martínez y col, 2006).

IS91 y elementos relacionados (*IS801* e *IS1294*) son secuencias de inserción atípicas debido a que no poseen repeticiones invertidas presentes en la mayoría de los elementos IS (Bernal y col, 1999; Garcillán-Barcia y col, 2001). En cambio, las secuencias terminales de estos elementos (*oriIS* y *terIS*) son particulares y poseen diferentes funciones (Mendiola y col, 1994). Esto se debe a que su mecanismo de transposición es distinto, ya que utilizan el mecanismo de replicación *rolling circle* (RC) para transponerse (transposición RC) (Mendiola y col, 1994; Garcillán-Barcia y col, 2002).

La única proteína codificada por el elemento es la enzima transposasa, responsable del inicio y terminación de la replicación del elemento, previo al paso final de recombinación del evento de transposición (Tavakoli y col, 2000). *oriIS*, sirve como origen de replicación del elemento, mientras que el otro extremo, *terIS*, es el terminador de la replicación (Tavakoli y col, 2000; Garcillán-Barcia y col, 2002). Estudios realizados demostraron que la presencia del tetranucleótido GTTC y/o CTTG localizado en el sitio *target* es indispensable para que este sea reconocido por la transposasa codificada en *IS1294*, *IS91* e *IS801* (Mendiola y de la Cruz, 1989; Romanstchuk y col, 1991; Tavakoli y col, 2000).

A través del estudio del elemento *IS1294* se ha demostrado que este puede movilizar secuencias adyacentes a través de la transposición RC (Figura 1.10). Esto se produce por una lectura errónea de *terIS*, con lo cual, el ADN adyacente es replicado y movilizado. En el caso de *IS1294*, la frecuencia de este fenómeno fue de 1-10% respecto de los eventos de transposición normales (Tavakoli y col, 2000). Esta característica diferencia a este elemento de otras secuencias de inserción, ya que la mayoría sólo puede movilizar ADN adicional cuando este se encuentra flanqueado por dos copias del mismo elemento (Bennet, 2001; Hallet y Sherratt, 1997).

Como se ha indicado, una única copia de *IS1294* posee la capacidad de movilizar secuencias adyacentes, lo cual da fuerte evidencia para sostener la hipótesis que los elementos *ISCR* pueden movilizar genes, transponiéndose adyacente a estos en primer lugar, luego se produce un evento de transposición aberrante que moviliza el ADN adyacente a otro elemento genético (por ej. un plásmido conjugativo) y este diseminarlo mediante algún mecanismo de transferencias entre bacterias. Por lo anterior, los elementos *ISCR* se presentan como un sistema poderoso de movilización de genes, que en teoría puede movilizar cualquier tipo de ADN (a diferencia de los integrones que sólo movilizan ADN en forma de genes en casete).

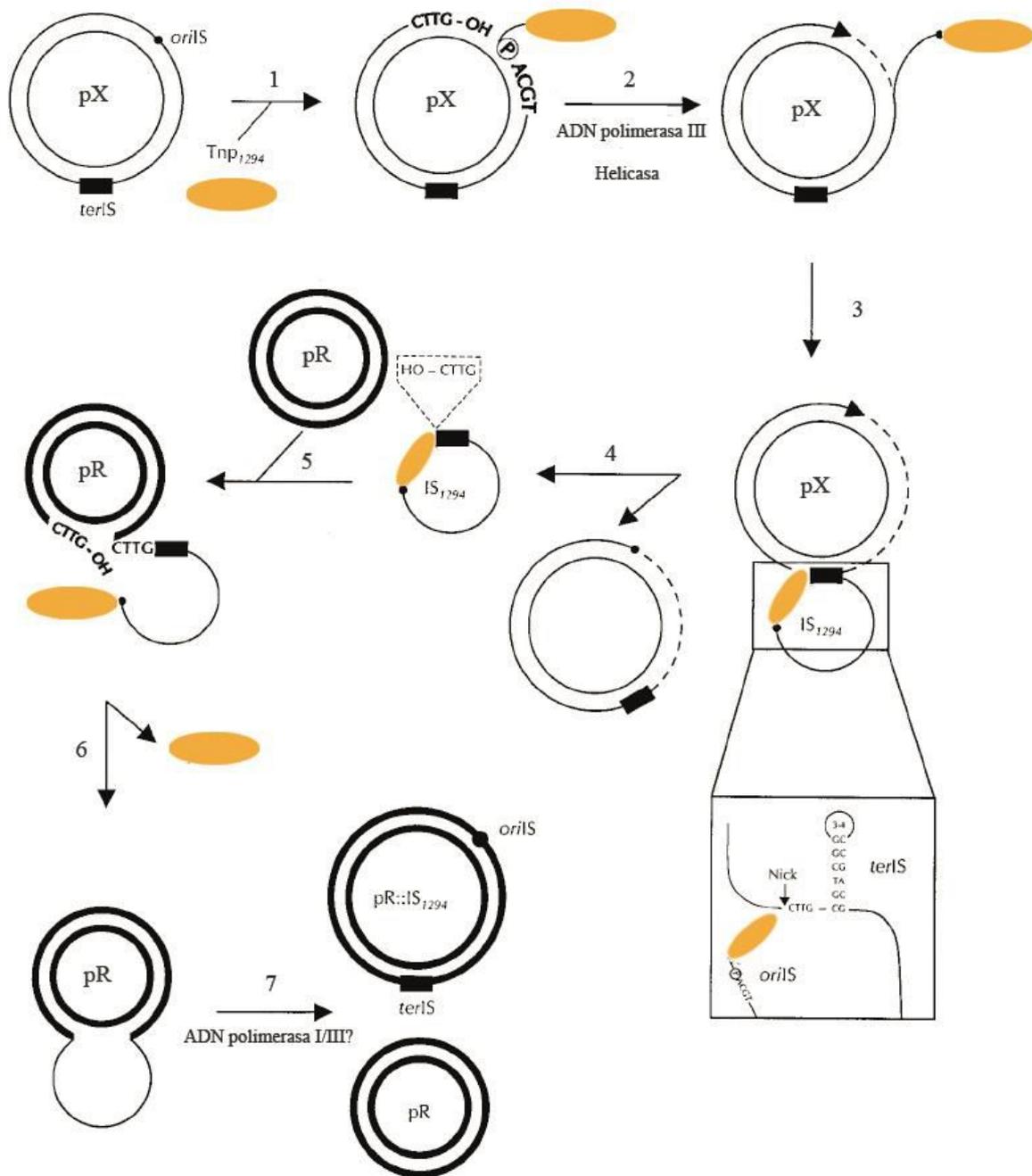
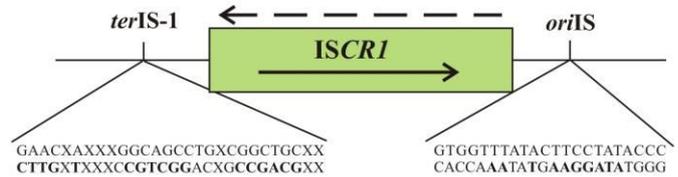


Figura 1.10. Modelo de transposición RC de IS1294. (Tavakoli y col, 2000) 1) La transposasa Tnp1294 reconoce y se une a un extremo de IS1294, en el oriIS. La secuencia específica de unión incluye al tetranucleótido CTTG, inmediatamente adyacente a oriIS. Se produce el corte de una hebra de ADN entre el sitio target, en general en GTTC, y el oriIS, liberándose así ADN simple hebra. 2) Se forma un complejo de replicación, unido de manera covalente, entre el ADN simple cadena y la transposasa, y se procede a la replicación del elemento IS, usando a la hebra intacta como molde. 3) El complejo ADN-IS1294 se desplaza progresivamente hasta encontrar la secuencia terIS. terIS adquiere una conformación de horquilla típica de secuencias terminadoras. 4) Se libera una forma simple cadena de IS1294, con la transposasa unida covalentemente en el extremo 5' y un grupo -OH en el extremo 3'. 5) El grupo -OH libre permite el ataque nucleofílico a un nuevo sitio de inserción reconocido por la transposasa (pR). 6) Por unión de IS1294 simple cadena a una hebra del nuevo sitio target se genera un heteroduplex de ADN. 7) Luego de la replicación del ADN se resuelve el heteroduplex y se obtienen 2 replicones: uno idéntico al original y otro con IS1294 incorporado (pR::IS1294).

ISCR1 es detectado en general formando parte de la estructura de un integrón clase 1 inusual, y, como se dijo anteriormente, en asociación con múltiples determinantes de resistencia a trimetoprima, quinolonas, aminoglucósidos, β -lactamasas. La secuencia *upstream* de *ISCR1* es la misma en todos los elementos estudiados, por lo tanto la unión entre *ISCR1* y la secuencia adyacente a 3'CS es invariable, lo cual sugiere que un único evento es el responsable de la inserción de este elemento en integrones clase 1. La secuencia de *ISCR1* es más corta que las de *IS91* y elementos relacionados, ya que *ISCR1* no posee *terIS*. (Toleman y col, 2006). Es esta última característica la que le confiere a *ISCR1* la capacidad de co-transponer la secuencia adyacente, ya que frente a un evento de replicación de la secuencia de inserción, la enzima continúa replicando las secuencias adyacentes hasta detectar un terminador alternativo (Figura 1.11).

Debido a las características antes mencionadas, la presencia de *ISCR1* como parte de integrones de clase 1 inusuales y su asociación creciente con determinantes de resistencia cada vez más efectivos es el aspecto más preocupante clínicamente, ya que este vehículo genético altamente móvil proveería a la bacteria de mecanismos de resistencia a antimicrobianos rápidamente, superando quizás a los otros elementos genéticos móviles descritos hasta el momento.

A



B

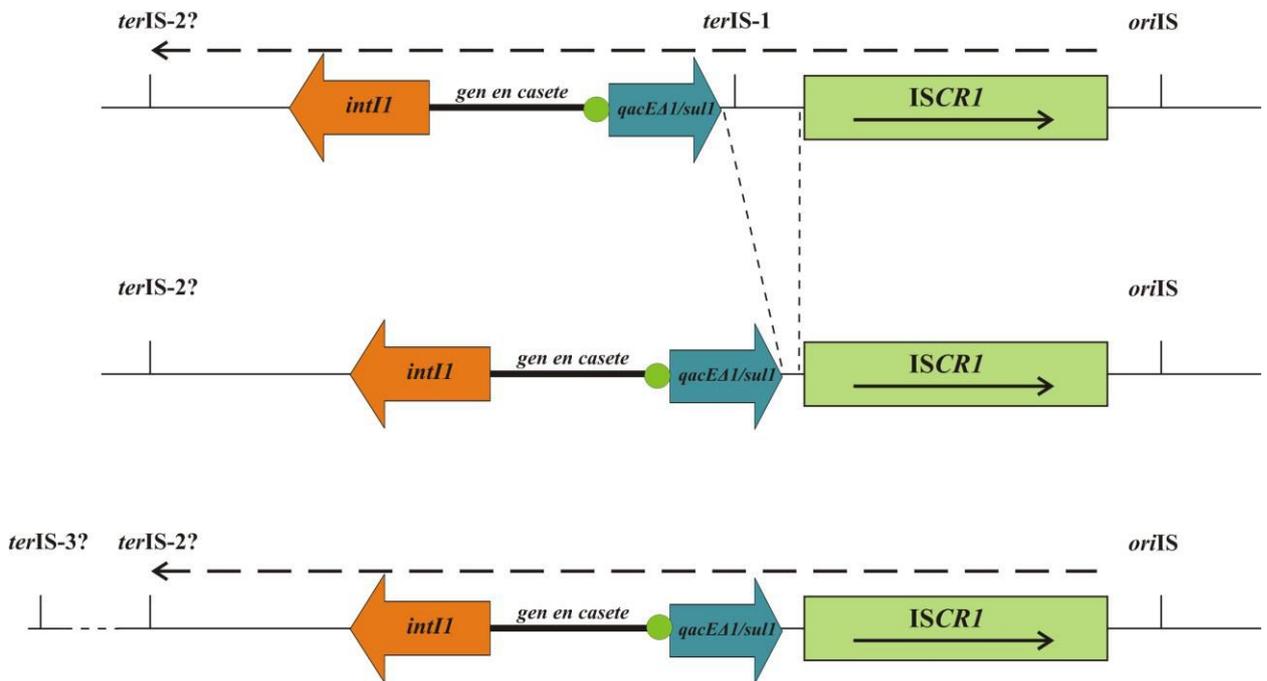


Figura 1.11: Movilización de genes por ISCR1 en integrones inusuales. A) *oriIS* y *terIS-1* son los sitios de inicio y terminación, respectivamente, de ISCR1. Las secuencias subrayadas están en sentido 5'-3', los nucleótidos en negrita son los idénticos a la secuencia consenso de esas regiones para IS91, IS1294 e IS801 (Tavakoli y col, 2000). La flecha sólida indica la dirección de la transcripción y la flecha interrumpida el origen y sentido de la replicación. B) El primer evento involucra la transposición de un progenitor de ISCR1 adyacente a la región 3'CS. Por un error de lectura de la transposasa, la replicación no culmina en *terIS-1*, sino en una secuencia alternativa *terIS-2*, por lo cual el segmento entre la región 3'CS y el *terIS-1* es eliminado y se produce la fusión integron-ISCR1. Luego de este suceso, ISCR1 posee la capacidad de movilizar genes adyacentes a través de la transposición RC posiblemente reconociendo como terminadores otras secuencias (*terIS-2* o *terIS-3*). Adaptado a partir de Toleman y col, 2006.

1.5.6. Dinámica de los integrones

La integración de los casetes génicos mediada por la enzima IntI ocurre a través de un mecanismo de recombinación específico de sitio², con mayor frecuencia a través de la interacción entre *attI* y el sitio *attC* o elemento de 59 pb (59-be) de los casetes genéticos (aunque también puede ocurrir una interacción entre dos sitios *attC* o 59-be), uniendo ambos sitios y facilitando la integración o escisión (Figura 1.12) del casete de resistencia (Collis y col, 2001).

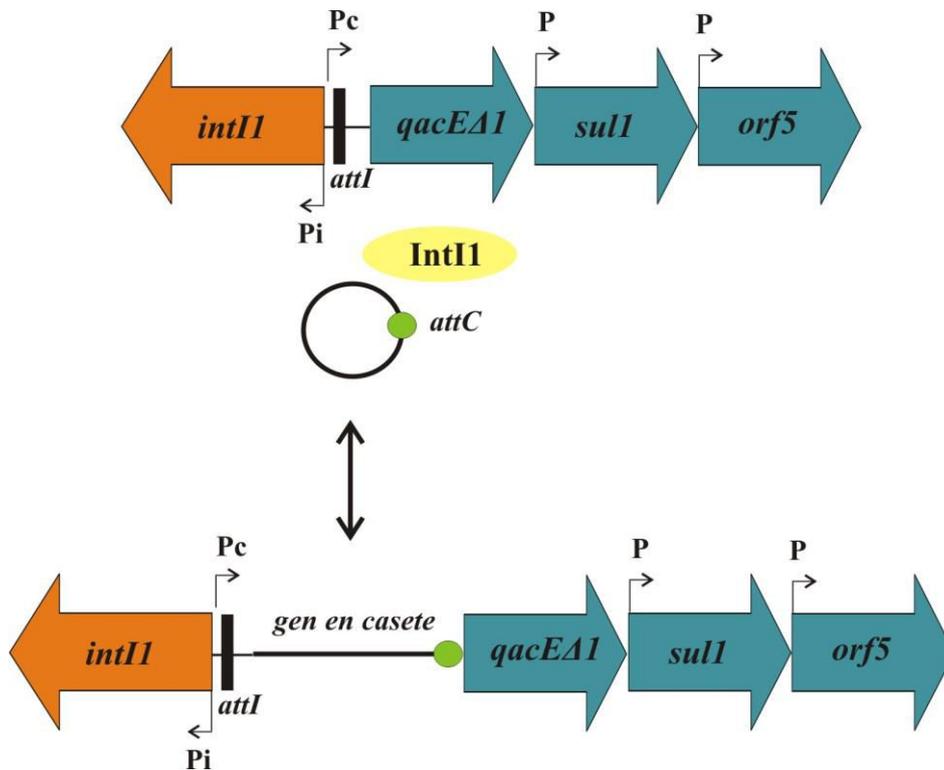


Figura 1.12. Modelo de integración y escisión de casetes. *intI*, gen codificante de la integrasa; *attI*, sitio de recombinación del integrón; *attC*, sitio de recombinación del gen en casete; *Pc* y *P_i*, promotores, *IntI1*: integrasa de clase 1.

² Recombinación específica de sitio: Este tipo de recombinación no requiere homología de secuencias entre el exogenote y el endogenote. En cambio, requiere de la presencia de enzimas que reconozcan regiones específicas de estas dos moléculas de DNA, las cuales pueden tener o no secuencias en común, y promover la recombinación entre esas dos regiones. Algunos de los procesos que utilizan este modo de recombinación genética son: transposición, la integración y escisión de profagos y otros elementos genéticos, la inversión de secuencias invertidas y la resolución de cointegrados mediada por resolvasas.

El movimiento de genes en casete o de regiones variables asociadas a *ISCR1* es un proceso aleatorio, como la mayoría de los otros rearrreglos genéticos en bacterias. La selección natural (a través de una presión selectiva, por ejemplo) es la que determina qué rearrreglo es favorable y cuál no. Es decir, si la expresión del nuevo gen supone un beneficio para la bacteria, debido a que ésta se encuentra en un ambiente donde exista un determinado antibacteriano frente al que el gen en cuestión confiere resistencia, la bacteria dispondrá de una ventaja selectiva que le permitirá desplazar a las demás.

A pesar de que los integrones no tienen movilidad genética, los mismos pueden ser diseminados en el ambiente a través de su asociación con secuencias de inserción (IS), plásmidos conjugativos y/o transposones, los cuales pueden servir de vehículo para la transmisión de material genético.

De lo anteriormente expuesto, es claro que los integrones funcionan como sistemas de captación de genes que confieren ventajas selectivas para la bacteria. Dada su capacidad para reconocer una amplia variedad de secuencias de recombinación, su capacidad de intercambio y origen remoto, estas estructuras permiten a las bacterias una rápida adaptación a los cambios ecológicos, cuyo ejemplo más reciente corresponde sin duda al advenimiento de la moderna era de la quimioterapia antimicrobiana.

2. Objetivos

2- Objetivos

El objetivo general de este trabajo estuvo centrado en el estudio de la epidemiología regional de los integrones clase 1 inusuales y la caracterización funcional de las proteínas codificadas por *ISCR1* y *bla*_{OXA-101}.

Se encuentra postulado que *ISCR1* contiene un marco abierto de lectura, *orf513*, que codificaría para una posible recombinasa, es por esto que se ha formulado la hipótesis de una función vital del mismo en la evolución y diseminación de la resistencia a antimicrobianos para lo cual debería interactuar con regiones de ADN que permitan la movilidad de estos elementos.

OXA-101 es una β -lactamasa clase D derivada de OXA-10 que ha sido detectada en un estudio previo en 3 especies de enterobacterias distintas, formando parte de la región variable de un integrón clase 1 como gen en casete.

Para poder cumplir estos objetivos generales, se programaron los siguientes objetivos puntuales:

Acerca de integrones clase 1

- Investigar la presencia de integrones clase 1 inusuales en aislamientos clínicos de enterobacterias aisladas en 2 centros de salud de la ciudad de Santa Fe.
- Realizar la caracterización molecular de los integrones detectados, mediante detección de regiones conservadas en los mismos, posterior amplificación y análisis de regiones variables.
- Analizar la presencia de genes *qnr* (alelos A, B y S) y β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) prevalentes en Argentina en los integrones inusuales detectados.

Acerca de ISCR1

- Obtención y expresión (de forma recombinante) de la proteína Orf513 y posterior purificación de la misma.

- Estudio de la interacción de la enzima con distintas secuencias de ADN a fin de poder determinar la/s secuencia/s involucradas en la interacción proteína-ADN.

Acerca de bla_{OXA-101}

- Realizar la caracterización molecular del gen *bla_{OXA-101}*.
- Estudiar su localización genética y transferibilidad.
- Obtener la proteína OXA-101 en forma recombinante para efectuar su caracterización bioquímica.

3. Materiales y Métodos

3- Materiales y Métodos

3.1. Microorganismos empleados

3.1.1. Aislamientos clínicos

Relevamiento 1:

Se estudiaron 90 enterobacterias recolectadas en el Hospital J. M. Cullen de la Ciudad de Santa Fe durante el mes de marzo del año 2005. Los aislamientos provenían de diversas muestras clínicas de pacientes ambulatorios e internados: orina, sangre y materia fecal. Solo se analizó un aislamiento por paciente para disminuir la posibilidad de relaciones clonales entre los aislamientos.

Relevamiento 2:

Los aislamientos de enterobacterias analizados en este estudio fueron provistos por el Laboratorio del Sanatorio Diagnóstico, Área Microbiología Clínica, de la Ciudad de Santa Fe, provenientes de muestras de pacientes tratados en distintos sectores de la institución. Se seleccionaron 34 microorganismos aislados entre febrero y agosto de 2007, con resistencia simultánea a oximino-cefalosporinas y fluoroquinolonas.

3.1.2. Estudios moleculares

Las cepas receptoras en los ensayos de transformación fueron:

- *E. coli* DH5 α (F⁻, *endA1*, *hsdR17* (r_k⁻ m_k⁺), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96* (Nal^R), *relA1* Δ (*lacIZYA-argF*)U169, *deoR*, (Φ 80*dlac* Δ (*lacZ*)M15)) (Invitrogen, USA).
- *E. coli* Top10F' {*lacIq*, Tn10(Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R)*endA1 nupG* (Invitrogen).

Estas cepas fueron utilizadas en ensayos de transformación con ADN plasmídico. Se utilizaron para el *screening* de colonias azules y blancas ya que permiten α -complementación del gen de la β -galactosidasa. La deficiencia en la endonucleasa

endA1 y/o la recombinasa *recA1* (con lo cual no hay posibilidad de recombinación homóloga) aumenta la estabilidad del inserto, además del rendimiento y calidad del ADN plasmídico.

- *E. coli* BL21 (DE3) F⁻ *ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm* (DE3) (Novagen, USA).

Esta cepa fue utilizada para la producción de proteínas recombinantes. BL21 (DE3) es lisógena del bacteriófago DE3, el cual es un derivado del fago λ que posee la región de inmunidad del fago 21 y acarrea un fragmento de ADN que contiene el gen *lacI*, el promotor *lacUV5*, y el gen codificante para la enzima T7 RNA polimerasa. El promotor *lacUV5* dirige la transcripción de la T7 RNA polimerasa y es inducible por el agregado de IPTG; por lo cual cuando éste se añade a un cultivo en crecimiento induce la transcripción de genes clonados en vectores apropiados, los cuales deben poseer las señales de transcripción del fago T7, en este trabajo se utilizaron vectores de la familia pET (Novagen). Además, esta cepa es deficiente en la proteasa *lon* y no posee la proteasa de membrana externa *ompT*, lo cual dificulta la degradación de la proteína durante el proceso de purificación.

- BL21 Rosetta (DE3) (pLysS) F⁻ *ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm* (DE3) pLysS (CamR) (Novagen)

Además de las características antes mencionadas para BL21 (DE3), esta cepa contiene el plásmido pACYC184, el cual posee el gen codificante para la lisozima del fago T7. Esta enzima se expresa constitutivamente a niveles bajos e inhibe los niveles basales de la RNA polimerasa de T7 y, de este modo, reduce el nivel basal de expresión del gen clonado.

- MP101 (DE3) F⁻ *ompT, hsdSB(r-m⁻), lac O^c, gal dcm* (DE3) (Menzella y col, 2002).

Esta cepa es una derivada de BL21 (DE3), posee dos modificaciones introducidas mediante ingeniería genética. Una de ellas es el cambio del operador *lac wild-type* por uno constitutivo (*lacO^c*), y el otro es el reemplazo de los alelos *gal*, para recuperar el

fenotipo Gal⁺. Ambos cambios favorecen la utilización de lactosa como inductor de la expresión.

Para los ensayos de conjugación se utilizó como receptora la cepa:

- *E. coli* CAG 12177 (F⁻, λ⁻, zej-298 :: Tn10 (Tet^R), gyrA261 (Nal^R), rph-1).
- *E. coli* HB101 (F⁻ mcrB mrr hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm^R) glnV44 λ⁻).

Las cepas empleadas como testigos o controles fueron:

- *E. coli* J53: productora de la β-lactamasa TEM-1 (cedida por A. Medeiros, Miriam and Rhode Island Hospitals and Brown Medical School, USA).
- *E. coli* 1353: productora de las β-lactamasas TEM-1 y CTX-M-2. (Radice M.A., 1998, Tesis Doctoral, UBA).
- *Salmonella enterica* serovar Infantis 21: portadora de un integrón clase 1 inusual (*intI1* e *ISCR1* positiva) y productora de las β-lactamasas TEM-1, OXA-2 y CTX-M-2 (Di Conza y col, 2002).
- *Citrobacter freundii* 33587: productora de las β-lactamasas TEM-1 y PER-2 (Power y col, 2007).
- *Klebsiella pneumoniae* B1 *qnrB1* (+) (Jacoby y col., 2006)
- *Escherichia coli* S7 *qnrS1* (+) (Poirel y col., 2006b).
- *Escherichia coli* Lo *qnrA1* (+) (Poirel y col., 2006b).

Estos últimos tres microorganismos fueron gentilmente cedidos por Patrice Nordmann (Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital de Bicêtre, Bicêtre, Paris).

3.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta tesis se detallan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Plásmidos utilizados.

Vector	Uso	Características	Tamaño (pb)	Proveedor
pGEM-T	Clonado de productos de PCR amplificados con <i>Taq</i> polimerasa.	AMP ^R α-complementación de <i>lacZ</i> ¹ Selección colonias azules y blancas.	3015	pGEM®-T Easy vector system I, Promega, USA
pET22b+	Clonado de genes para su expresión y posterior producción.	AMP ^R Promotor <i>T7lac</i> <i>His-tag</i> ² C-terminal	5493	Novagen
pET28a+/b+	Clonado de genes para su expresión y posterior producción.	KAN ^R Promotor <i>T7lac</i> <i>His-tag</i> ² N y C-terminal	5369	Novagen

¹gen codificante para la enzima β-galactosidasa. ²*His-tag*: cola de 6 histidinas que se agregan a la proteína recombinante.

3.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados se detallan en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Oligonucleótidos sintéticos.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Referencia
I5 (IntI1 F)	ACCGCCAACTTTCAGCACAT	Di Conza y col, 2002 M95287
I3 (IntI1 B)	GCGTTCGGTCAAGGTTCTGG	
5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC	Sandvang y col, 1997. M73189
3'CS	AAGCAGACTTGACCTGAT	
qacEΔ1F	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	Sandvang y col, 1997. X15370
Sul1B	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	Sandvang y col, 1997. X12869

Sigue en página 50

Nombre	Secuencia (5'→3')	Referencia
OXA-101-B	GAAGGATCCATGAAAACATTTGCCGC	Esta tesis
OXA-101-H	CTAACAAGCTTGCCACCAATGATGCC	Esta tesis
OXA-10F	GCCATGAAAACATTTGCCGC	Esta tesis
OXA-10R	GCCACCAATGATGCCCTCAC	Esta tesis
orf513-Nco	CCCCCATGGAAATGTCGCTGGCAAGG	Esta tesis
orf513-Bam	AGGGGATCCATGTCGCTGGCAAGGAACGC	Esta tesis
orf513-Xho	ATTTGCTCGAGGTCAAAGAGACGACTCTG	Esta tesis
orf513-NF	GGCCATGGGGATGTCGCTGGCAAGGAA	Esta tesis
orf513-XR	TGCTCGAGGTCAAAGAGACGACTCT	Esta tesis
341a	CGCCCACTCAAACAAACG	
341b	GAGGCTTTGGTGTAAACCG	Sabaté y col, 2002.
341-stop	ACATTAGTCGGCCAGCGG	
HS821	GTTTCGATCCATCACAGAGTCG	Chowdhury y col, 2011.
HS822	AGCTGTCGATTGAAACACGG	
QnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	Cattoir y col, 2007b
QnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	
QnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	Cattoir y col, 2007a.
QnrBm-R	TTTGCYGYCCGCCAGTCGAA	

Sigue en página 51

Nombre	Secuencia (5'→3')	Referencia
QnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	Cattoir y col, 2007b.
QnrSm-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	
PER-2A	ATGAATGTCATCACAAAATGTGT	Power y col, 2007
PER-2B	TCAATCCGGACTCACTGCAG	
BlaI	TTAATGATGACTCAGAGCATT	X92507
BlaII	GATACCTCGCTCCATTTATTGC	X92507
blaTEM-I	ATGAGTATTCAACATTTCCG	J01749
blaTEM-II	CCAATGCTTAATCAGTGAGC	J01749
oriISCR1-a	[6FAM]GTTTCGGGTATAGGAAGTATAAACCA	Esta tesis
oriISCR1-b	TGGTTTATACTTCCTATAACCCGAAC	Esta tesis
oriIS1294-a	[6FAM]GTTTCACGTATAGGAAATTGAAAAAC	Esta tesis
oriIS1294-b	GTTTTTCAATTCCTATACGTGAAC	Esta tesis
oriIS91-a	[6FAM]GTTTCATCGATAGGAATTTAAATCCC	Esta tesis
oriIS91-b	GGGATTTAAATTCCTATCGATGAAC	Esta tesis
terIS1294-a	TTGCAGCCGCCAGGCTGCCGTGGTTC	Esta tesis
terIS1294-b	[6FAM]GAACCACGGCAGCCTGGCGGCTGCAA	Esta tesis
terIS91-a	CCGCAGCCGCCAGGCTGCCTACTCGTTC	Esta tesis
terIS91-b	[6FAM]GAACGAGTAGGCAGCCTGGCGGCTGCGG	Esta tesis
oriISCR1-bB	[Biotina]TGGTTTATACTTCCTATAACCCGAAC	Esta tesis

Sigue en página 52

Nombre	Secuencia (5'→3')	Referencia
oriIS1294-bB	[Biotina]GTTTTTCAATTCCTATACGTGAAC	Esta tesis
oriIS91-bB	[Biotina]GGGATTTAAATTCCTATCGATGAAC	Esta tesis
terIS1294-aB	[Biotina]TTGCAGCCGCCAGGCTGCCGTGGTTC	Esta tesis
terIS91-aB	[Biotina]CCGCAGCCGCCAGGCTGCCTACTCGTTC	Esta tesis
341aF	[6FAM] CGCCCACTCAAACAAACG	Esta tesis
bla-up	[Cy5] GGCTTCCAGCTGCTGTTGCAC	Di Conza y col, 2005b
bla-down	TTGACTGACGACCCCAAATCC	

3.4. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detallan a continuación.

- LB: Tripteína (Britania, Argentina) 10 gr/l, NaCl (Cicarelli, Argentina) 5 gr/l, Extracto de levadura (Britania) 5 gr/l. pH 7.
- LBg: LB suplementado con glucosa 20%.
- 2XYT: Tripteína (Britania) 16 gr/l, NaCl (Cicarelli) 5 gr/l, Extracto de levadura (Britania) 10 gr/l. pH 7.
- TB: Peptona (Britania) 12 gr/l, Extracto de levadura (Britania) 24 gr/l, K₂HPO₄ (Cicarelli) 72 mM, KH₂PO₄ 17 (Cicarelli) mM, glicerol 4 ml/l.
- M9: en primer lugar se preparó el medio de cultivo M9 5x (30 g/l Na₂HPO₄, 15 g/l KH₂PO₄, 5 g/l NH₄Cl, 2.5 g/l NaCl, 15 mg/l CaCl₂) y previo a su uso, el medio concentrado fue diluído hasta 1x con H₂O destilada estéril y se añadieron las siguientes soluciones estériles: 1 ml/l 1 M MgSO₄·7H₂O, 10 ml/l glucosa 20% y 5 ml/l de casaminoácidos 20%.
- Müeller Hinton (Britania).

3.5. Conservación de microorganismos

Una vez verificada la pureza de los aislamientos, estos fueron conservados a -20°C y -80°C en caldo de cultivo usando como crioprotector glicerol al 20% (v/v).

3.6. Técnicas fenotípicas utilizadas en el estudio de la resistencia a antibacterianos.

3.6.1. Antibacterianos.

Los discos de antibacterianos utilizados para los ensayos cualitativos de la sensibilidad antimicrobiana fueron:

- β -lactámicos: ampicilina (AMP), cefalotina (CEF), cefotaxima (CTX), cefoxitina (FOX), cefepime (FEP) (Britania), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) (OXOID, Inglaterra);
- Aminoglucósidos: gentamicina (GEN) y amikacina (AMK) (Britania);
- Antifolatos: sulfisoxazol (SUL) (Britania), trimetoprima (TM), trimetoprima/sulfametoxazol (TMS), (OXOID);
- Otros antibacterianos: cloranfenicol (CMP), tetraciclina (TET) y ácido nalidíxico (NAL) (Britania).

Las drogas sólidas utilizadas en este trabajo fueron: KAN, AMP (Laboratorios Klonal, Argentina), OXA (Sigma, USA), CIP (Laboratorios Roemmers, Alemania) y NAL (Laboratorios Delta, Bolivia).

Las soluciones de antibacterianos fueron preparadas en el laboratorio y esterilizadas por filtración empleando filtros *Millipore* (poro: 0.2 μ m).

3.6.2. Determinación cualitativa de la resistencia de los microorganismos.

La sensibilidad a los distintos antibacterianos ensayados se determinó por el método de difusión en medio sólido siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI, 2010).

3.6.3. Determinación cuantitativa de la resistencia de los microorganismos.

La concentración inhibitoria mínima frente a los antibacterianos fue determinada mediante el método de dilución en medio sólido, siguiendo las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2010).

El rango de diluciones ensayadas varió entre 1024 µg/ml y 0.03 µg/ml según el antibacteriano. Resumidamente, se mezclaron 2 ml de las distintas diluciones de los antibacterianos con 38 ml de agar Mueller Hinton, previamente fundido y termostatzado a 45 °C. Cada concentración de antibacteriano se ensayó por duplicado.

Las suspensiones de los diferentes microorganismos fueron realizadas en solución fisiológica (NaCl 0.85% (p/v)) estéril para obtener una turbidez de 0.5 en la Escala MacFarland ($\approx 10^6$ UFC), luego se realizó una dilución 1/10 en solución fisiológica de la suspensión anterior, de manera de obtener una concentración final de 10^4 - 10^5 UFC.

Luego, cada una de las suspensiones bacterianas se inoculó sobre la superficie de los medios agarizados (≈ 2 µl) con un multi-inoculador de “Steers”.

Los inóculos de cada microorganismo fueron de aproximadamente 10^3 - 10^4 UFC.

Las placas sembradas fueron incubadas durante 18-24 hs a 37°C.

3.6.4. Metodología para confirmar fenotípicamente la presencia de BLEE.

Para la confirmación de BLEE se ensayaron discos de CTX (30µg) y CAZ (30µg) suplementados con 10 µg de clavulanato de litio en agar Mueller-Hinton, siguiendo los lineamientos propuestos por el CLSI (CLSI, 2010). Se compararon los diámetros de halos de inhibición de los discos con y sin inhibidor. Un incremento ≥ 5 mm en el halo de inhibición del disco que contiene inhibidor fue considerado positivo para la presencia de BLEE.

3.7. Estudio de la localización de genes de resistencia

3.7.1. Conjugación en medio sólido.

El/los antibacteriano/s utilizados para seleccionar las células transconjugantes dependieron de las resistencias a antimicrobianos de las cepas utilizadas como receptora y dadora. El procedimiento utilizado se detalla a continuación:

1. Se inocularon 5 ml de medio LB con las cepas a conjugar y se incubaron durante 16-18 hs a 37°C.
2. Sobre una placa de agar LB se colocó una porción de membrana de acetato de celulosa estéril; sobre la membrana se colocaron 40 µl del cultivo de células dadoras y el mismo volumen de receptoras. Se incubó a 37°C 24 hs.
3. Se retiró asépticamente la membrana, se colocó dentro de un tubo estéril y se resuspendieron las células con caldo LB o solución fisiológica (aproximadamente 3 ml). Se centrifugó (5 min a 3.000 rpm), se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en el remanente. El concentrado se sembró en distintas placas de LBA con el sistema de selección apropiado.

3.8. Ensayos de transformación

3.8.1. Transformación de bacterias por técnica clásica.

1. Preparación de células competentes:

Células de *E. coli* de la cepa deseada se cultivaron en medio LB a 37 °C y en agitación hasta saturación. El cultivo saturado fue diluido 100 veces en el mismo medio fresco e incubado en las mismas condiciones hasta $DO_{600} = 0,5-0,6$. Las células fueron separadas en alícuotas de 1 ml de este cultivo en tubos estériles, centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y resuspendidas en 500 µl de ST1 (MOPS 10 mM, KCl 10 mM, pH 7). Luego de una nueva centrifugación en idénticas condiciones que la anterior, las células se resuspendieron en 500 µl de ST2 (MOPS 100 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, pH 6,5) y se incubaron al menos 15 minutos a 0°C (en hielo). Se repitió la centrifugación y las células colectadas se resuspendieron en 100 µl de ST2.

II. Transformación de células competentes:

A 100 μ l de una suspensión de bacterias competentes se agregó la mezcla de ligación o ADN plasmídico. La mezcla se incubó 1 hora en hielo, luego de lo cual se realizó el choque térmico durante 45 segundos a 42°C. Posteriormente las células fueron diluidas en 1 ml de LB e incubadas 1 hora a 37°C. Finalmente, se centrifugaron 5 minutos a 4.800 rpm a temperatura ambiente y se eliminó 1 ml de sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en los 100 μ l restantes y el volumen total fue sembrado en placas con LB y el sistema de selección adecuado; incubando luego a 37 °C durante 16-20 hs.

En cada transformación se realizó un control negativo con células competentes sin el agregado de ADN y un control para verificar la viabilidad y el grado de competencia de las células utilizadas, agregando como control positivo ADN plasmídico (vector pUC-18, 10 ng/ μ l).

3.8.2. Transformación de bacterias por el método de electroporación.

I. Preparación de células electrocompetentes.

Las bacterias fueron crecidas toda la noche en agitación, a 37°C, en medio LB. El cultivo fue luego diluido 1/50 en medio LB fresco y se incubó en iguales condiciones hasta $DO_{600} = 0,5$. Luego fue colocado en hielo durante 1 hora. A continuación se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 volumen de H₂O *milliQ* estéril pre-enfriada. Se dejó 15 min en hielo y se centrifugó en las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron suavemente las células en 4/5 volumen de glicerol al 10% estéril pre-enfriado a 4°C. Se repitió el lavado con glicerol al 10%, se volcó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el volumen remanente. Se prepararon alícuotas en tubos estériles pre-enfriados de a 40 μ l y se conservaron a -80°C hasta su uso.

II. Transformación de células electrocompetentes.

A 40 μ l de una suspensión de células competentes se le adicionaron 1 o 2 μ l de ADN de baja fuerza iónica. Se incubó en hielo 1 minuto. Se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación estéril de 0,2 cm de paso (*Gene Pulser/MicroPulser cuvette*, BIO-

RAD). Luego se sometió a las células a un pulso eléctrico (25 μ F, 2500 V, 200 Ω) utilizando un electroporador *Gene Pulser II Electroporation System*, BIO-RAD. Se añadió inmediatamente 1 ml de medio SOC. Se transfirió la suspensión de células a un tubo estéril de 10 ml y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación. Se plaqueó todo el volumen en LBA con la adición del antibacteriano correspondiente y se incubó a 37°C durante 18-24 hs.

3.8.3. Análisis de colonias bacterianas por la presencia de plásmidos recombinantes.

Se realizó un análisis visual en el caso de transformaciones realizadas con cepas y vectores apropiadas para observar α -complementación, discriminando las colonias azules y blancas. Los vectores utilizados para tal fin (pUC18, pK19, pGEM-T) incluyen un segmento de ADN de *E. coli* que contiene la secuencia regulatoria (promotor *lac*) y un fragmento inicial del gen de la β -galactosidasa, *lacZ*. Dentro de esta región se encuentra el sitio de múltiple clonado del plásmido, que da lugar a una pequeña deleción en la región N-terminal del fragmento de la β -galactosidasa. Cuando estos vectores se usan para transformar células que codifican en su cromosoma la región C-terminal de esta enzima (*E. coli* DH5 α , Top10F'), ambos fragmentos se asocian para dar una proteína enzimáticamente activa. Este tipo de ensamble se denomina α -complementación. Las bacterias resultantes en presencia de un sustrato cromogénico (X-gal) y un inductor (IPTG), agregados al agar, forman colonias azules. Cuando se produce la inserción de un fragmento de ADN dentro del sitio de clonado, el fragmento N-terminal de la β -galactosidasa no se transcribe, por lo cual no puede sintetizarse la enzima activa. En consecuencia, la bacteria forma colonias blancas.

Las colonias blancas obtenidas en los ensayos de transformación fueron analizadas por PCR y/o miniprep de ADN plasmídico y posterior digestión con enzimas de restricción.

En el caso de las transformaciones realizadas con los vectores de expresión pET, las bacterias que potencialmente contenían el plásmido de interés se analizaron por PCR de colonia, miniprep y digestión con enzimas de restricción, cuyos productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 0,8-1%.

3.9. Técnicas utilizadas para el estudio del ADN

3.9.1. Extracción de ADN plasmídico.

Para la extracción de ADN plasmídico de los aislamientos en estudio se ensayaron diferentes técnicas: técnica de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979) y la técnica de Hansen y Olsen (Hansen y Olsen, 1978). También se ensayaron otros métodos de extracción con kits comerciales: *PhasePrep™ BAC DNA Kit* (Sigma) y *JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep Kit* (Genomed, Alemania).

La calidad y cantidad de producto obtenido se verificó electroforéticamente en geles de agarosa. En algunos casos, el ADN también fue cuantificado espectrofotométricamente ($\lambda=260$) utilizando el equipo *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, USA). El plásmido recuperado se conservó a -20°C hasta su utilización.

3.9.1.1. Lisis alcalina.

1. Se inocularon tubos con medio LB (5 ml) y se incubaron 24 horas a 37°C en agitación.
2. Se recolectaron las células de 3 ml de cultivo por centrifugación a 8.000-9.000 rpm durante 5 minutos en tubos *eppendorf*.
3. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 100 μl de solución de resuspensión (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25mM, EDTA 10 mM, pH 7,5).
4. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 200 μl de solución de lisis (NaOH 0,2M; SDS 1% (p/v)). Luego, se mezcló el tubo por inversión cuidadosamente.
5. A continuación, se añadieron 150 μl de solución de neutralización (Acetato de amonio (AcNH_4) 3M pH 4,8 ajustado con ácido acético glacial). Se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos en baño de hielo.
6. Se centrifugó 10 minutos a 13.500 rpm.
7. Al sobrenadante se le agregaron 2 μl de RNAsa A 2 mg/ml y se incubó una hora a 37°C .

8. Las proteínas fueron luego extraídas agregando al sobrenadante un volumen igual de fenol equilibrado con cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló y se separó la fase acuosa.

9. El ADN plasmídico presente en la fase acuosa se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol absoluto previamente enfriado a -20°C. Se invirtió un par de veces y se incubó a -20°C durante 15 minutos.

10. Se centrifugó a 13.500 rpm en microcentrífuga durante 15 minutos.

11. El precipitado se lavó con 200 µl de etanol 70% pre-enfriado a -20°C. Se centrifugó como en el paso anterior.

12. El sobrenadante se descartó y se dejó secar en estufa a 37°C. El *pellet* fue resuspendido en 20-30 µl de agua *milliQ* estéril y se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.9.1.2. Técnica de Hansen-Olsen para plásmidos de alto tamaño molecular.

1. Se inocularon 50 ml de caldo LB con 5 a 6 colonias de un aislamiento puro de las cepas correspondientes, suplementado con el antibacteriano adecuado. Se incubó a 35-37°C toda la noche, o hasta un inóculo aproximado de 10^8 bacterias/ml.

2. Las células se centrifugaron a 10.000 rpm por 30 min, a temperatura ambiente (rotor Sorvall SS34).

3. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 10 ml de *buffer* fosfato 10 mM, pH 7,0. Se centrifugó por 20 min como en 2.

4. Los sedimentos celulares fueron resuspendidos en 1,35 ml de sacarosa 25% en Tris 50 mM, pH 8,0 a temperatura ambiente, con vortex a máxima velocidad.

5. Se agregaron 0,1 ml de lisozima (10 mg/ml en Tris 0,25 M, pH 8,0), se mezcló 5 veces por inversión suave y se colocó en hielo por 5 min.

6. Se adicionaron 0,5 ml de EDTA 0,25 M, pH 8,0. Se invirtió suavemente el tubo 5 veces y se incubó en baño de hielo por 5 min.

7. Luego, se añadió SDS al 20% p/v (en *buffer* TE: Tris 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8) hasta alcanzar una concentración final de SDS de 4% y se incubó durante 15 seg en baño de agua a 55°C; se retiró y se mezcló suavemente por inversión durante 15 seg (5 inversiones). Se repitió este procedimiento siete veces más (ocho ciclos totales).

8. Se adicionaron 0,5 ml de NaOH 3N y se mezcló de inmediato por inversión durante 3 min (20 inversiones/min).

9. Se agregó 1 ml de Tris 2 M, pH 7,0, en dos alícuotas, separadas por 30 seg de inversión (20 inv/min).

10. Para realizar la remoción de los complejos membrana – cromosoma se añadió SDS al 20% p/v (en *buffer* TE pH 8,0) hasta concentración final de SDS de 4%, seguido de la adición de NaCl 5M para alcanzar la concentración final de NaCl 1M. Mezclar por inversión (20 a 20 inv/min). Luego de mezclar los tubos, se colocaron en baño de hielo y se refrigeraron a 4°C por 6 hs – 18 hs.

11. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 rpm por 30 min (4°C, Sorvall SS34) y se trasvasó el sobrenadante a tubos cónicos pre-enfriados a 4°C. Se colocó en baño de hielo, y con el objetivo de concentrar el ADN se agregó el volumen necesario de PEG 6000 al 42% p/v (en *buffer* fosfato 10 mM, pH 7,0), para obtener una solución de PEG al 10%. Se refrigeraron los tubos a 4°C durante 6-18 hs.

12. Se realizó una centrifugación a 8.000 rpm por 20 min (4°C, rotor Sorvall SS34) y los sedimentos se resuspendieron en 0,15 ml de *buffer* TES (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, pH 8) frío. La solución cruda obtenida se sometió a electroforesis en geles de agarosa para evaluar la cantidad y calidad del ADN obtenido.

3.9.1.3. Minipreparación de ADN plasmídico.

Para realizar minipreparación de ADN plasmídico de células transformadas se utilizaron los kits *Wizard[™] Minipreps DNA Purification Systems* (Promega) y *JETSTAR 2.0 Plasmid Miniprep Kit* (Genomed) y según instrucciones del fabricante.

3.9.2. Amplificación de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es un técnica que permite amplificar una determinada región específica de ADN de manera exponencial, utilizando oligonucleótidos específicos a partir de los cuales una enzima ADN polimerasa adiciona nucleótidos en sentido 5'→3'.

El protocolo utilizado para la amplificación de los genes se muestra en la siguiente tabla (volumen final 25-50 µl):

Reactivos	Volumen
<i>Buffer</i> 10 X libre de MgCl ₂	2.5-5 µl
MgCl ₂ 50 mM	1.25-2 µl
Mezcla de los 4 dNTPs a 10 mM (c/u)	0.75-1.25 µl
Cebador 1 10 µM	2.5-5 µl
Cebador 2 10 µM	2.5-5 µl
<i>Taq</i> pol. 5U/µl o <i>Pfu</i> pol.	0.25-1µl
ADN molde	1-2.5 µl
H ₂ O <i>milliQ</i> estéril	Csp. 25-50 µl

La *Taq* polimerasa empleada, junto al buffer de reacción 10X y el MgCl₂ fueron provistos por Inbio-Highway (Argentina), Fermentas (USA) o Promega. La enzima *Pfu* polimerasa empleada, junto con su correspondiente *buffer* 10X y MgCl₂ fue de Promega. En las reacciones de PCR en las cuales se requería una polimerasa de alta fidelidad se utilizó el kit *Platinum®PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen). Además, en el caso de la amplificación de fragmentos de gran tamaño se recurrió a una mezcla de *Taq* polimerasa y *Pfu* polimerasa (Promega) en una relación 2:1.

Como ADN molde en cada reacción se utilizó alguno de los siguientes preparados:

- ADN total proveniente de colonias, preparado de la siguiente manera: varias colonias del microorganismo se resuspendieron en 200 µl de una solución al 1% de

tritón X-100 (en agua destilada), luego se calentó a 100°C en baño de agua durante 15 min. y se centrifugó a 2.000 rpm durante 2 min.; el sobrenadante obtenido fue el empleado en la reacción de amplificación.

- ADN plasmídico obtenido mediante la técnica de lisis alcalina o el kit comercial de minipreparación de ADN plasmídico.

En todas las reacciones se realizaron controles negativos utilizando una mezcla formulada de la misma manera, pero sin ADN molde.

En algunos casos, para aumentar la especificidad de la reacción (y evitar la amplificación inespecífica de zonas de baja complementariedad) se agregó la enzima *Taq* polimerasa luego del primer paso de desnaturalización del ADN templado (*Hot start*).

En general, el programa utilizado fue el siguiente:

1 ciclo de desnaturalización
95°C - 5 minutos.
30 ciclos de amplificación
Desnaturalización: 94°C - 1 minuto.
Hibridación: n^a °C - 1 min.
Extensión: 72°C - 1-3 ^b minutos.
Finalización de la polimerización: 72°C - 10 minutos.

^a-n: La temperatura de hibridación (T_a) dependió de los oligonucleótidos utilizados. T_m (temperatura de "melting" en °C): $4*(G+C)+2*(A+T)$. T_a (Temperatura de "annealing" en °C): $T_m - 5$. ^b- El tiempo de extensión de cada programa dependió al tamaño del fragmento a amplificar.

Para realizar las diferentes reacciones de amplificación se utilizaron los cicladores TRIO-Thermoblock, Biometra (Alemania) e Ivema T-18, Ivema Desarrollos (Argentina).

3.9.3. Purificación de ADN.

Para purificar fragmentos de ADN obtenidos por PCR se utilizaron kits comerciales *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), *Accuprep Gel and PCR Purification Kit* (BIONEER, Corea) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Resumidamente, se escindió del gel de agarosa el fragmento a purificar y se lo sometió a la acción de un agente caotrópico que disuelve la agarosa, luego se realizaron diferentes pasos con distintas soluciones en una columna cromatográfica, obteniéndose como eluido final el ADN deseado.

3.9.4. Clonado de genes.

3.9.4.1. Digestión enzimática del ADN.

Las reacciones de digestión se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante (Fermentas, Promega, Genbiotech (Argentina)) de la enzima. Las digestiones se realizaron en 20-50 µl finales llevando a volumen con agua *milliQ* estéril.

3.9.4.2. Clonado de fragmentos de ADN obtenidos por PCR.

I. En un vector de clonado.

Se utilizó el kit *pGEM^R-T easy vector system I* (Promega), el cual posee el vector pGEM-T que se encuentra abierto con residuos de deoxitimidina (dTTP) en el extremo 3', lo que permite a los fragmentos obtenidos por PCR usando *Taq* polimerasa (esta adiciona deoxiadenosina (dATP) a los extremos 3' del producto de PCR) ligarse eficientemente con el vector.

Cuando se clonaron segmentos de ADN obtenidos con *Pfu* polimerasa, se procedió al agregado de residuos de dATP (ya que esta enzima no adiciona el residuo 3' deoxiadenosina) incubando el fragmento de PCR con dATP y *Taq* polimerasa durante 30 min a 72°C en un termociclador.

Se procedió a realizar la reacción de ligación siguiendo las instrucciones del fabricante; y posteriormente se transformaron células de *E. coli* de la cepa Top10 o DH5α con la mezcla de ligación.

La selección de colonias transformantes se realizó mediante el sistema de colonias azules y blancas en placas de LBA + AMP (100 µg/ml) + IPTG (1 mM) + X- Gal (40 µg/ml).

II. En un vector de expresión.

Previo a realizar la ligación del inserto y el vector, ambos fragmentos de ADN fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes. Luego del proceso de purificación del ADN digerido se realizó uno de los siguientes pasos:

- El vector fue desfosforilado para evitar el religado. La reacción de desfosforilación se realizó utilizando la fosfatasa *Antartic Phosphatase* (New England BioLabs) según indicaciones del fabricante.

- El inserto fue fosforilado para agregar los grupos fosfato que son eliminados por la actividad exonucleasa de la enzima *Pfu* polimerasa. La reacción de fosforilación se realizó con la enzima *T4 polynucleotide kinase* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la reacción de ligación en el vector de expresión pET22b+ o pET28a+/b+ se empleó T4 DNA ligasa (Promega) en un volumen de reacción de 20 µl. Los volúmenes de inserto y vector se ajustaron de manera de lograr una relación molar 3:1, respectivamente. Se añadieron 3 UI de la enzima y se incubó a 16°C toda la noche. Con el producto de ligación se transformaron células de *E. coli* Top10F'.

3.9.5. Electroforesis en geles de agarosa.

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. El porcentaje de agarosa (0.8-1.5%) dependió del tamaño del fragmento a resolver. El *buffer* de corrida utilizado fue TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5).

Las muestras se prepararon mezclando 10 µl ADN o producto de PCR con 1 µl de *buffer* de siembra 10X (azul de bromofenol 0.25% (p/v), xileno-cianol 0.25% (p/v), glicerol 30% (p/v)).

La corrida electroforética se realizó a 80-100 voltios durante el tiempo requerido para obtener una mejor resolución de los fragmentos.

Para visualizar los geles, estos fueron sumergidos en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y visualizados en el transiluminador UV *Molecular Imager Gel Doc™ XR System*, BIO-RAD.

3.9.6. Secuenciación de ADN.

Las secuencias nucleotídicas se realizaron con métodos automatizados (*Big Dye Terminator Method -Applied Biosystems-*) utilizando el secuenciador *ABI PRISM 3700 ADN Analyzer* (Applied Biosystems-Hitachi, Japón).

La secuenciación sobre productos de PCR purificados se realizó con oligonucleótidos específicos.

Para realizar la secuenciación del fragmento de ADN inserto en vectores de clonado y/o vectores de expresión se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (provistos por los servicios de secuenciación utilizados):

Nombre	Secuencia	Uso
M13Fw	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Secuenciación de insertos en pGEM-T-Easy
M13Rv	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
T7Rv	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Secuenciación de insertos en pET22b+ o pET28b+
T7Fw	TAATACGACTCACTATAGGG	

3.9.6.1. Análisis de las secuencias.

Las similitudes en las secuencias de nucleótidos fueron analizadas con el programa BLAST disponible en Internet, provisto por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information- NCBI, NIH, Md, USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>*). Los perfiles teóricos de restricción se realizaron con los programas disponibles en la página *BCM Search Launcher* (*Baylor*

College of Medicine HGSC: <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>). Para realizar los alineamientos y ensamblajes de secuencias se utilizó el programa Vector NTI Advance 10.3.0 (Invitrogen).

3.10. Técnicas utilizadas en el estudio de proteínas

3.10.1. Análisis bioinformáticos.

Los análisis *in silico* de proteínas se realizaron utilizando herramientas disponibles en el sitio *Expasy Bioinformatics Resource Portal* (<http://expasy.org/>). La búsqueda del sitio de clivaje teórico del péptido señal en proteínas se realizó utilizando el *software* SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen y col, 2011).

3.10.2. Obtención de extractos enzimáticos crudos.

Un volumen apropiado de medio de cultivo, suplementado con el antibacteriano correspondiente, fue inoculado con la cepa en estudio e incubado en agitación (180-220 rpm) a 37°C durante el tiempo necesario, en general 18 a 24 hs, en agitador orbital *Gyratory Water Bath Shaker G76* (New Brunswick Scientific, USA)

Las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet bacteriano fue resuspendido con 10-15 ml del *buffer* correspondiente. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se resuspendió en *buffer* en un volumen adecuado.

Se procedió a la ruptura celular mediante ultrasonido, utilizando el sonicador *Vibra Cell* (Sonics & Materials Inc.; USA). Se realizaron 8-10 ciclos de 30 segundos (*output*: 4-5, *duty cycle*: 50%), en baño de hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas. Entre los ciclos se incluyeron 2 minutos de enfriamiento.

Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 15000 rpm durante 20 minutos, a 4°C. Los extractos enzimáticos crudos (sobrenadante) fueron conservados a -20°C para su posterior utilización.

3.10.3. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando los siguientes kits: *BCA Protein Assay Reagent* (método del ácido bicinconínico) (Pierce), *BIO-RAD Protein Assay* (técnica de Bradford) (BIO-RAD) y *BIO-RAD DC Protein Assay* (BIO-RAD) (método de Lowry modificado); siguiendo las instrucciones del fabricante. Las lecturas se efectuaron en espectrofotómetro UV-Vis T80 UV/VIS *Spectrophotometer* (PG Instruments Ltd, Inglaterra). Se utilizaron patrones de BSA.

3.10.4. Estudio de la actividad de β -lactamasas.

La presencia de actividad β -lactamasa fue estudiada mediante los siguientes métodos:

3.10.4.1. Método de la cefalosporina cromogénica (Nitrocefín®).

Permite analizar rápida y sencillamente la presencia de enzimas β -lactamasas. El nitrocefín (OXOID) es una cefalosporina cromogénica que exhibe un rápido cambio de color del amarillo al rojo cuando el enlace amida del anillo β -lactámico es hidrolizado por una β -lactamasa.

Para realizar el ensayo, diez microlitros de extracto fueron incubados con un volumen igual de nitrocefín 10 mM en buffer fosfato 0,1 M pH 7. El desarrollo de color rojo dentro de los 10 minutos de contacto fue el indicador de la presencia de actividad β -lactamasa. Como control negativo se incubó el nitrocefín con *buffer* fosfato 100 mM, pH 7.

3.10.4.2. Método iodométrico en agar.

Utiliza un indicador colorimétrico para detectar la presencia del ácido peniciloico producido como consecuencia de la hidrólisis del antibacteriano β -lactámico por las β -lactamasas. El sustrato en el método iodométrico es el β -lactámico en un *buffer* fosfato con el agregado de yodo y almidón. El ácido peniciloico reduce al yodo e impide que éste se una al almidón (reacción positiva, incolora). Si no se produce la hidrólisis de la penicilina el yodo y el almidón forman un complejo violáceo (reacción negativa).

A 100 ml de solución de agar almidón (1,5 gr agar-agar (Britania) + 0,5 gr de almidón soluble (Sigma) en 100 ml de *buffer* fosfato¹ 0,1 M, pH7), fundido y termostatzado a 45°C fueron agregados 1,6 ml de solución de I₂/I⁻ (2% I₂, 55% IK (Merck, Alemania)). Como sustrato fueron utilizados alternativamente AMP (100 µg/ml), CEF (1000 ug/ml), CRO (1000 ug/ml), entre otros. Diez microlitros del extracto fueron sembrados directamente sobre el agar. Se consideró una reacción positiva (presencia de β-lactamasa) a la aparición de halo de decoloración al cabo de 30 minutos.

En ambos métodos se utilizaron como controles positivos extractos crudos de las cepas productoras de las enzimas β-lactamasas TEM-1, SHV-2 y CTX-M-2.

3.10.5. Determinación del peso molecular de β-lactamasas.

A partir de cultivos saturados de la cepa en estudio se tomaron alícuotas de 1 ml, estas fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 2 min en microcentrífuga. El sedimento bacteriano fue resuspendido en 1 ml de *buffer* de fosfatos 20 mM, pH 7, y se mezclaron 10 µl con 30 µl de *buffer* muestra 4x (Tris-Cl 62,5 mM pH 6.8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0.1%(p/v), β-mercaptoetanol 300 mM). Se sometió la muestra a ebullición durante 5 min y se centrifugó en las mismas condiciones. Se sembraron 20 µl en un gel SDS-PAGE al 12% y se resolvió el gel a 120 V durante aproximadamente 2 hs.

Luego de la electroforesis, los geles fueron lavados con *buffer* de fosfatos 50 mM, pH 7, durante 1 h y se procedió a la renaturalización de la/s enzima/s por incubación en una solución de penicilina 20 mg/ml preparada en el mismo *buffer* durante 1 h. Posteriormente el gel fue lavado 30 minutos con el mismo buffer y se empleó el método iodométrico para revelar la actividad β-lactamasa, utilizando CEF (500 µg/ml) como sustrato. El peso molecular fue estimado por comparación con marcadores de peso molecular (BIO-RAD).

¹ En todos los casos el *buffer* fosfato utilizado fue realizado a partir de soluciones 0,2 M de NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄.

3.10.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

3.10.6.1. Preparación de los geles.

Se utilizaron geles de separación de diferentes entramados de acril/bisacrilamida, seleccionados de acuerdo al peso molecular de la proteína de interés analizada. En todos los casos, se utilizó el gel de apilamiento para concentrar las proteínas de la muestra (Laemmli, 1970).

Las muestras fueron tratadas con *buffer* de muestra 4X (Tris HCl 250 mM, pH 6,8, 8% SDS, 20% β -mercaptoetanol, 0,008% azul de bromofenol, 40% glicerol) para SDS-PAGE, e incubadas en baño de agua a ebullición durante 5-10 min. Luego, se sembraron 15-25 μ l de cada una en el gel. La corrida electroforética se realizó a 100-120 V durante el tiempo requerido para obtener una mejor resolución de los fragmentos.

La fijación y tinción de geles se efectuó por inmersión en solución de azul de Coomassie R-250 (1 g de azul de Coomassie R-250, 450 ml de metanol, 450 ml de H₂O destilada y 100 ml de ácido acético glacial) y posteriormente se decoloró con la solución correspondiente (100 ml de metanol, 100 ml de ácido acético glacial, 800 ml de agua destilada).

3.10.7. Determinación del punto isoelectrico de β -lactamasas. Isoelectroenfoque analítico (IEF)

Los geles empleados fueron armados sobre la cara hidrofílica de un soporte inerte (Gel-Bond, Pharmacia). Este soporte fue colocado entre dos planchas de vidrio diseñadas *ad hoc*; la cara hidrofóbica del Gel-Bond fue adherida al vidrio inferior utilizando Tritón X-100 al 1% (Sigma), y se utilizó una sonda plástica de 1 mm para delimitar el tamaño del gel. Posteriormente fue cargada la mezcla adecuada y se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

Mezcla de polimerización para IEF:

Reactivo	Volumen (ml)
Acrilamida: bisacrilamida 30% (29.2:0.8)	4
Anfolitos (rango de pH 3-10)	1,5
H ₂ O	14,5
TEMED (N, N, N', N'-tetrametilenediamina)	0,025
Persulfato de amonio 10%	0,125

Para la realización de la electroforesis se empleó un equipo LKB 2117 Multiphor II (LKB Produkter AB). Se colocó el Gel Bond sosteniendo el gel de poliacrilamida sobre la plancha del equipo de electroforesis previamente refrigerada a 4°C y cubierta con vaselina líquida. Se colocaron tiras de papel embebidas en las respectivas soluciones de electrolitos límite (en el ánodo, H₃PO₄ 0,5 M y en el cátodo NaOH 0,1 M), de manera de que coincidan con los electrodos de platino del equipo de electroforesis.

Se realizó el pre-enfoque de los anfolitos, para que estos formen el gradiente de pH, a 500 V durante el tiempo necesario para llegar a 7-8 mA (aproximadamente 1 h). Luego, se depositaron 10-20 µl de extracto sobre sembradores de papel (Sigma), ubicados a 1 cm del ánodo y se realizó la corrida electroforética a 1000 V durante 1 h y a 1500 V por 2 hs utilizando una fuente de poder EPS 3500 (Pharmacia, USA). Se incluyeron enzimas β-lactamasas de pI conocido TEM-1 (pI 5,4), SHV-2 (pI 7,6), CTX-M-2 (pI 8,2), PER-2 (pI 5,4).

Previo al revelado, los geles se incubaron en en *buffer* fosfato 100 mM pH 7.5 + NaHCO₃ 50 mM durante 30 min. Las enzimas presentes se revelaron por método iodométrico en agar utilizando como sustrato AMP (500 µg/ml).

3.10.8. Expresión de proteínas recombinantes.

Células de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo las distintas construcciones plasmídicas fueron crecidas toda la noche en agitación (180-200 rpm) a 37°C en medio líquido LB

suplementado con AMP o KAN, según correspondiera. Una alícuota de este cultivo fue diluida 100 veces en un medio de cultivo apropiado suplementado con antibacteriano, hasta alcanzar la DO₆₀₀ deseada. Se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante el agregado de IPTG y se continuó incubando a 30°C o 37°C, según la proteína en estudio, durante el tiempo correspondiente. La DO₆₀₀ a la cual se agregó el inductor, la concentración de IPTG, el medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de inducción se ajustaron de tal forma de optimizar la expresión de la proteína recombinante. Luego de la inducción se recogieron las células centrifugando a 6000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y los paquetes celulares se guardaron a -20°C hasta su posterior uso. El nivel de expresión de la proteína de interés se evaluó mediante SDS-PAGE y/o *Western Blot*. Además, en el caso de OXA-101, mediante análisis de la actividad β-lactamasa utilizando Nitrocefín®.

3.10.8.1. Análisis de la expresión de proteínas recombinantes.

I. Western Blot.

1. Anticuerpos.

Para la detección de proteínas durante la realización de este trabajo, fue necesario recurrir a técnicas de inmunodetección. En la siguiente tabla se resumen los antiseros utilizados en este trabajo.

Nombre	Características	Referencia
HIS PROBE	Anticuerpo policlonal de conejo contra <i>tag</i> de histidinas, utilizado en ensayos de <i>Western blot</i> como anticuerpo primario	Santa Cruz Biotechnology, Inc. [His-probe (H-15): sc-803]
GAR-HRP	Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano. Usado como anticuerpo secundario en <i>Western blot</i> .	BIO-RAD Laboratories (Catálogo: 170-6515)

2. Reactivos para revelado quimioluminiscente.

- Solución de Luciferina: D(-)- Luciferin. (10 mg). MW: 280, 3 gr/mol. Preparación: 10 mg fueron disueltos en 2,1 ml de Tris 100 mM pH 7,8-8. La concentración resultante es 218X. (Roche, Alemania)

- Solución de Luminol: 5 gr. MW: 177,2 gr/mol. Se disolvieron 88,6 mg en 1 ml de DMSO. La concentración resultante es 200X. (Sigma).

- Agua oxigenada 30 V. (Merck).

3. Resolución de la muestra.

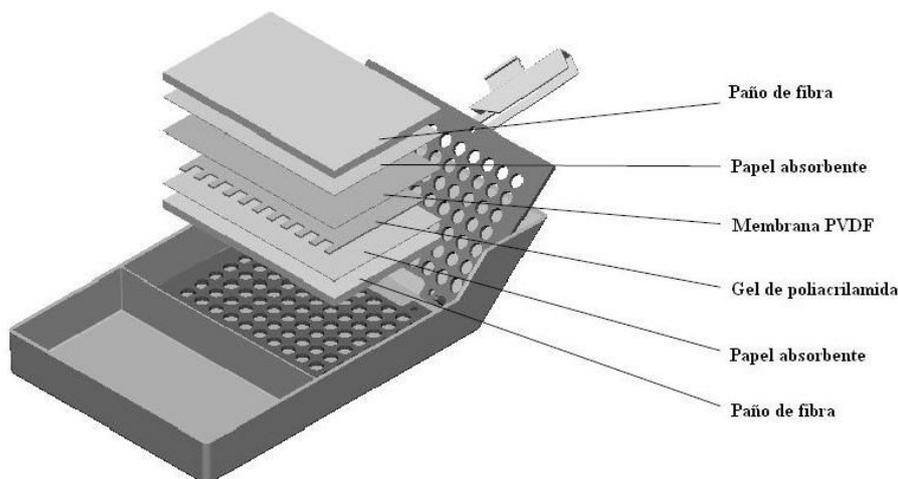
En primer lugar se realizó un SDS-PAGE con el fin de resolver las proteínas de la muestra en estudio.

4. Transferencia electroforética.

Luego, se realizó la transferencia electroforética de las proteínas a una membrana de polivinilideno fluoruro-PVDF (0,45 μm , Immobilon-P, Millipore) utilizando el equipo de transferencia *Criterion Blotter* (BIO-RAD) y según el procedimiento que sigue:

Debido a su carácter hidrofóbico, la membrana fue sumergida en metanol. Luego se dejó equilibrar, junto con el papel Whatman y el gel de poliacrilamida, por 15-30 min en *buffer* de transferencia (Glicina 2,93 gr/l, Tris 5,81 gr/l, SDS 0,375 gr/l, metanol 200 ml/l).

Posteriormente, se armó un “sándwich” entre el gel y la membrana siguiendo el siguiente esquema:



El cassette armado se colocó en el tanque de transferencia y esta se realizó a 20-30 V, 340-350 mA, durante 3 hs.

Pasado el tiempo de transferencia, se desarmó el casete, y se retiró la membrana para su revelado. Para verificar que la transferencia fue exitosa, el gel de poliacrilamida fue teñido por inmersión en azul de Coomassie G-250.

5. Hibridación e inmunodetección.

Para evitar falsos positivos, se realizó el bloqueo de la membrana. Este fue realizado con leche descremada en polvo al 3% preparada en *buffer* TBS-T (Tris 2,42 gr/l, NaCl 8,76 gr/l, Tween 20 0,05% (v/v), pH 7,5). Se incubó a temperatura ambiente en agitación al menos 1 hora. Se eliminó la solución anterior y se realizaron 2 lavados con TBS-T. Luego se adicionó el anticuerpo primario HIS PROBE diluído 1/3000 en TBS-T. Se incubó a temperatura ambiente en agitación durante 3 hs. Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-T en agitación. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario GAR-HRP diluído 1/3000 en TBS-T y se dejó en agitación a temperatura ambiente al menos 1 hora. Por último, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-T en agitación y la membrana fue revelada.

6. Revelado.

El revelado de la enzima HRP se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL (*Enhanced chemiluminescence*). En este sistema, la emisión de luz debida a la oxidación del luminol catalizada por el peróxido de hidrógeno se incrementa al agregar luciferina (*enhancer*). Se prepararon 1 ml de cada reactivo de revelado (R1: 5 μ l luminol 200X + 4,3 μ l luciferina 218X + 1 ml de Tris 100mM pH 7,8-8, y R2: 1,2 μ l de H₂O₂ + 1 ml de Tris 100mM pH 7,8-8), se mezclaron y se incubó la membrana en la solución resultante durante 1-2 min. Luego, se colocó en el casete de exposición, se cubrió con film transparente y las bandas se visualizaron mediante exposición a películas sensibles a rayos X (AGFA, Curix RP2, Medical X-Ray Film). Se expuso durante un tiempo adecuado (5-10 min) y fue revelado utilizando un equipo de revelado automático (KODAK X-OMAT 2000 PROCESSOR).

II. Evaluación de actividad β -lactamasa.

Se analizó la actividad β -lactamasa en los clones inducidos utilizando la cefalosporina cromogénica Nitrocefin® como sustrato, siguiendo la metodología detallada anteriormente en esta misma sección.

3.10.9. Purificación de proteínas recombinantes.

Se utilizaron agua y reactivos de alta calidad para la preparación de las soluciones utilizadas en todos los pasos de purificación. Previo a su uso todos los *buffers*, junto con el H₂O utilizado, fueron filtrados utilizando sistemas de filtración *Nalgene* con membranas de nitrocelulosa de 0.22-0.45 µm.

3.10.9.1. Purificación de Orf513.

Previo a la purificación de la proteína, se resuspendió el *pellet* de células post-inducción en *buffer* B (Tris-HCl 150 mM, NaCl 200 mM, glicerol 10%, imidazol 10 mM, pH 7,4). La ruptura celular fue llevada a cabo utilizando una *French Press* SLM-Aminco, presión máxima de 40.000 p.s.i (SLM Instruments, Inglaterra.). Se realizaron 3 pasajes por el cilindro pre-enfriado a 4°C. El extracto celular fue centrifugado a 20000 rpm, durante 20 min a 4°C. Este procedimiento se realizó 2 veces. Se separó el sobrenadante clarificado en tubos plásticos y fueron conservados en hielo hasta posterior uso.

Para enriquecer el extracto crudo en la proteína deseada se realizó una cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC), utilizando la resina Ni-NTA Agarose (agarosa níquel-ácido nitriloacético) (Qiagen). Este sistema consiste en un soporte de *Sepharose CL-6B* en el cual se encuentra acoplado Ni-NTA. El ácido nitriloacético (NTA) posee 4 sitios de quelación para iones níquel, para los cuales tienen una alta afinidad. Esta resina ya es provista por el fabricante disuelta en etanol y con los iones Ni²⁺ inmovilizados, lista para usar con el objetivo de purificar proteínas con cola de histidinas en el extremo C o N-terminal. El *His-tag* presente forma un complejo con el Ni²⁺ y de esta forma es retenida por la resina. La proteína eluye por competencia con imidazol.

En este caso, el proceso de purificación se realizó en forma *batch* siguiendo la siguiente metodología:

1. A la muestra con la proteína recombinante fueron agregados 500-1000 µl de resina Ni-NTA (previamente lavada para eliminar el etanol). Se dejó en agitación por rotación (en agitador de noria) a 4°C durante toda la noche.

2. Se dejó sedimentar la resina y se separó el sobrenadante. La resina con la muestra fue cargada en una columna de 15-20 ml (Econo-Pac Chromatography

columns, BIO-RAD). Se realizaron lavados (aproximadamente 50 volúmenes) con *buffer* W (Tris-HCl 150 mM, NaCl 1200 mM, glicerol 10%, pH 7,5).

3. Luego, se realizaron 4 eluciones de 1ml con *buffer* E (Tris-HCl 150 mM, NaCl 200 mM, glicerol 10%, imidazol 500 mM, pH 7,5).

El éxito del proceso de purificación fue analizado mediante SDS-PAGE 15%, seguido de tinción con azul de Coomasie G-250 y *Western Blot*.

Luego, las fracciones con la proteína de interés fueron dializadas durante toda la noche a 4°C frente a *buffer* F (Tris-HCl 150 mM, glicerol 10%, pH 7,5) utilizando el sistema *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes* (Pierce). Las muestras se conservaron a -80°C hasta posterior uso.

3.10.9.2. Purificación de la β -lactamasa OXA-101.

El paquete celular obtenido luego de la inducción fue resuspendido en *buffer* fosfatos 50mM, pH 6,5. Luego, en baño de hielo, se realizó a la ruptura celular utilizando un procesador ultrasónico de alta intensidad Vibra-cell VC-250 (Sonics & Materials, USA). Se realizaron 8-10 ciclos (*output*: entre 4-5, *duty cycle*: 50%) de 30 seg en baño de hielo. Los restos celulares fueron eliminados mediante centrifugación a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue almacenado a -20°C para posteriores análisis.

El primer paso de purificación se realizó mediante una cromatografía de intercambio iónico. Este, es un método adsortivo por el cual se separan las macromoléculas nativas de acuerdo a sus diferencias en la carga neta, determinada por sus residuos aminoacídicos más superficiales. Se basa en la adsorción y unión reversible de moléculas cargadas a grupos con carga opuesta unidos a una matriz insoluble (fase estacionaria). Las resinas utilizadas se encuentran sustituidas por grupos químicos que las transforman en intercambiadores catiónicos o aniónicos, los cuales pueden ser a su vez fuertes o débiles. La elución de la proteína unida se produce por cambios en la fuerza iónica en la fase móvil.

El segundo paso de purificación se realizó mediante una cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). Como se dijo anteriormente, se basa en la afinidad del aminoácido histidina para unirse a metales de transición que se encuentran

inmovilizados en un grupo quelante, en este caso se utilizó Ni^{2+} e imidazol para eluir la proteína unida.

1. Cromatografía de intercambio catiónico.

El pH al cual una proteína no posee carga neta se denomina punto isoeléctrico (pI). Cuando se la expone a un pH menor al pI queda cargada positivamente y se une a un intercambiador catiónico. A pH superior a su pI la proteína tendrá carga negativa y se unirá a un intercambiador aniónico. Debido a que se utilizó un intercambiador catiónico y el pI de OXA-101 es 7,2, el extracto proteico crudo fue dializado frente a *buffer* A (*buffer* fosfatos 50mM, pH 6.5) a 4°C durante toda la noche, por lo cual la β -lactamasa quedaba cargada positivamente. La muestra fue filtrada utilizando sistemas de filtración *Nalgene* con membranas de nitrocelulosa de 022-0,45 μm previo a cargarla en la columna.

El intercambio catiónico fue llevado a cabo utilizando el equipo ÄKTA-purifier (GE Healthcare) mediante *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC) utilizando la columna cromatográfica intercambio fuerte de cationes *HiTrap™ SP HP* (5 ml- GE Healthcare). Estas columnas están formadas por una matriz de agarosa sobre la cual se encuentran acoplados, mediante uniones químicas estables, grupos sulfonilpropil ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$) que le otorgan la carga neta negativa. La muestra se cargó con una velocidad de flujo de 2 ml/min en la columna antes mencionada previamente equilibrada con *buffer* A.

Debido a la carga positiva de OXA-101 esta, junto con otros contaminantes con pI > 6.5, permaneció retenida en la columna. Se realizaron varios lavados con *buffer* A para eliminar las proteínas no adsorbidas en la matriz, a un flujo 5 ml/min. La elución se llevó a cabo aplicando un un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M (*buffer* B: *buffer* fosfatos 50mM, NaCl 0.5M, pH 6.5) con una velocidad de flujo de 2 ml/min. El proceso fue monitorizado mediante medidas de absorbancia a 280 nm a medida que eluían las diferentes fracciones de la columna. Las fracciones recogidas se analizaron frente a nitrocefín para detectar actividad β -lactamasa y mediante SDS-PAGE.

Para realizar el segundo paso de purificación las muestras con actividad β -lactamasa fueron dializadas frente a *buffer C* (*buffer* fosfatos 50mM, NaCl 0.5M, pH 7.4) durante toda la noche en cámara fría.

II. Cromatografía de Afinidad de Metal Inmovilizado (IMAC).

Se utilizó el mismo equipo antes mencionado con columnas de *HisTrap™ HP* (1ml- GE Healthcare). Las columnas están formadas por una matriz de *Ni Sepharose* (GE Healthcare). En esta, los iones Ni^{2+} se encuentran inmovilizados sobre el ligando quelante presente en la matriz de agarosa. La región añadida a la proteína recombinante de 6 aminoácidos histidina se une por afinidad al Ni^{2+} presente en la matriz de la columna y queda retenida. Para eliminar interacciones inespecíficas y proteínas no unidas se realizaron lavados con *buffer C*, utilizando un flujo 2.5 ml/min. La elución fue realizada con un gradiente creciente de imidazol (*buffer D: buffer* fosfatos 50mM, NaCl 0.5M, imidazol 0.5M, pH 7.4), siendo el flujo de 0,5 ml/min. La purificación de la proteína fue monitorizada mediante medidas de absorbancia a 280 nm de las diferentes eluciones de la columna. Nuevamente, las fracciones recogidas se analizaron frente a nitrocefín para detectar actividad β -lactamasa y la pureza de la proteína se evaluó mediante SDS-PAGE.

Para eliminar las sales y el imidazol de la fracción de interés se procedió a dializar la misma frente a *buffer* fosfato 50 mM pH 7.4 durante toda la noche en cámara fría.

3.10.10. Caracterización de las proteínas recombinantes obtenidas.

El análisis de las proteínas recombinantes obtenidas se realizó mediante:

- Determinación de la masa molecular de la proteína (en el caso de OXA-101) mediante ionización “electrospray” (Espectrometría de masa con ionización), en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO), perteneciente a la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA).
- Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a equipo detector de iones (MALDI-TOF). Este procedimiento fue realizado por el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”

pertenece al Instituto Nacional de Proteómica, ProteoRed-ISCI (Plataforma en red de proteómica - Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España).

3.10.11. Ensayos de actividad enzimática.

3.10.11.1. Ensayos de retardo en gel (EMSA).

Los ensayos de retardo en gel (EMSA-*electrophoretic mobility shift assay*) permiten detectar y caracterizar *in vitro* la interacción ADN-proteína. La técnica consiste en la incubación de fragmentos de ADN con la proteína bajo unas condiciones adecuadas para favorecer la interacción ADN-proteína. El producto de esta reacción se carga en un gel de agarosa o en un gel de poliacrilamida no desnaturizante: la movilidad del fragmento de ADN en el gel estará determinada por la unión de éste a la proteína. Para disminuir las interacciones inespecíficas, se añade un oligonucleótido irrelevante (poli dI-dC) o DNA de esperma de salmón.

Para analizar la posible actividad como recombinasa de ADN de Orf513 se diseñaron ensayos de retardo en gels de agarosa y de poliacrilamida. Para la realización de este ensayo se utilizó, además de distintos fragmentos de ADN marcado, proteína unida a una cola de histidinas en carboxilo terminal y purificada, como se detalla en “Purificación de Orf513” de esta sección.

1. Obtención de los oligonucleótidos.

Para la realización de los ensayos de retardo se utilizaron diferentes oligonucleótidos (Tabla 6), algunos de ellos marcados en la región 5' con el fluoróforo Cy5 (Absorción máxima: 649 nm, Emisión máxima: 670 nm) o 6-FAM (Absorción máxima: 495 nm, Emisión máxima: 520 nm) (Sigma).

Estos oligonucleótidos fueron utilizados simple cadena, doble cadena o como cebadores en reacciones de PCR en las que se amplificaron los fragmentos de DNA requeridos para el ensayo.

Los oligonucleótidos liofilizados fueron reconstituidos con H₂O *milliQ* estéril a una concentración de 100 µM.

II. Obtención de los fragmentos de ADN doble cadena.

Para obtener las secuencias *oriIS* y *terIS* utilizadas en los ensayos de retardo se procedió a realizar el anillamiento de los oligonucleótidos complementarios correspondientes, siguiendo los pasos que se describen a continuación:

- 1) 5 μ l de cada oligonucleótido 100 μ M (sentido y antisentido) se mezclaron con 10 μ l de H₂O *milliQ* estéril y se colocaron en un tubo apropiado. De esta manera, la concentración final del fragmento de ADN doble cadena obtenido fue de 25 μ M.
- 2) La mezcla de reacción se incubó en un baño de H₂O en ebullición durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, se dejó en reposo en el baño hasta que la temperatura del mismo alcanzó los 20-25°C.
- 3) Los oligonucleótidos anillados se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso. El anillamiento pudo confirmarse visualmente mediante un gel de agarosa 1,5% (p/v).

III. Reacción de unión ADN-proteína.

Las condiciones de reacción fueron optimizadas con el fin de encontrar la mejor condición de ADN-proteína. Se evaluó la unión en distintas relaciones molares ADN:proteína (1:1, 1:3, 1:5, 1:10), diferentes temperaturas (25°C-30°C-37°C) y tiempos (30 min a 180 min) de incubación. Se utilizaron 2 *buffers* de reacción: *buffer* 1 (NaHPO₄ 10 mM, KCl 50 mM, glicerol 5%, BSA 50 μ g/ml, pH 7,5) y *buffer* 2 (HEPES 20 mM, NaCl 50 mM, BSA 100 μ g/ml, β -mercaptoetanol 5 mM, pH 6,9). Se realizaron experimentos con y sin agregado de ADN de esperma de salmón (0,5 μ g) en ambos *buffers*. También se evaluó la influencia de la presencia de β -mercaptoetanol variando la concentración del mismo en la reacción (0,5 mM-1mM). Todas las reacciones se incubaron en oscuridad (recubiertas con papel aluminio). Como control positivo de unión en las condiciones de reacción ensayadas se utilizó la dupla estreptavidina-ADN biotinilado. Se eligió este sistema ya que la interacción entre la estreptavidina-biotina es una de las interacciones no covalentes más fuertes que se conoce (Weber y col, 1989). El ADN biotinilado utilizado corresponde a las mismas secuencias *oriIS* y *terIS* utilizadas para los ensayos de interacción modificadas en un extremo con una molécula de biotina (Tabla 3.2). Se utilizó BSA en exceso como proteína control negativo de

interacción. Se utilizó un fragmento interno de *orf513* como control negativo de unión a Orf513.

III. Sistemas de electroforesis empleados para EMSA.

Geles de agarosa

Una vez transcurrido el tiempo determinado para el ensayo se cargaron las distintas muestras, utilizando sólo glicerol como *buffer* de carga, en un gel de agarosa al 1-1,5% en TAE 1X previamente pre-corrido al menos 45 min. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente a 70 V durante al menos 1 h. Luego, los geles fueron sumergidos en una solución de bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador UV.

Geles de poliacrilamida

La electroforesis se llevó a cabo en geles nativos de acrilamida-bisacrilamida al 6% en *buffer* TAE de retardo 1X (Tris-acetato 12 mM, EDTA 1mM, pH 7,5). Antes de cargar las muestras, los geles se pre-corrieron en durante 40 minutos a 5 mA/gel. A continuación se cargaron las muestras, empleando glicerol como *buffer* de carga, y la electroforesis se realizó a 5 mA/gel durante el tiempo apropiado, de acuerdo al tamaño del fragmento de ADN ensayado (45-180 min). Los resultados del experimento se revelaron utilizando el escáner de fluorescencia *Typhoon 9410* (GE Healthcare).

3.10.11.2. Determinación de parámetros cinéticos.

Los parámetros cinéticos de la enzima OXA-101 se determinaron a 25°C, en 0,5 ml de *buffer* de fosfatos 50 mM, pH 8,5 suplementado con NaHCO₃ 50 mM, conteniendo el antibacteriano que se deseaba estudiar. Cada ensayo de actividad se realizó por duplicado. La hidrólisis de los antibacterianos β-lactámicos se analizó por el monitoreo en el cambio de absorbancia, producido por la ruptura del anillo β-lactámicos del compuesto en distintos rangos de concentración de sustrato. La medición se llevó a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu 2401-PC UV-Vis (Shimadzu Corporation). Los parámetros K_m and k_{cat} se calcularon a partir de las tasas iniciales de hidrólisis, graficando V_o (velocidad inicial) vs concentración de sustrato, ajustando los datos a la

ecuación de Michaelis Menten utilizando el *software* GraphPad prism (GraphPad Software, Inc).

4. Resultados y Discusión

4- Resultados y Discusión

4.1. Capítulo 1: Integrones clase 1 inusuales en aislamientos clínicos de enterobacterias.

4.1.1. Aislamientos clínicos.

Se analizó la presencia de integrones inusuales en aislamientos clínicos de enterobacterias provenientes de los relevamientos 1 y 2 (R1 y R2, respectivamente) descritos en “Materiales y Métodos”. Estos relevamientos fueron realizados en distintos centros de salud de la ciudad de Santa Fe con el objetivo de efectuar estudios epidemiológicos por el grupo de trabajo.

Los microorganismos fueron inicialmente aislados a partir de muestras clínicas, identificados y conservados en agar blando. Luego, las bacterias fueron reactivadas en medio de cultivo LBA y los estudios fenotípicos y moleculares fueron realizados a partir de cultivos axénicos.

4.1.2. Análisis de la presencia de integrones clase 1 inusuales.

En cada uno de los microorganismos se analizó la presencia de integrones inusuales mediante la amplificación por PCR de un fragmento de *orf513*, el cual como se dijo anteriormente se encuentra codificado en el elemento *ISCR1* (Figuras 4.1.1 y 4.1.2). En aquellas muestras en las que se observó el amplicón correspondiente al tamaño esperado, se realizó la amplificación de un fragmento interno del gen codificante para la integrasa de clase 1 (región 5'CS) y de los genes *qacEAI-sulI* (región 3'CS) mediante PCR. El ADN utilizado como molde de cada reacción fue el ADN total obtenido mediante lisis de colonia. Como control de amplificación se utilizó la cepa *Salmonella entérica* serovar Infantis S21 portadora del integrón inusual InS21 (Di Conza y col, 2002).

Del estudio realizado pudo observarse que de las 90 enterobacterias del R1 el 4,5% (n=4) presentó integrones inusuales, y de las 34 enterobacterias del R2 el 36% (n=12) (Tabla 4.1.1). Una posible explicación para la diferencia de porcentaje de bacterias con integrones inusuales entre R1 y R2 es el criterio de selección de aislamientos utilizado en cada caso. En el caso del R1 se estudiaron todas las enterobacterias recolectadas

durante 1 mes, a diferencia del R2 en el cual se seleccionaron los aislamientos con resistencia simultánea a fluoroquinolonas y, resistencia a una o más oximinocefalosporinas (CAZ, CTX y CRO). Este resultado muestra concordancia con lo descrito por otros autores anteriormente, ya que la asociación entre la presencia de integrones inusuales y determinantes de resistencia a múltiples antibacterianos (otorgando un fenotipo de multiresistencia), entre ellos quinolonas y β -lactámicos se encuentra ampliamente descrita (Nordmann y col, 2005; Quiroga y col, 2007; Bado y col, 2010; Richter y col, 2010).

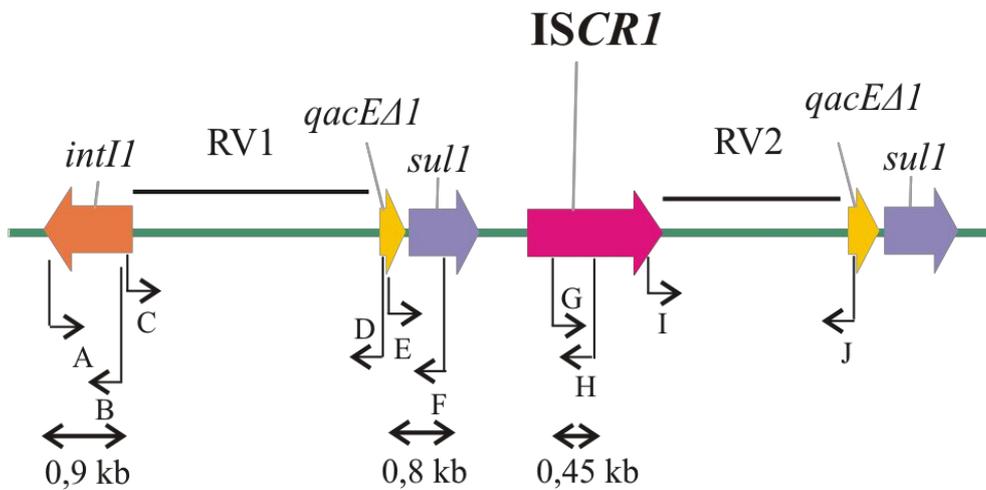


Figura 4.1.1. Esquema de la estrategia utilizada para amplificar por PCR diferentes regiones de un integrón clase I inusual. Para amplificar parte del gen *intI1* se utilizaron los oligonucleótidos A (*intI1F*) y B (*intI1R*); la región variable (RV1) de estos elementos fue amplificada con los cebadores C (5'CS) y D (3'CS). La amplificación conjunta de los genes *qacEΔ1* y *sul1* se realizó con E (*qacEΔ1F*) y F (*sulR*). Los oligonucleótidos G (341a) y H (341b) se utilizaron para amplificar un fragmento interno de *orf513*, y el par de cebadores I (HS821) y J (HS822) para amplificar la región variable RV2. El tamaño de RV1 y RV2 es variable de acuerdo a los genes presentes.

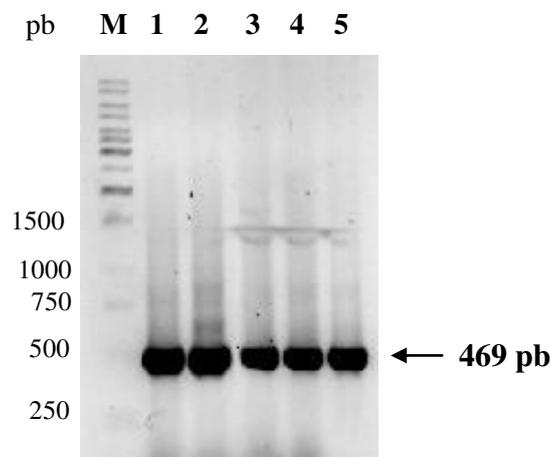


Figura 4.1.2. Amplificación del fragmento interno de *orf513*. Gel agarosa 1,5%. M: GeneRuler 1 kb DNA ladder (Fermentas). Calles 1-4: muestras incógnitas. Calle 5: control positivo.

Tabla 4.1.1. Características de los aislamientos de enterobacterias portadores de integrones clase I inusuales.

		Sensibilidad a antibióticos (mm/interpretación según CLSI)											Caracterización genotípica							
Especie	Código	AMP	PIP	CEF	FOX	CTX	CTX-C	CAZ	CAZ-C	NAL	CIP	NOR	<i>intI1</i>	3'CS	<i>ISCR1</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M2}	<i>bla</i> _{PER-2}	<i>qnr</i>	
R 1	ECO	83	6R	12R	15I	22S	30S	31	30S	29	6R	6R	6R	+	+	+	-	-	-	<i>qnrB</i>
	CFR	138	6R	6R	6R	6R	6R	23	17R	22	6R	30S	34S	+	+	+	-	+	-	-
	ECL	150	6R	6R	11R	9R	6R	6	10R	10	6R	6R	6R	+	+	+	-	+	-	<i>qnrB</i>
	ECL	151	6R	6R	9R	11R	7R	7	7R	7	6R	ND	ND	+	+	+	-	-	-	<i>qnrB</i>
R 2	KPN	1	6R	6R	6R	23S	8R	24	15R	22	6R	6R	6R	+	+	+	+	+	-	-
	KPN	3	6R	6R	6R	23S	12R	28	20I	28	6R	6R	6R	+	+	+	-	+	-	-
	CFR	7	6R	6R	6R	6R	6R	12	11R	12	6R	8R	11R	+	+	+	-	+	-	-
	ECL	8	6R	12R	6R	6R	14R	30	6R	28	6R	14R	20S	+	+	+	-	-	+	<i>qnrB</i>
	ECL	9	6R	14R	6R	6R	14R	30	6R	28	12R	24S	23S	+	+	+	-	-	+	<i>qnrB</i>
	PMI	12	6R	6R	6R	24S	14R	30	30S	32	6R	6R	6R	+	+	+	+	+	-	-
	ECL	20	6R	6R	6R	28S	14R	30	26S	29	6R	24S	22S	+	+	+	+	+	-	-
	SMA	22	6R	6R	6R	12R	6R	18	12R	18	6R	6R	6R	+	+	+	+	+	-	-
	PMI	28	ND	ND	ND	22S	31S	33	32S	33	6R	6R	6R	+	+	+	-	-	-	-
	ECO	34	6R	6R	6R	22S	17R	23	19I	28	6R	9R	8R	+	+	+	-	-	-	-
	KPN	35	6R	6R	6R	24S	6R	29	6R	32	6R	6R	6R	+	+	+	-	-	+	<i>qnrB</i>
KPN	36	6R	6R	6R	22S	10R	30	14R	29	6R	6R	6R	+	+	+	+	+	-	<i>qnrB</i>	

KPN: *K. pneumoniae*, CFR: *C. freundii*, ECL: *E. cloacae*, PMI: *P. mirabilis*, SMA: *S. marcescens*, ECO: *E. coli*. R: Resistente, I: intermedio, S: Sensible. +: Presencia del amplicón deseado, -: No se observó el amplicón esperado.

4.1.3. Análisis de la presencia de determinantes de resistencia a antibacterianos

En primer lugar se analizó la presencia de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* en los aislamientos en los cuales anteriormente fueron detectados integrones clase 1 inusuales. Para esto se realizó la extracción de ADN plasmídico de los mismos (Figura 4.1.3) y se amplificó un fragmento interno mediante PCR, utilizando oligonucleótidos (Tabla 4.1.2) y protocolos anteriormente descriptos (Cattoir y col., 2007c; Escobar y col., 2010).

Tabla 4.1.2. Oligonucleótidos y alelos de genes qnr que amplifican.

Oligonucleótido	Gen	Tamaño (pb)
qnrAm-F	<i>qnrA1-qnrA7</i>	580
qnrAm-R		
qnrBm-F	<i>qnrB1-qnrB25</i>	226
qnrBm-R		
qnrSm-F	<i>qnrS1-qnrS4</i>	428
qnrSm-R		

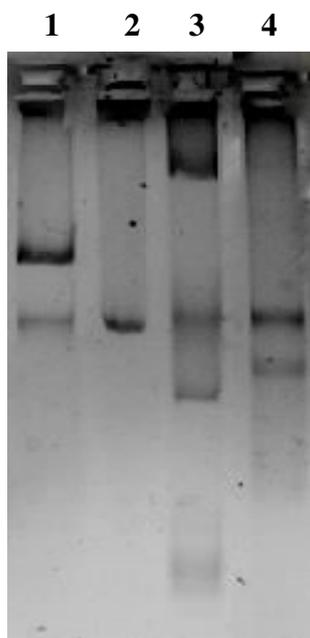


Figura 4.1.3. Extracción de plásmidos de aislamientos con integrones inusuales utilizando la técnica de Hansen y Olsen. Gel de agarosa 0,8%. Calle 1: ECL8. Calle 2: KPN35. Calle 3: KPN36. Calle 4: ECL151.

De los 16 aislamientos portadores de integrones inusuales analizados, se obtuvo amplificación para el alelo *qnrB* en 7 cepas, lo que representó el 43,7% de los aislamientos estudiados. *qnrB* se detectó en 4 aislamientos de *Enterobacter cloacae*, en 2 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y en 1 aislamiento de *Escherichia coli* (Tabla 4.1.1). No hubo amplificación para ninguna de las variantes alélicas de *qnrA* ni *qnrS* en las bacterias estudiadas. Respecto a la localización plasmídica de los determinantes *qnr*, estos genes han sido detectados en plásmidos de diversos tamaños, diferente grupo de incompatibilidad y distintos arreglos de genes de resistencia; lo cual indica que la transferencia de múltiples plásmidos ha facilitado la diseminación de esta resistencia en todo el mundo (Rodríguez-Martínez y col, 2011).

El análisis de la sensibilidad a antimicrobianos se realizó siguiendo las recomendaciones del CLSI. Los datos de susceptibilidad cualitativa y cuantitativa (Tablas 4.1.1 y 4.1.3) obtenidos muestran que las cepas portadoras de los genes *qnrB* (ECL8, ECL9, KPN35, KPN36, EC83, ECL150 y ECL151) presentan perfiles de media/alta resistencia a quinolonas (representadas por ácido nalidíxico) o fluorquinolonas (representadas por ciprofloxacina). De hecho, en la totalidad de los aislamientos se determinó una CIM > 1024 µg/ml para NAL.

Tabla 4.1.3. CIM (µg/ml) de los aislamientos *qnrB* positivos.

	EC83	ECL150	ECL151	ECL8	ECL9	KPN35	KPN36
NAL	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
CIP	64	512	ND*	128	512	64	64

*ND: no determinado.

Si bien estos datos de sensibilidad cualitativos y cuantitativos muestran la reducida eficacia *in vitro* de las quinolonas y fluorquinolonas en los aislamientos estudiados, no puede adjudicarse esta resistencia únicamente al mecanismo investigado. En general, la adquisición de un plásmido portador de genes *qnr* otorga a la bacteria un fenotipo sensible a fluorquinolonas y resistente a ácido nalidíxico de acuerdo a los puntos de corte establecidos por CLSI. La bacteria *wild type* que posee estos plásmidos presenta mayores niveles de resistencia a quinolonas que una cepa transconjugante o productora

de *Qnr* recombinante, tanto debido al número de copias del plásmido portador de *qnr* y el nivel de transcripción de estos genes en la bacteria (Rodríguez-Martínez y col, 2006; Xu y col, 2007) como a los distintos mecanismos plasmídicos (como ser *aac(6')-Ib-cr*) (Robicsek y col, 2006; Xu y col, 2007) y cromosómicos (mutaciones en *gyrA* y *parC*, pérdida o alteración de porinas, activación de bombas de eflujo, genes cromosomales *qnr-like*) (Hooper, 2000; Hawkey, 2003; Ruiz, 2003) que actúan en forma sinérgica para determinar finalmente la disminución en la susceptibilidad (Martínez-Martínez y col, 2003; Jeong y col, 2008).

Los aislamientos que mostraron co-resistencia fenotípica a quinolonas y en los cuales no se evidenció la presencia de genes *qnr* (Tabla 4.1.1), podrían presentar alguno de los mecanismos de resistencia a quinolonas no estudiados en este trabajo

Si bien los mecanismos localizados en el cromosoma bacteriano suelen ser los responsables de los altos valores de CIM detectados en aislamientos clínicos, se ha observado que la resistencia a quinolonas mediada por PMQR, aunque produce resistencia de bajo nivel, también facilita la selección de resistencia de alto nivel a quinolonas (Martínez-Martínez y col, 1998). Como se dijo anteriormente, existe un efecto aditivo de los distintos mecanismos de resistencia a quinolonas con la presencia de *qnr* (Martínez-Martínez y col, 2003).

Para confirmar la identidad de los amplicones *qnrB* obtenidos en las cepas ECL8, ECL9, KPN35 y KPN36, los mismos fueron secuenciados con los oligonucleótidos *qnrBm-F* y *qnrBm-R*. Posteriormente fueron comparados con las secuencias depositadas en bases de datos. A través del análisis bioinformático de las 226 pb secuenciadas, en 3 casos (correspondiente a los aislamientos ECL8, ECL9 y KPN35) se obtuvo 100% de identidad con el alelo *qnrB10* ya descrito en Argentina (Figura 4.1.4) (Quiroga y col, 2007; Petroni y col, 2007, Andrés y col, 2009). Como se muestra en la figura 4.1.5 el amplicón obtenido a partir del aislamiento KPN36 mostró 100% de identidad con los alelos *qnrB2/qnrB20*.

		301		350
ECL8	(1)	-----	TTTCGCGGTGCAAGCTTTATGAATATGAT	
ECL9	(1)	-----	TTTCGCGGTGCAAGCTTTATGAATATGAT	
KPN35	(1)	-----	TTTCGCGGTGCAAGCTTTATGAATATGAT	
<i>qnrB10</i>	(301)	TGTCGCGCACAAAGGCGCAGAT	TTTCGCGGTGCAAGCTTTATGAATATGAT	
		351		400
ECL8	(31)		CACCACGCGCACCTGGTTTTGCAGCGCATATATCACTAATACCAATCTAA	
ECL9	(31)		CACCACGCGCACCTGGTTTTGCAGCGCATATATCACTAATACCAATCTAA	
KPN35	(31)		CACCACGCGCACCTGGTTTTGCAGCGCATATATCACTAATACCAATCTAA	
<i>qnrB10</i>	(351)		CACCACGCGCACCTGGTTTTGCAGCGCATATATCACTAATACCAATCTAA	
		401		450
ECL8	(81)		GCTACGCCAATTTTTCGAAAGTCGTGTTGGAAAAGTGTGAGCTATGGGAA	
ECL9	(81)		GCTACGCCAATTTTTCGAAAGTCGTGTTGGAAAAGTGTGAGCTATGGGAA	
KPN35	(81)		GCTACGCCAATTTTTCGAAAGTCGTGTTGGAAAAGTGTGAGCTATGGGAA	
<i>qnrB10</i>	(401)		GCTACGCCAATTTTTCGAAAGTCGTGTTGGAAAAGTGTGAGCTATGGGAA	
		451		500
ECL8	(131)		AACCGCTGGATGGGGACTCAGGTACTGGGTGCGACGTTTCAGTGGTTCAGA	
ECL9	(131)		AACCGCTGGATGGGGACTCAGGTACTGGGTGCGACGTTTCAGTGGTTCAGA	
KPN35	(131)		AACCGCTGGATGGGGACTCAGGTACTGGGTGCGACGTTTCAGTGGTTCAGA	
<i>qnrB10</i>	(451)		AACCGCTGGATGGGGACTCAGGTACTGGGTGCGACGTTTCAGTGGTTCAGA	
		501		550
ECL8	(181)		TCTCTCCGGCGGCGAGTTTTTCGACTTTTCGACTGGCGAGCCGCAA	-----
ECL9	(181)		TCTCTCCGGCGGCGAGTTTTTCGACTTTTCGACTGGCGAGCCGCAA	-----
KPN35	(181)		TCTCTCCGGCGGCGAGTTTTTCGACTTTTCGACTGGCGAGCCGCAA	-----
<i>qnrB10</i>	(501)		TCTCTCCGGCGGCGAGTTTTTCGACTTTTCGACTGGCGAGCCGCAA	CTTCA

Figura 4.1.4. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del fragmento de 226 pb amplificado en los aislamientos ECL8, ECL9 y KPN35 con el gen *qnrB10* (Número de acceso: DQ631414).

		1		50
KPN36	(1)	-----		
<i>qnrB20</i>	(1)	ATGACGCCATTACTGTATAAAAAAACAGGCACAAAT	ATGGCTCTGGCACT	
<i>qnrB2</i>	(1)	-----	ATGGCTCTGGCACT	
		51		100
KPN36	(1)	-----		
<i>qnrB20</i>	(51)		CGTTGGCGAAAAAATTAACAGAAACCGCTTCACCGGTGAGAAAATTGAAA	
<i>qnrB2</i>	(15)		CGTTGGCGAAAAAATTAACAGAAACCGCTTCACCGGTGAGAAAATTGAAA	
		101		150
KPN36	(1)	-----		
<i>qnrB20</i>	(101)		ATAGTACATTTTTTAACTGTGATTTTTTCAGGTGCCGACCTGAGCGGCACCT	
<i>qnrB2</i>	(65)		ATAGTACATTTTTTAACTGTGATTTTTTCAGGTGCCGACCTGAGCGGCACCT	
		151		200
KPN36	(1)	-----		
<i>qnrB20</i>	(151)		GAATTTATCGGCTGTCAGTTCCTATGATCGTGAAAGCCAGAAAGGGTGCAA	
<i>qnrB2</i>	(115)		GAATTTATCGGCTGTCAGTTCCTATGATCGTGAAAGCCAGAAAGGGTGCAA	
		201		250
KPN36	(1)	-----		
<i>qnrB20</i>	(201)		TTTATAGTCGTGCGATGCTGAAAGATGCCATTTTTTAAAAGCTGTGATTTAT	
<i>qnrB2</i>	(165)		TTTATAGTCGTGCGATGCTGAAAGATGCCATTTTTTAAAAGCTGTGATTTAT	

Sigue en página 90

```

KPN36      (1) -----
qnrB20    (251) CCATGGCGGATTTTCGCAATGCCAGTGCCTTGGCATTGAAATTCGCCAC
qnrB2     (215) CCATGGCGGATTTTCGCAATGCCAGTGCCTTGGCATTGAAATTCGCCAC

KPN36      (1) -----TTTCGCGGGCGCAAGTTTTATGAATATGAT
qnrB20    (301) TGTTCGTGCGCAAGGCGCAGATTTTCGCGGGCGCAAGTTTTATGAATATGAT
qnrB2     (265) TGTTCGTGCGCAAGGCGCAGATTTTCGCGGGCGCAAGTTTTATGAATATGAT

KPN36      (31) CACTACTCGCACCTGGTTTTGCAGTGCATATATCACTAACACAAATCTAA
qnrB20    (351) CACTACTCGCACCTGGTTTTGCAGTGCATATATCACTAACACAAATCTAA
qnrB2     (315) CACTACTCGCACCTGGTTTTGCAGTGCATATATCACTAACACAAATCTAA

KPN36      (81) GCTACGCCAATTTTTTCGAAAAGTCGTGTTGGAAAAGTGTGAGCTGTGGGAA
qnrB20    (401) GCTACGCCAATTTTTTCGAAAAGTCGTGTTGGAAAAGTGTGAGCTGTGGGAA
qnrB2     (365) GCTACGCCAATTTTTTCGAAAAGTCGTGTTGGAAAAGTGTGAGCTGTGGGAA

KPN36      (131) AACCGTTGGATGGGGGCCAGGTACTGGGCGCGACGTTTCAGTGGTTCAGA
qnrB20    (451) AACCGTTGGATGGGGGCCAGGTACTGGGCGCGACGTTTCAGTGGTTCAGA
qnrB2     (415) AACCGTTGGATGGGGGCCAGGTACTGGGCGCGACGTTTCAGTGGTTCAGA

KPN36      (181) TCTCTCCGGCGGCGAGTTTTTCGACTTTTCGACTGGCGAGCAGCAA-----
qnrB20    (501) TCTCTCCGGCGGCGAGTTTTTCGACTTTTCGACTGGCGAGCAGCAACTTCA
qnrB2     (465) TCTCTCCGGCGGCGAGTTTTTCGACTTTTCGACTGGCGAGCAGCAACTTCA

KPN36      (227) -----
qnrB20    (551) CACATTGCGATCTGACCAATTCGGAGTTGGGTGACTTAGATATTCGGCGC
qnrB2     (515) CACATTGCGATCTGACCAATTCGGAGTTGGGTGACTTAGATATTCGGCGC

KPN36      (227) -----
qnrB20    (601) GTTGATTTACAAGGCGTTAAGTTGGACAACACCAGGCATCGTTGCTCAT
qnrB2     (565) GTTGATTTACAAGGCGTTAAGTTGGACAACACCAGGCATCGTTGCTCAT

KPN36      (227) -----
qnrB20    (651) GGAACGTCTTGGCATCGCGGTTGATTGGTTAG
qnrB2     (615) GGAACGTCTTGGCATCGCGATTATTGGCTAG

```

Figura 4.1.5. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del fragmento de 226 pb amplificado en el aislamiento KPN36 con los genes *qnrB20* (Número de acceso: AB379831) y *qnrB2* (Número de acceso: DQ351242).

En segundo lugar, y con el objetivo de analizar la presencia de determinantes de resistencia a β -lactámicos en los aislamientos ISCR1 positivos, se realizó la detección del gen codificante para la β -lactamasa TEM-1 y las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) prevalentes en Argentina, *bla*_{PER-2} y *bla*_{CTX-M-2} (miembro de la familia *bla*_{CTX-M}) utilizando condiciones ya establecidas (Power y col, 2007; Power y col, 1999). Como control positivo se utilizaron las cepas *Citrobacter freundii* 33587 y *Salmonella entérica*

serovar Infantilís 21. Previamente, se buscó fenotípicamente la presencia de β -lactamasas de espectro extendido en estos aislamientos (Figura 4.1.6).

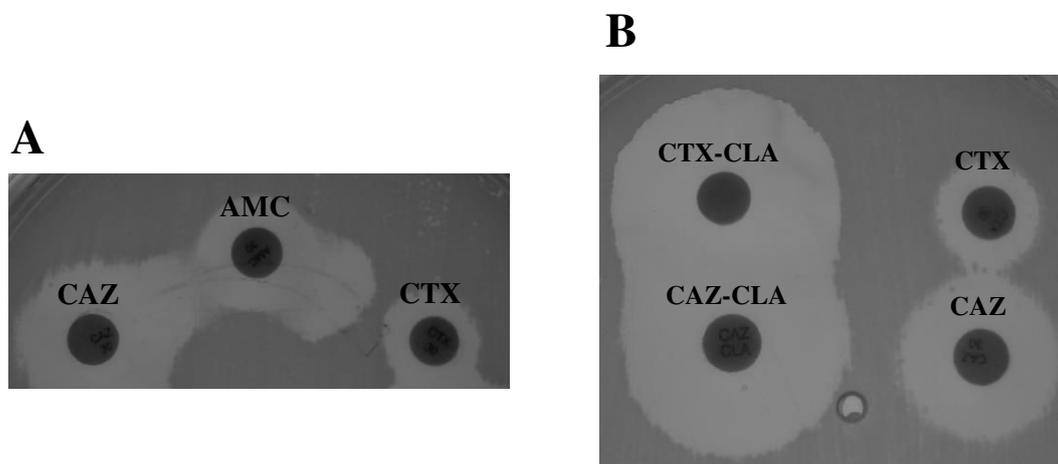


Figura 4.1.6. Detección fenotípica de BLEE en el aislamiento KPN36. A- Ensayo de doble disco. B- Test confirmatorio de la presencia de BLEE. Ambos ensayos ponen en evidencia la presencia de una β -lactamasa de espectro extendido.

Como se muestra en la Tabla 4.1.1, la mayoría (12/16) de los aislamientos con integrones inusuales presentan una BLEE asociada. En 5/7 aislamientos portadores de *qnrB* se detectó la presencia de *bla*_{CTX-M-2} o *bla*_{PER-2}. En los aislamientos ECL8, ECL9 y KPN35 el alelo *qnrB10* detectado fue coligado mediante PCR al gen *bla*_{PER-2}, codificante para la β -lactamasa PER-2 (Tabla 4.1.1). En el caso de KPN36 se detectó un gen del grupo *bla*_{CTX-M-2} asociado a los alelos *qnrB2/qnrB20* (Tabla 4.1.1).

El alelo *qnrB10* fue descrito por primera vez en aislamientos de enterobacterias en Argentina (Quiroga y col, 2007) y en un aislamiento de *E. coli* en China (Wang y col, 2003), asociado al elemento *ISCR1* como parte de un integrón clase 1 inusual (In37) localizado en un plásmido conjugativo. Estudios posteriores reportan la presencia de este alelo en aislamientos de enterobacterias clínicos (Escobar y col, 2010; Gomez y col, 2011; Santos y col, 2011; Shao y col, 2011), enterobacterias comensales en niños sanos (Pallechi y col, 2009) y en aislamientos de origen veterinario (Wu y col, 2009; Fortini y col, 2011). Respecto a la distribución geográfica de este gen, diversos autores han detectado *qnrB10* en Argentina (Escobar y col, 2010; Gomez y col, 2011), Bolivia (Pallechi y col, 2009), Portugal (Santos y col, 2011), China (Shao y col, 2011; Wu y

col, 2009) y Nigeria (Fortini y col, 2011). En los casos en los cuales se ha realizado un estudio de transferibilidad del determinante de resistencia y su entorno genético, en general se ha detectado en plásmidos conjugativos de alto peso molecular (Shao y col, 2011; Fortini y col, 2011) en asociación con *ISCR1*, sólo hay un caso reportado de *qnrB10* no asociado a una estructura de tipo integrón clase 1 inusual (Santos y col, 2011). Las β -lactamasas PER-2 (Escobar y col, 2011; Gomez y col, 2011) y TEM-1 (Fortini y col, 2011) han sido asociadas a este alelo.

qnrB2 fue el primer alelo detectado de la familia de *qnrB* (Jacoby y col, 2006) y posee una amplia diseminación entre aislamientos bacterianos de todo el mundo, de origen humano y veterinario (Pomba y col, 2009; Fortini y col, 2009), nombrando algunos ejemplos: Estados Unidos (Jacoby y col, 2006), China (Yang y col, 2008), Hungría (Szabo y col, 2008), Israel (Chmelnitski y col, 2008), Portugal (Pomba y col, 2009), Inglaterra (Hopkins y col, 2008), Senegal (Garnier y col, 2006) y en un ámbito más cercano han sido descritos en Brasil (Minarini y col, 2008) y Bolivia (Pallecchi y col, 2009). Este alelo se encuentra localizado en plásmidos de variados pesos moleculares y grupos de incompatibilidad, inserto dentro de integrones clase 1 inusuales asociado a una única copia de *ISCR1* (Espedido y col, 2008) o flanqueado por dos copias de este elemento (Garnier y col, 2006). Las enzimas β -lactamasas relacionadas con *qnrB2* incluyen CMY-2 (Pai y col, 2007), CTX-M-14 (Yang y col, 2008), CTX-M-15 (Liassine y col, 2008), IMP-4 (Espedido y col, 2008), IMP-8 (Wu y col, 2008), KPC-2 (Chmelnitsky y col, 2008) y SHV-12 (Jacoby y col, 2006).

Recientemente ha sido demostrado que el promotor de la expresión de *qnrB2* se encuentra bajo el control de un regulador de la respuesta SOS de tipo LexA (Da Re y col, 2009). De esta manera, el antibacteriano mismo (por ejemplo, ciprofloxacina) puede actuar como inductor del sistema SOS¹ y regular positivamente la expresión de su propio determinante de resistencia. Este tipo de regulación parecería ser común a los determinantes *qnrB*, ya que se ha detectado *in silico* el sitio de unión a LexA

¹ Este sistema se induce en respuesta a daños en el ADN mediante luz UV, agentes genotóxicos y ciertas disrupciones génicas, de esta manera aumenta la expresión de varios genes involucrados en la reparación del ADN. La proteína LexA actúa como represor de este sistema, con lo cual una disminución de LexA, resulta en la inducción del sistema SOS, permitiendo la transcripción de una serie de genes, que codifican las ADN polimerasas propensas a error de este sistema de reparación.

conservado en las regiones promotoras de los alelos *qnrB* descritos hasta el momento (Da Re y col, 2009). Así, el tratamiento de un microorganismo con un fármaco al que tiene bajo nivel de resistencia podría convertirse potencialmente en un grave problema en el manejo de la enfermedad infecciosa. Esto es particularmente cierto para los agentes patógenos o comensales que contienen *qnrB2*, ya que la ciprofloxacina es generalmente utilizada como droga de elección para el tratamiento empírico de las infecciones del tracto urinario e infecciones gastrointestinales en los hospitales. Por lo tanto, la movilización de los genes *qnrB2* podría conducir a la rápida difusión y selección de patógenos resistentes (Da Re y col, 2009).

A diferencia de *qnrB2*, una búsqueda bibliográfica respecto de *qnrB20* arroja sólo el resultado de su primera descripción en un aislamiento de *K. pneumoniae* en Singapur. Este alelo fue detectado en un plásmido conjugativo de alto peso molecular, flanqueado corriente arriba por la secuencia de inserción IS26 y corriente abajo por *orf1005*, codificante para una posible transposasa (Teo y col, 2009). De acuerdo a la bibliografía consultada, no existen reportes posteriores de *qnrB20*.

Si bien la secuencia del amplicón de 226 pb obtenido a partir de KPN36 no permite identificar unívocamente al alelo *qnrB* (100% de identidad con *qnrB2/20*), cabe destacar que tanto *qnrB2* como *qnrB20* no han sido descritos en nuestro país hasta el momento. Es por esto que reviste gran importancia la realización de futuros análisis tendientes a identificar y caracterizar este alelo.

Como se describió en “Introducción”, los genes codificantes para las β -lactamasas de espectro extendido generalmente se encuentran localizados en plásmidos móviles que alojan numerosos determinantes de resistencia (Sirot y col, 1987).

En Argentina, las enzimas de la familia de CTX-M y PER son las BLEEs predominantes. CTX-M-2 ha sido la variante alélica absolutamente prevalente en los aislamientos clínicos de enterobacterias durante mucho tiempo (Bertona y col, 2005; Quinteros y col, 2003; Quinteros y col, 1999; Power y col, 1999; Radice y col, 2002), sin embargo, en relevamientos recientes se observó la emergencia y diseminación de otras enzimas de la familia CTX-M, predominantemente CTX-M-15 (Sennati y col, 2012).

Desde su descubrimiento, PER-2 ha sido detectada en Argentina en aislamientos de enterobacterias, como *K. pneumoniae* (Melano y col, 2003), *E. cloacae*, *E. aerogenes* (Quinteros y col, 2003), *V. cholerae* (Petroni y col, 2002) y en *A. baumannii* (Pasterán y col, 2006). Asimismo, la detección de PER-2 ha sido reportada en otros países del mundo, como en aislamientos de *E. coli* enteropatógena (EPEC) en Uruguay (Vignoli y col, 2005), en un aislamiento de *Salmonella* Senftenberg en India (Revathi y col, 1998) y en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *E. aerogenes* en Bolivia (Celenza y col, 2006).

Es importante destacar la relación establecida entre la presencia de los determinantes *qnr* en aislamientos portadores de integrones clase 1 inusuales y la producción de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de enterobacterias de nuestro medio, ya que la localización plasmídica de ambos determinantes contribuye a la diseminación de bacterias productoras de BLEE con susceptibilidad reducida a quinolonas a través de mecanismos de co-selección. De esta manera, el uso de un antimicrobiano para el tratamiento de una infección bacteriana puede permitir una transferencia en “bloque” de múltiples determinantes de resistencia. Esto tiene un impacto clínico directo debido a que los niveles de resistencia a los cuales se asocian dichos determinantes, expresados como mecanismos de resistencia simultánea y seleccionables, impiden la utilización de grandes familias de antimicrobianos con excelentes ventajas farmacocinéticas y farmacodinámicas, como las penicilinas, cefalosporinas y quinolonas, limitando drásticamente el espectro de antibacterianos a utilizar en el tratamiento de estas cepas asociadas a diversas infecciones.

Los datos anteriormente presentados son los primeros reportes de detección de genes *qnrB* en aislamientos clínicos provenientes de dos centros de salud de la ciudad de Santa Fe.

4.1.4. Regiones variables de integrones clase 1 inusuales.

Se estudiaron con mayor profundidad las regiones variables localizadas entre *ISCR1* y la segunda copia de 3'CS (RV2) de ciertos integrones clase 1 inusuales detectados (seleccionados al azar). Esto se realizó con el fin de analizar los arreglos de genes presentes en esa región en los aislamientos: KPN1, ECL8, ECL9, PMI28, KPN35, ECO83, CFR138, ECL150 y ECL 151.

4.1.4.1. Obtención de las construcciones con las regiones variables de los integrones inusuales.

Las regiones variables se amplificaron mediante PCR con los oligonucleótidos específicos HS821 y HS822 en condiciones estandarizadas (Chowdhury y col., 2011). Los productos obtenidos fueron analizados electroforéticamente en un gel de agarosa al 0.8% (p/v). Luego, la banda con el tamaño esperado para cada región fue purificada con el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). La presencia de ADN en el eluido fue verificada posteriormente mediante corridas en geles de agarosa al 0.8 % (p/v), y su concentración se midió a $\lambda=260$ nm. El producto de PCR purificado fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

Se obtuvieron diferentes amplicones para los aislamientos estudiados, y en algunos microorganismos se detectó la presencia de más de un producto de amplificación (Figura 4.1.7 y Tabla 4.1.4).

Tabla 4.1.4. Regiones variables amplificadas para los diferentes aislamientos.

Aislamiento	Región variable amplificada (pb)/(denominación)		
KPN1	2900 (1)		
ECL8	\approx 6000 (8A)		
ECL9	\approx 6000 (9A)		
PMI28	2500 (28)		
KPN35	\approx 6000 (35A)		
ECO83	\approx 6000 (83A)		
CFR138	\approx 6000 (138A)	3000 (138B)	2000 (138C)
ECL150	\approx 6000 (150A)	3000 (150B)	
ECL151	\approx 6000 (151A)		

Como se observa en la tabla 4.1.4, en los aislamientos ECL8, ECL9, KPN 35, ECO83, CFR138, ECL 150 y ECL151 se obtuvo una banda de ≈ 6000 pb (A), además, en los aislamientos CFR138 y ECL150 otra de 3000 pb (B), y, sólo en CFR138 una última de 2000 pb (C) (Figura 4.1.7).

Con el fin de evaluar si se trataba de las mismas regiones variables se realizó la digestión de las bandas purificadas con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, en forma separada. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.1.8. Se obtuvo el mismo perfil de restricción con ambas enzimas en los fragmentos de ≈ 6000 pb correspondientes a los aislamientos ECL8 (8A), ECL9 (9A), KPN35 (35A), ECO83 (83A), ECL150 (150A) y ECL151 (151A), lo cual indicaría que presentan similar RV2. En cambio, el fragmento A correspondiente al aislamiento CFR138 (138A) no fue digerido con ninguna de las 2 enzimas, por lo cual podría concluirse que la secuencia nucleotídica de este amplicón difiere de la de los demás aislamientos. Los fragmentos de 3000 pb de los aislamientos CFR138 (138B) y ECL150 (150B) poseen un perfil de restricción similar, ambos son digeridos con *HindIII* pero no con *EcoRI*. Por último, el producto de amplificación de 2000 pb del aislamiento CFR138 (138C), solo es digerido con *EcoRI*.

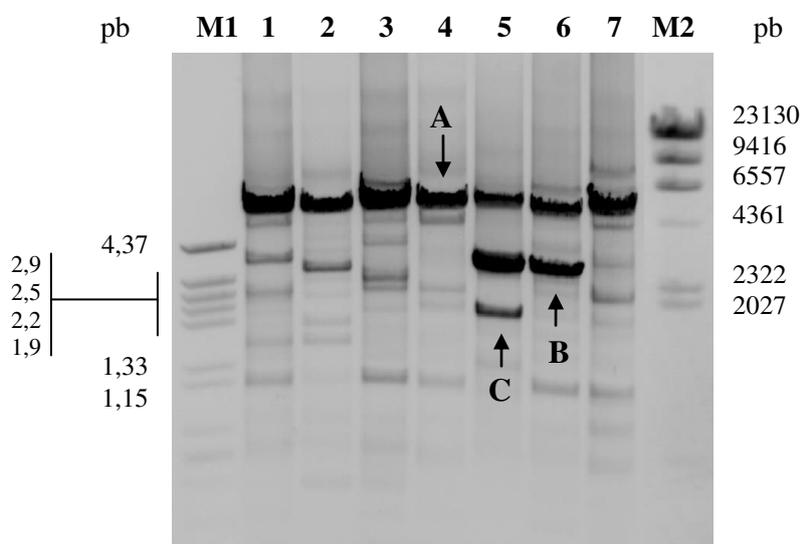


Figura 4.1.7. Amplicones de RV2 obtenidos mediante PCR. Gel de agarosa 0,8%. M1: ϕ_{29} , M2: λ /*HindIII*. Calle 1: ECL8, Calle2: ECL9, Calle 3: KPN35, Calle 4: ECO83, Calle 5: CFR138, Calle 6: ECL150, Calle 7: ECL151. Se encuentran señalados los productos de amplificación de RV2 seleccionados para analizar (A, B y C).

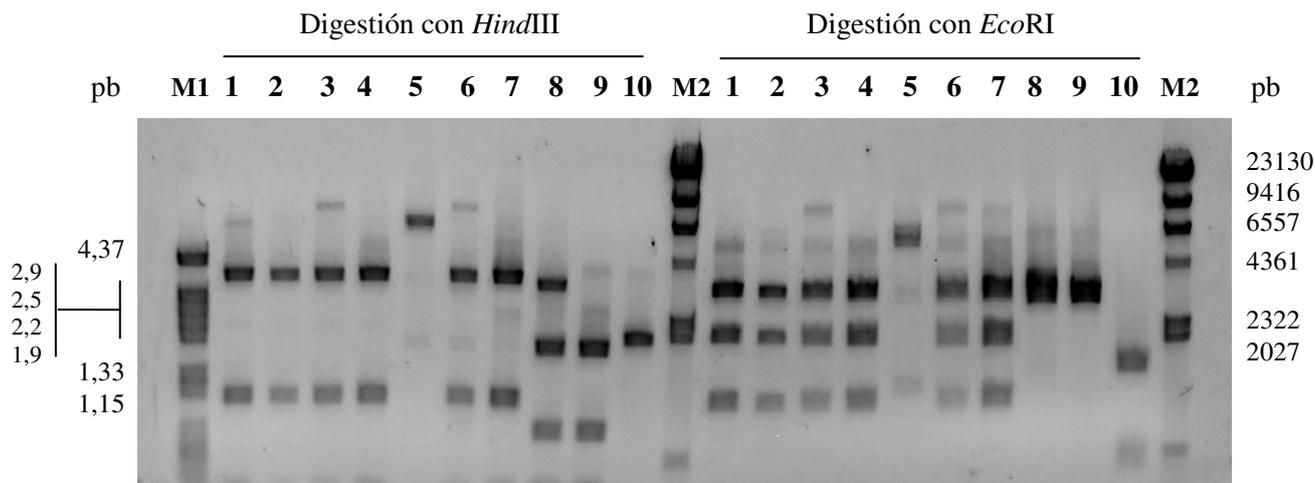


Figura 4.1.8. Digestión enzimática de RV2 con *HindIII* y *EcoRI*. Gel de agarosa 0,8%. M1: ϕ_{29} , M2: λ HindIII. Calle 1: 8A, Calle 2: 9A, Calle 3: 35A, Calle 4: 83A, Calle 5: 138A, Calle 6: 150A, Calle 7: 151, Calle 8: 138B, Calle 9: 150B, Calle 10: 138C.

En vista de los anteriores resultados, se procedió a realizar el clonado de los amplicones 1, 28, 83A, 138A, 138B y 138C en el vector pGEM-T. Las construcciones deseadas [pGEM-T/RV2s] fueron obtenidas a partir de la ligación del fragmento de ADN correspondiente a la región variable purificado anteriormente con el vector pGEM-T, siguiendo instrucciones del fabricante. Con la mezcla de ligación se transformaron células de *E. coli* DH5 α competentes y se seleccionaron en medio LBA suplementado con AMP (100 μ g/ml), IPTG (0,5 mM) y X-gal (80 μ g/ml) mediante diferenciación visual de colonias blancas (que potencialmente poseen el inserto) y de azules (que no poseerían el inserto). Se tomaron distintas colonias blancas y se repicaron en caldo LB suplementado con AMP (100 μ g/ml).

Para verificar la presencia del inserto se realizó la extracción de plásmido de las colonias crecidas utilizando el kit comercial *Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega). Luego, se realizó la digestión del ADN plasmídico obtenido con la enzima *EcoRI* y/o se amplificó por PCR el inserto con los cebadores HS821 y HS822 (Figura 4.1.9).

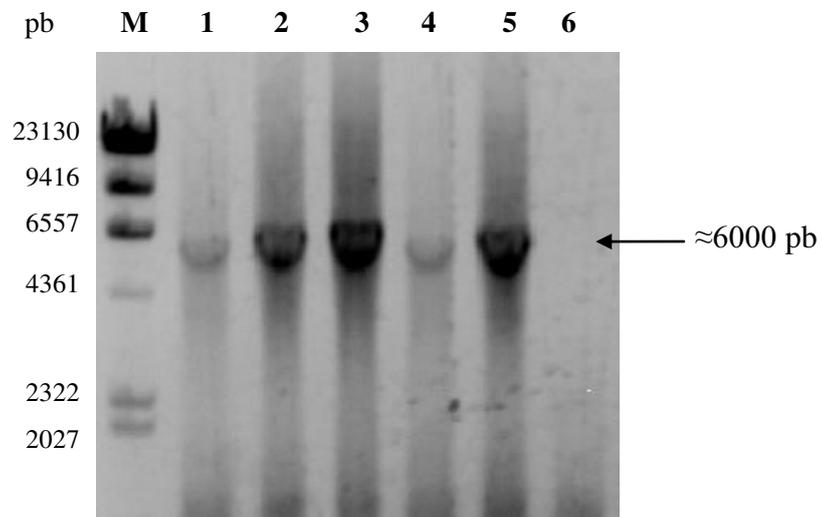


Figura 4.1.9. Análisis de la presencia del inserto 83A mediante amplificación por PCR. Gel de agarosa 0,8%. M: λ /HindIII. Calle 1-5: clones analizados. Calle 6: control negativo (pGEM-T).

Se obtuvieron todas las construcciones deseadas, correspondientes a las regiones variables (RV2) de los integrones clase 1 inusuales presentes en los aislamientos seleccionados, para su posterior secuenciación.

4.1.4.2. Análisis de las secuencias nucleotídicas.

Como se mencionó anteriormente, se realizó el clonado de las RV2 representativas de los fragmentos que presentaron perfil de restricción similar:

Fragmento clonado	RV2 con perfil de restricción similar	Denominación de la construcción
1	-	pGRV1
28	-	pGRV28
83A	8A, 9A, 35A, 150A, 151A	pGRV83A
138B	150B	pGRV138B

La secuenciación de las RV2 clonadas en pGEM-T fue realizada utilizando los oligonucleótidos M13Fw y M13Rv detallados en “Materiales y Métodos”. En el caso de la construcción pGRV83A el esquema de *primers* utilizados para secuenciar fue el que se muestra en la figura 4.1.10. Esto fue realizado debido a que en los aislamientos a partir de los cuales se amplificó esta RV2 se había detectado previamente un amplicón con el par de oligonucleótidos qnrBFw y qnrBRv.

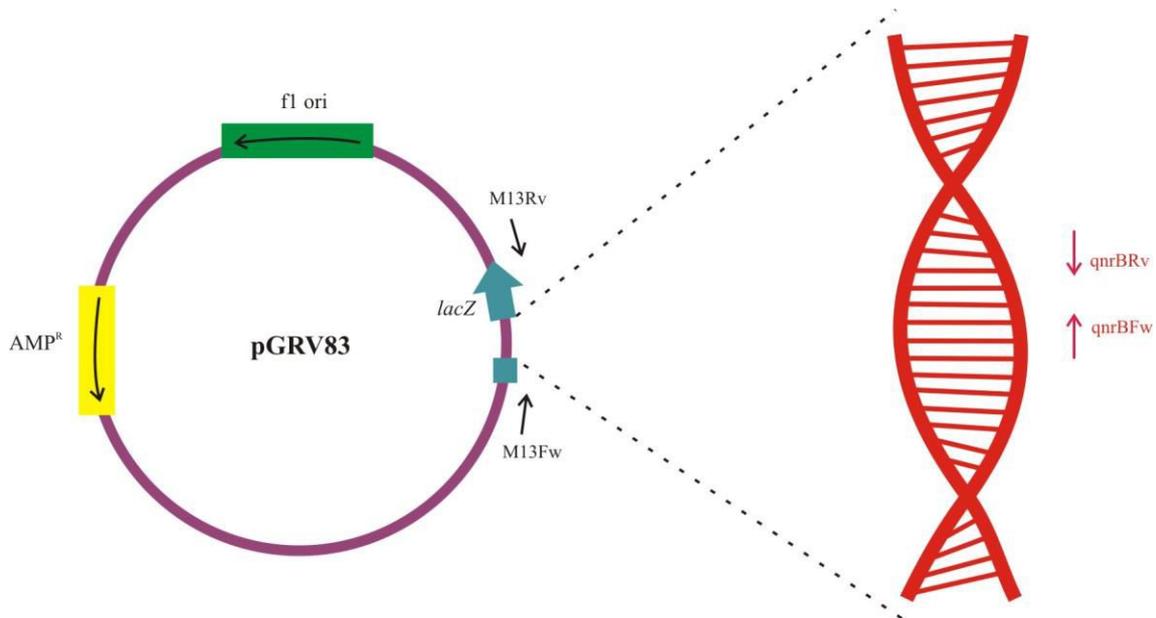


Figura 4.1.10. Esquema de los oligonucleótidos utilizados para secuenciar pGRV83. Como cebadores externos se utilizó el par M13Fw y M13Rv. qnrBFw y qnrBRv fueron utilizados como cebadores internos.

Mediante el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se identificaron los arreglos de genes que forman parte de las regiones variables de los integrones inusuales estudiados.

Inicialmente se realizó el análisis y búsqueda en base de datos de las secuencias nucleotídicas obtenidas (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con los oligonucleótidos antes mencionados.

Posteriormente, para reafirmar la identidad de las secuencias de RV2 se analizó el perfil de restricción teórico que se obtendría al realizar una digestión *in silico* de las mismas

con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI, utilizando el *software* Vector NTI. Como resultado de este análisis pudo concluirse que el perfil de restricción obtenido teóricamente coincidió plenamente con el empírico, lo cual confirma la identidad de las secuencias obtenidas.

En la figura 4.1.11 se observan los arreglos inferidos a partir de los fragmentos secuenciados y análisis de restricción. En A se esquematiza el arreglo de aproximadamente 6 kb detectado en la RV2 del integrón inusual clase 1 en los aislamientos ECL8, ECL9, KPN35, EC83, ECL150 y ECL151. En el integrón complejo presente en KPN1, fue detectado el arreglo que se describe en B, al igual que en los amplicones B (≈3 kb) detectados en CFR138 y ECL150. En el aislamiento PMI28 se encontró la estructura descrita en C. El análisis de la secuencia A y C del aislamiento 138 dió como resultado que eran productos de amplificación inespecífica.

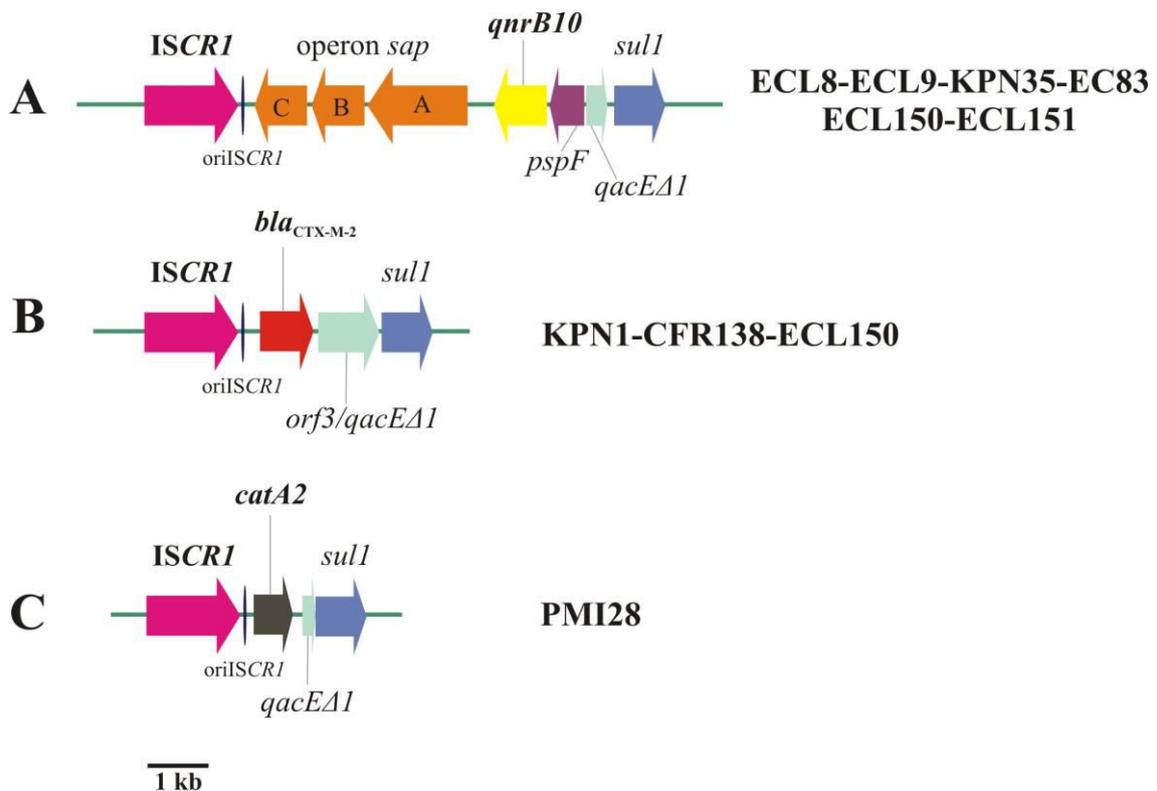


Figura 4.1.11. Organización genética de las RV2 analizadas. A la derecha, se muestran los aislamientos poseedores de integrones clase 1 inusuales que portan las distintas RV2.

La estructura A detectada en los aislamientos ECL8, ECL9, KPN35, EC83, ECL150 y ECL151, In37:: ISCR1::*qnrB10*, fue descrita previamente como parte de un plásmido conjugativo en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* en Argentina (Quiroga y col, 2007) y en un aislamiento de *E. coli* en China (Wang y col, 2003). El gen *qnrB10* se localiza en una orientación opuesta a ISCR1, y se encuentra flanqueado en su extremo 3' por el operon *sap* (*sapC*, *sapB* y *sapA*), el cual codifica un sistema putativo de transporte de péptidos en bacterias gram negativas; y en el extremo 5' por el gen *pspF*, codificante para un activador transcripcional del operon *psp* inducible por estrés. En los aislamientos en los que fue detectado este arreglo fue observado un alto nivel de resistencia a quinolonas (Tabla 4.1.3).

La secuencia nucleotídica de la RV2 dentro de un integrón clase 1 inusual de KPN1, CFR138 y ECL150 indica que el gen *bla*_{CTX-M-2} se encuentra asociado a ISCR1. En nuestro país, este arreglo ha sido ampliamente descrito asociado a plásmidos conjugativos (Di Conza y col, 2002; Power y col, 2004; Arduino y col, 2002; Márquez y col, 2008). La localización plasmídica de esta estructura facilita la diseminación de este determinante de resistencia entre bacterias. La presencia de la enzima CTX-M-2 en KPN1, CFR138 y ECL150 podría explicar el perfil de susceptibilidad a β-lactámicos observado en estos aislamientos (Tabla 4.1.1).

Como se dijo anteriormente, CTX-M-2 ha sido durante mucho tiempo la BLEE prevalente en Argentina. De hecho, las únicas enzimas de la familia CTX-M anteriormente reportadas pertenecen al grupo CTX-M-2. (Radice y col, 2002; Quinteros y col, 2003). Un estudio multicéntrico recientemente realizado en nuestro país (Sennati y col, 2012) reveló que, si bien CTX-M-2 sigue siendo endémica, se observa la emergencia y notable propagación de CTX-M-15 (grupo CTX-M-1) y, en menor medida, de enzimas pertenecientes a otros grupos, como CTX-M-8 y CTX-M-9. La aparición de CTX-M-15 se observó tanto en *E. coli* y *Klebsiella* spp. A diferencia del gen *bla*_{CTX-M-2}, que siempre se encuentra localizado *downstream* al elemento ISCR1 (Arduino y col, 2002; Di Conza y col, 2002), al investigar el entorno genético de *bla*_{CTX-M-15}, este determinante ha sido asociado al elemento de inserción *ISEcp1* completo o truncado (con su secuencia promotora completa) (Sennati y col, 2012). Se encuentra demostrado que esta secuencia de inserción es capaz de movilizar a *bla*_{CTX-M-19} (Poirel y col, 2003), con lo cual su detección junto a *bla*_{CTX-M-15} es consistente con la amplia

diseminación de esta enzima en el mundo (Brigante y col, 2005; Lavollay y col, 2006; Pallecchi y col, 2007; Bado y col, 2010).

Es de destacar la presencia de dos integrones inusuales detectados en un mismo aislamiento: ECL150. La estrategia utilizada para la amplificación e identificación de las RV2 permitió detectar y analizar la presencia de más de una de estas regiones en el aislamiento anteriormente mencionado. Si bien es de esperar, en la literatura no hay reportes que describan esta situación, probablemente debido a la diferencia en el enfoque de estudio de estas regiones, esquema de amplificación y análisis; lo cual podría enmascarar la detección de múltiples integrones clase 1 inusuales. Nuevamente, la asociación detectada entre *bla_{CTX-M-2}* y *qnrB10* e *ISCR1* reviste gran importancia, ya que, como se dijo anteriormente, se encuentra postulado que esta secuencia de inserción poseería un importante rol en la movilización de genes adyacentes y su diseminación (Toleman y col, 2006a).

El integrón inusual presente en PMI28 posee en su RV2 el gen *catA2*, codificante para una enzima cloranfenicol acetiltransferasa tipo II. Esta enzima confiere resistencia a cloranfenicol, ya que cataliza la transferencia del grupo acetyl-CoA al grupo hidroxilo del cloranfenicol dando 3-acetilcloranfenicol, el cual no puede unirse a los ribosomas bacterianos (Murray y col, 1990). La asociación entre *ISCR1* y *catA2* se encuentra reportada en uno de los primeros integrones inusuales detectados: In6, de localización plasmídica (pSa) (Stokes y col, 1993). De acuerdo a la bibliografía consultada, este es el primer reporte de este gen asociado a *ISCR1* en nuestro país.

En el año 2011, Chowdbury y colaboradores realizaron el estudio de la presencia de integrones clase 1 en 199 aislamientos de *K. pneumoniae* multiresistentes provenientes de Argentina, Chile, Uruguay y Sidney (Australia). En el 88% (22/25) de los aislamientos procedentes de Argentina se detectaron integrones clase 1, y a su vez, el 77% (17/22) de estos se encontraba asociado a *ISCR1*. Respecto del total de aislamientos el 68% presentó integrones clase 1 inusuales. Si bien este valor es mayor que a lo detectado en el presente estudio, es posible asociar este resultado con el perfil de multiresistencia de las bacterias estudiadas y el criterio de selección de estos aislamientos, ya que se encuentra reportada la estrecha relación entre la presencia de

integrones y la múltiple resistencia a antimicrobianos, independientemente de la especie u origen del aislamiento (Porto y col, 2005).

Los resultados obtenidos confirman la presencia de diversos determinantes de resistencia a antimicrobianos en los aislamientos clínicos de nuestra región dentro de estos elementos potencialmente móviles. Siguiendo la hipótesis presentada por Toleman y col, que establece que *ISCR1* pertenece a la familia de secuencias de inserción *IS91* capaces de movilizar secuencias adyacentes por errores en la replicación de círculo rodante, no hay razón por la cual estos elementos no puedan movilizar cualquier fragmento adyacente de ADN. Por lo tanto, no es sorprendente que este potente mecanismo de movilización de genes se haya relacionado con tal facilidad a los determinantes seleccionables de resistencia a antibacterianos, lo cual es muy preocupante a nivel clínico ya que constituye una nueva vía de diseminación de genes de resistencia, tal vez aún más efectiva que integrones y transposones (Toleman y col, 2006a).

La variedad de arreglos de genes asociados a *ISCR1*, la posible movilización a través de la transposición de *Orf513* y la asociación estos integrones complejos con elementos automovilizables como transposones y plásmidos conjugativos da cuenta de la flexibilidad genética y adaptabilidad del genoma bacteriano frente a condiciones de presión selectiva.

Los resultados anteriormente presentados constituyen el primer estudio de la presencia y caracterización de integrones clase 1 inusuales en la ciudad de Santa Fe, los cuales conforman una aproximación inicial en lo que a la diseminación de genes asociados a *ISCR1* respecta.

4.2. Capítulo 2: Estudios de ISCR1

4.2.1. ISCR1: Generalidades.

Como se describió anteriormente, los integrones clase 1 inusuales presentan una región común (CR) a continuación de la primera región 3'CS. Esta región común consiste en el marco abierto de lectura *orf513* junto a un sitio de recombinación. La secuencia nucleotídica de *orf513* se muestra en la figura 4.2.1. La traducción aminoacídica deducida *in silico* (<http://web.expasy.org/tools/translate/>) se encuentra detallada en la figura 4.2.2. La masa molecular calculada teóricamente (http://web.expasy.org/compute_pi/) para esta proteína nativa es de 58,5 kDa.

```
1 atgtcgctgg caaggaacgc cacggcgagt caatcgccca ctcaaacaaa cggttacgaa
61 cgccaccaac cggaccagac gctgctctac cagctgggtg agcagcacta cccagccttc
121 aaagcctcac tcgaagccca aggtcaacac ctgcctcgct acatccaaca agaattcaac
181 gacctcctcc aatgtggccg tctggagtat ggtttcatgc gggttcgctg cgaggattgt
241 catcacgagc gtctggtcgc cttcagctgt aaacgacgcg gcttttgccc tagctgcggt
301 gcccgcgga tggccgagag tgcggcgctg ctgatagacg aagtcttccc caaggagccc
361 attcgccagt ggggtgctcag ctttcctttc cagctacgct ttttgctggc tcgccatccc
421 cagctgatgg gccaggctct gagtatcgtc tategtacac tctcaactca tctgatcaaa
481 aaagccggtt acaccaaagc ctctgcacaa actggctcag tgactcttat ccaacgcttt
541 ggctccgcmc taaatctcaa tgtccactac cacatgctgt ttctcgatgg tgtctatgcc
601 gaagatgact atggcaagca acgcttccat cgtgtcaagg caccactta cgatgagctg
661 aatacgtcgc ctcacaccct cagccatcgc atcgtctcgt gcatggaaaa gcgtgggatt
721 ttggagcgtg atgccgagaa tacgtgggtg aactggaag agggcgaaga cgatacgtg
781 actcaattac atggtgcttc ggttacgtat cgcattgccc tcggccccca gcaaggcgc
841 aaagtcttca ccctgcaaac cttgccaggg cgtgaggata aagccgactc aagcagtcga
901 gtagccaacc atgctggttt ctgcctacac gccgggtgtga tggccgaagc gcatcagcgg
961 gataagcttg agcgttctg tgcctacatt agtcggccag cggtttcaga aaaacgtctg
1021 gcattaaccg ccaatgggca ggtgcgctac gagctcaaaa ctccgtaccg caatggcacc
1081 acccatgtga tcttcgagcc gctggacttc atcgccaaac tcgctgcggt ggtacctaac
1141 ccgcgagtca acctcacacg cttccacggc gtctttgcac cgaacagcaa acaccgagtt
1201 caagtaacac ccgccaagcg gggcaagaag cccgacaaat cgggaaggtct cgatactaac
1261 tggcgtgaca agagtcctgc agagcgcac cgcgccatga cctggatgca acgcctcaag
1321 cgagtcttca atattgatat tgaagtctgc gaacactgcg gcggtcacgt caaagtgatt
1381 gccagcatcg aagatccgaa ggtcattgag cagattctca agcatctgaa acagaaaaca
1441 gccaaaggca atgccgcaa gcagcgtgag ctgccaccag aacgagcgcg gccactgact
1501 cccagcctgt tcgatccatc acagagtcgt ctctttgact ga
```

Figura 4.2.1. Secuencia nucleotídica de *orf513* (1541 bp). Número de acceso GenBank: GU943791.1

```

1 MSLARNATAS QSPTQTNGYE RHQPDQTLLY QLVEQHYPAF KASLEAQQQH LPRYIQQEFN
61 DLLQCGRLEY GFMRVRCEDC HHERLVAFSC KRRGFCPSCG ARRMAESAAL LIDEVFPKEP
121 IRQWVLSFPF QLRFLARHP QLMGQVLSIV YRTLSTHLIK KAGYTKASAQ TGSVTLIQRF
181 GSALNLNVHY HMLFLDGVYA EDDYGKQRFH RVKAPTYDEL NTLAHTLSHR IARCMEKRG I
241 LERDAENTWL TLEEGEDDTL TQLHGASVTY RIAVGPQQGR KVFTLQTLPG REDKADSSSR
301 VANHAGFSLH AGVMAEAHQ RDKLERLCRYI SRPAVSEKRL ALTANGQVRY ELKTPYRNGT
361 THVIFEPLDF IAKLAALVPK PRVNLTRFHG VFAPNSKHRV QVTPAKRGKK PDKSEGLDTN
421 WRDKSPAERH RAMTWMQRLK RVFNIDIEVC EHC GGHV KVI ASIEDPKVIE QILKHLKQKT
481 AKANA AKQRE LPPERAPPLT PSLFDPSQSR LFD

```

Figura 4.2.2. Secuencia aminoacídica deducida para *Orf513* (513 aa). MM: 58,5 KDa

En 2006, el estudio realizado por Toleman y colaboradores plantea la hipótesis de que esta CR pertenece a un grupo de secuencias de inserción atípicas, de la familia de *IS91*, y debido a esto propone denominar a la CR como *ISCR1* (Toleman y col, 2006). Con lo cual, *orf513* codificaría para una posible enzima transposasa de características particulares.

Una característica diferencial de estas secuencias de inserción es su modo de replicación, la cual es denominada replicación de círculo rodante. Se encuentra demostrado que secuencias de inserción de esta familia son capaces de mover genes adyacentes por errores en durante la replicación (Tavakoli y col, 2000). Se encuentra reportado también que *ISCR1* provee un promotor (P_{CR1-1}) para la expresión de genes integrados *downstream* a estos elementos (Rodríguez-Martínez y col, 2006).

Lo anteriormente expuesto enfatiza la importancia de estas secuencias y refuerza la hipótesis de que *Orf513* poseería una función vital en la evolución y diseminación de la resistencia a antimicrobianos.

4.2.2. Obtención del marco abierto de lectura *orf513* y clonado del mismo.

Para este objetivo se plantearon tres estrategias diferentes de clonado y expresión. Se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos específicos para amplificar *orf513*, los cuales se encontraban modificados en cada uno de sus extremos con distintos sitios de restricción reconocidos por las enzimas a utilizar para realizar su clonado en el vector seleccionado. En los 3 casos se eliminó el codón de terminación propio del marco abierto de lectura. (Tabla 4.2.1).

Tabla 4.2.1. Estrategias de clonado y expresión de *orf513*. Plásmidos recombinantes obtenidos y ensayados.

Oligonucleótido	Vector	Sitios de clonado	Construcción
ORF513-BamH ORF513-Xho	pET28a+	<i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I	p28ORFA
ORF513-Nco ORF513-Xho	pET28b+	<i>Nco</i> I- <i>Xho</i> I	p28ORFB
ORF513-NF ORF513-XR	pET22b+	<i>Nco</i> I- <i>Xho</i> I	p22ORF

Mediante PCR se amplificó *orf513*, a partir de ADN plasmídico extraído del microorganismo *Salmonella enterica* serovar Infantis (S21) (Di Conza y col, 2002) portador de un integrón de clase 1 inusual utilizando oligonucleótidos específicos y condiciones de amplificación apropiadas. En todos los casos se utilizó una enzima ADN polimerasa de alta fidelidad (Figura 4.2.3).

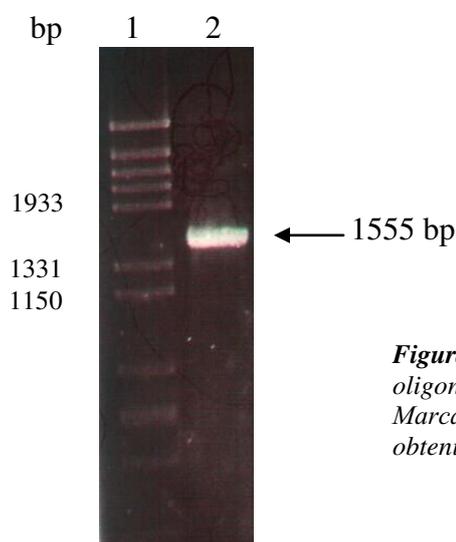


Figura 4.2.3. Amplificación de *orf513* utilizando los oligonucleótidos ORF513-Nco y ORF513-Xho. Calle 1: Marcador de masa molecular ϕ_{29} , Calle 2: amplicón obtenido.

Los fragmentos obtenidos fueron clonados en distintos vectores (Tabla 4.2.1), siguiendo el procedimiento descrito en “Materiales y Métodos”. Con las construcciones obtenidas se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* Top 10 (F') o electrocompetentes *E. coli* DH5 α . La presencia del plásmido recombinante deseado en los clones obtenidos fue confirmada mediante diferentes técnicas: extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina, o con kits comerciales, digestión con enzimas de restricción (Figura 4.2.4), amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos (Figura 4.2.5) y secuenciación con los oligonucleótidos T7Fw y T7Rv.

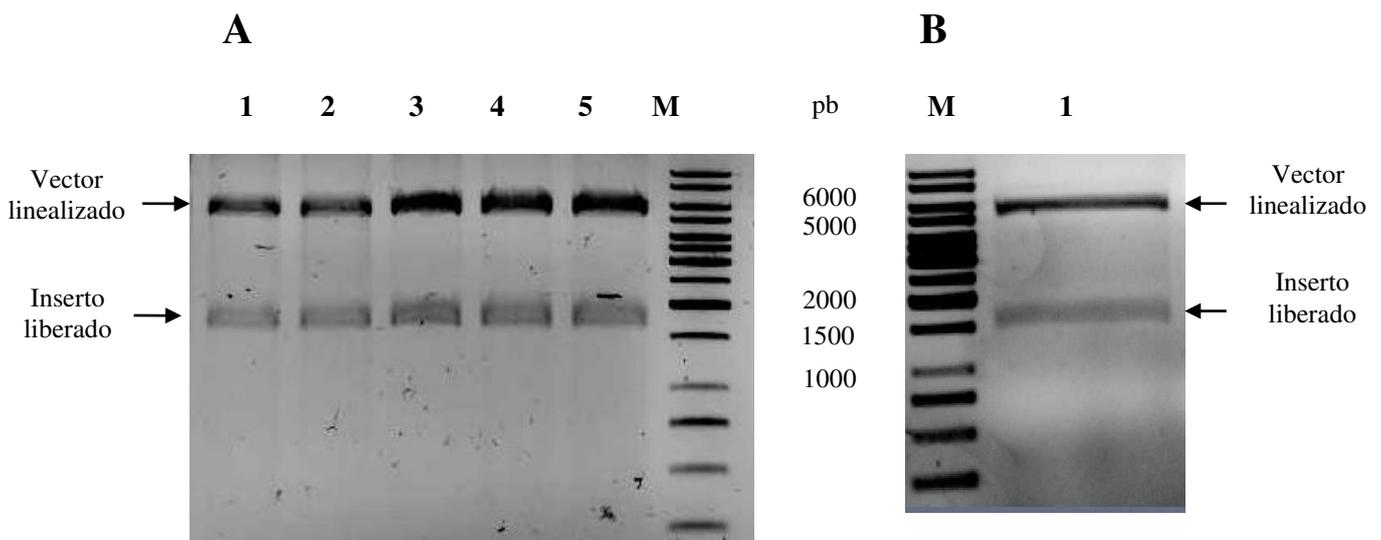
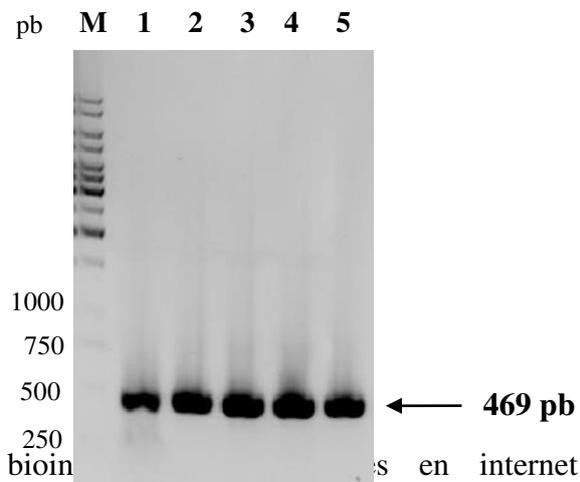


Figura 4.2.4. Liberación del inserto clonado mediante digestión con enzimas de restricción. Gel de agarosa 0,8%. M: marcador Gene Ruler 1 kb DNA Ladder. A) Digestión de p22ORF con las enzimas *NcoI* y *XhoI*. Calles 1-5: clones obtenidos con el plásmido recombinante p22ORF. B) Digestión de p28ORFA con *BamHI* y *XhoI*. Calle 1: clon 11. En todos los casos se verifica la presencia de un inserto del tamaño esperado (≈ 1500 pb).

Figura 4.2.5. Amplificación por PCR de un fragmento interno de *orf513* utilizando los oligonucleótidos 341a y 341b. Gel de agarosa 1,5%. M: marcador Gene Ruler 1 kb DNA Ladder. Calles 1-4: plásmidos recombinantes extraídos de los clones obtenidos. Calle 5: control positivo, ADN plasmídico extraído de S21 (Di Conza y col, 2002).



Mediante la utilización de recursos bioinformáticos disponibles en internet (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y herramientas del software Vector NTI (perfil de

restricción, alineamientos y ensambles de secuencias) se analizaron las secuencias obtenidas. En los diferentes clones se examinó si en las construcciones obtenidas el gen codificante para la proteína se encontraba en fase, y si este presentaba mutaciones. Los clones que tenían la construcción en la fase correcta (Figura 4.2.6) y sin mutaciones fueron utilizados para transformar células competentes de cepas de *E. coli* apropiadas para expresión. En las bacterias recombinantes obtenidas fue inducida la producción de la proteína Orf513. En todos los casos, para realizar estos ensayos se utilizaron células transformadas con 24-48 hs de anticipación.

		1			60
<i>orf513</i>	(1)	----- <u>RBS</u> ----- <u>Sitio NcoI</u> -----		ATGTCGCTGGCAAGGAACGCCACGGCGAGTCAA	
p28ORFB	(1)	ACTTTAAGAAGGAGATATACCATGAAATGTCGCTGGCAAGGAACGCCACGGCGAGTCAA			
		61			120
<i>orf513</i>	(34)	TCGCCACTCAAACAAACGGTTACGAACGCCACCAACCCGACCAGACGCTGCTCTACCAG			
p28ORFB	(61)	TCGCCACTCAAACAAACGGTTACGAACGCCACCAACCCGACCAGACGCTGCTCTACCAG			
		121			180
<i>orf513</i>	(94)	CTGGTTGAGCAGCACTACCCAGCCTTCAAAGCCTCACTCGAAGCCCAAGGTCAACACCTG			
p28ORFB	(121)	CTGGTTGAGCAGCACTACCCAGCCTTCAAAGCCTCACTCGAAGCCCAAGGTCAACACCTG			
		181			240
<i>orf513</i>	(154)	CCTCGCTACATCCAACAAGAATTCAACGACCTCCTCCAATGTGGCCGTCTGGAGTATGGT			
p28ORFB	(181)	CCTCGCTACATCCAACAAGAATTCAACGACCTCCTCCAATGTGGCCGTCTGGAGTATGGT			
		241			300
<i>orf513</i>	(214)	TTCATGCGGGTTCGCTGCGAGGATTTGTCATCACGAGCGTCTGGTCGCCTTCAGCTGTAAA			
p28ORFB	(241)	TTCATGCGGGTTCGCTGCGAGGATTTGTCATCACGAGCGTCTGGTCGCCTTCAGCTGTAAA			
		301			360
<i>orf513</i>	(274)	CGACGCGGCTTTTGCCCTAGCTGCGGTGCCCGCCGGATGGCCGAGAGTGCGGCGCTGCTG			
p28ORFB	(301)	CGACGCGGCTTTTGCCCTAGCTGCGGTGCCCGCCGGATGGCCGAGAGTGCGGCGCTGCTG			
		361			420
<i>orf513</i>	(334)	ATAGACGAAGTCTTCCCAAGGAGCCCATTCGCCAGTGGGTGCTCAGCTTTCCTTCCAG			
p28ORFB	(361)	ATAGACGAAGTCTTCCCAAGGAGCCCATTCGCCAGTGGGTGCTCAGCTTTCCTTCCAG			
		421			480
<i>orf513</i>	(394)	CTACGCTTTTTGCTGGCTCGCCATCCCCAGCTGATGGGCCAGGTCTTGAGTATCGTCTAT			
p28ORFB	(421)	CTACGCTTTTTGCTGGCTCGCCATCCCCAGCTGATGGGCCAGGTCTTGAGTATCGTCTAT			
		481			540
<i>orf513</i>	(454)	CGTACACTCTCAACTCATCTGATCAAAAAAGCCGGTTACACCAAAGCCTCTGCACAAACT			
p28ORFB	(481)	CGTACACTCTCAACTCATCTGATCAAAAAAGCCGGTTACACCAAAGCCTCTGCACAAACT			
		541			600
<i>orf513</i>	(514)	GGCTCAGTGACTCTTATCCAACGCTTTGGCTCCGCGCTAAATCTCAATGTCCACTACCAC			
p28ORFB	(541)	GGCTCAGTGACTCTTATCCAACGCTTTGGCTCCGCGCTAAATCTCAATGTCCACTACCAC			
		601			660
<i>orf513</i>	(574)	ATGCTGTTTCTCGATGGTGTCTATGCCGAAGATGACTATGGCAAGCAACGCTTCCATCGT			
p28ORFB	(601)	ATGCTGTTTCTCGATGGTGTCTATGCCGAAGATGACTATGGCAAGCAACGCTTCCATCGT			
		661			720
<i>orf513</i>	(634)	GTCAAGGCACCCACTTACGATGAGCTGAATACGCTCGCTCACACCCCTCAGCCATCGCATC			
p28ORFB	(661)	GTCAAGGCACCCACTTACGATGAGCTGAATACGCTCGCTCACACCCCTCAGCCATCGCATC			

Sigue en la página 109

721				780
	<i>orf513</i>	(694)	GCTCGCTGCATGGAAAAGCGTGGGATTTTGGAGCGTGATGCCGAGAATACGTGGTTGACA	
	p28ORFB	(721)	GCTCGCTGCATGGAAAAGCGTGGGATTTTGGAGCGTGATGCCGAGAATACGTGGTTGACA	
			781	840
	<i>orf513</i>	(754)	CTGGAAGAGGGCGAAGACGATACGCTGACTCAATTACATGGTGCTTCGGTTACGTATCGC	
	p28ORFB	(781)	CTGGAAGAGGGCGAAGACGATACGCTGACTCAATTACATGGTGCTTCGGTTACGTATCGC	
			841	900
	<i>orf513</i>	(814)	ATTGCCGTTCGGCCCCAGCAAGGGCGCAAAGTCTTACCCTGCAAACCTTGCCAGGGCGT	
	p28ORFB	(841)	ATTGCCGTTCGGCCCCAGCAAGGGCGCAAAGTCTTACCCTGCAAACCTTGCCAGGGCGT	
			901	960
	<i>orf513</i>	(874)	GAGGATAAAGCCGACTCAAGCAGTCGAGTAGCCAACCATGCTGGTTTCTCGCTACACGCC	
	p28ORFB	(901)	GAGGATAAAGCCGACTCAAGCAGTCGAGTAGCCAACCATGCTGGTTTCTCGCTACACGCC	
			961	1020
	<i>orf513</i>	(934)	GGTGTGATGGCCGAAGCGCATCAGCGGGATAAGCTTGAGCGCTTGTGTGCTACATTAGT	
	p28ORFB	(961)	GGTGTGATGGCCGAAGCGCATCAGCGGGATAAGCTTGAGCGCTTGTGTGCTACATTAGT	
			1021	1080
	<i>orf513</i>	(994)	CGGCCAGCGGTTTCAGAAAAACGTCTGGCATTAAACCGCCAATGGGCAGGTGCGTTACGAG	
	p28ORFB	(1021)	CGGCCAGCGGTTTCAGAAAAACGTCTGGCATTAAACCGCCAATGGGCAGGTGCGTTACGAG	
			1081	1140
	<i>orf513</i>	(1054)	CTCAAAACTCCGTACCGCAATGGCACCACCCATGTGATCTTCGAGCCGCTGGACTTCATC	
	p28ORFB	(1081)	CTCAAAACTCCGTACCGCAATGGCACCACCCATGTGATCTTCGAGCCGCTGGACTTCATC	
			1141	1200
	<i>orf513</i>	(1114)	GCCAAACTCGCTGCGTTGGTACCTAAGCCGCGAGTCAACCTCACACGCTTCCACGGCGTC	
	p28ORFB	(1141)	GCCAAACTCGCTGCGTTGGTACCTAAGCCGCGAGTCAACCTCACACGCTTCCACGGCGTC	
			1201	1260
	<i>orf513</i>	(1174)	TTTGCACCGAACAGCAAACACCGAGTTCAAGTAACACCCGCCAAGCGGGGCAAGAAGCCC	
	p28ORFB	(1201)	TTTGCACCGAACAGCAAACACCGAGTTCAAGTAACACCCGCCAAGCGGGGCAAGAAGCCC	
			1261	1320
	<i>orf513</i>	(1234)	GACAAATCGGAAGGTCTCGATACTAACTGGCGTGACAAGAGTCTTCGAGAGCGCCACCGC	
	p28ORFB	(1261)	GACAAATCGGAAGGTCTCGATACTAACTGGCGTGACAAGAGTCTTCGAGAGCGCCACCGC	
			1321	1380
	<i>orf513</i>	(1294)	GCCATGACCTGGATGCAACGCCTCAAGCGAGTCTTCAATATTGATATTGAAGTCTGCGAA	
	p28ORFB	(1321)	GCCATGACCTGGATGCAACGCCTCAAGCGAGTCTTCAATATTGATATTGAAGTCTGCGAA	
			1381	1440
	<i>orf513</i>	(1354)	CACTGCGGCGGTACGTCAAAGTGATTGCCAGCATCGAAGATCCGAAGGTCATTGAGCAG	
	p28ORFB	(1381)	CACTGCGGCGGTACGTCAAAGTGATTGCCAGCATCGAAGATCCGAAGGTCATTGAGCAG	
			1441	1500
	<i>orf513</i>	(1414)	ATTCTCAAGCATCTGAAACAGAAAACAGCCAAGGCGAATGCCGCAAGCAGCGTGAGCTG	
	p28ORFB	(1441)	ATTCTCAAGCATCTGAAACAGAAAACAGCCAAGGCGAATGCCGCAAGCAGCGTGAGCTG	
			1501	1560
	<i>orf513</i>	(1474)	CCACCAGAACGAGCGCCGCCACTGACTCCCAGCCTGTTTCGATCCATCACAGAGTCGTCTC	
	p28ORFB	(1501)	CCACCAGAACGAGCGCCGCCACTGACTCCCAGCCTGTTTCGATCCATCACAGAGTCGTCTC	
			1561	1596
	<i>orf513</i>	(1534)	TTTGACTGA-----	
	p28ORFB	(1561)	TTTGACTCGAGCACCACCACCACCACCAC <u>TGAGAT</u>	
			Sitio <i>Xho</i> I	His-tag
				*

Figura 4.2.6. Alineamiento de secuencias. *orf513* es la secuencia depositada en base de datos (Nº acceso: GU943791.1). *p28ORFB* es la secuencia obtenida como resultado de la secuenciación de esa construcción. RBS: sitio de unión a ribosoma. His-tag: secuencia codificante para 6 histidinas. *: codón de terminación.

4.2.3. Expresión de Orf513 recombinante.

4.2.3.1. Construcción p28ORFA.

En primer lugar, se trabajó con las células transformadas con la construcción p28ORFA (Figura 4.2.7). Luego de analizar la presencia del inserto deseado en el vector siguiendo la metodología antes mencionada se decidió realizar los ensayos de expresión con un clon (c-11), aquel que no poseía mutaciones y se encontraba en fase.

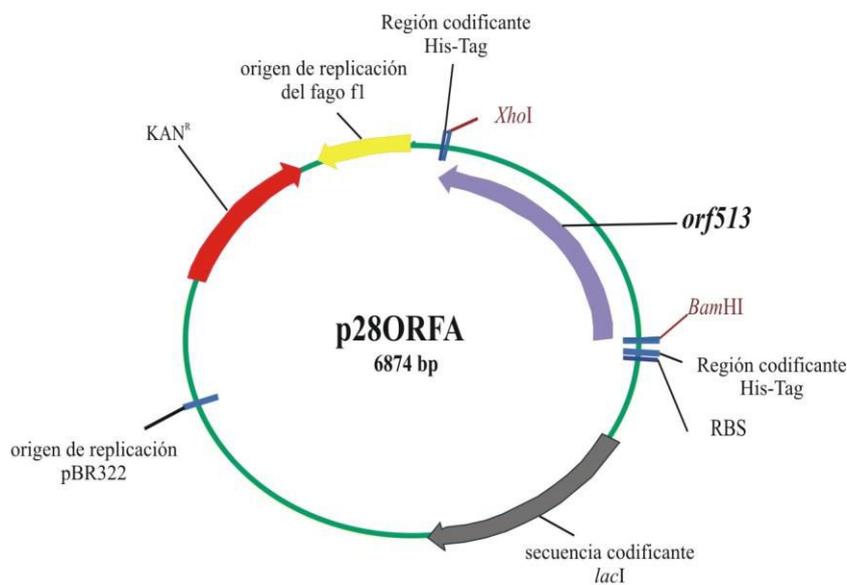


Figura 4.2.7. Esquema de la construcción p28ORFA. Se indica el sitio de clonado de orf513, el gen de resistencia (Kan), la secuencia codificante para las colas de Histidinas N y C-terminal (His-Tag). RBS: sitio de unión a ribosoma.

Como puede observarse en las figuras 4.2.7 y 4.2.8, utilizando esta estrategia de clonado se agregarían 34 aminoácidos en el extremo N-terminal, de los cuales 19 pueden ser eliminados a través de una digestión con trombina (entre ellos la cola N-terminal de 6 histidinas), y 8 aminoácidos el extremo C-terminal (6 ellos correspondientes a la cola C-terminal de histidinas) (MM 63,13 kDa). De realizar la reacción de proteólisis con trombina la proteína resultante poseería 15 aminoácidos extras en el extremo N-terminal, y sólo una cola de histidinas en C-terminal (MM 61,11 kDa).

1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSM~~SLARN~~ ATASQSPTQT
 51 NGYERHQPDQ TLLYQLVEQH YPAFKASLEA QGQHLPRYIQ QEFNDLLQCG
 101 RLEYGFMRVR CEDCHHERLV AFSCKRRGFC PSCGARRMAE SAALLIDEVF
 151 PKEPIRQWVL SFPFQLRFL L ARHPQLMGQV LSIVYRTLST HLIKKAGYTK
 201 ASAQTGSVTL IQRFGSALNL NVHYHMLFLD GVYAEDDYGK QRFHRVKAPT
 251 YDELNTLAHT LSHRIARCME KRGILERDAE NTWLTLEEGE DDTLTQLHGA
 301 SVTYRIAVGP QQGRKVFTLQ TLPGREDKAD SSSRVANHAG FSLHAGVMAE
 351 AHQRDKLERL CRYISRPAVS EKRLALTANG QVRYELKTPY RNGTHVIFE
 401 PLDFIAKLAA LVPKPRVNL T RFHGVPFAPNS KHRVQVTPAK RGKPKDKSEG
 451 LDTNWRDKSP AERHRAMTWM QRLKRVFNID IEVCEHCGGH VKVIASIEDP
 501 KVIEQILKHL KQKTAKANAA KQRELPPER A PPLTPSLFDP SQSRLFDLEH
 551 HHHHH 555

MM: 63,13 kDa.

Figura 4.2.8. Secuencia aminoacídica teórica de la proteína recombinante resultante a partir de la construcción p28ORFA. En rojo se indican los aminoácidos extras. El sitio reconocido por la proteasa trombina se encuentra subrayado. En azul se indican las colas de histidinas N y C-terminal. Se indica la masa molecular teórica de la proteína.

Para inducir la expresión de la proteína se siguió la metodología descrita en “Materiales y Métodos”. Se realizaron múltiples ensayos para optimizar las condiciones de inducción, los cuales se resumen en la tabla 4.2.2. En cada uno de estos experimentos se analizó la expresión de la proteína deseada en 10-12 clones obtenidos en la transformación con p28ORFA-11.

Tabla 4.2.2. Condiciones de inducción ensayadas

<i>E. coli</i>	T (°C) ¹	Medio de cultivo	IPTG (mM) ²	DO ₆₀₀ ³	Tiempo de inducción (hs) ⁴
BL21(DE3)	25	LB/LBg/TB	1	0,4-0,5-0,6-0,8	2-4-6
	30	LB/LBg/TB			
	37	LB			
MP101	25	LB/LBg/TB	1	0,5-0,6	2-4-6
	30	LB/LBg/TB			
	37	LB			
BL21 (DE3) pLysS	28	TB	0,4	0,5-0,6	2-4-6

¹Temperatura a la cual fue incubado el cultivo post inducción. ²Concentración final de IPTG en el cultivo. ³Densidad óptica a la cual se añadió el inductor. ⁴tiempos de toma de muestra post adición de IPTG al cultivo.

Finalizado el ensayo de inducción se analizó la presencia de la proteína recombinante. Se tomaron alícuotas del cultivo ensayado y cada una de estas fue resuelta electroforéticamente mediante geles SDS-PAGE. En algunos casos, también se realizó el análisis mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo anti Histidinas.

Como puede observarse en la figura 4.2.9, al inducir la expresión en un cultivo de células del clon p28ORFA-11 a una DO_{600} :0,6 no se observó la sobreexpresión de la proteína recombinante (63,13 kDa), que se traduciría en una diferencia a la altura correspondiente en el perfil de proteínas entre los cultivos sin inducir e inducidos.

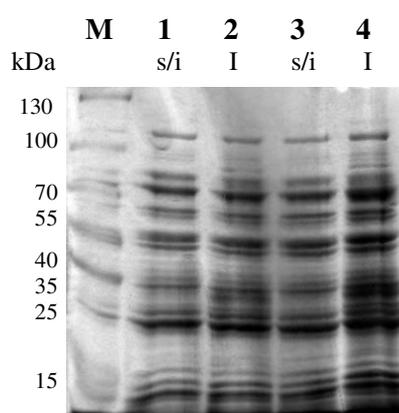


Figura 4.2.9. Ensayo de inducción de células de *E. coli* BL21 (DE3)/p28ORFA-11 realizado en LB a 30°C. Gel SDS-PAGE 15%. El IPTG (concentración final 1mM) fue añadido al cultivo cuando este alcanzó una DO_{600} : 0,6. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). Calles 1 y 2- 2 hs post inducción, Calles 3 y 4- 4 hs post inducción. s/i: cultivo sin inducir; I: cultivo inducido.

Finalmente, luego de probar todas las condiciones citadas en la tabla 4.2.2, en ninguno de los ensayos realizados se observó un alto nivel de expresión de Orf513 recombinante (63,13 kDa) por SDS-PAGE (Figura 4.2.10-A). Sin embargo, al realizar *Western blot* usando el anticuerpo anti Histidina se detectó la presencia de una proteína del tamaño esperado (Figura 4.2.10-B). Esto podría deberse a la diferencia en el límite de detección que presentan estas técnicas. Para ensayos de *Western blot*, el límite de detección es de 50 pg de proteína, en cambio, la técnica de SDS-PAGE utilizando como método de visualizado la tinción del gel con una solución de azul de Coomassie R-250 detecta 50-100 ng de proteína (100 veces menos).

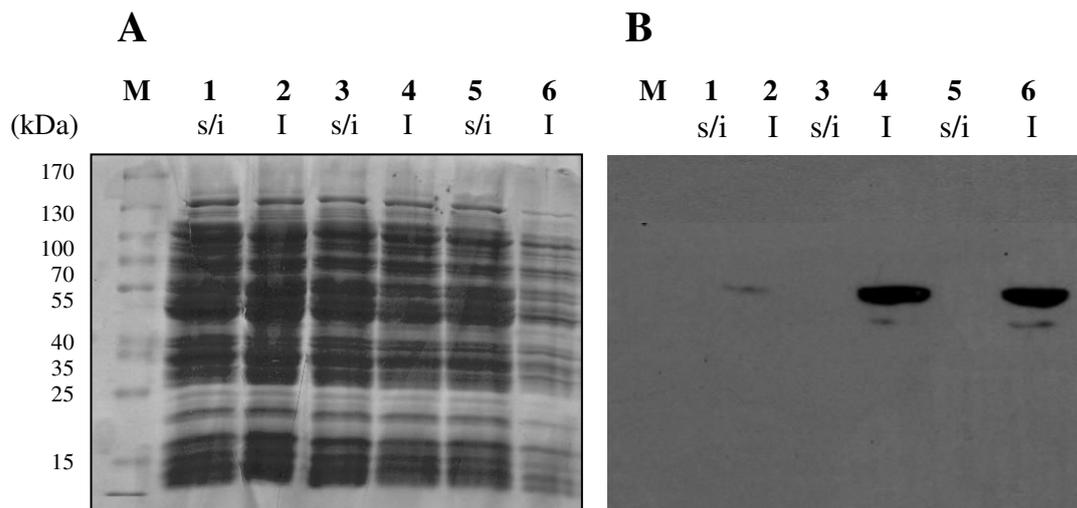


Figura 4.2.10. Ensayo de inducción de expresión en *BL21(DE3)/p28ORFA-c11*. (A) Gel SDS-PAGE 15%. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas), (B) Western-blot utilizando un anticuerpo anti histidinas para la inmunodetección de la expresión de la proteína. Calles 1 y 2- 2 hs post inducción, Calles 3 y 4- 4 hs post inducción, Calles 5 y 6- 6 hs post inducción. s/i: cultivo sin inducir; I: cultivo inducido.

Estos resultados permiten concluir que si bien la proteína se expresa, lo hace en baja cantidad, sólo detectable mediante *Western blot*, lo cual presenta una desventaja siendo que el objetivo final es su purificación para posteriormente realizar su caracterización.

Es por ello que se decidió continuar los estudios de expresión de Orf513 con otra construcción plasmídica.

4.2.3.2. Construcción p22ORF.

Posteriormente, se intentó la sobreexpresión de la proteína utilizando la construcción p22ORF-1 (Figura 4.2.11). Se seleccionó este clon debido a que al analizar los resultados obtenidos de la secuenciación del mismo se observó que se encontraba correctamente en fase, sin codones de terminación internos ni mutaciones.

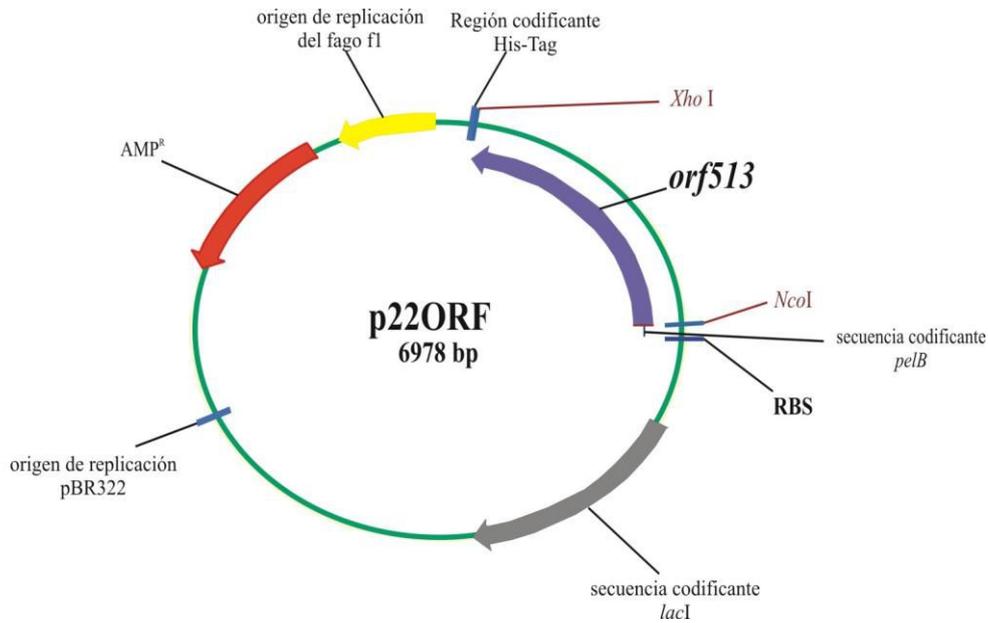


Figura 4.2.11. Esquema de la construcción p22ORF-1. Se indica el sitio de clonado de orf513, el gen de resistencia (Amp), la secuencia codificante para la cola de Histidinas C-terminal. RBS: sitio de unión a ribosoma.

Utilizando esta construcción para obtener la proteína recombinante Orf513 (Figura 4.2.11) se añade en el extremo C-terminal una cola de 6 histidinas, y debido a que el vector pET22b+ tiene en su extremo N-terminal la secuencia señal de localización periplásmica *pelB*, es posible direccionar su expresión a esa localización celular. Luego de la expresión y translocación de la proteína recombinante al espacio periplásmico se produce el clivaje de la secuencia de 23 aminoácidos *pelB*, con lo cual la proteína resultante poseería 2 aminoácidos extras en el extremo N-terminal y 8 en el C-terminal (que incluyen la cola de 6 histidinas) (Figura 4.2.12).

```

1      MGMSLARNAT ASQSPTQTNG YERHQPDQTL LYQLVEQHYP AFKASLEAQQ
51     QHLPRIYQQE FNDLLQCGRL EYGFMRVRC E DCHHERLVAF SCKRRGFCPS
101    CGARRMAESA ALLIDEVFPK EPIRQWVLSF PFQLRFLAR HPQLMGQVLS
151    IVYRTLSTHL IKKAGYTKAS AQTGSVTLIQ RFGSALNLNV HYHMLFLDGV
201    YAEDDYGKQR FHRVKPTYD ELNLAHTLS HRIARCMKR GILERDAENT
251    WLTLEEGEDD TLTQLHGASV TYRIAVGPQQ GRKVFTLQTL PGREDKADSS
301    SRVANHAGFS LHAGVMAEAEH QRDKLERLCR YISRPAVSEK RLALTANGQV
351    RYELKTPYRN GTTHVIFEPL DFIAKLAALV PKPRVNLTRF HGVEVPNSKH
401    RVQVTPAKRG KKPDKSEGLD TNWRDKSPAE RHRAMTWMQR LKRVENIDIE
451    VCEHCGGHVK VIASIEDPKV IEQILKHLKQ KTAKANAAKQ RELPPERAPP
501    LTPSLFDPSQ SRLFDLEHHH HHH 523

```

MM: 59,78 kDa.

Figura 4.2.12. Secuencia aminoacídica teórica de la proteína recombinante resultante. En rojo se indican los aminoácidos extras. En azul se indica la cola de histidinas C-terminal. Se indica la masa molecular teórica de la proteína.

Con las células de *E. coli* BL21 (DE3) y MP101 transformadas con el plásmido p22ORF-1 se realizaron diferentes ensayos de inducción utilizando diferentes medios de cultivo suplementados con AMP (50µg/ml) (Tabla 4.2.3).

Tabla 4.2.3. Condiciones de inducción de la expresión con la construcción p22ORF-1

<i>E. coli</i>	Medio de cultivo	T (°C) ¹	IPTG (mM) ²	DO ₆₀₀ ³	Tiempo de inducción (hs) ⁴
BL21 (DE3)	M9	30	0,2	0,3	1-2-3
		37	0,5	0,4-0,6	1-2-4-ON
	LB	37	0,5	0,4-0,6	1-2-4-ON
MP101	LB	25	1	0,8	ON
	TB	30	1	0,5-0,6	2-4-6-ON

¹Temperatura a la cual fue incubado el cultivo post inducción. ²Concentración final de IPTG en el cultivo. ³Densidad óptica a la cual se añadió el inductor. ⁴tiempos de toma de muestra post adición de IPTG al cultivo. ON: inducción durante toda una noche.

Concluido el tiempo de inducción se analizó la expresión de la proteína (MM 59,78 kDa) mediante SDS-PAGE y *Western blot*. En ninguna de las condiciones estudiadas pudo observarse una sobreexpresión de la proteína por SDS-PAGE (Figura 4.2.13) ni tampoco mediante inmunodetección con anticuerpos anti Histidinas.

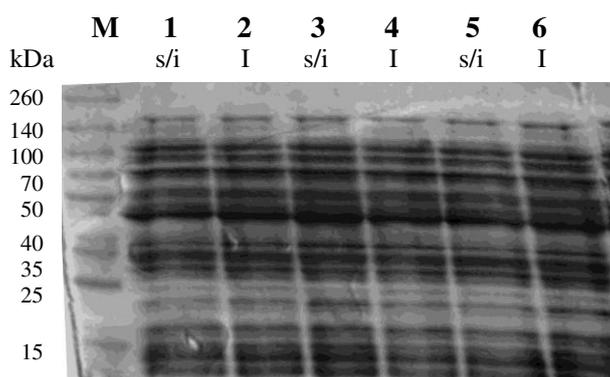


Figura 4.2.13. Ensayo de inducción de células de *E. coli* MP101/ p22ORF-1 realizado en TB a 30°C. Gel SDS-PAGE 15%. El IPTG (concentración final 1mM) fue añadido al cultivo cuando este alcanzó una DO₆₀₀: 0,6. M: Spectra Multicolor Broad Range (Fermentas). Calles 1 y 2- 2 hs post inducción, Calles 3 y 4- 4 hs post inducción. Calles 5 y 6- 6 hs post inducción. s/i: cultivo sin inducir; I: cultivo inducido.

Debido a que a pesar de los numerosos intentos realizados no se logró detectar la expresión de la proteína recombinante deseada se decidió utilizar una nueva estrategia de clonado y expresión de Orf513.

4.2.3.3. Construcción p28ORFB.

Luego de amplificar por PCR con los oligonucleótidos específicos 341a y 341b un fragmento interno de *orf513* y verificar la liberación del inserto mediante digestión con las enzimas *NcoI* y *XhoI* se enviaron a secuenciar 4 clones obtenidos con el plásmido recombinante. El análisis de la secuencia nucleotídica reveló que sólo en uno de estos (p28ORFB-11) la construcción obtenida (Figura 4.2.14) presentaba el gen codificante para la proteína en fase y sin mutaciones (Figura 4.2.6).

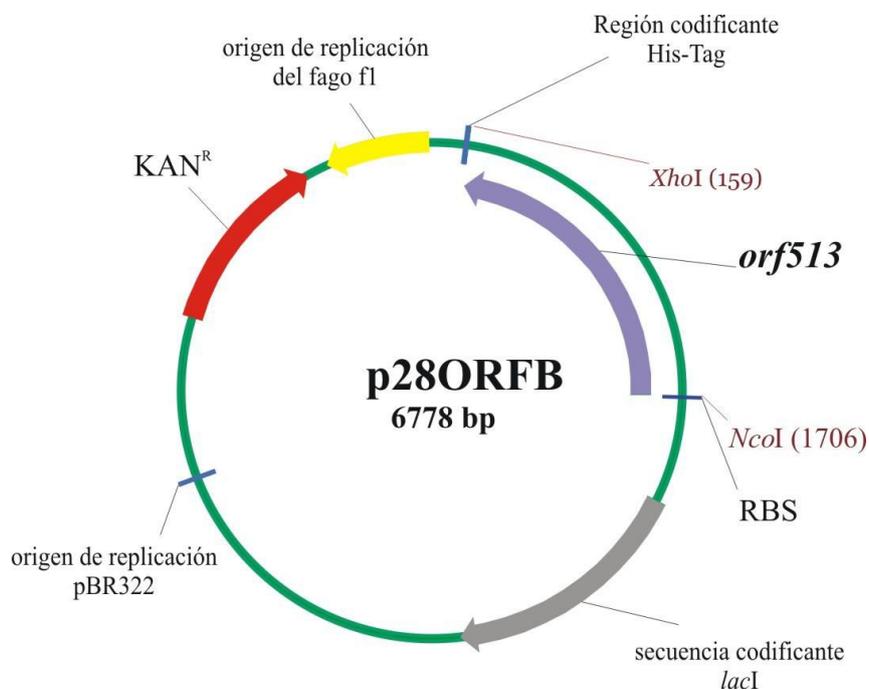


Figura 4.2.14. Esquema de la construcción p28ORFB. Se indica el sitio de clonado de *orf513*, el gen de resistencia (Kan), la secuencia codificante para la cola de Histidinas C-terminal. RBS: sitio de unión a ribosoma.

En este caso, el clonado del marco abierto de lectura *orf513* se realizó utilizando los sitios *NcoI* y *XhoI*, y al quitar el codón de terminación propio de *orf513* se agrega una cola de histidinas en el extremo C-terminal (Figura 4.2.14). La proteína recombinante

que se obtendría entonces poseería 2 aminoácidos extras en el extremo N-terminal y 8 en el extremo C-terminal, entre los cuales se encuentra la cola de 6 histidinas que se agrega en este extremo (Figura 4.2.15). Como en el caso de la construcción anterior, p22ORF, esta estrategia de clonado añade una menor cantidad de aminoácidos que la construcción p28ORFA.

```

1      MEMSLARNAT ASQSPTQTNG YERHQPDQTL LYQLVEQHYP AFKASLEAQQ
51     QHLPRIYQQE FNDLLQCGRL EYGFMRVRCE DCHHERLVAF SCKRRGFCPS
101    CGARRMAESA ALLIDEVFPK EPIRQWVLSF PFQLRFLRLAR HPQLMGQVLS
151    IVYRTLSTHL IKKAGYTKAS AQTGSVTLIQ RFGSALNLNV HYHMLFLDGV
201    YAEDDYGKQR FHRVKAPTYD ELNLAHTLS HRIARCMEKR GILERDAENT
251    WLTLEEGEDD TLTQLHGASV TYRIAVGPQQ GRKVFTLQTL PGREDKADSS
301    SRVANHAGFS LHAGVMAEAH QRDKLERLCR YISRPAVSEK RLALTANGQV
351    RYELKTPYRN GTTHVIFEPL DFIAKLAALV PKPRVNLTRF HGVFVPNSKH
401    RVQVTPAKRG KKPDKSEGLD TNWRDKSPAE RHRAMTWMQR LKRVPNDIE
451    VCEHCGGHVK VIASIEDPKV IEQILKHLKQ KTAKANAANKQ RELPPERAPP
501    LTPSLFDPSQ SRLFDLEHHH HHH 523

```

MM: 59,85 kDa.

Figura 4.2.15. Secuencia aminoacídica teórica de la proteína recombinante Orf513. En rojo se indican los aminoácidos extras. En azul se indica la cola de histidinas C-terminal. Se indica la masa molecular teórica de la proteína.

Con el plásmido recombinante p28ORFB-11 (Figura 4.2.14) se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) para realizar la inducción de la expresión de Orf513. En estos experimentos se utilizaron 10-50 ml de medio de cultivo LB suplementado con KAN (30 µg/ml). Con el objetivo de optimizar la producción de la proteína recombinante fueron ensayadas las condiciones que se listan en la tabla 4.2.4.

Tabla 4.2.4. Condiciones de inducción ensayadas.

T (°C) ¹	DO ₆₀₀ ²	IPTG (mM) ³	Tiempo de inducción (hs) ⁴
30°C	0,6	0,2	3-5
		1	2-4
37°C	0,1	1	2-4
	0,4	1	2-4
	0,6	0,5	2-4
	0,6	1	2-4

¹Temperatura a la cual fue incubado el cultivo post inducción. ²Densidad óptica a la cual se añadió el inductor. ³Concentración final de IPTG en el cultivo. ⁴tiempos de toma de muestra post adición de IPTG al cultivo.

Además, se realizaron curvas de crecimiento celular (Absorbancia ($\lambda=600$ nm) en función del tiempo) para evaluar el crecimiento de la población BL21(DE3)/p28ORFB-11 en presencia y ausencia de IPTG (0,5 mM)

Como se muestra en la figura 4.2.16, se observa claramente que el cultivo inducido (I) presenta una velocidad de crecimiento menor con respecto a la población no inducida (S/I), lo cual estaría indicando que la expresión de la proteína recombinante afecta el crecimiento celular en estas condiciones experimentales.

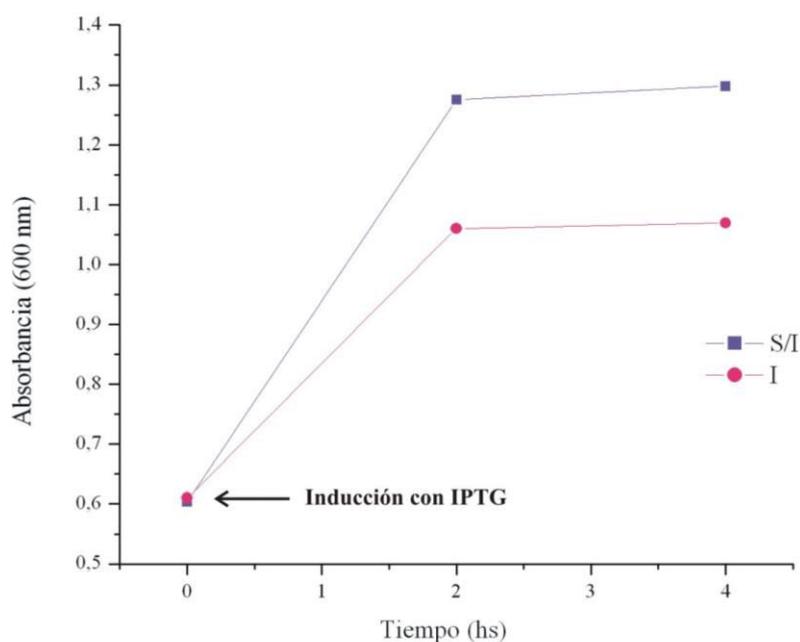


Figura 4.2.16. Curva de crecimiento de BL21(DE3)/p28ORFB-11. S/I: cultivo sin inducir, I: cultivo inducido.

Las células obtenidas en cada tiempo de muestreo fueron centrifugadas y resuspendidas en *buffer* muestra 4X. La expresión de la proteína de interés (59,85 kDa) se analizó mediante SDS-PAGE 15% y posterior *Western blot* utilizando anticuerpos anti histidinas. Al realizar la inducción con IPTG 1mM (concentración final) cuando el cultivo presentaba una DO_{600} : 0,6 e incubar durante 2-4 hs a 37° en agitación (220 rpm), condiciones resaltadas en la Tabla 4.2.4, se detectó visualmente una diferencia en el perfil de proteínas obtenido mediante SDS-PAGE. En la figura 4.2.17-A se encuentra señalada la banda observada a la altura esperada. Asimismo, la expresión de Orf513 fue detectada mediante *Western blot*, utilizando anticuerpos específicos contra la cola de histidinas C-terminal de la misma (Figura 4.2.17-B).

Debido a que en las condiciones antes mencionadas pudo detectarse la expresión de la proteína, y utilizando esta estrategia de expresión Orf513 se obtiene con pocos aminoácidos extras, se decidió realizar la producción a gran escala de la proteína utilizando estas condiciones de inducción y realizar la purificación de la misma siguiendo la metodología descrita en “Materiales y Métodos”.

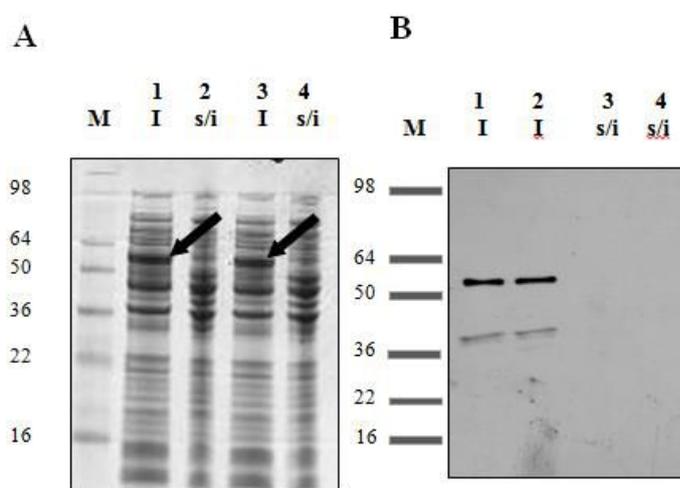


Figura 4.2.17. Ensayo de inducción de expresión en BL21 (DE3)/p28ORFB-11. (A) Gel SDS-PAGE 10%. M: See Blue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen), Calles 1 y 2- 2 hs post inducción, Calles 3 y 4- 4 hs post inducción. (B) Western blot utilizando un anticuerpo anti histidinas para la inmunodetección de la expresión de la proteína. Calle 1 y 2: 2 hs post inducción. Calle 2 y 4: 4 hs post inducción. s/i: cultivo sin inducir; I: cultivo inducido.

4.2.4. Producción y purificación de Orf513 a gran escala.

4.2.4.1. Producción a gran escala.

Luego, con el objetivo de obtener una mayor cantidad de proteína se realizó una producción a gran escala. Esto fue realizado en el Servicio de Fermentación del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”- Universidad Autónoma de Madrid (Madrid, España), utilizando un reactor agitado semiautomático Biostat UD30 (B. Braun Biotech) de 30 L de capacidad. El volumen de medio de cultivo LB fue de 10 L, suplementado con KAN (30 µg/ml). La velocidad de agitación fue de 220 rpm, la temperatura promedio de crecimiento fue de 37°C, y el flujo de aireación 1 L/min. La inducción se realizó cuando el cultivo celular alcanzó una $DO_{600}=0,6$ con IPTG 0,5 mM de concentración final, a 37°C durante 4 hs. Finalizada la inducción las células fueron cosechadas por centrifugación y se almacenaron a -20°C para su posterior tratamiento.

4.2.4.2. Purificación por IMAC.

La purificación se realizó en dos partes, en cada una fueron procesadas las células cosechadas a partir de un volumen de 5 L. El paquete celular se resuspendió en *buffer B*. La ruptura celular fue llevada a cabo utilizando una *French Press* y la suspensión resultante se centrifugó 2 veces a 20000 rpm, a 4°C durante 20 minutos. El extracto crudo se purificó por IMAC, de acuerdo a lo detallado en “Materiales y Métodos”. Brevemente, la proteína recombinante retenida en la resina Ni-NTA fue lavada con 50 volúmenes de *buffer W* y luego, se realizaron 4 eluciones de 1ml con *buffer E*. Se recolectaron las diferentes fracciones (lavados y eluciones) y fueron analizadas por SDS-PAGE (Figura 4.2.18).

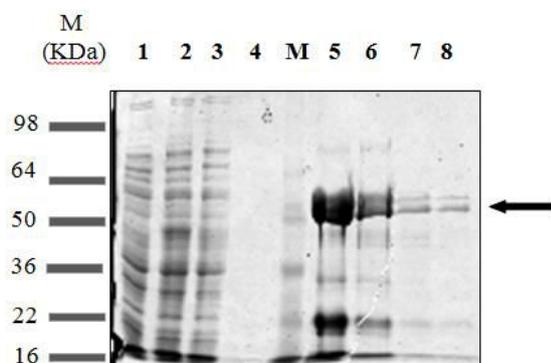


Figura 4.2.18: Purificación de Orf513/His-tag. Gel SDS-PAGE 15%. M: See Blue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). Calle 1: Exclusión. Calles 2-4: Lavados con *buffer W*. Calles 5-8: Elución 1-4 con *buffer E*.

Se observó en las fracciones correspondientes a las distintas eluciones que el extracto crudo se encontraba enriquecido con una proteína de la masa molecular esperada. Se realizó un ensayo de *Western blot* con anticuerpos anti histidinas sobre las distintas eluciones, y se verificó la presencia de la misma (Figura 4.2.19).

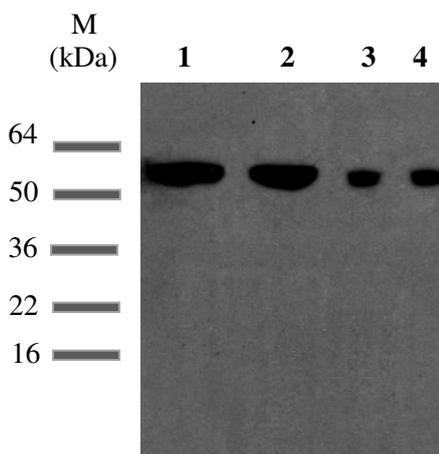


Figura 4.2.19. Purificación de Orf513/His-tag. *Western blot* utilizando un anticuerpo anti histidinas para la inmunodetección de la expresión de la proteína M: See Blue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). Calle 1: Elución 1. Calle 2: Elución 2. Calle 3: Elución 3. Calle 4: Elución 4.

Las eluciones 1 y 2, en las que fue detectada la proteína de masa esperada, fueron inmediatamente dializadas frente a *buffer F* para eliminar el imidazol de estas. Posteriormente se verificó mediante SDS-PAGE (Figura 4.2.20) y *Western blot* la integridad del extracto enriquecido en la proteína deseada. Luego de dicha confirmación, las fracciones dializadas fueron conservadas a -80°C para posterior uso.

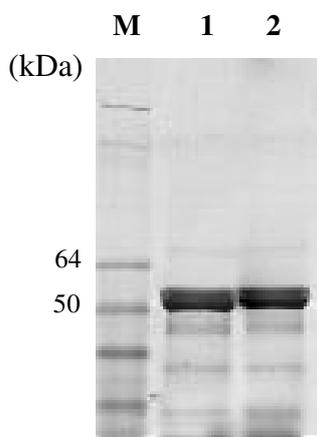


Figura 4.2.20. Fracciones post dializado. SDS-PAGE 15%. M: See Blue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). Calle 1 y Calle 2: Eluciones 1 y 2, respectivamente.

Para llevar a cabo la caracterización de enzimas transposasas y recombinasas los diferentes autores utilizan distintas aproximaciones para realizar los ensayos de unión a ADN y estudiar su actividad.

Por un lado, utilizan como estrategia la producción de una proteína fusionada a una cola en forma recombinante que permita su posterior purificación por afinidad (como en el caso de este trabajo). Este es el caso de la purificación de la integrasa clase 1 de Tn21, la cual fue fusionada a una cola de diez histidinas y recuperada en baja cantidad (la mayor cantidad se encontraba formando parte de cuerpos de inclusión) en forma activa a partir de la fracción soluble de la bacteria recombinante *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Grigorescu y col, 2006). Johansson y colaboradores proceden de igual manera para obtener la proteína de forma recombinante para estudiar la unión de esta integrasa a diferentes sitios de unión *attC* (Johansson y col, 2004). En ambos trabajos la cantidad de enzima recuperada es baja y, a diferencia de los experimentos mostrados en este trabajo, estos autores obtuvieron mejores resultados de expresión al utilizar la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, que posee un control más estricto de la expresión basal de las proteínas. Otro ejemplo de esta aproximación es la obtención en forma recombinante de la transposasa de IS2 (Lewis y col, 2012) y IS256 (Hennig y Ziebuhr, 2010), en ambos casos se obtiene la proteína deseada de forma soluble y activa al producirla como proteína fusión para realizar ensayos tendientes a lograr su caracterización.

En otro tipo de ensayos se utiliza un extracto crudo de la bacteria que posea el elemento transponible para realizar experimentos de transposición y medir la frecuencia de estos eventos en el interior de la misma bacteria. De esta manera fue realizado el estudio de la transposasa de IS1294, perteneciente a la familia de las secuencias de inserción de IS91 (Tavakoli y col, 2000). También así fue se analizado el rol de las secuencias flanqueantes a IS91 (Mendiola y col, 1994).

De acuerdo a la bibliografía consultada, este es el primer trabajo que ensaya la expresión *in vitro* y posterior purificación de Orf513. De las 3 estrategias de clonado y expresión utilizadas, sólo una de estas proporcionó los resultados esperados y necesarios para realizar una producción a mayor escala y posterior purificación de la proteína deseada mediante cromatografía de pseudoafinidad. Es importante destacar que para llegar a esta condición, que *a priori* parecería apropiada para la obtención de la

proteína recombinante deseada, debieron ser realizados múltiples ensayos con combinaciones de los parámetros de inducción, con lo cual la expresión de esta proteína presentó un grado de dificultad mayor que el reportado para otras proteínas de similares características.

4.2.5. Identificación de las proteínas utilizando MALDI-TOF.

Debido a que el extracto purificado presentaba varias bandas (Figura 4.2.21), se decidió realizar la identificación de las mismas mediante la técnica de MALDI-TOF (Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a equipo detector de iones). Este procedimiento fue realizado por el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” perteneciente al Instituto Nacional de Proteómica, ProteoRed-ISCIH (Plataforma en red de proteómica - Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España). Se eligieron 3 bandas próximas a la masa molecular esperada para la proteína recombinante Orf513, las cuales se encuentran señaladas en la figura 4.2.21.

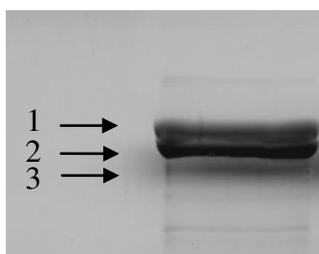


Figura 4.2.21: Selección de proteínas a identificar por MALDI-TOF. Se indica con una flecha cada una de las 3 bandas enviadas a identificar.

Los resultados obtenidos indicaron que la banda 1 (muestra 1) y la banda 2 (muestra 2) no correspondían a la proteína de interés, ya que la búsqueda en la base de datos Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) de la mezcla de péptidos obtenida, *post* digestión con tripsina, arrojó los resultados resumidos en la tabla 4.2.5.

Tabla 4.2.5. Resultados obtenidos para las muestras proteicas 1 y 2.

Muestra	Máximo score	MM (kDa)	Nº acceso	Organismo	Actividad postulada
1	Epimerasa/deshidratasa NAD dependiente	73,05	323941049	<i>E. coli</i>	Cataliza la interconversión UDP-glucosa UDP-galactosa en el metabolismo de la galactosa.
2	Cadena A de la enzima Glucosamina 6-fosfato sintasa	66,69	17942686	<i>E. coli</i>	Cataliza la primera etapa y limitante de la velocidad en el metabolismo de la hexosamina, convirtiendo fructosa-6-fosfato en glucosamina-6-fosfato en presencia de glutamina.

Al observar detalladamente las secuencias depositadas en Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) y realizar la búsqueda en la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>) de estas proteínas, se observó que ninguna de las dos posee capacidad de unir ADN. En ambas muestras, las proteínas con mayor *score* participan en metabolismo de carbohidratos y aminoazúcares en *E. coli* BL21. En conclusión, ambas proteínas se identifican como proteínas de *E. coli*, no relacionadas con la proteína de interés.

La banda 3 (muestra 3) presentó un espectro de MALDI-TOF con muchos picos pero todos con baja intensidad. Si bien se detectaron picos coincidentes en masa con péptidos de la proteína recombinante Orf513, quedaron picos sin poder ser asignados. Para confirmar la presencia de la proteína de interés en dicha banda, la muestra 3 fue analizada por LC-MS/MS (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem). Este análisis fue realizado por el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Tras el análisis de la muestra por LC-MS/MS y su posterior búsqueda en la base de datos del software *Proteome Discoverer* 1.3 (Thermo Scientific), se pudo confirmar que la muestra 3 corresponde a la proteína de interés.

Finalmente, mediante el análisis densitométrico del gel SDS-PAGE, se estimó que la proteína Orf513 representaba el 3% de las proteínas eluídas y concentradas de la purificación con IMAC.

4.2.6. Contenido proteico obtenido.

Se determinó la concentración del extracto proteico obtenido mediante las técnicas descritas en “Materiales y métodos”. Los resultados de rendimiento y concentración se resumen a continuación:

	Volumen final eluído (ml)	Contenido proteico (mg/ml)	Proteínas totales (mg)	% Orf513 estimado muestra	Orf513 (µg/ml)	Orf513 (µM)
Fracción purificada	2,2	0,66	1,32	3	18	0,33

De lo anteriormente expuesto, se concluye que luego de los pasos de purificación realizados se obtuvo una baja cantidad de la proteína de interés (Orf513), la cual se encuentra resuspendida junto a otras proteínas de *E. coli*, principalmente una epimerasa/deshidratasa NAD-dependiente y la cadena A de la glucosamina 6-fosfato sintasa. Como se dijo anteriormente, estas proteínas presentan roles metabólicos establecidos y relacionados con la vía de utilización de hidratos de carbono, además carecen de motivos que permitan suponer una interacción con ADN. Estos extractos fueron usados para los ensayos de retardo efectuados.

4.2.7. Ensayos de retardo en geles: interacción ADN-Orf513.

Con el extracto de Orf513 obtenido se realizaron ensayos que permitan evaluar la actividad recombinasa postulada. Se diseñaron diversos experimentos para estudiar la interacción entre esta proteína y diferentes secuencias de ADN.

4.2.7.1. Secuencias de ADN.

Se estudió la interacción con Orf513 de 2 tipos de secuencias de ADN. Por un lado, se ensayaron frente a un fragmento del *oriIS* propuesto para *ISCR1* (*oriISCR1*) y frente a un fragmento de los *oriIS* y *terIS* descritos en elementos relacionados: *oriIS1294*, *oriIS91*, *terIS1294* y *terIS91*.

La secuencia original de estos fue modificada con el agregado de 5'GTTC3' (ver Tabla 3.2 de “Materiales y Métodos”), en el extremo 5' para *oriIS* y en el extremo 3' en el caso de *terIS*. Este agregado se realizó ya que ha sido demostrado el rol esencial que esta secuencia tiene en la transposición de *IS91* (Mendiola y col, 1994) y, por lo tanto, se podría postular el mismo rol para la interacción de la proteína Orf513 con estas secuencias de ADN.

Por otro lado, se amplificaron por PCR, utilizando una polimerasa de alta fidelidad y oligonucleótidos marcados con Cy5 o 6-FAM las regiones flanqueantes a *oriISCR1*, utilizando como ADN molde al plásmido extraído de S21, portador de un integrón clase 1 inusual. Los oligonucleótidos empleados y las regiones amplificadas se señalan en la figura 4.2.22. Los fragmentos B y D comprenden *oriISCR1* junto con la región *upstream* a este, el fragmento C contiene las secuencias *upstream* y *downstream* de *oriISCR1*; y el fragmento A corresponde a una región interna de *orf513* el cual fue usado como fragmento de ADN para el control negativo de interacción. Estos detalles se resumen en las figuras 4.2.22, 4.2.23 y 4.2.24.

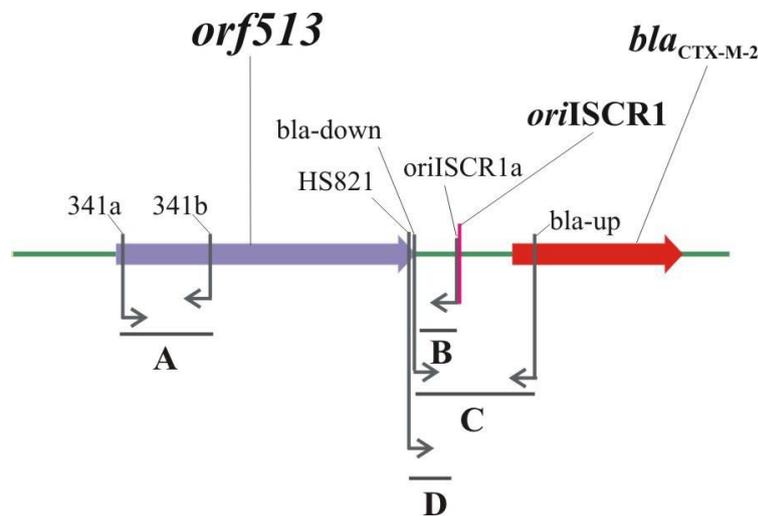


Figura 4.2.22. Esquema de las estrategias utilizadas para amplificar los fragmentos de ADN empleados en los ensayos de interacción. A: 469 bp, B: 244 bp, C: 623 bp, D: 270 bp.

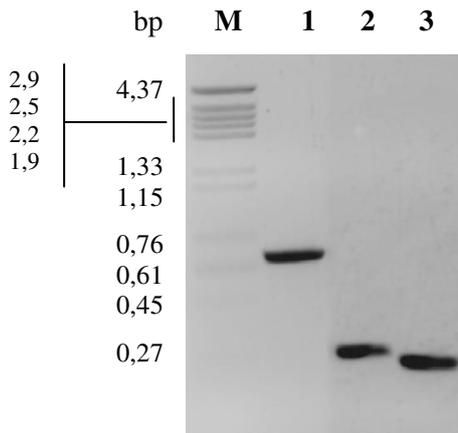


Figura 4.2.23. Amplificación de las regiones flanqueantes a *oriISCR1*. Gel de agarosa 1,5%. M: marcador de masa molecular ϕ_{29} /HindIII. Calle 1: Fragmento C. Calle 2: Fragmento D. Calle 3: Fragmento B.

Fragmento A (469 bp):

CGCCCACTCAAACAAACGGTTACGAACGCCACCAACCCGACCAGACGCTGCTCTACCAGCTGGTTGAGCAG
 CACTACCCAGCCTTCAAAGCCTCGCTCGAAGCCCAAGGTCAACACCTGCCTCGCTACATCCAACAAGAATT
 CAACGACCTCCTCCAATGTGGCCGTCTGGAGTATGGTTTCATGCGGGTTTCGCTGCGAGGATTGTCATCACG
 AGCGTCTGGTTCGCTTTCAGCTGTAAACGACGCGGCTTTTGCCCTAGCTGCGGTGCCCGCCGGATGGCCGAG
 AGTGCGGCGCTGCTGATAGACGAAGTCTTCCCAAGGAGCCATTTCGCCAGTGGGTGCTCAGCTTTCCTTT
 CCAGCTACGCTTTTTGCTGGCTCGCCATCCCCAGCTGATGGGCCAGGTCTTGAGTATCGTCTATCGTACAC
 TCTCAACTCATCTGATCAAAAAAGCCGGTTACACCAAAGCCTC

Fragmento B (244 bp):

TTGACTGACGACCCCAAATCCAACACTGCTCAACACTGCCAACTTTTAAACGGGGCGGTGGGGCAGTTTGT
 ATCTCTCGAGCTATCAGGCTAGAGATTTTACCGCCAAATCGAACCTTATTAGAGCGGTTTAGGCTGGACCG
 GCAGTTAAATTTGGGGCTTGAGCGGTAAACGAGTGAGGGAATTTTCAGGTAAGATACTTCGGATGAGGAGCA
 AAAAGGTGGTTTATACTTCCTATACCCgaac

Fragmento C (623 bp):

TTGACTGACGACCCCAAATCCAACACTGCTCAACACTGCCAACTTTTAAACGGGGCGGTGGGGCAGTTTGT
 ATCTCTCGAGCTATCAGGCTAGAGATTTTACCGCCAAATCGAACCTTATTAGAGCGGTTTAGGCTGGACCG
 GCAGTTAAATTTGGGGCTTGAGCGGTAAACGAGTGAGGGAATTTTCAGGTAAGATACTTCGGATGAGGAGCA
 AAAAGGTGGTTTATACTTCCTATACCCCTCGCCCTTTAAACCCCTATTGATTTTATGGCTAATTTTTCGAC
 GACGTCAAAAAATTTTGGCGTACCTGCGTACCCCTCATCTTTTTTCCGCTGCTGCAAAATGTGCTGCTCC
 TTTCGTGAGCGATCTCTGACTTTTTGCTTTTTTCGCCGCGATGTAAACATGGACCAGGCTCAATTGTGGAGAT
 ATTGGCAGGTTTTGTTTTTACTTTTTGTTTTTCAATGTATACTTGAAGGCCGAGGGATAATACTAATAGA
 GGATTTTTAATGATGACTCAGAGCATTTCGCCGCTCAATGTTAACGGTGATGGCGACGCTACCCCTGCTATT
 TAGCAGCGCAACGCTGCATGCGCAGGCGAACAGCGTGCAACAGCAGCTGGAAGCC

Fragmento D (270 bp):

GTTCGATCCATCACAGAGTCGTCTCTTTGACTGACGACCCCAAATCCAACACTGCTCAACACTGCCAACTT
 TAAACGGGGCGGTGGGGCAGTTTGTATCTCTCGAGCTATCAGGCTAGAGATTTTACCGCCAAATCGAAC
 TTATTAGAGCGGTTTAGGCTGGACCGGCAGTTAAATTTGGGGCTTGAGCGGTAAACGAGTGAGGGAATTT
 AGGTAAGATACTTCGGATGAGGAGCAAAAAGGTGGTTTATACTTCCTATACCCgaac

Figura 4.2.24. Secuencia nucleotídica de las regiones utilizadas para estudiar interacción con *ORF513*. Fragmento A: región interna de *ORF513*, Fragmento B y D: regiones upstream a *oriISCR1*, Fragmento C: regiones upstream y downstream a *oriISCR1*. El origen de replicación *oriISCR1* se encuentra subrayado y en negrita. La secuencia en minúscula es el tetranucleótido con el que se modificó *oriISCR1*.

4.2.7.2. Condiciones de interacción ADN-proteína.

Debido a que en este tipo de experimentos hay múltiples factores que deben optimizarse, se realizaron combinaciones de los factores detallados en la tabla 4.2.6 con el fin de encontrar el nivel óptimo de cada uno.

Tabla 4.2.6. Condiciones de interacción ensayadas.

Factor	Niveles ensayados
Relaciones molares ADN:proteína	1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10
Temperatura de incubación	4°C-25°C-30°C-37°C
Tiempo de incubación	30 a 180 min
Buffers de reacción	<i>buffer 1</i> (NaHPO ₄ 10 mM, KCl 50 mM, glicerol 5%, BSA 50 µg/ml, pH 7,5) <i>buffer 2</i> (HEPES 20 mM, NaCl 50 mM, BSA 100 µg/ml, β-mercaptoetanol 5 mM, pH 6,9).
ADN de espermatozoos de salmón	0 µg (sin añadir)-0,5 µg en ambos <i>buffers</i>
β-mercaptoetanol	0-0,5-1mM

4.2.7.3. Ensayos de interacción ADN-proteína en geles de agarosa.

Para ensayar el sistema de detección (tinción con bromuro de etidio y posterior observación con UV), en primer lugar se analizó la visualización correcta de los fragmentos de ADN simple (sc) y doble cadena (dc) de las secuencias de *oriIS* y *terIS* seleccionadas (secuencias cuyas longitudes varían entre 24 y 28 pb). Se ensayaron varias concentraciones de ADN: 0,625 µM; 1,25 µM y 2,5 µM. La detección de las distintas secuencias de ADN fue correcta en todas las concentraciones estudiadas (Figura 4.2.25).

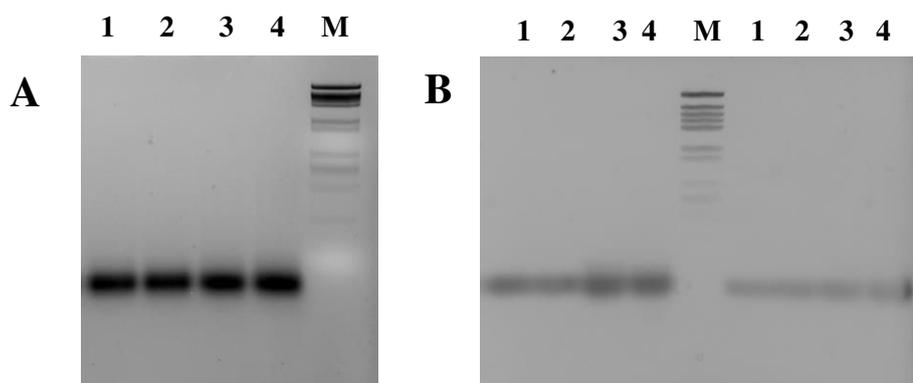


Figura 4.2.25. Visualización de fragmentos de ADNdc. Gel agarosa 1,5%. M: $\phi_{29}/HindIII$. A) 2,5 μ M. B) 1,25 μ M (izquierda de M), 0,625 μ M (derecha de M) Calle 1: *oriISCR1 dc*, Calle 2: *oriIS91 dc*, Calle 3: *oriIS1294*, Calle 5: *terIS91*.

Una vez verificada la detección de los fragmentos de ADNdc se realizaron los diferentes ensayos de interacción frente a las regiones específicas *oriIS* y *terIS* con el objetivo de optimizar los parámetros involucrados en la interacción (detallados en Tabla 4.2.5). En los ensayos realizados se utilizaron los controles de reacción descritos en “Materiales y Métodos”.

En ninguna de las condiciones se obtuvo un retraso discreto en la movilidad electroforética del ADN; sin embargo, se observó la aparición de un *smear* de ADN cuando se lo incubó con el extracto proteico conteniendo Orf513 (0,33 μ M).

En el caso de los ensayos realizados con el ADN doble cadena de *oriISCR1*, *oriIS91*, *oriIS1294*, *terIS91* y *terIS1294* se observó que los mejores resultados fueron obtenidos a una concentración de ADNdc 0,25 μ M, utilizando como tampón de unión al *buffer 2* e incubando la mezcla de reacción 2 horas a 30°C. Esto último puede observarse en la figura 4.2.26, donde el efecto de *smear* es más claro cuando la incubación de la mezcla ADN-proteína se realizó a 30°C (en la incubación a 4°C se observa con mayor intensidad la presencia de ADNdc).

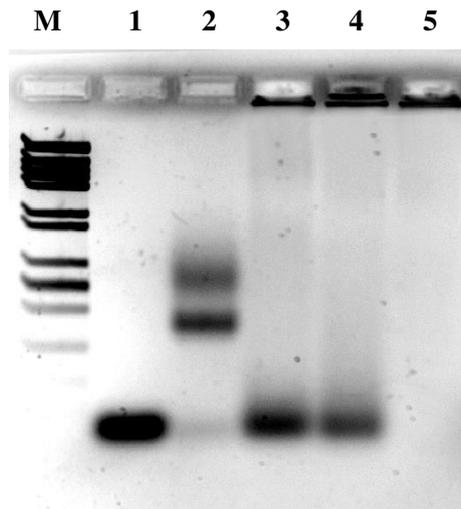


Figura 4.2.26. Ensayo de retardo para *oriISCR1* a 2 horas de incubación a 4 y 30°C. Gel agarosa 1,5%. M: $\phi_{29}/HindIII$. Calle 1: *oriISCR1*. Calle 2: ADN biotinilado + streptavidina. Calle 3: *oriISCR1* + Orf513. Incubación 4°C. Calle 4: *oriISCR1* + Orf513. Incubación 30°C. Calle 5: Orf513. Relación molar ADN:Proteína: 1:1.

Al analizar la interacción de Orf513 con los fragmentos de B, C y D (regiones flanqueantes a *ISCR1*) se observó que las mejores condiciones ensayadas fueron al incubar la mezcla ADN:Orf513 en proporción molar 1:2 a 30°C durante 2 hs (Figura 4.2.27). Como se observa en la figura 4.2.27 el *buffer 2* es un mejor tampón para evaluar la interacción entre las secuencias de ADN seleccionadas y Orf513.

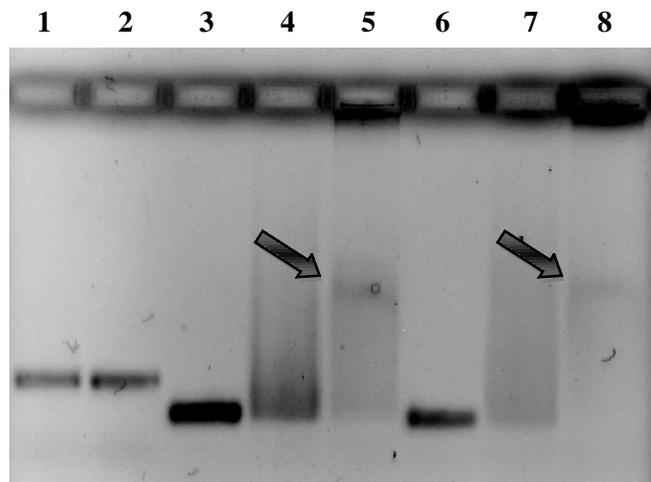


Figura 4.2.27. Ensayo de retardo de distintos fragmentos de ADNdc con 2 horas de incubación a 30°C. Gel agarosa 1%. Calle 1: fragmento A (0,026 μM). Calle 2: fragmento A + Orf513. Calle 3: fragmento D (0,042 μM). Calle 4: fragmento D + Orf513. Reacción en *buffer 1*. Calle 5: fragmento D + Orf513. Reacción en *buffer 2*. Calle 6: fragmento B (0,032 μM). Calle 7: fragmento B + Orf513. Reacción en *buffer 1*. Calle 8: fragmento B + Orf513. Reacción en *buffer 2*. Relación molar ADN: Proteína 1:2.

Estos resultados sugieren la posible interacción de la proteína Orf513 con los fragmentos ensayados, mientras que las imágenes de interacción con las secuencias de ADNdc específicas de *oriIS* y *terIS* fueron menos contundentes. Debido a estos resultados se efectuaron ensayos de retardo en geles de poliacrilamida con el objetivo de clarificar y reforzar los resultados obtenidos.

4.2.7.4. Ensayos de interacción ADN-proteína en geles de poliacrilamida.

En este caso, la detección del ADN se realizó mediante fluorescencia. Como en los ensayos en geles de agarosa, en primer lugar se analizó la efectividad de este sistema de detección (Figura 4.2.28).

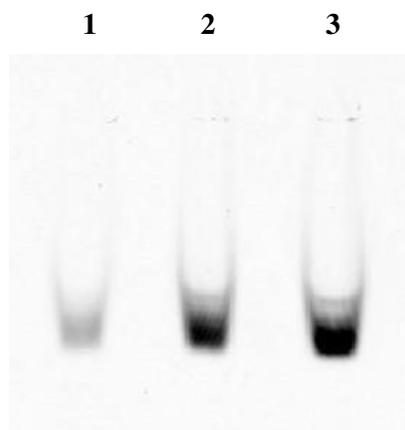


Figura 4.2.28. Fluorescencia detectada en el equipo Typhoon 9410. Oligonucleótido bla-up marcado con Cy5. Gel de poliacrilamida 6%. Calle 1: 0,25 pmol, Calle 2: 0,5 pmol. Calle 3: 1 pmol. En todas las concentraciones ensayadas se observa correctamente la fluorescencia.

Cuando se analizó si el *buffer* F, en el cual se encontraba la proteína Orf513, modificaba la movilidad del ADN ensayado, no fue detectada ninguna alteración en la misma (Figura 4.2.29).

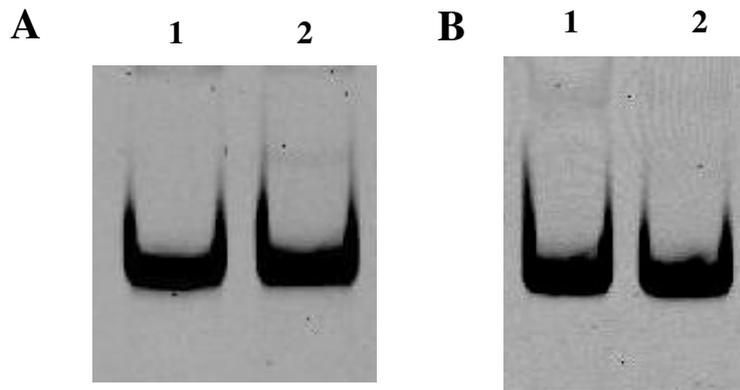


Figura 4.2.29. Ensayo de interacción entre el fragmento B (0,08 μ M) utilizado y el buffer de resuspensión de Orf513. Gel de poliacrilamida 6%. A) Ensayo en buffer 1 de interacción. Calle 1: sólo ADN. Calle 2: ADN + buffer F. Ensayo en buffer 2 de interacción. Calle 1: sólo ADN. Calle 2: ADN + buffer F.

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN a ensayar se realizaron múltiples ensayos tendientes a optimizar las condiciones de reacción según lo descrito en la tabla 4.2.5.

Al analizar la capacidad de unión de la proteína Orf513 con los *oriIS* y *terIS*, se observaron indicios de interacción al realizar la mezcla de reacción en *buffer* 1 suplementado con ADN de salmón con una relación molar ADN-proteína 1:1 e incubando 30 minutos a 25°C, como se observa en la figura 4.2.30.

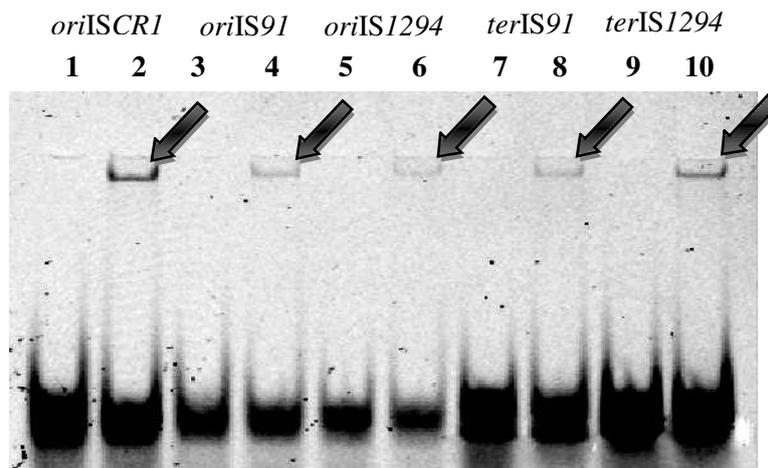


Figura 4.2.30. Geles de retardo: interacción con *oriIS* y *terIS*. Calles 1, 3, 5, 7 y 9: Sólo ADNdc de *oriISCR1*, *oriIS91*, *oriIS1294*, *terIS91* y *terIS1294*. Calles 2, 4, 6, 8 y 10: ADNdc + proteína en proporciones molares 1:1. La interacción detectada se encuentra señalada con una flecha negra.

En el caso de los fragmentos B, C y D se observaron mejores resultados utilizando el *buffer* 2 suplementado con ADN de esperma de salmón, con una relación molar ADN-proteína de 1:3, e incubando durante 30-45 minutos a 37°C (Figuras 4.2.31 y 4.2.32). La evidencia de interacción más fuerte se observó con el fragmento C (Figura 4.2.31), el cual contiene la secuencia del origen de replicación *oriISCR1* junto con las secuencias flanqueantes *upstream* y *downstream*.

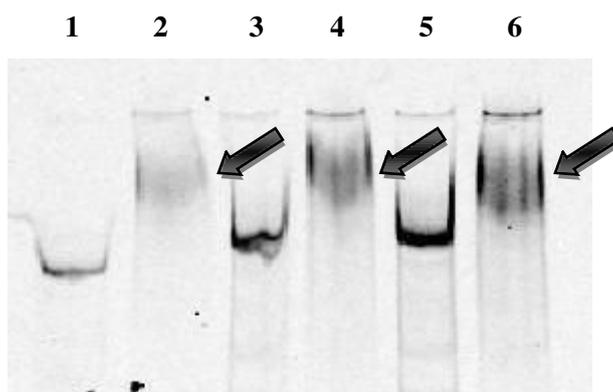


Figura 4.2.31. Geles de retardo mostrando interacción con el fragmento C. Fluorescencia detectada. Calles 1, 3 y 5: Sólo ADN (en concentraciones crecientes: 0,01 μ M, 0,02 μ M, 0,03 μ M). Calle 2, 4 y 6: ADN + proteína en proporciones molares 1:10, 1:5, 1:3. Como ADN competidor se utilizó ADN de esperma de salmón.

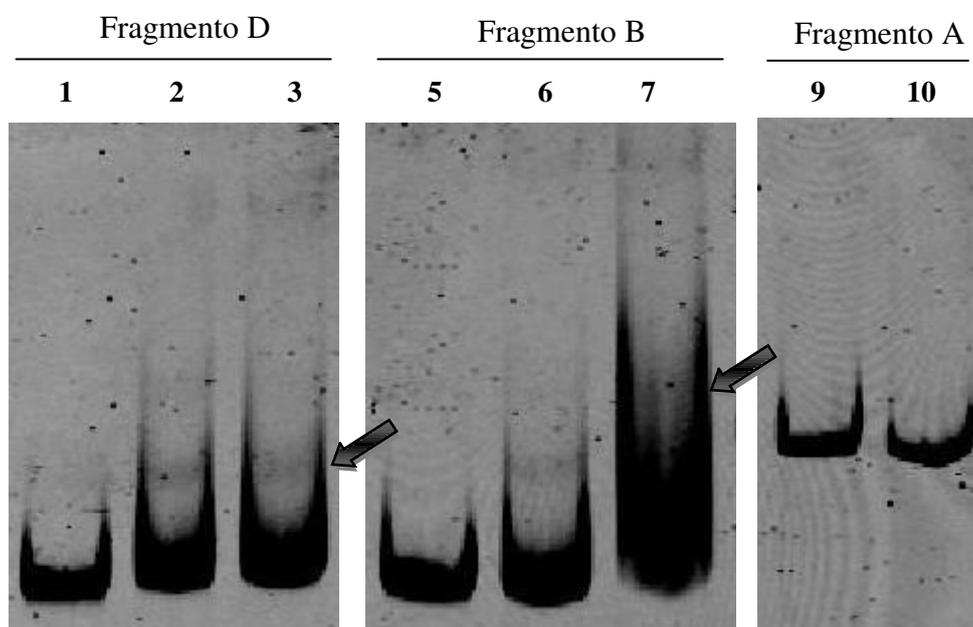


Figura 4.2.32. Geles de retardo: interacción de los distintos fragmentos de ADN y Orf513. Se indican en la figura las secuencias analizadas en cada carril. Calle 1: Sólo ADN (D). Calles 2 y 3: ADN + proteína en proporciones molares 1:3, 1:6. Calle 5: Sólo ADN (B). Calles 6 y 7: ADN + proteína en proporciones molares 1:3, 1:6. Calle 9: Sólo ADN (A). Calle 10: ADN + proteína en proporción molar 1:6.

Como conclusión, después de incubar el extracto proteico conteniendo Orf513 con diferentes fragmentos de ADN que contienen los sitios *oriIS* y *terIS* de algunos elementos *IS91* y derivados o la región *oriISCR1*, se detectó retardo en la movilidad electroforética de estos ADN, lo que pondría en evidencia la interacción con la proteína Orf513. Esto se observó también cuando se realizó el ensayo con fragmentos que contiene *oriISCR1* y las regiones flanqueantes. Un dato a destacar es que, en comparación, los cambios observados en la movilidad *oriISCR1* son más fuertes que con los otros *oriIS* y secuencias *terIS* ensayadas; este cambio en la movilidad es aún más notorio cuando la secuencia incluye *oriISCR1* y regiones circundantes.

A modo de resumen, en la tabla 4.2.7 se enumeran las condiciones utilizadas en las cuales se detectó interacción ADN: Orf513 al realizar los ensayos de retardo en geles de poliacrilamida.

Tabla 4.2.7. Condiciones en las cuales se detectó interacción ADN: Orf513.

	Secuencias <i>oriIS/terIS</i>	Secuencias flanqueantes <i>oriISCR1</i>
ADN: Proteína (proporción molar)	1:1	1:3
<i>Buffer</i> de interacción	<i>Buffer</i> 1	<i>Buffer</i> 2
ADN de esperma de salmón	0,5 µg	0,5 µg
Condiciones de incubación	Oscuridad-30 min -35°C	Oscuridad-30-45 min- 37°C
Control de interacción inespecífica /control negativo de proteína	ADNdc de interés + BSA en exceso	
Control de interacción negativo de ADN	Fragmento A+ Orf513	

Respecto a las metodologías utilizadas para estudiar la existencia de interacción ADN: Orf513, podría concluirse que el ensayo de retardo de movilidad electroforética en geles de agarosa y posterior detección con bromuro de etidio es un método más rápido y accesible para laboratorios con menor complejidad y equipamiento que el ensayo en geles de poliacrilamida y detección del ADN mediante fluorescencia, que implica el uso de reactivos y equipos de mayor costo. Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo muestran que esta última técnica es más sensible para detectar la interacción ADN:proteína, lo cual representa una sustancial ventaja en muchos casos de estudio.

Como se describió en “Introducción” las secuencias de inserción (IS) de la familia de IS91 se diferencian de la mayoría de las secuencias de inserción debido a que poseen características que varían respecto de estas: el gen codificante para la transposasa no está flanqueado por repeticiones invertidas (IR) de mayoría de las IS (Bernaes y col, 1999; Garcillán-Barcia y col, 2001), en cambio, sus extremos son distintos en secuencia nucleotídica y cada uno de estos posee diferentes funciones (Mendiola y col, 1994), debido a que ya que utilizan el mecanismo de replicación que utilizan para transponerse es denominado *rolling circle* (RC) (transposición RC) (Mendiola y col, 1994; Garcillán-Barcia y col, 2002). Además, la actividad de las transposasas codificadas por esta familia de elementos se basa en residuos tirosina y están relacionadas con las proteínas Rep de plásmidos de *Staphylococcus aureus* y la proteína de replicación del colifago ϕ X174 debido a que presentan cuatro motivos conservados con secuencias similares (Mendiola y col, 1992).

Estudios tendientes a estudiar la actividad de esta familia de secuencias de inserción han sido realizados.

La actividad de la transposasa codificada por IS91 fue analizada por Mendiola y colaboradores (Mendiola y col, 1994). Esto fue realizado mediante ensayos de apareamiento dentro de una misma célula entre dos plásmidos, de los cuales sólo uno poseía el elemento IS91. A través de esta investigación los autores determinaron el rol diferencial de cada uno de los extremos de esta secuencia, es decir que *oriIS* actuaba como origen de replicación y *terIS* como terminador de la misma. Se determinó además que *oriIS* y las 80 pb *upstream* al mismo junto con la secuencia GTTC eran absolutamente necesarios para que se produzca el evento de transposición (no se detectó

actividad cuando se eliminó alguna de estas secuencias) (Mendiola y col, 1994). En el presente estudio, se utilizaron fragmentos de ADN (fragmentos B, C y D - Figura 4.2.22) que poseían estas 80 pb (Fragmento B, C o D) y el tetranucleótido GTTC postulados como fundamentales para que la transposasa interactuara, también añadido a las secuencias de *oriIS* y *terIS* utilizadas. Los resultados de retardo observados indicarían interacción ADN:Orf513, y esta interacción es más evidente cuando se encuentran añadidos estos 80 nucleótidos extras, en comparación a lo observado cuando se enfrenta a Orf513 la secuencia de *oriIS* sin su región *upstream*, pese a que posea el tetranucleótido señalado como esencial para el reconocimiento de la transposasa, lo cual concuerda con lo descrito por estos autores.

En el trabajo realizado por Tavakoli y colaboradores se estudió la actividad y mecanismo de transposición de *IS1294* (Tavakoli y col, 2000). Diversos tipos de ensayos fueron realizados: se estudió la frecuencia de transposición de *IS1294* y la capacidad de transponer un marcador de resistencia de la transposasa codificada en este elemento, y por otro lado, se utilizó al transposón *Tn1725* para generar mutantes por inserción de *IS1294* y así evaluar la actividad de las transposasas mutantes. La frecuencia de transposición de *IS1294* reportada fue de 10^{-4} , al igual que para *IS91*. Se detectó que la secuencia *target* preferida de esta transposasa era el tetranucleótido 5'GTTC3'. Además, se observó que *IS1294* no sólo es capaz de auto transponerse sino también de movilizar secuencias adyacentes (en este caso, determinantes de resistencia a antibióticos) con un rango de frecuencias de 10^{-4} - 10^{-10} . En cambio, no fue detectada actividad cuando el gen codificante para la transposasa fue interrumpido, tampoco cuando se realizó la complementación de *IS91* en *trans*, en contraste con lo observado para este último elemento (Mendiola y col, 1992), por lo cual se concluyó que la transposasa codificada por *IS1294* tendría una fuerte preferencia para actuar en *cis* (Tavakoli y col, 2000).

Tanto en el caso de los estudios realizados sobre *IS91* como en *IS1294*, de los resultados obtenidos se desprende que la enzima transposasa codificada en cada uno de estos elementos requiere la presencia de secuencias nucleotídicas específicas para interactuar y realizar el evento de transposición. En adición a esta especificidad, *IS1294* también exhibe cierto grado de preferencia de orientación en el ADN *target* (Tavakoli y col, 2000).

De acuerdo a los datos disponibles hasta el momento, no hay trabajos que hayan estudiado la interacción de estas enzimas con otras secuencias relacionadas (como por ejemplo entre la transposasa codificada en *IS1294* y las secuencias *oriIS91/terIS91*). En este trabajo, fue evaluada la interacción entre Orf513 (codificada en *ISCRI*) y diferentes secuencias *oriIS* (*oriISCRI*, *oriIS1294* y *oriIS91*) y *terIS* (*terISCRI*, *terIS1294* y *terIS91*). En todos los casos fue observada una posible interacción entre estas secuencias de ADN y la proteína en estudio, lo cual aporta información sobre el interrogante anteriormente planteado, y permite conjeturar que Orf513 podría participar no sólo en el movimiento de *ISCRI*, sino también de secuencias de inserción relacionadas.

Para finalizar, en este estudio se realizaron ensayos de cambio de movilidad de ADN en geles de retardo para evaluar la capacidad de unión de un extracto proteico que contiene Orf513 a secuencias específicas de ADN. Se obtuvieron datos empíricos de interacción entre un extracto parcialmente purificado de Orf513 y *oriISCRI* y regiones flanqueantes. Según la bibliografía consultada, esta es la primera descripción experimental relacionada con la actividad enzimática propuesta para esta proteína.

4.3. Capítulo 3: Estudios sobre una β -lactamasa tipo OXA

4.3.1. Detección y descripción.

Se analizaron 3 aislamientos provenientes del relevamiento 1: *C. freundii* (CF14), *E. coli* (EC112) y *E. cloacae* (ECL153). Estos aislamientos presentan resistencia a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalotina, cefoxitina, trimetoprima-sulfametoxazol, mostrando además altos niveles de resistencia a cefotaxima (512-1024 $\mu\text{g/ml}$), ceftazidima (128-256 $\mu\text{g/ml}$), gentamicina (>1024 $\mu\text{g/ml}$) y amicacina (>1024 $\mu\text{g/ml}$).

Estos tres aislamientos poseen además, la presencia simultánea de integrones clase 1 y clase 2.

Se estudiaron con mayor profundidad las regiones variables de los integrones clase 1 (RV1) con el fin de analizar los arreglos de genes en casete presentes en estos aislamientos. Para ello, las regiones variables se amplificaron mediante PCR con los oligonucleótidos 5'CS y 3'CS en condiciones estandarizadas. Los productos obtenidos fueron analizados electroforéticamente en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) mostrando un único amplicón de $\approx 1,5$ kb. Luego, el amplicón para cada región fue purificado y la concentración de ADN se evaluó mediante corridas en geles de agarosa al 0.8 % (p/v) y cuantificación espectrofotométrica (λ_{260}).

Los fragmentos RV1 purificados fueron clonados en el vector pGEM-T Easy y las construcciones deseadas [pGEM-T/RVs] se transformaron en células de *E. coli* DH5 α competentes y se seleccionaron en medio LBA + AMP (100 $\mu\text{g/ml}$) + IPTG (1 mM) + X-gal (40 $\mu\text{g/ml}$). Se tomaron distintas colonias blancas (que potencialmente poseían el inserto) y se repicaron en caldo LB suplementado con AMP (100 $\mu\text{g/ml}$). Seguidamente, se realizó la extracción de plásmido de las colonias crecidas y la presencia del inserto se verificó mediante digestión del ADN plasmídico con la enzima *EcoRI* (Figura 4.3.1).

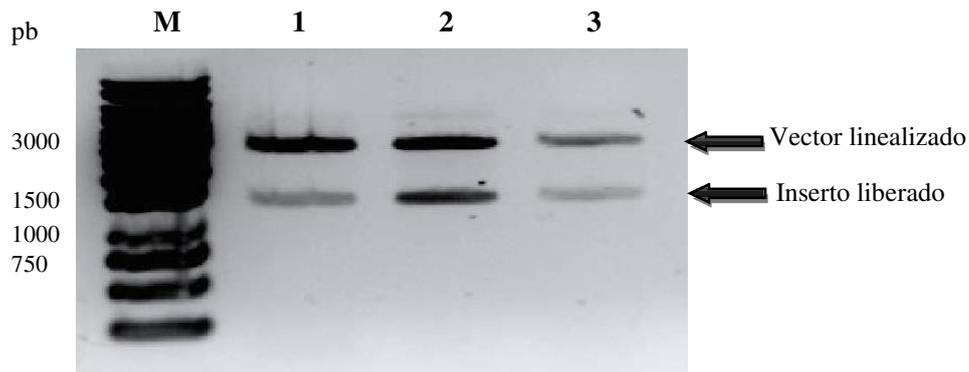


Figura 4.3.1. Liberación del inserto clonado en el vector *pGEM-T Easy* mediante digestión con *EcoRI*. Gel de agarosa 0,8%. Se observa la liberación del inserto de $\approx 1,5$ kb en las calles 1, 2 y 3. M: Marcador de masa molecular Gene Ruler 1 kb DNA Ladder. Calle 1: pRV1-14, 5: Calle 2: pRV1-112, Calle 3: pRV1-153.

Las construcciones seleccionadas, fueron secuenciadas utilizando los oligonucleótidos M13Fw y M13Rv y mediante el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se identificó el siguiente arreglo de genes en casete en los tres aislamientos (Figura 4.3.2):

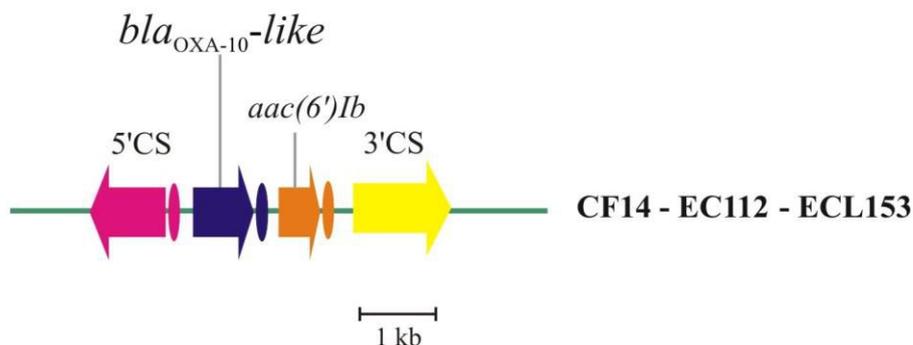


Figura 4.3.2. Esquema del arreglo de genes detectados en los tres aislamientos de enterobacterias. 5'CS: Región 5' conservada (*intI1*). 3'CS: Región 3' conservada (*qacEΔ1+sul1*). N° de acceso: AM412777.

Las secuencias de las regiones variables de los integrones clase 1 detectados en las tres especies de enterobacterias estudiadas (correspondientes a las regiones variables de los integrones clase 1 de los aislamientos CF14 (pRV1-14), EC112 (pRV1-112) y ECL153 (pRV1-153)) fueron idénticas. Dentro de la misma fueron detectados dos genes en casete: un nuevo gen en casete codificante para una β -lactamasa clase D derivada de *bla*_{OXA-10}, la cual posteriormente fue designada *bla*_{OXA-101}, asociado al gen en casete *aac(6')-Ib* o *aacA4* codificante para una enzima modificadora de aminoglucósidos

(AAC-aminoglucósido acetil transferasa). Las enzimas AAC(6') son de particular importancia dado el amplio espectro de su substratos y por su alta frecuencia en aislamientos clínicos resistentes. Pese a toda la gama de enzimas AACs descritas, estas enzimas son las que producen la mayoría de los casos de resistencia en bacterias gram negativas. De todas las variantes de AAC(6')-I, la de mayor relevancia clínica es la AAC(6')-Ib codificada por el gen *aac(6')-Ib* ya que se encuentra en el 70% de los aislamientos de enterobacterias con un perfil de resistencia del tipo de las enzimas AAC(6')-I (Vakulenko y Mobashery, 2003).

La secuencia de la región variable antes descrita fue depositada en la base de datos *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) bajo el número de acceso: AM412777 (Figura 4.3.3).

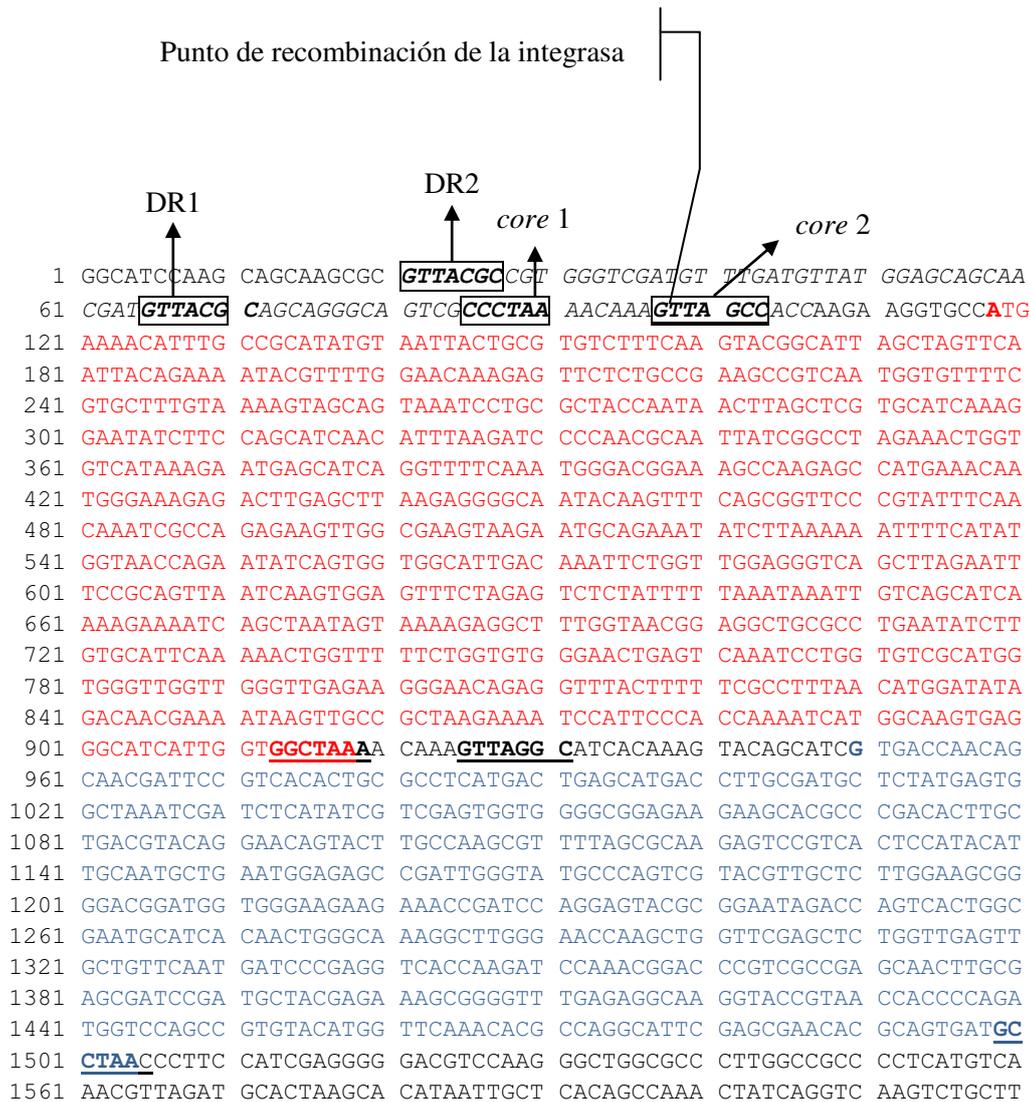


Figura 4.3.3. Secuencia de la región variable detectada dentro del integrón clase 1 de CF14, EC112 y ECL153. En cursiva se encuentra destacado el sitio *attI1* (Partridge y col, 2000). Los respectivos sitios core correspondientes al *attC* de cada gen en casete se encuentran subrayados (Collis y Hall, 1992; Stokes y col, 1997). En rojo: *bla*_{OXA-101}. En azul: *aac(6')*-Ib.

4.3.2. Caracterización del gen en casete *bla*_{OXA-101}.

Comenzando con la caracterización de la enzima se realizó un análisis bioinformático donde se evaluaron distintos parámetros o estructuras para ser consideradas en futuros análisis. Se analizó la secuencia nucleotídica obtenida y la aminoacídica deducida a partir de esta y se determinó mediante análisis *in silico* el péptido señal, pI y masa molecular teórica de la proteína madura.

4.3.2.1. Análisis de los sitios *attI* y *attC*.

Como se dijo en la sección “Introducción”, la integración de genes en casete dentro de un integrón ocurre mediante un evento de recombinación de sitio específico entre los sitios *attI* (localizado en la región 5’CS del integrón) y *attC* (perteneciente al gen en casete). Por este motivo, se realizó el análisis de la presencia de ambos sitios de recombinación para confirmar la presencia de las estructuras nucleotídicas necesarias para la integración y escisión de estos genes en los integrones estudiados, además de verificar que los genes integrados se encuentran como genes en casete.

Como se muestra en la figura 4.3.3, se detectó la presencia del sitio *attII*, junto con las todas las características propias del mismo (Partridge y col, 2000) en el integrón clase 1 perteneciente a los aislamientos CF14, EC112 y ECL153.

En los genes detectados dentro de la región variable, se analizó la presencia del sitio de recombinación *attC*. Mediante el análisis de las secuencias localizadas corriente arriba y abajo de los genes integrados dentro de las regiones variables de los integrones estudiados pudo observarse que poseían este elemento, característica necesaria para definir a estos como genes en casete. En la figura 4.3.3 se encuentran remarcados los sitios simples de unión LH y RH detectados con sus respectivos dominios 1L y 1R según lo descrito previamente por otros autores (Collis y Hall, 1992; Stokes y col, 1997). Comparando ambos sitios y los dominios detectados en los dos genes en casete se observó la secuencia consenso de 7 pb reportada los dominios 1L y 1R. Como se muestra en la tabla 4.3.1, la secuencia de los dominios 1R y 1L es similar en ambos genes en casetes, sólo difieren entre ellos por uno o dos nucleótidos.

Tabla 4.3.1. Dominios característicos del sitio *attC* detectados en los genes en casete de la RVI del integrón clase 1 de EC112, CF14 y ECL153.

Gen en casete	1R*	1L*
<i>bla_{OXA-101}</i>	GTTAGCC	GGCTAAA
<i>aac(6)-Ib</i>	GTTAGGC	GCCTAAC

*En cursiva se destacan los nucleótidos en los que se diferencia cada dominio.

4.3.2.2. Análisis nucleotídico y aminoacídico de la β -lactamasa OXA-101.

En microorganismos gram negativos las enzimas β -lactamasas se localizan en el periplasma. Para translocarse a esta localización y ser funcionales poseen en el extremo N-terminal un péptido señal. Al final de este, se localiza el sitio de clivaje reconocido por una peptidasa, y luego de escindir el péptido señal queda conformada la proteína madura dentro de este espacio celular

De acuerdo al resultado arrojado por el software Signal P, existe un posible sitio de clivaje entre los aminoácidos 19 y 20, como puede observarse en la figura 4.3.4:

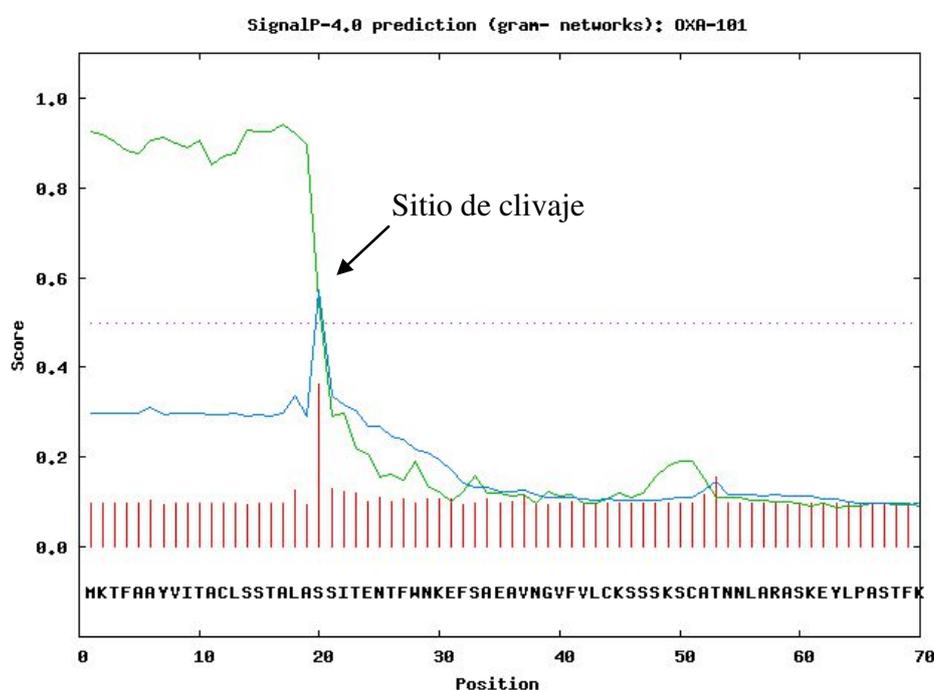


Figura 4.3.4. Análisis de sitio teórico de clivaje del péptido señal. En verde se encuentra graficado los resultados del algoritmo que realiza la predicción de péptido señal para cada aminoácido, un alto score indica que el aminoácido es parte del péptido señal, un bajo score indica que el aminoácido es parte de la proteína madura. En rojo se indica el score de cada aminoácido para el sitio de clivaje. En este caso el máximo score indica el primer residuo aminoacídico de la proteína madura. El parámetro graficado en celeste es una combinación de los score anteriores que resulta en un mejor predictor del sitio de clivaje del péptido señal.

La secuencia nucleotídica de *bla*_{OXA-101} (800 pb) y la aminoacídica derivada de esta mediante la traducción *in silico* (266 aa) se muestra en la figura 4.3.5. Utilizando recursos disponibles en internet (http://web.expasy.org/compute_pi/) se determinó que

para la proteína madura (sin péptido señal) el pI teórico de la misma era 8.73 y la masa molecular estimada 27,4 kDa.

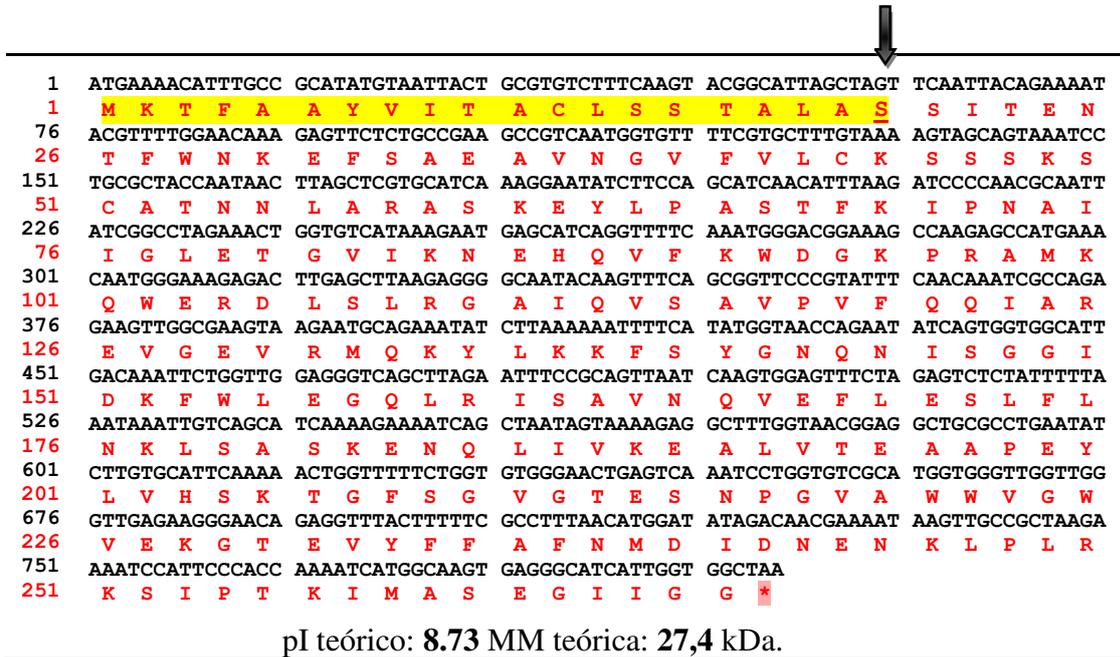


Figura 4.3.5. Secuencia nucleotídica del gen *bla_{OXA-101}*. La traducción in silico de la misma (secuencia aminoacídica) se encuentra marcada en rojo. El péptido señal se encuentra resaltado en amarillo y con una flecha se encuentra señalado el sitio de clivaje del mismo (residuo serina subrayado). Se indican además los valores teóricos calculados para el punto isoeléctrico (pI) y masa molecular (MM) de la proteína madura (sin péptido señal).

Las enzimas β -lactamasas de clase OXA han sido mayormente descritas en bacterias del género *Enterobacteriaceae* y en *P. aeruginosa* (Naas y Nordmann, 1999), y entre las β -lactamasas de clase D que han sido detectadas como genes en casete, formando parte de integrones, las más frecuentes son los genes de la familia *bla_{OXA}* de espectro ampliado (*bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-2}* y *bla_{OXA-10}*) (Naas y Nordmann, 1999). Al realizar una búsqueda en la base de datos INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>), la cual alberga más de 1497 descripciones de integrasas y 8454 genes en casete, estableciendo como criterio de búsqueda conjunta las palabras *intI1* y *bla_{OXA}* devuelve 179 descripciones de integrones clase 1 que poseen en su región variable un gen en casete de la familia de *bla_{OXA}* al día de la fecha (10 de noviembre 2012). Además, se observa que una gran mayoría se encuentra asociado a un gen en casete de resistencia a aminoglucósidos. Para citar unos ejemplos: OXA-7 ha sido descrita por primera vez en aislamiento de *E. coli*, inserta en un integrón clase 1 como gen en casete y asociado al gen en casete *aadB* (Scoulica y col, 1995) y *bla_{OXA-35}* ha sido detectada como gen en casete formando parte

de la región variable de un integrón clase 1 junto con *aac(6')-Ib* (también como gen en casete) en un aislamiento de *P. aeruginosa* (Aubert y col, 2001b).

4.3.3. OXA-101 y enzimas de la familia de OXA-10.

Las enzimas de clase D son el grupo más heterogéneo en cuanto a secuencia nucleotídica y aminoacídica dentro de las β -lactamasas. De hecho, entre algunas enzimas pertenecientes a esta familia hay sólo 20% de identidad, aunque poseen tres motivos aminoacídicos altamente conservados. Esta diversidad de secuencia es característica de este grupo de β -lactamasas (Poirel y col, 2010). Alineamientos de la secuencia de *bla_{OXA}* detectada como gen en casete en los aislamientos revelaron cambios nucleotídicos y aminoacídicos respecto a diferentes enzimas de la familia de OXA-10. Esta familia está integrada por las enzimas OXA-7, OXA-11, OXA-13, OXA-13-1, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-28, OXA-35, OXA-56, entre otras (Poirel y col, 2010) (Figura 4.3.6). Al compararla con el gen *bla_{OXA-56}* se observan 2 cambios de nucleótidos, los cuales se traducen en dos sustituciones aminoacídicas: (I89V y A230T). Frente al gen *bla_{OXA-35}* presenta 4 cambios nucleotídicos, pero sólo se traduce en un cambio aminoacídico fuera del péptido señal (S27F). Con la secuencia nucleotídica de *bla_{OXA-10}* posee 25 cambios nucleotídicos que se traducen en 9 cambios aminoacídicos (Figuras 4.3.7 y 4.3.8). La diversidad estructural observada en este grupo también es observada a nivel bioquímico, ya que se encuentran descritas enzimas de bajo y amplio espectro de hidrólisis, y también algunas con actividad carbapenemasa (Poirel y col, 2010). Incluso con la limitada identidad entre las β -lactamasas de clase OXA, la mayoría de las nuevas enzimas pueden ser relacionadas o clasificadas como “derivadas” de algún miembro pre-existente de esta familia de β -lactamasas (Poirel y col, 2010).

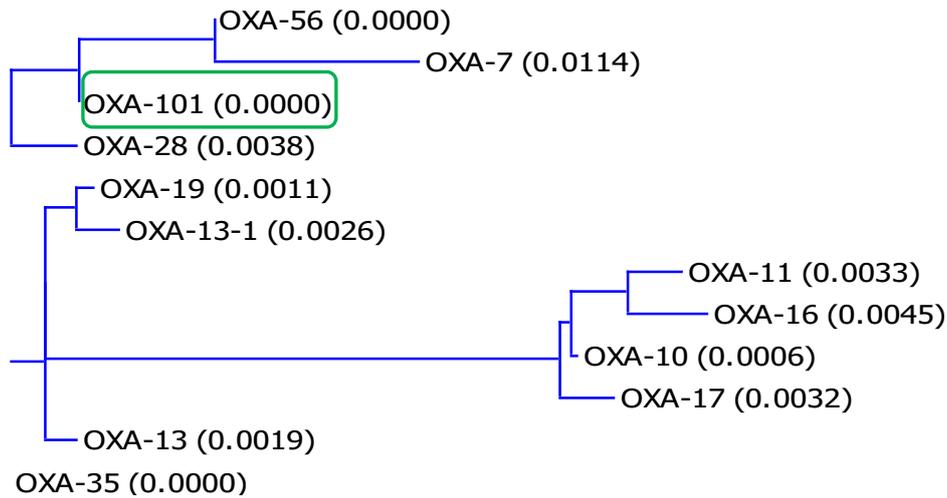


Figura 4.3.6. Dendrograma construido a partir del análisis de las secuencias aminoacídicas de OXA-10 y enzimas derivadas utilizando el algoritmo neighbor joining creado por Saitou y Nei (Saitou y Nei, 1987) empleando el software Vector NTI 10.3.0. La distancia filogenética de cada secuencia al nodo más cercano se muestra en paréntesis.

	1	50
<i>bla</i> _{OXA-101}	ATGAAAACATTTGCCGCATATGTAATTA	CTGCGTGTCTTTCAAGTACGGC
<i>bla</i> _{OXA-10}	ATGAAAACATTTGCCGCATATGTAATTAT	CGCGTGTCTTTTCGAGTACGGC
<i>bla</i> _{OXA-35}	ATGAAAACATTTGCCGCATATGTAATTA	CTGCGTGTCTTTCAAGTACGGC
<i>bla</i> _{OXA-56}	ATGAAAACATTTGCCGCATATGTAATTA	CTGCGTGTCTTTCAAGTACGGC
	51	100
<i>bla</i> _{OXA-101}	ATTAGCTAGTTCAATTACAGAAAATACGT	TTTGGAACAAAGAGTTCTCTG
<i>bla</i> _{OXA-10}	ATTAGCTGGTTCAATTACAGAAAATACGT	CTTGGAACAAAGAGTTCTCTG
<i>bla</i> _{OXA-35}	ATTAGCTAGTTCAATTACAGAAAATACGT	CTTGGAACAAAGAGTTCTCTG
<i>bla</i> _{OXA-56}	ATTAGCTAGTTCAATTACAGAAAATACGT	TTTGGAACAAAGAGTTCTCTG
	101	150
<i>bla</i> _{OXA-101}	CCGAAGCCGTCAATGGTGT	TTTCGTGCTTTGTAAAAGTAGCAGTAAATCC
<i>bla</i> _{OXA-10}	CCGAAGCCGTCAATGGTGT	CTTCGTGCTTTGTAAAAGTAGCAGTAAATCC
<i>bla</i> _{OXA-35}	CCGAAGCCGTCAATGGTGT	TTTCGTGCTTTGTAAAAGTAGCAGTAAATCC
<i>bla</i> _{OXA-56}	CCGAAGCCGTCAATGGTGT	TTTCGTGCTTTGTAAAAGTAGCAGTAAATCC
	151	200
<i>bla</i> _{OXA-101}	TGCGCTACCAATAACTTAGCTCGTGCAT	CAAAGGAATATCTTCCAGCATC
<i>bla</i> _{OXA-10}	TGCGCTACCAATGACTTAGCTCGTGCAT	CAAAGGAATATCTTCCAGCATC
<i>bla</i> _{OXA-35}	TGCGCTACCAATAACTTAGCTCGTGCAT	CAAAGGAATATCTTCCAGCATC
<i>bla</i> _{OXA-56}	TGCGCTACCAATAACTTAGCTCGTGCAT	CAAAGGAATATCTTCCAGCATC
	201	250
<i>bla</i> _{OXA-101}	AACATTTAAGATCCCCAACGCAATTAT	CGGCCTAGAACTGGTGTGCATAA
<i>bla</i> _{OXA-10}	AACATTTAAGATCCCCAACGCAATTAT	CGGCCTAGAACTGGTGTGCATAA
<i>bla</i> _{OXA-35}	AACATTTAAGATCCCCAACGCAATTAT	CGGCCTAGAACTGGTGTGCATAA
<i>bla</i> _{OXA-56}	AACATTTAAGATCCCCAACGCAATTAT	CGGCCTAGAACTGGTGTGCATAA
	251	300
<i>bla</i> _{OXA-101}	AGAATGAGCATCAG	GTTTTTCAAATGGGACGGAAAGCCAAGAGCCATGAA
<i>bla</i> _{OXA-10}	AGAATGAGCATCAG	GTTTTTCAAATGGGACGGAAAGCCAAGAGCCATGAA
<i>bla</i> _{OXA-35}	AGAATGAGCATCAG	GTTTTTCAAATGGGACGGAAAGCCAAGAGCCATGAA
<i>bla</i> _{OXA-56}	AGAATGAGCATCAG	ATTTTTCAAATGGGACGGAAAGCCAAGAGCCATGAA

Sigue en página 147

<i>bla</i> _{OXA-101}	CAATGGGAAAGAGACTTGA	GCTTAAGAGGGGCAATACAAGTTTCAGC	GGT
<i>bla</i> _{OXA-10}	CAATGGGAAAGAGACTT	GACCTTAAGAGGGGCAATACAAGTTTCAGCTGT	
<i>bla</i> _{OXA-35}	CAATGGGAAAGAGACTTGA	GCTTAAGAGGGGCAATACAAGTTTCAGC	GGT
<i>bla</i> _{OXA-56}	CAATGGGAAAGAGACTTGA	GCTTAAGAGGGGCAATACAAGTTTCAGC	GGT
	351		400
<i>bla</i> _{OXA-101}	TCCCGTATTTCAACAAATCGCCAGAGAAGTTGGCGAAGTAAGAATGCAGA		
<i>bla</i> _{OXA-10}	TCCCGTATTTCAACAAATCGCCAGAGAAGTTGGCGAAGTAAGAATGCAGA		
<i>bla</i> _{OXA-35}	TCCCGTATTTCAACAAATCGCCAGAGAAGTTGGCGAAGTAAGAATGCAGA		
<i>bla</i> _{OXA-56}	TCCCGTATTTCAACAAATCGCCAGAGAAGTTGGCGAAGTAAGAATGCAGA		
	401		450
<i>bla</i> _{OXA-101}	AATA	TCTTAAAAAATTTTCATATGGTAACCAGAATATCAGTGGTGGCATT	
<i>bla</i> _{OXA-10}	AATACCTTAAAAAATTTTCCTATGGCAACCAGAATATCAGTGGTGGCATT		
<i>bla</i> _{OXA-35}	AATACCTTAAAAAATTTTCATATGGCAACCAGAATATCAGTGGTGGCATT		
<i>bla</i> _{OXA-56}	AATA	TCTTAAAAAATTTTCATATGGTAACCAGAATATCAGTGGTGGCATT	
	451		500
<i>bla</i> _{OXA-101}	GACAAATTCTGGTTGGAGGGT	CAGCTTAGAATTTCCGCAGTTAATCAAGT	
<i>bla</i> _{OXA-10}	GACAAATTCTGGTTGGAAGGCCAGCT	TAGAATTTCCGCAGTTAATCAAGT	
<i>bla</i> _{OXA-35}	GACAAATTCTGGTTGGAGGGT	CAGCTAAGAATTTCCGCAGTTAATCAAGT	
<i>bla</i> _{OXA-56}	GACAAATTCTGGTTGGAGGGT	CAGCTTAGAATTTCCGCAGTTAATCAAGT	
	501		550
<i>bla</i> _{OXA-101}	GGAGTTTCTAGAGTCTCTAT	TTTTAAATAAATTGTCAGCATCAAAAGAAA	
<i>bla</i> _{OXA-10}	GGAGTTTCTAGAGTCTCTAT	TTTTAAATAAATTGTCAGCATCTAAAGAAA	
<i>bla</i> _{OXA-35}	GGAGTTTCTAGAGTCTCTAT	TTTTAAATAAATTGTCAGCATCAAAAGAAA	
<i>bla</i> _{OXA-56}	GGAGTTTCTAGAGTCTCTAT	TTTTAAATAAATTGTCAGCATCAAAAGAAA	
	551		600
<i>bla</i> _{OXA-101}	A	T	CAGCTAATAGTAAAAGAGGCTTTGGTAACGGAGGCTGCGCCTGAATAT
<i>bla</i> _{OXA-10}	ACCAGCTAATAGTAAAAGAGGCTTTGGTAACGGAGGCGGCACCTGAATAT		
<i>bla</i> _{OXA-35}	A	T	CAGCTAATAGTAAAAGAGGCTTTGGTAACGGAGGCTGCGCCTGAATAT
<i>bla</i> _{OXA-56}	A	T	CAGCTAATAGTAAAAGAGGCTTTGGTAACGGAGGCTGCGCCTGAATAT
	601		650
<i>bla</i> _{OXA-101}	CT	T	TGTGCATTCAAAAACCTGGTTTTTCTGGTGTGGGAACTGAGTCAAATCC
<i>bla</i> _{OXA-10}	CTAGTGCATTCAAAAACCTGGTTTTTCTGGTGTGGGAACTGAGTCAAATCC		
<i>bla</i> _{OXA-35}	CT	T	TGTGCATTCAAAAACCTGGTTTTTCTGGTGTGGGAACTGAGTCAAATCC
<i>bla</i> _{OXA-56}	CT	T	TGTGCATTCAAAAACCTGGTTTTTCTGGTGTGGGAACTGAGTCAAATCC
	651		700
<i>bla</i> _{OXA-101}	TGGTGT	CGCATGGTGGGTGGT	TGGGTTGAGAAGGGAACAGAGGTTTACT
<i>bla</i> _{OXA-10}	TGGTGT	CGCATGGTGGGTGGGTTGGGTTGAGAAGGAGACAGAGGTTTACT	
<i>bla</i> _{OXA-35}	TGGTGT	CGCATGGTGGGTGGT	TGGGTTGAGAAGGGAACAGAGGTTTACT
<i>bla</i> _{OXA-56}	TGGTGT	CGCATGGTGGGTGGT	TGGGTTGAGAAGGAGACAGAGGTTTACT
	701		750
<i>bla</i> _{OXA-101}	TTTTCGCCTTTAACATGGATATAGACAACGAAA	A	TAAGTTGCCGCTAAGA
<i>bla</i> _{OXA-10}	TTTTCGCCTTTAACATGGATATAGACAACGAAAGTAAGTTGCCGCTAAGA		
<i>bla</i> _{OXA-35}	TTTTCGCCTTTAACATGGATATAGACAACGAAA	A	TAAGTTGCCGCTAAGA
<i>bla</i> _{OXA-56}	TTTTCGCCTTTAACATGGATATAGACAACGAAA	A	TAAGTTGCCGCTAAGA
	751		801
<i>bla</i> _{OXA-101}	AAATCCATTCCCACCAAATCATGG	CAAGTGAGGGCATCATTGGTGGCTAA	
<i>bla</i> _{OXA-10}	AAATCCATTCCCACCAAATCATGGAAAGTGAGGGCATCATTGGTGGCTAA		
<i>bla</i> _{OXA-35}	AAATCCATTCCCACCAAATCATGG	CAAGTGAGGGCATCATTGGTGGCTAA	
<i>bla</i> _{OXA-56}	AAATCCATTCCCACCAAATCATGG	CAAGTGAGGGCATCATTGGTGGCTAA	

Figura 4.3.7. Alineamiento de secuencias nucleotídicas. Números de acceso (NCBI): DQ984668 (*bla*_{OXA-10}), AF315786 (*bla*_{OXA-35}) y AY660529 (*bla*_{OXA-56}). Los cambios nucleotídicos se indican en rojo.

	1		50
OXA-101	MKTFAAYVITACLSSTALASSITENTFWNKEFSAEAVNGVFLCKSSSKS		
OXA-10	MKTFAAYVITACLSSTALAGSITENTSWNKEFSAEAVNGVFLCKSSSKS		
OXA-35	MKTFAAYVITACLSSTALASSITENTSWNKEFSAEAVNGVFLCKSSSKS		
OXA-56	MKTFAAYVITACLSSTALASSITENTFWNKEFSAEAVNGVFLCKSSSKS		
	51		100
OXA-101	CATNNLARASKEYLPASTFKIPNAIIGLETGVKNEHQVFKWDGKPRAMK		
OXA-10	CATNDLARASKEYLPASTFKIPNAIIGLETGVKNEHQVFKWDGKPRAMK		
OXA-35	CATNNLARASKEYLPASTFKIPNAIIGLETGVKNEHQVFKWDGKPRAMK		
OXA-56	CATNNLARASKEYLPASTFKIPNAIIGLETGVKNEHQVFKWDGKPRAMK		
	101		150
OXA-101	QWERDLSLRGAIQVSAPVVFQQIAREVGEVRMQKYLKKFSYGNQNISGGI		
OXA-10	QWERDLTLRGAIQVSAPVVFQQIAREVGEVRMQKYLKKFSYGNQNISGGI		
OXA-35	QWERDLSLRGAIQVSAPVVFQQIAREVGEVRMQKYLKKFSYGNQNISGGI		
OXA-56	QWERDLSLRGAIQVSAPVVFQQIAREVGEVRMQKYLKKFSYGNQNISGGI		
	151		200
OXA-101	DKFWLEGQLRISAVNQVEFLESIFLNKLSASKENQLIVKEALVTEAAPEY		
OXA-10	DKFWLEGQLRISAVNQVEFLESILYNKLSASKENQLIVKEALVTEAAPEY		
OXA-35	DKFWLEGQLRISAVNQVEFLESIFLNKLSASKENQLIVKEALVTEAAPEY		
OXA-56	DKFWLEGQLRISAVNQVEFLESIFLNKLSASKENQLIVKEALVTEAAPEY		
	201		250
OXA-101	LVHSKTGFSGVGTESNPGVAWWVGWVEKETEVEYFFAFNMDIDNENKLPLR		
OXA-10	LVHSKTGFSGVGTESNPGVAWWVGWVEKETEVEYFFAFNMDIDNESKLPLR		
OXA-35	LVHSKTGFSGVGTESNPGVAWWVGWVEKETEVEYFFAFNMDIDNENKLPLR		
OXA-56	LVHSKTGFSGVGTESNPGVAWWVGWVEKGAEVEYFFAFNMDIDNENKLPLR		
	251		266
OXA-101	KSIPTKIMASEGIIGG		
OXA-10	KSIPTKIMESEGIIGG		
OXA-35	KSIPTKIMASEGIIGG		
OXA-56	KSIPTKIMASEGIIGG		

Figura 4.3.8. Alineamiento de secuencias aminoacídicas. Números de acceso (NCBI): ABJ09665 (OXA-10), AAK49460.1 (OXA-35) y AAT74614.1 (OXA-56). Se encuentran resaltados en amarillo los motivos conservados típicos en las β -lactamasas clase D (Poirel y col, 2010). Los aminoácidos resaltados en rojo indican las diferencias entre las distintas enzimas.

Múltiples mutaciones han sido descritas en enzimas derivadas de OXA-10, si bien es difícil definir cual de ellas es la principal responsable del espectro de hidrólisis de la enzima, se postulan dos cambios como fundamentales: a- La sustitución de ácido aspártico en lugar de una glicina en la posición 157 (D157G) se considera crítica para la resistencia a ceftazidima (Danel y col, 1998), b- El cambio aminoacídico S73N (un residuo serina en la posición 73 en lugar de asparagina) sería responsable de la extensión del perfil de hidrólisis a cefalotina, cefotaxima y ceftazidima (Naas y Nordmann, 1999). Además de estos dos cambios puntuales, la acumulación y combinación de diferentes mutaciones determina el espectro de hidrólisis de estas enzimas frente a diferentes β -lactámicos (Tabla 4.3.2) (Vercheval, 2010).

A través de la comparación de secuencias aminoacídicas de las variantes de espectro extendido de OXA-10 frente a OXA-101 se analizó la presencia de los cambios aminoacídicos involucrados en la extensión del perfil del sustrato descritos. Como se muestra en la tabla 4.3.2, si bien OXA-101 presenta algunos de estos cambios, ninguna de las dos sustituciones postuladas como fundamentales para ampliar el perfil de hidrólisis fueron observadas en OXA-101.

Tabla 4.3.2. Mutaciones de diferentes variantes de la β -lactamasa OXA-10 (Tomado y modificado de la versión original de Vercheval, 2010)

Enzima	Cambios aminoacídicos											Sustrato	
	Ile-10 (I)	Gly-20 (G)	Asp-58 (D)	Asn-73 (N)	Thr-107 (T)	Ala-124 (A)	Asn-143 (N)	Gly-157 (G)	Tyr-174 (Y)	Glu-229 (E)	Ser-245 (S)		Glu-259 (E)
OXA-10													Penicilinas
OXA-11							Ser (S)	Asp (D)					Ceftazidima Cefotaxima Moxalactam
OXA-13	Thr (T)	Ser (S)	Asn (N)	Ser (S)	Ser (S)				Phe (F)	Gly (G)	Asn (N)	Ala (A)	Cefotaxima Aztreonam
OXA-14								Asp (D)					Ceftazidima Cefotaxima
OXA-16						Thr (T)		Asp (D)					Ceftazidima Cefotaxima Moxalactam
OXA-17				Ser (S)									Ceftazidima Cefotaxima Cefalotina
OXA-19	Thr (T)	Ser (S)	Asn (N)		Ser (S)		Asp (D)	Phe (F)	Gly (G)	Asn (N)	Ala (A)		Ceftazidima Cefotaxima
OXA-101	Thr (T)	Ser (S)	Arg (R)		Ser (S)			Phe (F)		Asn (N)	Ala (A)		

4.3.4. Localización genética de *bla*_{OXA-101}.

4.3.4.1. Análisis de la presencia de plásmidos en las enterobacterias.

Se evaluó la presencia de plásmidos en los aislamientos *bla*_{OXA-101} positivos, y en los 3 aislamientos, se observó la presencia de al menos un plásmido de elevado peso molecular (Figura 4.3.9).

Debido al impacto clínico que podría tener la transferencia horizontal de la multiresistencia, se realizaron ensayos de conjugación para evaluar la presencia de elementos genéticos móviles.

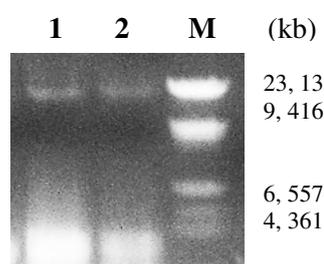


Figura 4.3.9. Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina. Gel de agarosa 0,8%. M: Marcador de masa molecular λ /HindIII. Calle 1: CF14, Calle 2: EC112.

4.3.4.2. Conjugación.

Para analizar la localización genética de *bla*_{OXA-101} y su transferibilidad se realizó un ensayo de conjugación en medio sólido, utilizando como célula dadora (célula F⁺) a uno de los aislamientos clínicos que presenta el gen codificante para esta β -lactamasa, *Enterobacter cloacae* 153 -ECL153- (STR^S, AMP^R)¹, y como célula receptora (célula F) a la cepa *E. coli* HB101 (STR^R, AMP^S). Se seleccionó a ECL153 para realizar este ensayo debido a que era uno de los cuales permitía establecer un sistema de selección de doble antibacteriano utilizando como receptora a *E. coli* HB101.

La selección de células transconjugantes se realizó en medio LBA suplementado con STR (100 μ g/ml) y AMP (30 μ g/ml) luego de poner en contacto ambos aislamientos durante 18-24 hs.

¹ STR^S: Sensible a estreptomicina, STR^R: Resistente a estreptomicina.

AMP^S: Sensible a ampicilina, AMP^R: Resistente a ampicilina.

La identificación de los transconjugantes seleccionados se realizó por pruebas bioquímicas convencionales, tipificándose como *E. coli* a los transconjugantes HB153-1, HB153-3 y HB153-6 (Tabla 4.3.3).

Tabla 4.3.3. Pruebas de identificación realizadas a las células transconjugantes

Microorganismo	Pruebas bioquímicas			
	TSI	Citrato	SIM	Urea
HB101	K/A	-	-/+	-
HB153-1/3/6	K/A	-	-/+	-
ECL153	A/A	+	-/-	+

K: alcalino, A: ácido. +: reacción positiva -: reacción negativa

La sensibilidad a antibacterianos de las cepas transconjugantes HB153 se determinó por el método de difusión con disco y dilución en medio sólido. Los resultados se muestran en las tablas 4.3.4 y 4.3.5, respectivamente.

Tabla 4.3.4. Sensibilidad de los transconjugantes a los ATM's por el método de difusión

ATB	ECL 153	HB153-1	HB153-3	HB153-6	HB101
AMP	6R	6R	6R	9R	21S
PIP	6R	21S	25S	25S	32S
AMC	6R	20S	20S	20S	26S
CEF	6R	26S	28S	28S	23S
FOX	6R	30S	30S	30S	31S
CTX	6R	36S	39S	36S	36S
NAL	6R	26S	28S	32S	33S
AKN	6R	6R	8R	6R	30S
GEN	6R	6R	6R	6R	26S
CMP	7R	14R	14R	20S	31S
TMS	6R	31S	30S	31S	40S
SUL	6R	26S	9R	12R	38S
NIT	35S	35S	35S	37S	35S
STR	20S	7R	6R	7R	6R

Para cada antibacteriano se muestra la interpretación de los resultados de acuerdo a las tablas del CLSI (S: Sensible, R: Resistente). Se encuentran resaltadas las posibles resistencias transferidas con el plásmido de ECL153.

El aislamiento ECL153 presentó resistencia a la mayoría de los antibacterianos ensayados, siendo excepciones los antibacterianos nitrofurantóina y estreptomycin. Como se encuentra resaltado en la tabla 4.3.4, se observó en las células transconjugantes una posible transferencia de determinantes de resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos (AKN y GEN) y sulfizoxazol. Si bien la estreptomycin pertenece a la familia de los aminoglucósidos, no es sustrato de la enzima AAC (6')-Ib (Vakulenko y Mobashery, 2003), lo cual explicaría la susceptibilidad del microorganismo frente al mismo.

Tabla 4.3.5. Sensibilidad de los transconjugantes a β -lactámicos por el método de dilución

Microorganismo	CIM ($\mu\text{g/ml}$)							
	AMP	PIP	CEF	FOX	CAZ	CTX	FEP	IMI
ECL153	>1024	>256	>1024	512	256	512	4	0.5
HB153-1	64	8	4	1	0,06	0,03	0.03	0.25
HB153-3	64	8	4	1	0,06	0,03	0.03	0.25
HB153-6	64	8	4	1	0,06	0,03	0.03	0.25
HB101	1	0,5	2	1	0,06	0,03	0.03	0.25

Al determinar la CIM de ciertos antimicrobianos β -lactámicos un aumento de los niveles de resistencia a ampicilina y piperacilina fue observado en las transconjugantes respecto de HB101 (64 veces los valores de CIM para AMP, 16 veces los de PIP). Como se observa en la tabla 4.3.5 en los tres transconjugantes estudiados se detectó el mismo antibiograma.

Al comparar los valores de CIM de OXA-35 con OXA-101, los niveles de susceptibilidad a diferentes β -lactámicos fueron similares, incluso cuando estos fueron analizados en diferentes perfiles genéticos en cada caso. Para OXA-35, la CIM fue determinada en una cepa de *E. coli* XL1 que alberga un plásmido recombinante de alto número de copias que sobreexpresa OXA-35 (Aubert et al., 2001), en cambio, para OXA-101, la CIM de antibacterianos β -lactámicos fueron determinados para transconjugantes de *E. coli* HB101, que sólo contenía OXA-101 como mecanismo de hidrólisis enzimática de β -lactámicos, codificado en un megaplásmido nativo, los cuales suelen ser, generalmente, de bajo número de copias. Los resultados obtenidos hasta el momento permiten comenzar a inferir que OXA-101 no poseería un espectro de hidrólisis de antibacterianos β -lactámicos ampliado como otras enzimas de la familia de OXA-10 (Naas y Nordmann, 1999).

La presencia de al menos un plásmido en las transconjugantes analizadas (HB153-1, HB153-3 y HB153-6) con movilidad electroforética similar a la observada en el

aislamiento ECL153 permite demostrar la existencia de un elemento extracromosómico conjugativo proveniente de la cepa dadora anteriormente mencionada. Como puede observarse en la Figura 4.3.10, el aislamiento ECL153 posee varios plásmidos de diferentes tamaños, en cambio sólo puede observarse uno de ellos en las cepas transconjugantes. Conforme a lo esperado, no se observó ningún elemento plasmídico en HB101.

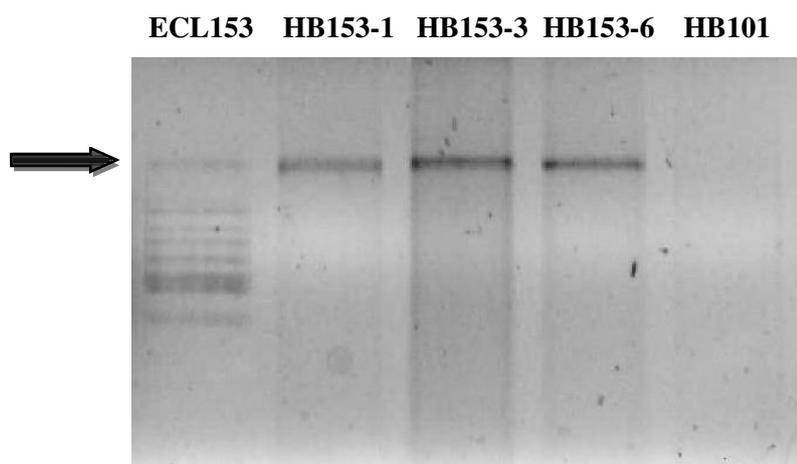


Figura 4.3.10. Extracción de plásmidos de ECL153 y de los transconjugantes. Gel agarosa 0,8 %. La flecha indica el plásmido transferido.

Además, se verificó la presencia de los genes *intI1* y *bla_{OXA-101}* (Figura 4.3.11) en las células transconjugantes mediante amplificación por PCR, confirmando la localización extracromosómica de esta β -lactamasa. Si bien el aislamiento ECL153 además posee el gen *bla_{TEM}* no se obtuvo el amplicón correspondiente en las transconjugantes obtenidas a partir de ECL 153, esto puede deberse a que posea una localización genética diferente a la del plásmido transferido a las células transconjugantes.

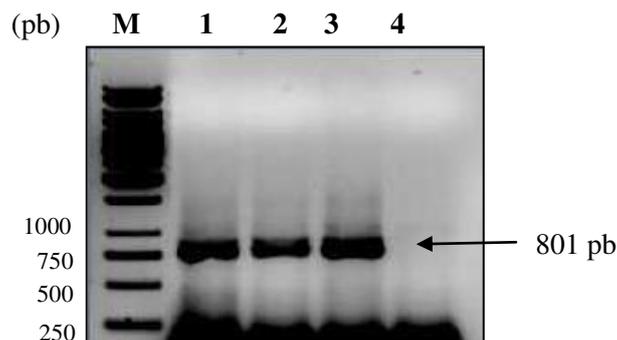


Figura 4.3.11. PCR del gen *bla_{OXA-101}* en células transconjugantes. M: 1 kb DNA ladder (Fermentas), 1: ECL153, 2-3: células transconjugantes, 4: HB101.

En síntesis, los resultados obtenidos sugieren que ECL153 presenta un plásmido conjugativo donde se encuentra localizado un integrón de clase 1, que la β -lactamasa OXA-101 se encuentra codificada en este elemento extracromosomal y que con ella se co-transfiere la resistencia a aminoglucósidos. Lo anterior, además, queda corroborado al describir esta plataforma genética en tres especies de enterobacterias diferentes, CF14, EC112 y ECL153.

Estos plásmidos conjugativos son la principal ruta de diseminación de genes que codifican enzimas que inactivan o modifican antimicrobianos de diversas familias, entre ellos: β -lactámicos y aminoglucósidos (Waters, 1999). La presencia de genes de resistencia en estos elementos genéticos móviles da cuenta de la flexibilidad genética y adaptabilidad del genoma bacteriano frente a condiciones de presión selectiva (Norman y col., 2009). La transferencia horizontal de la resistencia posee un gran impacto clínico negativo, por lo cual múltiples medidas tendientes a minimizarla deberían ser adoptadas (Bennet, 2008).

4.3.4.3. Actividad enzimática de los extractos crudos.

Para analizar la presencia de actividad enzimática en las células transconjugantes, se realizaron extractos crudos en los que se verificó esta actividad mediante hidrólisis de nitrocefín y/o de ampicilina (500 μ g/ml) revelado por método iodométrico (Figura 4.3.12).

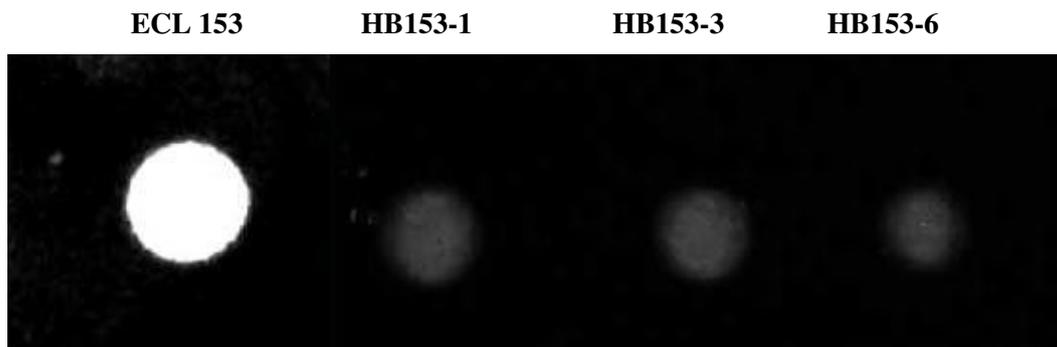


Figura 4.3.12. Se muestra la hidrólisis de ampicilina en la célula dadora (ECL153) y en bacterias transconjugantes (HB153-1,-3, -6).

Se visualiza una mayor actividad hidrolítica sobre el extracto crudo de ECL153 respecto a las células transconjugantes, lo que podría deberse en parte a la expresión simultánea de otras β -lactamasas en este aislamiento (ver próximo inciso).

4.3.5. Determinación del punto isoelectrico (pI) de OXA-101.

Al realizar isoelectroenfoque de los extractos crudos obtenidos a partir de las células transconjugantes se observó la presencia de tres enzimas presentes en el de ECL153, una con un punto isoelectrico aparente de 5,4 (se asume que corresponde a la enzima TEM, cuyo gen fue detectado por PCR), otra con pI aparente de 8 (compatible con las enzimas cromosómicas AmpC) y una enzima de pI aparente de 7,2. En cambio, en el extracto de las células transconjugantes sólo se observó la presencia de una enzima β -lactamasa de pI 7,2; el cual fue asociado a OXA-101.

Si bien el valor de pI determinado experimentalmente (7,2) no concuerda con el valor teórico obtenido con la secuencia aminoacídica de la proteína madura (8,73) esto puede deberse a que el algoritmo con el cual fue realizado el cálculo no se ajustaba a la proteína en estudio (http://web.expasy.org/compute_pi/). Al realizar el mismo análisis sobre OXA-35 el *software* da como resultado un pI de 8,73, siendo que el declarado por los autores del trabajo donde es caracterizada es de 8 (Aubert y col, 2001) y en el caso de OXA-10 el valor teórico obtenido es de 6,75 y el experimental 6,1 (Huovinen y col, 1988). Por lo anterior, puede especularse que los datos obtenidos *in silico* con este programa sólo sirven de orientación en la caracterización de enzimas de tipo OXA, siendo la evidencia empírica la determinante.

Por otro lado, como se dijo en el capítulo “Introducción”, la familia de las β -lactamasas OXA es el grupo más diverso en cuanto a secuencia aminoacídica en comparación con otras familias de β -lactamasas. Esta heterogeneidad de secuencia se traduce en un amplio rango de valores de pI para enzimas de la familia de OXA. En particular, para las OXA's de espectro ampliado este rango va desde 6,1 a 9,1 (<http://www.lahey.org/Studies/>). De las enzimas derivadas de OXA-10, OXA-19 posee un valor de pI similar (7,6) al observado para OXA-101 (Mugnier y col, 1998).

A continuación, en la tabla 4.3.6, se resumen los datos teóricos y prácticos obtenidos en este apartado respecto de OXA-101.

Tabla 4.3.6. Características de OXA-101.

Aislamientos bacterianos con <i>bla</i> _{OXA-101}	<i>E. coli</i> , <i>C. freundii</i> y <i>E. cloacae</i>
Localización genética	Dentro de la región variable de un integrón clase 1 localizado en un plásmido de alto peso molecular.
Gen en casete	800 pb, se observó la presencia de dominios característicos del sitio de recombinación <i>attC</i> .
Péptido señal	Se determinó la presencia de un posible péptido señal entre los aminoácidos 19 y 20.
Número de aminoácidos	266
Masa molecular proteína madura	27,3 kDa (teórica)
Motivos característicos	Se observó la presencia de los tres motivos conservados típicos en las β -lactamasas clase D.
pI	7,2 (empírico)/8,73 (teórico).
Transferibilidad	<p>-Mediante un ensayo de conjugación se comprobó la transferibilidad de este determinante de resistencia a β-lactámicos.</p> <p>-En las células transconjugantes obtenidas se detectó actividad β-lactamasa (hidrólisis de nitrocefina y ampicilina).</p> <p>-Al analizar en este entorno genético la susceptibilidad a β-lactámicos sólo se observó un incremento de valores de CIM a ampicilina y piperacilina en las células transconjugantes respecto a la célula receptora.</p>

4.3.6. Clonado de *bla*_{OXA-101}.

Con el propósito de continuar con la caracterización de esta nueva β -lactamasa se diseñó un esquema de clonado molecular para obtener OXA-101 de manera recombinante.

Como primer paso, se diseñaron los oligonucleótidos modificados (OXA-101-B y OXA-101-H conteniendo los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Hind*III respectivamente) para obtener el gen completo *bla*_{OXA-101} (sin codón de terminación) y poder clonarlo en fase en el vector de expresión seleccionado (pET28a+). Se procedió a la amplificación por PCR y el fragmento obtenido (821 pb) se purificó del gel de agarosa.

Luego, se realizó el clonado en el vector pGEM-T-Easy y se transformaron células de *E. coli* Top 10 (F') competentes, las cuales fueron sembradas en medio LBA suplementado con AMP (100 μ g/ml) + IPTG (1 mM) + X-gal (40 μ g/ml). La presencia de transformantes conteniendo el plásmido recombinante se confirmó mediante PCR realizadas a las colonias blancas obtenidas (Figura 4.3.13-A), extracción de ADN plasmídico y digestión con enzimas de restricción (Figura 4.3.13-B).

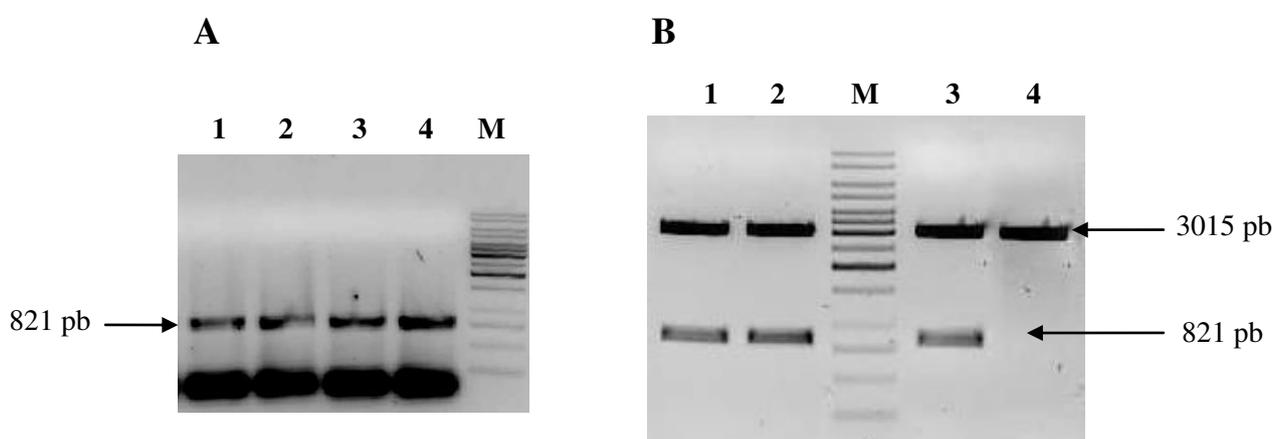


Figura 4.3.13. Clonado de *bla*_{OXA-101} en pGEM-T. A) PCR de colonia del gen *bla*_{OXA-101} sobre clones seleccionados para analizar. M: 1 kb DNA ladder (Fermentas), Calle 1: ECL153 (control positivo), Calles 2-4: clones pGEM-T-Easy/*bla*_{OXA-101}. En todos los clones se observa la presencia del inserto deseado (821 pb). B) Digestión de los clones obtenidos con la enzima *Eco*RI. M: 1 kb DNA ladder (Fermentas) Calles 1-3: clones pGEM-T-Easy/*bla*_{OXA-101}. Se observa la liberación del inserto en todos los casos. Calle 4: vector pGEM-T sin inserto.

En los clones en los cuales se verificó la presencia de un inserto del tamaño esperado (821 pb) se realizó una preparación de ADN plasmídico, y la identidad de la construcción (pGEM-T-Easy/*bla*_{OXA-101}) fue confirmada por secuenciación. En la construcción seleccionada se realizó posteriormente la digestión del fragmento con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. Se procedió a la purificación del mismo a partir del gel y luego a la reacción de fosforilación del fragmento purificado. Posteriormente, se efectuó la ligación con el vector de expresión pET28a+ digerido con las mismas enzimas de restricción. Esta estrategia de clonado agrega una cola de histidinas (6xHis) en el extremo C-terminal a la proteína en estudio, permitiendo la posterior purificación por cromatografía de pseudoafinidad (Figura 4.3.14). Debido a que fue clonado el gen completo, que incluye la región codificante para péptido señal, se espera que los aminoácidos corriente arriba del sitio *Bam*HI que se añadirían sean eliminados cuando se produce el clivaje del péptido señal (Figura 4.3.15) al transformarse en proteína madura.

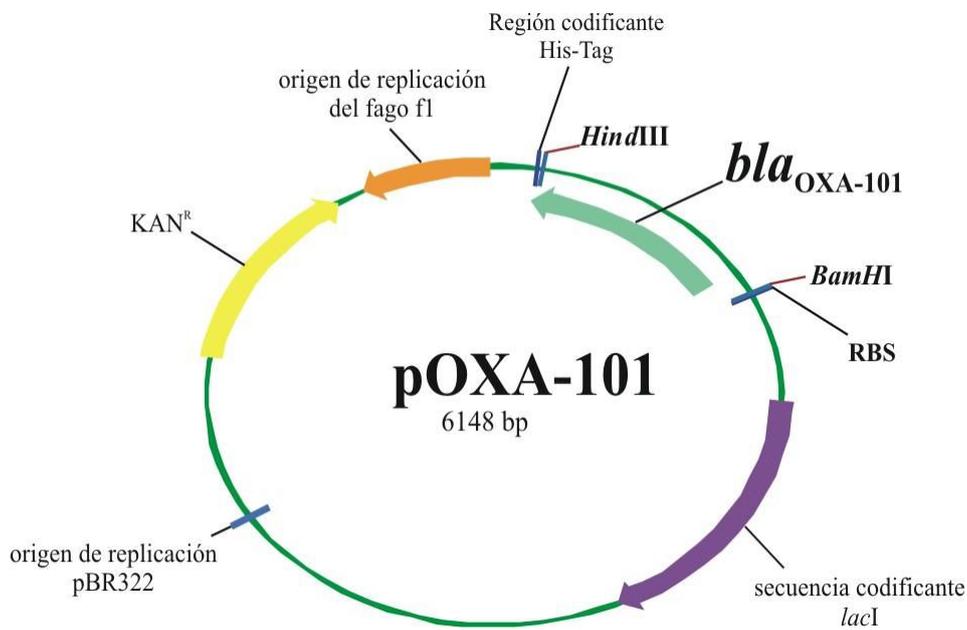


Figura 4.3.14. Esquema del clonado realizado en el vector pET28a+. KAN: gen que confiere resistencia a kanamicina, RBS: Sitio de unión a ribosoma.

```

1   MGSSHHHHHHH SSSLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSMKTFAA YVITACLSST
51  ALA[S]SITENT FWNKEFSAEA VNGVFVLCCKS SSKSCATNNL ARASKEYLPA
101 STFKIPNAII  GLETGVIKNE HQVFKWDGKP RAMKQWERDL SLRGAIQVSA
151 VPFVQQIARE VGEVRMOKYL KKFSYGNQNI SGGIDKFWLE GQLRISAVNQ
201 VEFLESFLN  KLSASKENQL IVKEALVTEA APEYLVHSKT GFSGVGTESN
251 PGVAWWVGWV EKGTEVYFFA FNMDIDNENK LPLRKS IPTK IMASEGIIGG
301 KLA[A]LEHHH HHH

```

MM: 34,51 kDa

```

1   SITENTFWNK EFSAEAVNGV FVLCKSSSKS CATNNLARAS KEYLPASTFK
51  IPNAII GLET GVIKNEHQVF KWDGKPRAMK QWERDLSLRG AIQVSAVPVF
101 QQIAREVGEV RMQKYLKKFS YGNQNISGGI DKFWLEGQLR ISAVNQVEFL
151 ESLFLNKLSA SKENQLIVKE ALVTEAAPEY LVHSKTGFSG VGTESNPGVA
201 WWVGWVEKGT EVYFFAFNMD IDNENKLPLR KSIPTKIMAS EGIIGGKLA[A]
251 ALEHHHHHHH

```

MM: 28,93

Figura 4.3.15. Secuencia aminoacídica teórica de la proteína recombinante resultante a partir de la construcción p28OXA-101. A) Proteína con péptido señal. B) Proteína resultante luego del clivaje del péptido señal. El sitio postulado para el mismo se encuentra resaltado en amarillo y subrayado. En rojo se indican los aminoácidos extras. En azul se indican las colas de histidinas N y C-terminal. Se indica la masa molecular (MM) teórica de la proteína.

La identidad de la construcción fue confirmada por secuenciación (Figura 4.3.16) y dicha construcción se transformó en cepas apropiadas de *E. coli* competentes para luego producir y purificar la enzima en estudio.

```

blaoXA-101      (1) 1-----RBS-----50
p28OXA-101      (1) ACTTTAAG[AAGGAG]ATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCA
51-----100
blaoXA-101      (1) -----
p28OXA-101      (51) CAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTG
101-----150
blaoXA-101      (1) -----ATGAAAACATTTGCCGCATATGTAATT
p28OXA-101      (101) GACAGCAAATGGGTGCGGGATCCATGAAAACATTTGCCGCATATGTAATT
151-----200
blaoXA-101      (28) ACTGCGTGTCTTTCAAGTACGGCATTAGCTAGTTCAATTACAGAAAATAC
p28OXA-101      (151) ACTGCGTGTCTTTCAAGTACGGCATTAGCTAGTTCAATTACAGAAAATAC
201-----250
blaoXA-101      (78) GTTTTGAACAAAGAGTTCTCTGCCGAAGCCGTCAATGGTGTTCGTGC
p28OXA-101      (201) GTTTTGAACAAAGAGTTCTCTGCCGAAGCCGTCAATGGTGTTCGTGC
251-----300
blaoXA-101      (128) TTTGTAAAAGTAGCAGTAAATCCTGCGCTACCAATAACTTAGCTCGTGCA
p28OXA-101      (251) TTTGTAAAAGTAGCAGTAAATCCTGCGCTACCAATAACTTAGCTCGTGCA
301-----350
blaoXA-101      (178) TCAAAGGAATATCTTCCAGCATCAACATTTAAGATCCCCAACGCAATTAT
p28OXA-101      (301) TCAAAGGAATATCTTCCAGCATCAACATTTAAGATCCCCAACGCAATTAT
351-----400
blaoXA-101      (228) CGGCCTAGAACTGGTGTCTATAAAGAATGAGCATCAGTTTTTCAAATGGG
p28OXA-101      (351) CGGCCTAGAACTGGTGTCTATAAAGAATGAGCATCAGTTTTTCAAATGGG

```

Sigue en página 162

		401		450
<i>bla</i> OXA-101	(278)	ACGGAAAGCCAAGAGCCATGAAACAATGGGAAAGAGACTTGAGCTTAAGA		
<i>p28OXA</i> -101	(401)	ACGGAAAGCCAAGAGCCATGAAACAATGGGAAAGAGACTTGAGCTTAAGA		
		451		500
<i>bla</i> OXA-101	(328)	GGGGCAATACAAGTTTCAGCGGTTCCCGTATTTCAACAAATCGCCAGAGA		
<i>p28OXA</i> -101	(451)	GGGGCAATACAAGTTTCAGCGGTTCCCGTATTTCAACAAATCGCCAGAGA		
		501		550
<i>bla</i> OXA-101	(378)	AGTTGGCGAAGTAAGAATGCAGAAATATCTTAAAAAATTTTCATATGGTA		
<i>p28OXA</i> -101	(501)	AGTTGGCGAAGTAAGAATGCAGAAATATCTTAAAAAATTTTCATATGGTA		
		551		600
<i>bla</i> OXA-101	(428)	ACCAGAATATCAGTGGTGGCATTGACAAATCTGGTTGGAGGGTCAGCTT		
<i>p28OXA</i> -101	(551)	ACCAGAATATCAGTGGTGGCATTGACAAATCTGGTTGGAGGGTCAGCTT		
		601		650
<i>bla</i> OXA-101	(478)	AGAATTTCCGCAGTTAATCAAGTGGAGTTTCTAGAGTCTCTATTTTTTAAA		
<i>p28OXA</i> -101	(601)	AGAATTTCCGCAGTTAATCAAGTGGAGTTTCTAGAGTCTCTATTTTTTAAA		
		651		700
<i>bla</i> OXA-101	(528)	TAAATTGTCAGCATCAAAAGAAAATCAGCTAATAGTAAAAGAGGCTTTGG		
<i>p28OXA</i> -101	(651)	TAAATTGTCAGCATCAAAAGAAAATCAGCTAATAGTAAAAGAGGCTTTGG		
		701		750
<i>bla</i> OXA-101	(578)	TAACGGAGGCTGCGCCTGAATATCTTGTGCATTCAAAAACCTGGTTTTTCT		
<i>p28OXA</i> -101	(701)	TAACGGAGGCTGCGCCTGAATATCTTGTGCATTCAAAAACCTGGTTTTTCT		
		751		800
<i>bla</i> OXA-101	(628)	GGTGTGGGAACTGAGTCAAATCCTGGTGTGCGCATGGTGGGTTGGTTGGGT		
<i>p28OXA</i> -101	(751)	GGTGTGGGAACTGAGTCAAATCCTGGTGTGCGCATGGTGGGTTGGTTGGGT		
		801		850
<i>bla</i> OXA-101	(678)	TGAGAAGGGAACAGAGGTTTACTTTTTTCGCCTTTAACATGGATATAGACA		
<i>p28OXA</i> -101	(801)	TGAGAAGGGAACAGAGGTTTACTTTTTTCGCCTTTAACATGGATATAGACA		
		851		900
<i>bla</i> OXA-101	(728)	ACGAAAATAAGTTGCCGCTAAGAAAATCCATTCCCACCAAATCATGGCA		
<i>p28OXA</i> -101	(851)	ACGAAAATAAGTTGCCGCTAAGAAAATCCATTCCCACCAAATCATGGCA		
		901		950
<i>bla</i> OXA-101	(778)	AGTGAGGGCATCATTGGTGGCTAA-----		
<i>p28OXA</i> -101	(901)	AGTGAGGGCATCATTGGTGGCAAGCTTGC GGCCGCACTCGAG CACCACCA		
		951	966	His-tag
<i>bla</i> OXA-101	(802)	-----		
<i>p28OXA</i> -101	(951)	CCACCACCAC TGAGAT		

*

Figura 4.3.16: Alineamiento de secuencias. *bla*_{OXA-101} es la secuencia depositada en base de datos (Nº acceso: AM412777.1). *p28OXA-101* es la secuencia obtenida como resultado de la secuenciación de esa construcción. RBS: sitio de unión a ribosoma. His-tag: secuencia codificante para 6 histidinas. *: codón de terminación.

Con las construcciones obtenidas se transformaron células de *E. coli* Top 10 (F') competentes y se realizó la selección de colonias transformantes en medio LBA suplementado con KAN (30 µg/ml). La presencia de transformantes conteniendo el plásmido recombinante se confirmó mediante extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina o con kits comerciales y digestión con enzimas de restricción (Figura 4.3.17).

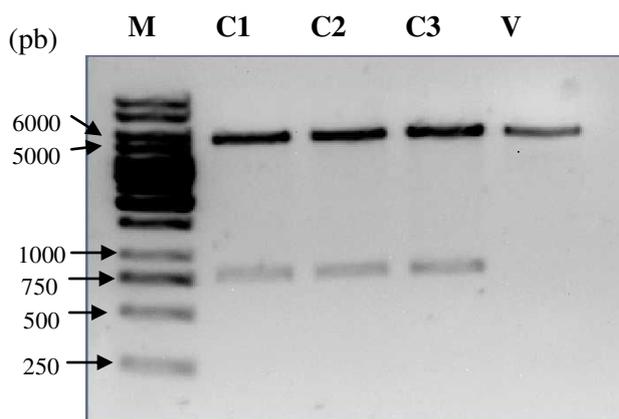


Figura 4.3.17: Digestión de los plásmidos recombinantes seleccionados (C1-3, distintos clones) con las enzimas *Bam*HI e *Hind*III y liberación del inserto clonado (*bla*_{OXA-101}). Como control de la digestión se incluyó al vector *pET28a+* sin inserto (V). Marcador: 1 kb DNA ladder (Fermentas)

4.3.7. Expresión de OXA-101 recombinante.

Se ensayaron diferentes condiciones de inducción de expresión de la proteína. Se optimizaron los medios de cultivo utilizados, temperatura de inducción, concentración de IPTG y célula receptora de expresión (Tabla 4.3.7). Para realizar estos experimentos se utilizaron 10-50 ml de medio de cultivo para probar la inducción de la proteína en estudio.

Tabla 4.3.7. Condiciones de inducción ensayadas.

Células de expresión	BL21 (DE3)*			BL21 (DE3) pLysS		MP101	
Medio de cultivo	LB*	TB	2XYT	LB	TB	LB	TB
IPTG (μM)	0,5 1*	0,5 1	0,5 1	0,5 1	0,5 1	0,5 1	0,5 1
T (°C)	28*-37	28-37	28-37	28-37	28-37	28-37	28-37

* Condiciones óptimas de expresión.

Se tomaron alícuotas a las 2, 3 y 5 hs post inducción y, luego de ser tratadas con *buffer* muestra 4x, fueron sembradas en geles SDS-PAGE al 15% para visualizar sobreexpresión de la enzima de interés, de masa molecular teórica 28,9 kDa. Además, se evaluó la actividad β-lactamasa de las alícuotas utilizando la cefalosporina cromogénica Nitrocefin® como sustrato hidrolizable, corroborándose su presencia por el cambio de color de la solución.

Finalmente, la inducción de la expresión de la proteína para posterior purificación fue realizada en las condiciones en las que se observó sobreexpresión de la proteína con la masa molecular esperada en geles SDS-PAGE (Figura 4.3.18) y rápida hidrólisis de nitrocefin respecto del control negativo (células transformadas con pET28a+ sin inserto). Se realizó una dilución 1/100 en 1 L de medio LB suplementado con KAN (30 $\mu\text{g/ml}$) a un cultivo saturado de BL21 (DE3)/pOXA-101. Se incubó en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una $\text{DO}_{600}=0,5-0,6$; y se agregó IPTG a una concentración final 1mM. Luego, se incubó a 28°C a una velocidad de agitación de 200 rpm durante 5 hs. Transcurrido este tiempo, las células se cosecharon y se almacenaron a -20°C para su posterior tratamiento.

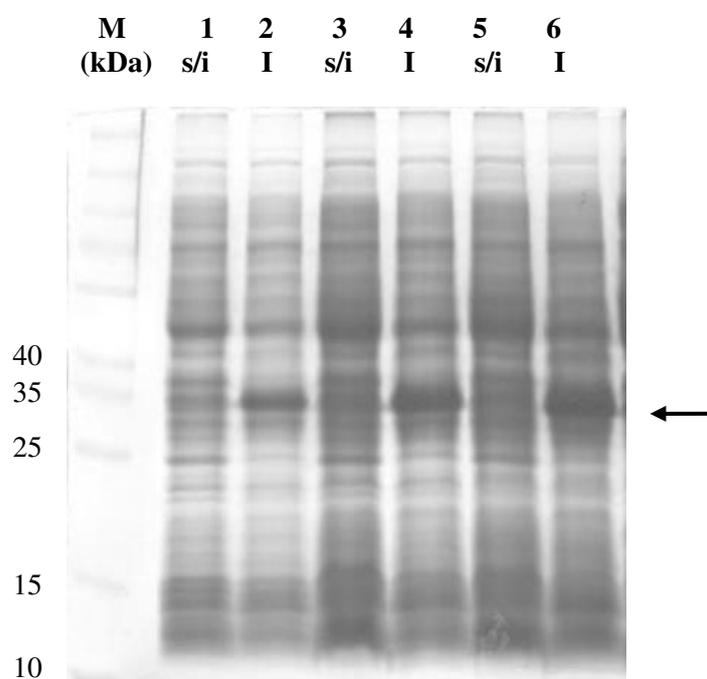


Figura 4.3.18. SDS-PAGE 15%. M: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas), Calles 1 y 2- 2 hs post inducción, Calles 3 y 4- 3 hs post inducción, Calles 5 y 6- 5 hs post inducción. s/i: cultivo sin inducir; I: cultivo inducido. La flecha señala la proteína sobreexpresada.

4.3.8. Purificación de la proteína de interés.

El extracto crudo se purificó en primer lugar por cromatografía de intercambio catiónico. El *pellet* celular fue resuspendido en 60 ml de *buffer* A y luego se realizó la ruptura celular por ultrasonido. Luego de dializar la muestra frente a *buffer* A y filtrar la misma, se realizó la purificación en la columna de 5 ml de resina. En la figura 4.3.19 se

observa el cromatograma obtenido luego de la purificación. Las distintas fracciones de elución se analizaron por SDS-PAGE al 15% y ensayos de actividad β -lactamasa con Nitrocefín®, y se observó que la proteína eluyó mayoritariamente al alcanzar el 20% de mezcla con *buffer* B (Figura 4.3.20, calle 6 y 7).

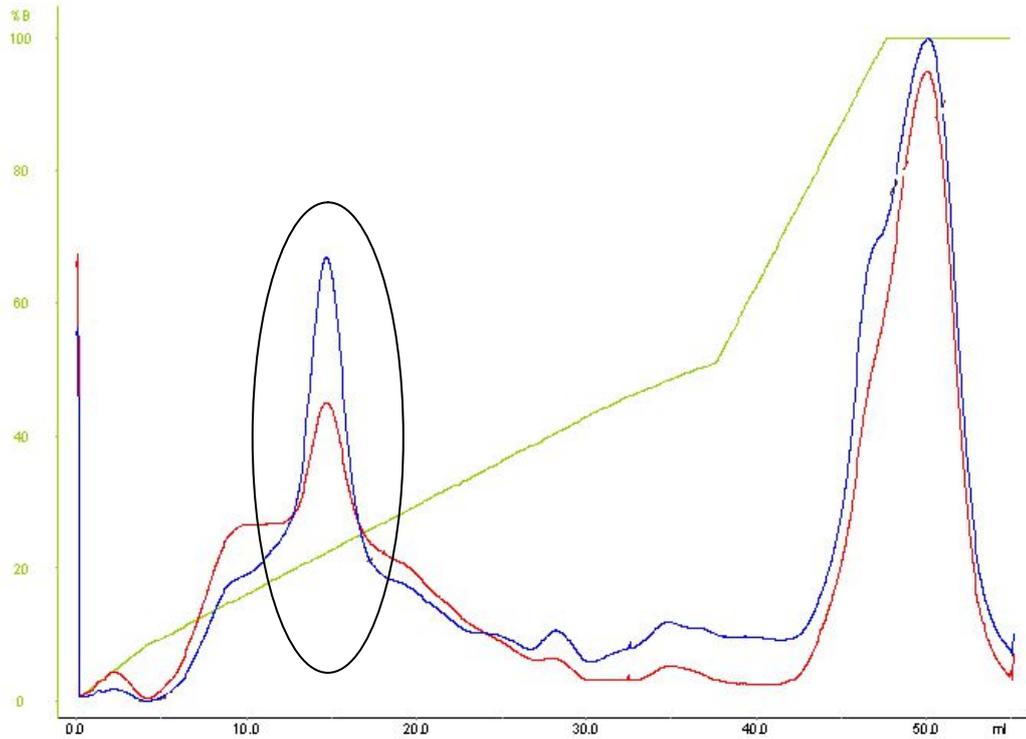


Figura 4.3.19. Cromatograma obtenido de la purificación del extracto mediante intercambio catiónico HiTrap SP-HP. Se muestra el perfil de elución, en el que se señala el pico que presentó la proteína de fusión. En azul: Lectura $\lambda=280$ nm, en rojo: Lectura $\lambda=254$ nm, en verde: gradiente de *buffer* B.

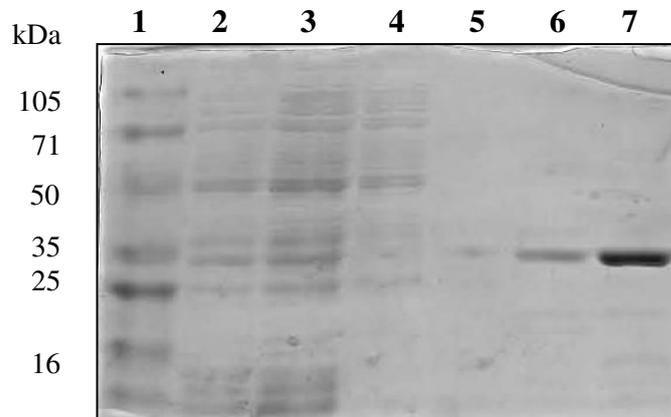


Figura 4.3.20. SDS-PAGE 15%. Calle 1: Prestained Mid Range ladder (Genbiotech). Calle 2: extracto crudo. Calle 3: extracto crudo post diálisis. Calle 4: fracción no retenida. Calles 5-7: elución con *buffer* B.

Posteriormente, con el fin de obtener la proteína con un mayor grado de pureza, las fracciones en las que se detectó la proteína de interés fueron dializadas frente a *buffer C* y se purificó por IMAC utilizando una columna con 1 ml de resina. El cromatograma correspondiente se muestra en la figura 4.3.21. Luego de analizar los picos de elución obtenidos se concluyó que la proteína eluyó principalmente entre el 70-85% de mezcla con *buffer D*. Para eliminar las sales y el imidazol de la fracción purificada se procedió a dializar la misma frente a *buffer* fosfato 50 mM pH 7,4. La pureza de la enzima fue estimada por SDS-PAGE y se la consideró del 100%. (Figura 4.3.22).

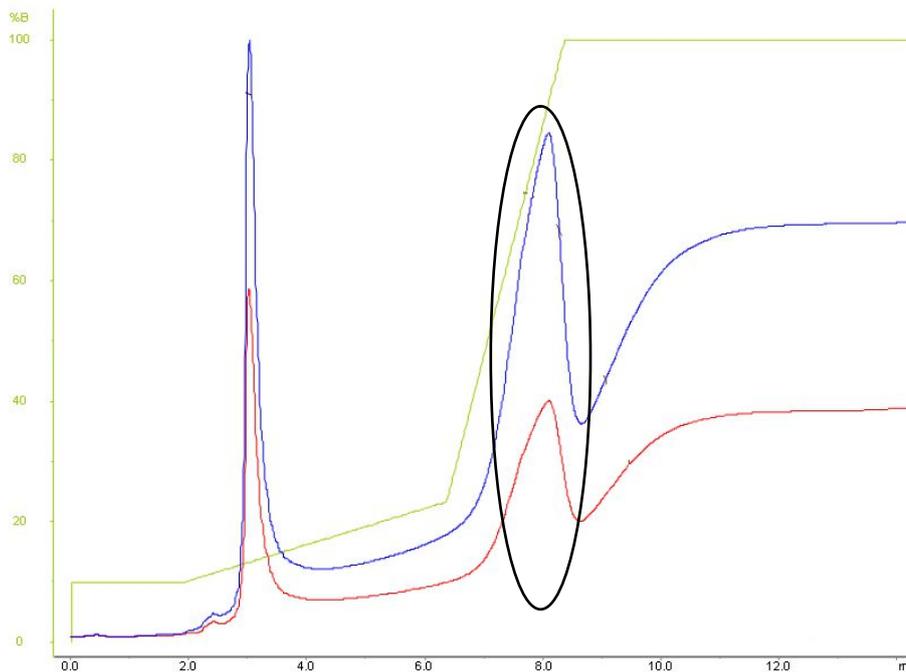


Figura 4.3.21. Cromatograma obtenido de la purificación del extracto mediante IMAC HisTrap HP. Se muestra el perfil de elución, en el que se señala el pico que presentó la proteína de fusión. En azul: Lectura $\lambda=280$ nm, en rojo: Lectura $\lambda=254$ nm, en verde: gradiente de *buffer B*.

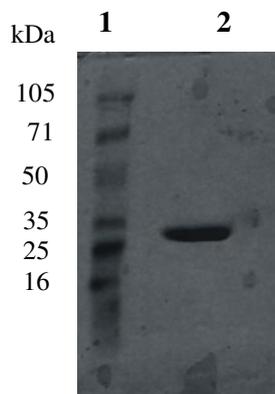


Figura 4.3.22. Fracción purificada post diálisis. SDS-PAGE 15%. Calle 1: Prestained Mid Range ladder (Genbiotech). Calle 2: proteína OXA-101 purificada.

Para realizar la cuantificación de la proteína purificada se utilizó el método del ácido bicinónico. La concentración de la proteína pura recuperada fue de 55,5 µg/ml.

4.3.9. Determinación de masa molecular de OXA-101.

Para estimar la masa molecular de la enzima se realizaron geles SDS-PAGE con los extractos crudos de ECL153 y transconjugantes, posteriormente la enzima fue re-naturalizada y se reveló su presencia con método iodométrico. Se observó que la masa molecular de OXA-101 sería de aproximadamente 29 kDa.

En paralelo, se realizó la determinación de la masa molecular de OXA-101 utilizando la proteína purificada mediante ionización “electrospray” (Espectrometría de masa con ionización), en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO), perteneciente a la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Se determinó que la masa molecular de la proteína recombinante es de 29,028 kDa, en concordancia con el experimento anteriormente realizado (Figura 4.3.23).

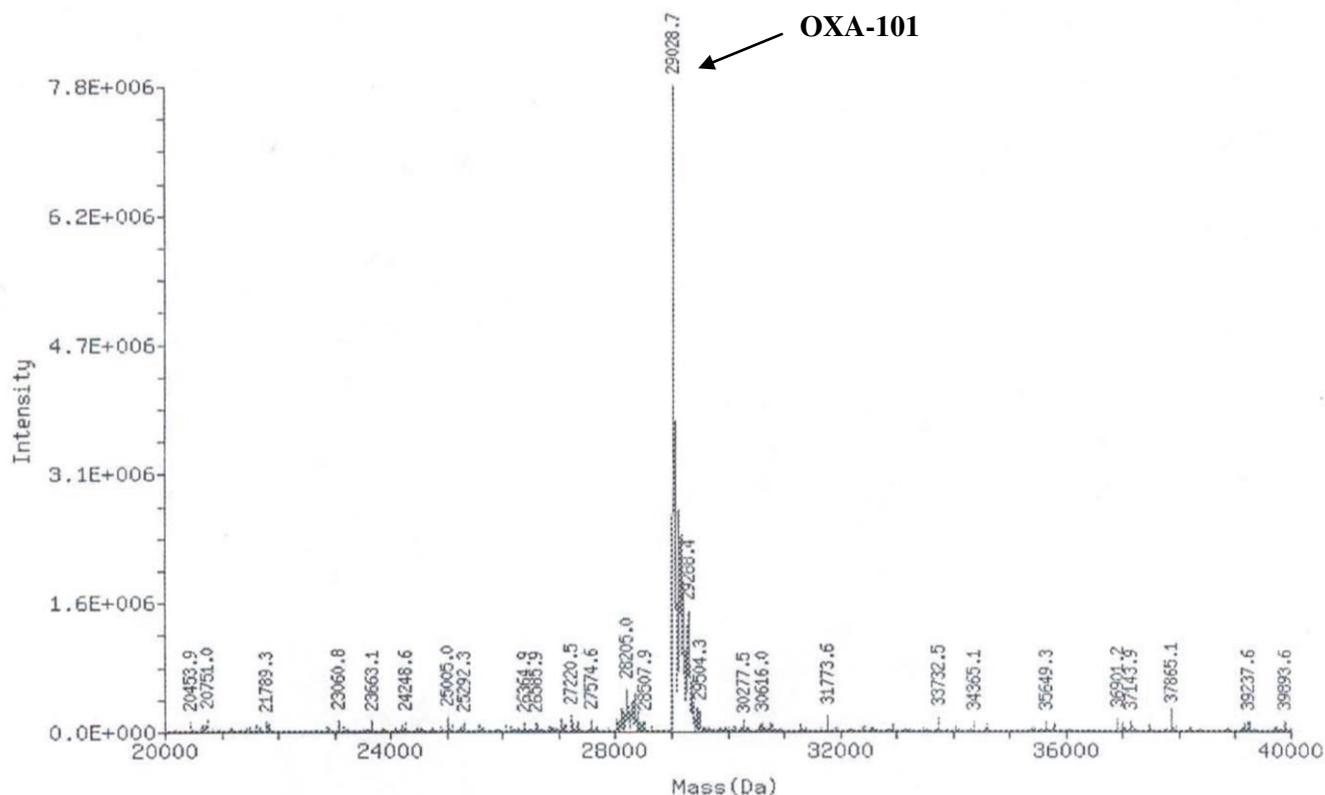


Figura 4.3.23. Espectro de la proteína purificada OXA-101 obtenido mediante espectrometría de masa con ionización. La señal con mayor intensidad corresponde a OXA-101.

El valor de masa molecular obtenido para OXA-101 con los métodos experimentales utilizados concuerda con lo esperado de acuerdo a lo calculado *in silico* para la secuencia aminoacídica teórica de la proteína recombinante madura (sin péptido señal-28,93 kDa) (Figura 4.3.15). Además, este resultado confirmaría que la enzima OXA-101 posee los cambios aminoacídicos respecto de OXA-10 y enzimas derivadas deducidos a partir de la secuencia nucleotídica.

4.3.10. Medida de la actividad enzimática.

Como primera aproximación a la caracterización cinética de OXA-101 fueron determinados los parámetros cinéticos de OXA-101 para el β -lactámico oxacilina. En la siguiente tabla se presenta el peso molecular (MM), su constante de absorción molar (ϵ_M^λ), y la longitud de onda (λ) a la cual absorbe el compuesto que fue utilizado en el ensayo.

MM	ϵ_M^λ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	$\Delta\epsilon_M^\lambda$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ (nm)
400	+1280	+400	260

Para caracterizar el comportamiento bioquímico de OXA-101 frente a oxacilina se determinaron los parámetros K_m y k_{cat} . Resumidamente, k_{cat} (conocida como constante catalítica) representa el número de recambio de la enzima, es decir, el número máximo de moléculas de sustrato convertidas a producto, por sitio activo por unidad de tiempo. La constante de Michaelis, K_m , es la concentración de sustrato a la cual la mitad de los sitios activos están ocupados y es una medida de la estabilidad del complejo ES (enzima sustrato), una K_m alta indica unión débil y un valor de K_m bajo indica unión fuerte. El cociente k_{cat}/K_m es una constante referida a las propiedades y reacciones de enzima y sustrato libres, y es un reflejo de la eficiencia hidrolítica de la enzima frente a un determinado sustrato.

Como puede observarse en la tabla 4.3.8, la eficiencia de hidrólisis para el mismo sustrato (oxacilina) varía ampliamente entre las diferentes enzimas tipo OXA. OXA-101 demostró tener poca afinidad por oxacilina (K_m : 1179 μM), así como también una baja eficiencia de hidrólisis (debido a su bajo k_{cat}/K_m) para este sustrato. Si bien OXA-35 posee un alto porcentaje de similitud de secuencia aminoacídica con OXA-101 (99,6%) (http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html) (Figura 4.3.6) los parámetros cinéticos son muy disímiles, al igual que frente a OXA-10 (ambas enzimas tienen alta afinidad por oxacilina). Esta enzima posee una eficiencia de hidrólisis del sustrato oxacilina similar a OXA-16 y OXA-17, aunque el porcentaje de identidad aminoacídica con OXA-101 para ambas sea 96,1%, menor que para OXA-35 (Figura 4.3.6). Además, OXA-16 presenta una constante de afinidad y k_{cat} equivalente a OXA-101 frente a oxacilina (K_m : 960 μM).

Tabla 4.3.8. Constantes cinéticas determinadas para oxacilina.

OXA-101			OXA-10 (V_{max}) ¹			OXA-35 ²			OXA-17 ³			OXA-16 ¹		
k_{cat} ^{*1}	K_m ^{*2}	k_{cat}/K_m ^{*3}	k_{cat} ^{*1}	K_m ^{*2}	k_{cat}/K_m ^{*3}	k_{cat} ^{*1}	K_m ^{*2}	k_{cat}/K_m ^{*3}	k_{cat} ^{*1}	K_m ^{*2}	k_{cat}/K_m ^{*3}	k_{cat} ^{*1}	K_m ^{*2}	k_{cat}/K_m ^{*3}
389	1179	0,33	608	222	2,739	95	50	1900	120	153	0,78	411	960	0,43

¹Danel y col. (1998), ²Hoquet y col. (2011), ³Danel y col. (1999). ^{*1}- k_{cat} : s^{-1} , ^{*2}- K_m : μM , ^{*3}- k_{cat}/K_m : $(\mu\text{M}\cdot\text{s})^{-1}$

Con el fin de realizar una caracterización bioquímica completa de esta enzima sería interesante realizar estudios cinéticos frente a múltiples antibacterianos β -lactámicos.

Los estudios efectuados en combinación con el análisis *in-silico* y la caracterización bioquímica parcial realizada hasta el momento permiten especular con que OXA-101 sería una β -lactamasa clase D plasmídica, localizada como gen en casete dentro de un integrón clase 1 localizado en un plásmido conjugativo, e involucrada principalmente en la resistencia a β -lactámicos de tipo amino y ureidopenicilinas (AMP y PIP) en aislamientos clínicos de distintas especies de enterobacterias.

5. Conclusiones

Conclusiones

Durante este trabajo de tesis se ha estudiado la presencia de integrones clase 1 inusuales en aislamientos clínicos de enterobacterias, su caracterización molecular y genes de resistencia a quinolonas y β -lactámicos asociados. Además, se realizó el clonado, expresión y purificación de las proteínas Orf513 y OXA-101. Posteriormente, se efectuaron ensayos tendientes a caracterizar bioquímicamente a ambas proteínas.

Los resultados obtenidos han enriquecido y ampliado los conocimientos sobre el tema. La mayor parte de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo han sido presentados en congresos y revistas nacionales e internacionales, lo cual avala la relevancia de estos hallazgos.

A continuación se detallan las conclusiones más notables de este trabajo, organizadas sobre el esquema de los objetivos planteados inicialmente:

Acerca de integrones clase 1

Al investigar la presencia de integrones clase 1 inusuales en aislamientos clínicos de enterobacterias se observó que de las 90 enterobacterias del relevamiento R1 (Hospital J.M. Cullen, todas las enterobacterias recuperadas en 1 mes) el 4,5% (n=4) presentó integrones inusuales, y de las 34 enterobacterias del relevamiento R2 (Sanatorio Diagnóstico, incluye a las enterobacterias con resistencia simultánea a fluoroquinolonas y a una o más oximino-cefalosporinas (CAZ, CTX y CRO) aisladas durante 7 meses), el 36% (n=12).

Se realizó la extracción de ADN plasmídico de las bacterias portadoras de integrones clase 1 inusuales, y posteriormente se amplificaron por PCR las regiones 5'CS y 3'CS, las cuales fueron detectadas en todos los aislamientos.

Conjuntamente, se estudió la presencia de determinantes de resistencia a quinolonas *qnr* y β -lactamasas de espectro extendido *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{PER-2}. Se detectó el gen *qnrB* en 7/16 aislamientos con integrones inusuales. La mayoría (12/16) de estos aislamientos presentó una BLEE (CTX-M2 o PER-2) asociada, las cuales fueron detectadas fenotípica y molecularmente.

Al azar fueron seleccionados 9 aislamientos con el objeto de analizar en profundidad los genes asociados a la segunda región variable presente los integrones inusuales. Fueron detectados 3 tipos de estructuras, los genes asociados a cada una fueron diferentes: uno de determinantes de resistencia a quinolonas (*qnrB10*), otro de resistencia a β -lactámicos (*bla_{CTX-M-2}*) y por último, resistencia a cloranfenicol (*catA2*). Las primeras dos estructuras han sido detectadas previamente en nuestro país, sin embargo, no existen reportes locales de la asociación de *catA2* a *ISCR1*, con lo cual esta es su primera descripción en Argentina.

Si bien hay reportes de caracterización de integrones clase 1 inusuales realizados en nuestro país, este estudio es el primero en analizar y caracterizar estos elementos en los aislamientos de enterobacterias de la ciudad de Santa Fe.

Acerca de ISCR1

Luego de diseñar diferentes estrategias de clonado e inducción de la sobre-expresión de la proteína Orf513 pudo obtenerse un extracto parcialmente purificado que contenía la proteína deseada (las proteínas co-purificadas no poseían capacidad de unir ADN).

Fueron realizados diversos experimentos en geles de agarosa y poliacrilamida con el fin de optimizar los ensayos de interacción y detección del retardo frente a diferentes fragmentos de ADN. Se utilizaron las secuencias correspondientes al origen de replicación *oriIS* y terminador *terIS* detectados en elementos de la familia de *IS91* (*IS91*, *IS1294* e *ISCR1*) y regiones flanqueantes a *ISCR1*. Del análisis de los resultados de los ensayos de retardo de movilidad del ADN se desprenden fuertes indicios de que Orf513 interacciona con las secuencias de ADN ensayadas, en especial con *oriISCR1* y secuencias adyacentes.

Nuevas estrategias de purificación del extracto proteico post inducción deberían ser desarrolladas, para realizar ensayos de interacción con la proteína ORF513 pura que confirmen la actividad detectada.

Acerca de bla_{OXA-101}

En tres aislamientos de enterobacterias multiresistentes (*Citrobacter freundii* 14 -CF14-, *Escherichia coli* 112 -EC112- y *Enterobacter cloacae* 153 -ECL153-) se detectó un nuevo gen en casete codificante para una β -lactamasa (*bla_{OXA-101}*) localizado en la región variable de un integrón clase 1.

Se determinó que este elemento genético que contiene el gen *bla*_{OXA-101} se encuentra localizado en un plásmido conjugativo. Sólo un aumento de los niveles de resistencia a ampicilina y piperacilina fue observado en las transconjugantes respecto de la célula receptora, lo cual podría deberse a un entorno genético no favorable para la expresión de esta enzima. Mediante isoelectroenfoque analítico se determinó el punto isoeléctrico de esta β -lactamasa, el cual fue 7,2.

Luego se realizó el clonado molecular del gen codificante para OXA-101, sobre-expresión y posterior purificación mediante IMAC. Con la proteína purificada se analizó la masa molecular de la enzima mediante 2 técnicas (geles SDS-PAGE, posterior re-naturalización y revelado con método iodométrico; y espectrometría de masa), con ambas se observó que la masa molecular de OXA-101 es de 29 KDa. Se determinaron los parámetros cinéticos de OXA-101 para oxacilina. En las condiciones ensayadas, esta enzima tiene baja afinidad por este sustrato, además de una baja de eficiencia de hidrólisis del mismo.

En el futuro, con el fin de completar la caracterización bioquímica de OXA-101 y evaluar su verdadero rol en la resistencia a antibacterianos β -lactámicos, deberían realizarse ensayos de actividad de hidrólisis frente a diferentes antibacterianos β -lactámicos para así determinar los parámetros cinéticos propios de cada uno.

6. Bibliografía

Bibliografía

Almuzara, M.; Radice, M.; de Garate, N.; Kossman, A.; Cuirolo, A.; Santella, G.; Famiglietti, A.; Gutkind, G. y Vay, V. (2007) *VIM-2-producing Pseudomonas putida*, Buenos Aires. *Emerg Infect Dis*; 13: 668-9.

Amabile-Cuevas, C. F. y Chicurel, M. E. (1992) *Bacterial plasmids and gene flux*. *Cell*. 70: 189-99.

Ambler, R. P. (1980) *The structure of β -lactamases*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*. 289: 321-331.

Andersson, D. I. y Hughes, D. (2010) *Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?* *Nature Rev. Microbiol*. 8: 260-271.

Andrés, P.; Soler Bistué, A.; Guerriero, L.; Lucero, C.; Ceriana, P.; Zorreguieta, A.; Corso, A.; Petroni, A. *Plasmid Mediated Quinolone Resistance Mechanisms (PMQRs) in Clinical Enterobacteria from Argentina: A View from the Microbiological Practice*. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco, USA. 12 al 15 de Septiembre de 2009.

Arduino, S. M.; Catalano, M.; Orman, B. E.; Roy, P. H.; Centrón, D. (2003) *Molecular epidemiology of orf513-bearing class 1 integrons in multiresistant clinical isolates from Argentinean hospitals*. *Antimicrob Agents Chemother*. 47: 3945-9.

Arduino, S. M.; Roy, P. H., Jacoby, G. A.; Orman, B. E.; Pineiro, S. A. y Centrón, D. (2002) *bla_{CTX-M-2} is located in an unusual class 1 integron (In35) wich includes orf513*. *Antimicrob Agents Chemother*. 46: 2303-6.

Aubert, D.; Poirel, L.; Ali, A. B.; Goldstein, F. W. y Nordmann., P. J. (2001b) *OXA-35 is an OXA-10-related beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Chemother*.48: 717-721.

Aubert, D.; Poirel, L.; Chevalier, J.; Leotard, S.; Pages, J. M. y Nordmann, P. (2001a) *Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 45(6):1615-20.

- Bado, I.; Cordeiro, N.F.; Robino, L.; García-Fulgueirasa, V.; Seija, V.; Bazet, C.; Gutkind, G.; Ayala, J.A. y Vignoli, R. (2010) *Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum β -lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients*. Int. J. Antimicrob. Agents. 36: 453–8.
- Ball, P. (2000) *Quinolone generations: natural history or natural selection?* J. Antimicrob. Chemother. 46 (suppl. T1): 17-24.
- Barbolla, R.; Catalano, M.; Orman, B. E.; Famiglietti, A.; Vay, C.; Smayevsky, J.; Centrón, D. y Piñeiro, S.A. (2004) *Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates*. Antimicrob Agents Chemother. 48: 666-9.
- Bauernfeind, A.; Grimm, H. y Schweighart, S. (1990) *A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli**. Infection. 18:294-8.
- Bauernfeind, A.; Stemplinger, I.; Jungwirth, R.; Ernst, S. y Casellas, J. M. (1996b) *Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other betalactamases*. Antimicrob Agents Chemother. 40:509-513.
- Bauernfeind, A.; Stemplinger, I.; Jungwirth, R.; Mangold, P.; Amann, S.; Akalin, E.; Anđ, O.; Bal, C. y Casellas, J.M. (1996a) *Characterization of β -lactamase gene bla_{PER-2}, which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase*. Antimicrob Agents Chemother. 40: 616–20.
- Bennet, P.M. (1999) *Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria*. J Antimicrob Chemother. 43: 1-4.
- Bennet, P.M. (2001) *The bacterial genome: the mobility of genetic material*. En: *Molecular medical microbiology* (Ed.: M. Sussman). Academic Press, San Diego, California, p: 401-417.
- Bennet, P.M. (2008) *Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria*. Br. J. Pharmacol. 153: S347-S357.
- Bernales, I.; Mendiola, M.V. y de la Cruz, F. (1999) *Intramolecular transposition of insertion sequence IS91 results in second-site simple insertions*. Mol. Microbiol. 33(2):223-34.

- Bertona, E.; Radice, M.; Rodríguez, C.H.; Barberis, C.; Vay, C.; Famiglietti A. y Gutkind G. (2005) *Phenotypic and genotypic characterization of resistance to third-generation cephalosporins in Enterobacter spp.* Rev. Argent. Microbiol. 37(4):203-8.
- Bissonnette, L. y Roy, P.H. (1992) *Characterization of In0 of Pseudomonas aeruginosa plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria.* J. Bacteriol. 174: 1248-57.
- Bojorquez, D.; Belei, M.; Delira, S.F.; Sholly, S.; Mead, J. y Tolmasky, M.E. (1998) *Characterization of OXA-9, a beta-lactamase encoded by the multiresistance transposon Tn1331.* Cell. Mol. Biol. (Noisy-le grand). 44: 483-91.
- Bönemann, G.; Stiens, M.; Pühler, A. y Schlüter, A. (2006) *Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, qnrS2, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant.* Antimicrob. Agents Chemother. 50(9):3075-80.
- Boyd, D.A. y Mulvey, M. R. J. (2006) *OXA-1 is OXA-30 is OXA-1.* Antimicrob. Chemother. 2006, 58, 224-225.
- Bradford, M.M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Brenner, D. J. (1984) Section 5. *Facultatively anaerobic Gram-negative rods.* En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Eds.: Krieg, N. R. y Holt, J. G.). Williams & Wilkins, Baltimore, Estados Unidos de Norteamérica, vol 1, p. 408-423.
- Brigante, G.; Luzzaro, F.; Perilli, M.; Lombardi, G.; Coli, A.; Rossolini, G. M.; Amicosante, G. y Toniolo, A. (2005) *Evolution of CTX-M-type β -lactamases in isolates of Escherichia coli infecting hospital and community patients.* Int. J. Antimicrob. Agents 25:157-62.
- Brown, H.J.; Stokes, H.W. y Hall, R.M. (1996) *The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives.* J. Bacteriol. 178: 4429-37.
- Bush, K. (1989) *Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'.* Antimicrob. Agents Chemother. 33(3): 264–270.

Bush, K. y Jacoby, G.A. (2010) *Updated functional classification of β -lactamases*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 969-976.

Bush, K.; Jacoby, G.A. y Medeiros, A.A. (1995) *A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1211-1233.

Carvalho, A. P.; Albano, R.M.; de Oliveira, D.N.; Cidade, D.A.; Teixeira, L.M. y Marques Ede, A. (2006) *Characterization of an epidemic carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil*. *Microb. Drug Resist.* 12: 103-8.

Cattoir, V. y Nordmann, P. (2009) *Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update*. *Curr. Med. Chem.* 16: 1028–1046.

Cattoir, V.; Poirel, L. y Nordmann, P. (2007a) *Plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrB4 identified in France in an Enterobacter cloacae clinical isolate coexpressing a QnrS1 determinant*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 2652–2653.

Cattoir, V.; Poirel, L.; Mazel, D.; Soussy, C. J. y Nordmann, P. (2007b). *Vibrio splendidus as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 2650–2651.

Cattoir, V.; Poirel, L.; Rotimi, V.; Soussy, C. y Patrice Nordmann, P. (2007c) *Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates*. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 394-397.

Cattoir, V.; Weill, F.; Poirel, L.; Fabre, L.; Soussy, C.J. y Nordmann, P. (2007d) *Prevalence of qnr genes in Salmonella in France*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 751–754.

Cattoir, V.; Nordmann, P.; Silva-Sanchez, J.; Espinal, P.; y Poirel, L. (2008a) *ISEcp1-mediated transposition of qnrB-like gene in Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2929–2932.

Cattoir, V.; Poirel, L.; Aubert, C.; Soussy, C.J. y Nordmann, P. (2008b) *Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental Aeromonas spp.* *Emerging Infect. Dis.* 14, 231–237.

Cavaco, L.M.; Hasman, H.; Xia, S. y Aarestrup, F.M. (2009) *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enteric serovars Kentucky and Bovismorbificans* of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:603–608.

Celenza, G.; Pellegrini, C.; Caccamo, M.; Segatore, B.; Amicosante, G. y Perilli, M. (2006) *Spread of bla_{CTX-M-type} and bla_{PER-2} β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals.* *J. Antimicrob. Chemother.* 57(5):975-8.

Centrón, D. y Roy, P.H. (1998) *Characterization of the 6'-Naminoglycoside acetyltransferase gene aac(6')-Iq from the integron of a natural multiresistance plasmid.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1506-8.

Chen, Y.T.; Shu, H.Y.; Li, L.H.; Liao, T.L.; Wu, K.M.; Shiau, Y.R.; Yan, J.J.; Su, I.J.; Tsai, S.F. y Lauderdale, T.L. (2006) *Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum-beta-lactamase activity in a clinical Klebsiella pneumoniae isolate.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(11):3861-6.

Chmelnitsky, I.; Navon-Venezia, S.; Strahilevitz, J. y Carmeli, Y. (2008) *Plasmid-mediated qnrB2 and carbapenemase gene bla_{KPC-2} carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible Enterobacter cloacae isolates.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2962–2965.

Chowdhury, P.R.; Ingold, A., Vanegas, N.; Martínez, E.; Merlino, J.; Merkier, A.K.; Castro, M.; González Rocha, G.; Borthagaray, G.; Centrón, D.; Bello Toledo, H.; Márquez, C.M. y Stokes, H.W. (2011). *Mechanisms of Resistance: Dissemination of Multiple Drug Resistance Genes by Class I Integrons in Klebsiella pneumoniae Isolates from Four Countries: a Comparative Study.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3140-3149.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2010) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement M100-S20.* Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA.

Cohen, N.; Chang, A.C.Y. y Hsu, L. (1972) *Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 2110-4.

Collis, C.M. y Hall, R.M. (1992) *Genes cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles*. Mol. Microbiol. 6: 2875-85.

Collis, C.M. y Hall, R.M. (1995) *Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons*. Antimicrob Agents Chemother. 39: 155-62.

Collis, M.C.; Recchia, G.D.; Mi-Jurung, K.; Stokes, H.W. y Hall, R.M. (2001). *Efficiency of Recombination Reactions Catalyzed by Class 1 Integron Integrase IntI1*. J. Bacteriol. 183:2535-2542.

Cuirolo, A.; Almuzara, M.; Radice, M. y Gutkind, G. *Molecular characterization of IMP-13 producing Pseudomonas aeruginosa*. 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, California, Estados Unidos de Norteamérica, 27 a 30 de Septiembre de 2006, p. 109.

Da Re, S.; Garnier, F.; Guérin, E.; Campoy, S.; Denis, F. y Ploy, M. (2009) *The SOS response promotes qnrB quinolone-resistance determinant expression*. EMBO Rep. 10(8): 929–933.

Dale, J.W. (1971) *Characterization of the β -lactamase specified by the resistance factor R-1818 in E. coli K12 and other Gram-negative bacteria*. Biochem. J. 123(4):501-5.

Danel, F.; Frere, J.M. y Livermore, D.M. (2001a) *Evidence of dimerisation among class D beta-lactamases: kinetics of OXA-14 beta-lactamase*. Biochem. Biophys. Acta. 1546: 132–142.

Danel, F.; Hall, L.M.; Duke, B.; Gur, D. y Livermore, D.M. (1999) *OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1362-1366.

Danel, F.; Hall, L.M.; Gur, D. y Livermore, D.M. (1998) *OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -Lactamase, from two Pseudomonas aeruginosa isolates*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 3117-3122.

Danel, F.; Hall, L.M.; Gur, D.; Akalin, H.E. y Livermore, D.M. (1995) *Transferable production of PER-1 β -lactamase in Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 35: 281–294.

Danel, F.; Paetzel, M.; Strynadka, N.C. y Page, M.G. (2001b) *Effect of divalent metal cations on the dimerization of OXA-10 and -14 class D beta-lactamases from Pseudomonas aeruginosa*. Biochemistry. 40: 9412–9420.

Di Conza, J. y Gutkind, G. (2010) *Integrases: los coleccionistas de genes*. Rev. Argentina Microbiol. 42: 63-78.

Di Conza, J.; Ayala, J.; Porto, A.; Mollerach, M. y Gutkind, G. (2005a) *Molecular characterization of InJR06, a class 1 integron located in a conjugative plasmid of Salmonella enteric serotype Typhimurium*. Int. Microbiol. 8: 287-90.

Di Conza, J.; Ayala, J.; Power, P.; Mollerach, M. y Gutkind G. (2002) *Novel class 1 integron (InS21) carrying bla_{CTX-M-2} in Salmonella enterica Serovar Infantis*. Antimicrob. Agents Chemother. 46:2257-2261.

Di Conza, J.; Gutkind, G.; Mollerach, M. y Ayala, J. (2005b) *Transcriptional analysis of the bla(CTX-M-2) gene in Salmonella enterica serovar Infantis*. Antimicrob. Agents Chemother. 49(7):3014-7.

Docquier, J. D.; Calderone, V.; De Luca, F.; Benvenuti, M.; Giuliani, F.; Bellucci, L.; Tafi, A.; Nordmann, P.; Botta, M.; Rossolini, G.M. y Mangani, S. (2009) *Crystal structure of the OXA-48 beta-lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases*. Chem. Biol. 16, 540-547

Drlica, K. (1999). *Mechanism of fluoroquinolone action*. Curr. Opin. Microbiol. 2: 404-8.

Empel, J.; Filczak, K.; Mrowka, A.; Hryniewicz, W.; Livermore, D.M. y Gniadkowski, M. (2007) *Outbreak of Pseudomonas aeruginosa infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex*. J. Clin. Microbiol. 45: 2829-34.

Escobar, A.; Porto, A.; Joris, R.; Sansevich, M.E.; Gutkind, G.; Di Conza, J. y Truppia, L.A. (2010) *Detección de genes qnr en aislamientos de enterobacterias con resistencia simultánea a fluorquinolonas y oximinocefalosporinas*. FABICIB. 14: 39 - 45.

Espedido, B.; Partridge, S. e Iredell, J. (2008) *bla_{IMP-4} in different genetic contexts in Enterobacteriaceae isolates from Australia*. Antimicrob. Agents Chemother. 52(8):2984-7.

Espedido, B.; Iredell, J.; Thomas, L. y Zelynski, A. (2005) *Wide dissemination of a carbapenemase plasmid among gram-negative bacteria: implications of the variable phenotype*. J. Clin. Microbiol. 43(9): 4918-9.

Faccone, D.; Barreiro, L.; Pasterán, F.; Melano, R.; Rapoport, M.; Galas, M.; *et al.* *Genetic support of bla_{GES-1}: novel location in Tn402-like transposons of Pseudomonas aeruginosa (Pae) from Argentina*. 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC, Estados Unidos de Norteamérica, 25 a 28 de octubre de 2008, p. 120.

Fluit, A.C. y Schmitz, F.J. (1999) *Class I integrons, gene cassettes, mobility and epidemiology*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18:761-770.

Fonseca, E. L.; Dos Santos Freitas, F.; Vieira, V.V. y Vicente, A.C. (2008) *New qnr gene cassettes associated with superintegron repeats in Vibrio cholerae O1*. Emerg. Infect. Dis. 14:1129–1131.

Fortini, D.; García-Fernández, A.; Veldman, K.; Mevius, D. y Carattoli, A. (2009) *Novel genetic environment of plasmid-mediated quinolone resistance gene qnrB2 in Salmonella Bredeney from poultry*. J Antimicrob Chemother. 64(6):1332-4.

Fortini, D.; Fashae, K.; García-Fernández, A.; Villa, L. y Carattoli, A. (2011) *Plasmid mediated quinolone resistance and β -lactamases in Escherichia coli from healthy animals from Nigeria*. J. Antimicrob. Chemother. 66(6):1269-72.

Franceschini, N.; Boschi, L.; Pollini, S.; Herman, R.; Perilli, M.; Galleni, M.; Frere, J.M.; Amicosante, G. y Rossolini, G.M. (2001) *Characterization of OXA-29 from Legionella (Fluoribacter) gormanii: molecular class D beta-lactamase with unusual properties*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 3509–3516

Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985) *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal. Biochem 150: 76-85.

Garau, J.; Xercavins, M.; Rodriguez-Carballeira, M.; Gomez-Vera, J.R.; Coll, I.; Vidal, D.; Llovet, T. y Ruiz-Bremon, A. (1999) *Emergence and dissemination of quinolone-resistant Escherichia coli in the community*. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2736–2741.

Garcillán-Barcia, M.; Bernales, I.; Mendiola, M.V. y de la Cruz, F. (2002) *IS91 rolling-circle transposition*. En: *Mobile DNA II* (Eds.: Craig, N.L.; Craigie, R.; Gellert, M. y Lambowitz, A.M.). ASM Press, Washington, D. C., p. 891-904.

Garcillán-Barcia, M.; Bernales, I.; Mendiola, M.V. y de la Cruz, F. (2001) *Single-stranded DNA intermediates in IS91 rolling-circle transposition*. *Mol. Microbiol.* 39(2):494-501.

Garnier, F.; Raked, N.; Gassama, A.; Denis, F. y Ploy, M.C. (2006) *Genetic environment of quinolone resistance gene qnrB2 in a complex sul1-type integron in the newly described Salmonella enterica serovar Keurmassar*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3200–3202.

Gillings, M.; Boucher, Y.; Labbate, M.; Holmes, A.; Krishnan, S.; Holley, M. y Stokes, H.W. (2008) *The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance*. *J. Bacteriol.* 190: 5095-100.

Giuliani, F.; Docquier, J.D.; Riccio, M.L.; Pagani, L.; Rossolini, G.M. (2005) *OXA-46, a new class D beta-lactamase of narrow substrate specificity encoded by a bla_{VIM-1}-containing integron from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1973-80.

Gomez, S.; Rapoport, M.; Togneri, A.; Viegas-Caetano, J.; Faccone, D.; Corso, A.; Petroni, A. y Pasteran, F. (2011) *Emergence of metallo-β-lactamases in Enterobacteriaceae from Argentina*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 69(1):94-7.

Grigorescu, I.; Andersson, A.; Galin, M.; Jönsson, A.; Molin, A.; Nyholm-Westin, S.; Johansson, C.; Sundström, L. y Flensburg, J. (2006) *Automated purification of soluble histidine tagged integrase of Tn21 expressed in E. coli cells in low amounts*. *Microb. Cell Fact.* 5(S1): p48.

Hall, R.M. y Collis, C.M. (1995) *Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination*. *Mol. Microbiol.* 15: 593-600.

Hall, R.M.; Brown, H.J.; Brookes, D.E. y Stokes, H.W. (1994) *Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends*. *J. Bacteriol.* 176: 6286-94

Hall, R.M.; Collis, C.M.; Kim, M.J.; Partridge, S.R.; Recchia, G.D. y Stokes, H.W. (1999) *Mobile gene cassettes in evolution*. *Ann N Y Acad Sci*; 87: 68-80.

Hall, R.M. y Stokes, H.W. (1990) *The structure of a partial duplication in the integron of plasmid pDGO100*. Plasmid. 23: 76-79.

Hallet, B. y Sherratt, D.J. (1997) *Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut and paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements*. FEMS Microbiol. Rev. 21: 157-178.

Hansen, J.B. y Olsen, R.H. (1978) *Isolation of Large Bacterial Plasmids and Characterization of the P2 Incompatibility Group Plasmids pMG1 and pMG5*. J. Bacteriol. 135: 227-238.

Hansen, L.H.; Jensen, L. B.; Sørensen, H. I. y Sørensen, S. J. (2007) *Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in Escherichia coli and selected enteric bacteria*. J. Antimicrob. Chemother. 60:145–147.

Hansen, L.H.; Johannesen, E.; Burmolle, M.; Sørensen, A.H. y Sørensen, S. J. (2004) *Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 48:3332–3337.

Hata, M.; Suzuki, M.; Matsumoto, M.; Takahashi, M.; Sato, K.; Ibe, S. y Sakae, K. (2005) *Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in Shigella flexneri 2b*. Antimicrob. Agents Chemother. 49:801–803

Hawkey, P.M. (1998) *The origins and molecular basis of antibiotic resistance*. BMJ. 317:657–60.

Hawkey, P.M. (2003) *Mechanisms of quinolone action and microbial response*. J. Antimicrob. Chemother. 51: S29–S35.

Heddle, J.G.; Blance, S.J.; Zamble, D.B.; Hollfelder, F.; Miller, D.A.; Wentzell, L.M.; Walsh, C.T. y Maxwell, A. (2001) *The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition*. J. Mol. Biol. 307(5):1223-34.

Hegde, S.S.; Vetting, M.W.; Roderick, S.L.; Mitchenall, L.A.; Maxwell, A.; Takiff, H.E. y Blanchard, J.S. (2005) *A fluoroquinolone resistance protein from Mycobacterium tuberculosis that mimics DNA*. Science. 308(5727):1480-3.

Hennig S, Ziebuhr W. (2010) *Characterization of the transposase encoded by IS256, the prototype of a major family of bacterial insertion sequence elements*. J. Bacteriol. 192 (16): 4153-63.

- Héritier, C.; Poirel, L.; Aubert, D. y Nordmann, P. (2003) *Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:268–273.
- Hocquet, D.; Colomb, M.; Dehecq, B.; Belmonte, O.; Courvalin, P.; Plesiat, P.; Meziane-Cherif, D. (2011) *Ceftazidime-hydrolysing β -lactamase OXA-145 with impaired hydrolysis of penicillins in Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 1745–1750.
- Hooper, D.C. (1998) *Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance*. *Clin. Infect. Dis.* 27(Suppl 1):S54–63.
- Hooper, D.C. (2000) *Mechanisms of action and resistance to older and newer fluoroquinolones*. *Clin. Infect. Dis.* 31: S24–8.
- Hooper, D.C. y Wolfson, J.S. (1993) *Mechanism of quinolone action and bacterial killing*. En: *Quinolone antimicrobial agents* (Eds.: Hooper, D.C. y Wolfson, J.S.) American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 53–75.
- Hopkins, K. L.; Day, M. y Threlfall, E. J. (2008) *Plasmid-mediated quinolone resistance in Salmonella enterica, United Kingdom*. *Emerg. Infect. Dis.* 14:340–342.
- Hu, F.P.; Xu, X.G.; Zhu, D.M. y Wang, M.G. (2008) *Coexistence of qnrB4 and qnrS1 in a clinical strain of Klebsiella pneumoniae*. *Acta Pharmacol. Sin.* 29: 320–324.
- Huovinen, P.; Huovinen, S. y Jacoby, G. (1988) *Sequence of PSE-2 β -lactamase*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 134-136.
- Jacoby, G.A.; Griffin, C.M. y Hooper, D.C. (2011) *Citrobacter spp. as a source of qnrB alleles*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 4979–4984.
- Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A.; O'Brien, T.F.; Pinto, M.E. y Jiang, H. (1988) *Broad-spectrum, transmissible β -lactamases*. *N. Engl. J. Med.* 319:723-723.
- Jacoby, G.A.; Walsh, K.E.; Mills, D.M.; Walker, V.; Robicsek, A. y Hooper, D.C. (2006) *qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1178-1182.

Jaurin, B. y Gündstrom, T. (1981) *ampC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillase type. Proc. Natl Acad. Sci USA. 78: 4897-4901.

Jeong, J.Y.; Kim, E.S.; Choi, S.H.; Kwon, H.H.; Lee, S.R.; Lee, S.O.; Kim, M.N.; Woo, J.H. y Kim, Y.S. (2008) *Effects of a plasmid-encoded qnrA1 determinant in Escherichia coli strains carrying chromosomal mutations in the acrAB efflux pump genes*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 60(1):105-7.

Jeong, J.Y.; Yoon, H.J.; Kim, E.S.; Lee, Y.; Choi, S.H.; Kim, N.J.; Woo, J.H. y Kim, Y.S. (2005) *Detection of qnr in clinical isolates of Escherichia coli from Korea*. Antimicrob. Agents Chemother. 49(6):2522-4.

Johansson, C.; Kamali-Moghaddam, M. y Sundström, L. (2004) *Integron integrase binds to bulged hairpin DNA*. Nucleic Acids Res. 2;32(13):4033-43.

Kehrenberg, C.; Friederichs, S.; de Jong, A. y Schwarz, S. (2008) *Novel variant of the qnrB gene, qnrB12, in Citrobacter werkmanii*. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 1206–1207.

Kehrenberg, C.; Friederichs, S.; de Jong, A.; Michael G.B. y Schwarz, S. (2006) *Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene qnrS in Salmonella enterica serovar Infantis*. J. Antimicrob. Chemother. 58(1):18-22.

Kitzis, M.D.; Billot-Klein, D.; Goldstein, F.W.; Williamson, R.; Nhieu, G.T.V.; Carlet, J.; Acar, J.F. y Gutmann, L. (1988) *Dissemination of the novel plasmid-mediated β -lactamase CTX-1, which confers resistance to broad spectrum cephalosporins, and its inhibition by β -lactamase inhibitors*. Antimicrob. Agents Chemother. 32:9-14.

Kratz, J.; Schmidt, F. y Wiedemann, B. (1983) *Transposition of a gene encoding OXA-2 beta-lactamase*. J. Gen. Microbiol. 129: 2951-2957.

Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 227: 680-685.

Laraki, N.; Galleni, M.; Thamm, I.; Riccio, M.L.; Amicosante, G.; Frère, J.M. y Rossolini, G.M. (1999) *Structure of In31, a bla_{IMP}-containing Pseudomonas aeruginosa integron phylogenically*

related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. Antimicrob. Agents Chemother; 43: 890-901.

Lavollay, M.; Mamlouk, K.; Frank, T.; Akpabie, A.; Burghoffer, B.; Ben Redjeb, S.; Bercion, R.; Gautier, V. y Arlet, G. (2006) *Clonal dissemination of a CTX-M-15 β -lactamase-producing Escherichia coli strain in the Paris area, Tunis, and Bangui.* Antimicrob. Agents Chemother. 50:2433-8.

Ledent, P. y Frere, J.M (1993b) *Substrate induced inactivation of the OXA-2 β -lactamase.* Biochem. J. 295: 871-878.

Ledent, P.; Raquet, X.; Joris, B.; Van Beeumen, J. y Frère, J.M. (1993a) *A comparative study of class-D β -lactamases.* Biochem J. 292(Pt 2): 555–562.

Levesque, C.; Piché, L.; Larose, C. y Roy, P.H. (1995). *PCR mapping of integron reveals several novel combinations of resistance genes.* Antimicrob. Agents Chemother. 39: 185-91.

Lewis, L.A.; Astatke, M.; Umekubo, P.T.; Alvi, S.; Saby, R.; Afrose, J.; Oliveira, P.H.; Monteiro G.A. y Prazeres, D. M. (2012) *Protein-DNA interactions define the mechanistic aspects of the circle formation and insertion reactions in IS2 transposition.* Mob DNA. 26; 3(1):1.

Liassine, N.; Zulueta-Rodriguez, P.; Corbel, C.; Lascols, C.; Soussy, C. J y Cambau, E. (2008) *First detection of plasmid-mediated quinolone resistance in the community setting and in hospitalized patients in Switzerland.* J. Antimicrob. Chemother. 62:1151–1152.

Ling, T.K.; Xiong, J.; Yu, Y.; Lee, C.C.; Ye, H. y Hawkey, P.M. (2006) *Multicenter antimicrobial susceptibility survey of gram-negative bacteria isolated from patients with community-acquired infections in the People's Republic of China.* Antimicrob. Agents Chemother. 50:374–378.

Livermore, D.M. (2009) *Has the era of untreatable infections arrived?* J. Antimicrob. Chemother. 64 Suppl. 1: i29–i36.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.* J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Márquez, C.; Labbate, M.; Raymondo, C.; Fernández, J.; Gestal, A.; Holley, M.; Borthagaray, G. y Stokes, H.W. (2008) *Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread*

of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. J. Clin. Microbiol. 46:3417-3425.

Martínez-Martínez, L. y Calvo, J. (2010) *The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28 Suppl 2:25-31.

Martínez-Martínez, L.; Pascual, A. y Jacoby, G.A. (1998) *Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet.* 351:797–9.

Martínez-Martínez, L.; Pascual, A.; García, I.; Tran, J. y Jacoby, G. (2003) *Interaction of plasmid and host quinolone resistance. J Antimicrob Chemother.* 51(4):1037-9.

Melano, R.; Corso, A.; Petroni, A.; Centrón, D.; Orman, B.; Pereyra, A.; Moreno, N. y Galas, M. (2003) *Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a Klebsiella pneumoniae clinical strain isolated in Argentina. J. Antimicrob. Chemother.* 52(1):36-42.

Mendiola, M.V. y de la Cruz, F. (1989) *Specificity of insertion of IS91, an insertion-sequence present in Alphahemolysin plasmids of Escherichia coli. Mol. Microbiol.* 3(7): 979–984.

Mendiola, M.V. y de la Cruz, F. (1992) *IS91 transposase is related to the rolling-circle-type replication proteins of the pUB110 family of plasmids. Nucleic Acids Research.* 20: 3521.

Mendiola, M.V.; Bernales, I. y de La Cruz, F. (1994) *Differential roles of the transposition termini in IS91transposition. Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 1922-1926.

Menzella, H.G.; Ceccarelli, E. A. y Gramajo, H. C. (2003) *Novel Escherichia coli Strain Allows Efficient Recombinant Protein Production Using Lactose as Inducer. Biotech. Bioeng.* 82: 809-817.

Meyer, K.S.; Urban, C.; Eagan, J.A.; Berger, B.J. y Rahal, J.J. (1993) *Nosocomial outbreak of Klebsiella infection resistant to late-generation cephalosporins. Ann Int Med.* 119:353-358.

Minarini, L.A.; Poirel, L.; Cattoir, V.; Darini, A.L. y Nordmann, P. (2008) *Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. J. Antimicrob. Chemother.* 62, 474–478.

Montero, C.; Mateu, G.; Rodriguez, R. y Takiff, H. (2001) *Intrinsic resistance of Mycobacterium smegmatis to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA*. Antimicrob. Agents Chemother. 45(12):3387-92.

Mugnier, P.; Casin, I.; Bouthors, A. T. y Collatz, E. (1998) *Novel OXA-10-derived extended spectrum beta-lactamases selected in vivo or in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 3113-6.

Mulvey, M.R.; Boyd, D.A.; Baker, L.; Mykytczuk, O.; Reis, E. M.F.; Asensi, M.D.; Rodrigues, D.P.; Ng, L.K. (2004) *Characterization of a Salmonella enterica serovar Agona strain harbouring a class I integron containing novel OXA-type beta-lactamase (bla_{OXA-53}) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [aac(6')-Ib]*. J. Antimicrob. Chemother. 54: 354-359.

Murray, I.A.; Martínez-Suarez, J.V.; Close, T.J. y Shaw, W.V. (1990). *Nucleotide sequences of genes encoding the type II chloramphenicol acetyltransferases of Escherichia coli and Haemophilus influenzae, which are sensitive to inhibition by thiol-reactive reagents*. Biochem. J. 272:505-10.

Naas, T.; Mikami, Y.; Imai, T.; Poirel, L. y Nordmann, P. (2001) *Characterization of In53, a class I plasmid- and composite transposon-located integron of Escherichia coli which carries an unusual arrays of gene cassettes*. J. Bacteriol. 183: 235-49.

Naas, T.; Namdari, F.; Bogaerts, P.; Huang, T.D.; Glupczynski, Y. y Nordmann, P. (2008) *Genetic structure associated with bla_{OXA-18} gene, encoding a clavulanic acid-inhibited extended spectrum oxacillinase*. Antimicrob. Agents Chemother. 52:3898–3904.

Naas, T. y Nordmann, P. (1999) *OXA-type beta-lactamases*. Curr. Pharm. Des. 5(11):865-79.

Nakazawa, H. y Mitsunashi, S. (1983) *Tn2011, a new transposon encoding oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase*. Antimicrob. Agents Chemother. 23: 407-412.

Neuhauser, M.M.; Weinstein, R.A.; Rydman, R.; Danziger, L.H; Karam, G. y Quinn, J.P. (2003) *Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use*. JAMA. 289: 885–888.

Nikaido, H. y Pagès, J. M. (2012). *Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria*. FEMS Microbiol. Rev. 36: 340-363.

Norman, A.; Hansen, L.H. y Sorensen, S.J. (2009) *Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool*. Phil. Trans. R. Soc. B. 364: 2275-2289.

Ochman, H.; Lawrence, J.G. y Groisman, E.A. (2000). *Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation*. Nature. 405(6784):299-304.

Orman, B.E.; Piñeiro, S.A.; Arduino, S.; Galas, M.; Melano, R.; Caffer, M.I.; Sordelli, D. y Centrón, D. (2002) *Evolution of multiresistance in nontyphoid Salmonella serovars from 1984 to 1998 in Argentina*. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 3963-70.

Paauw, A.; Fluit, A.C.; Verhoef, J.; Leverstein-van Hall, M.A. (2006) *Enterobacter cloacae outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital*. Emerg. Infect. Dis. 12(5):807-12.

Paauw, A.; Verhoef, J.; Fluit, A.C.; Blok, H.E.; Hopmans, T.E.; Troelstra, A.; Leverstein-van Hall, M.A. (2007) *Failure to control an outbreak of qnrA1-positive multidrug-resistant Enterobacter cloacae infection despite adequate implementation of recommended infection control measures*. J. Clin. Microbiol. 45(5):1420-5.

Pagniez, G.; Radice, M.; Cuirolo, A.; Rodríguez, O.; Rodriguez, H.; Vay, C.; Famiglietti, A. y Gutkind, G. (2006) *Prevalence of metallo- β -lactamase in carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa at a university hospital of Buenos Aires City*. Rev. Argent Microbiol. 38: 33-7.

Pai, H.; Seo, M. R y Choi, T. Y. (2007) *Association of QnrB determinants and production of extended-spectrum β -lactamases or plasmid-mediated AmpC β -lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 51:366–368.

Pallecchi, L.; Bartoloni, A.; Fiorelli, C.; Mantella, A.; Di Maggio, T.; Gamboa, H.; Gotuzzo, E.; Kronvall, G.; Paradisi, F. y Rossolini, G. M. (2007) *Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum β -lactamase genes in commensal Escherichia coli isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America*. Antimicrob. Agents Chemother. 51:2720-5.

- Pallecchi, L.; Riccobono, E.; Mantella, A.; Bartalesi, F.; Sennati, S.; Gamboa, H.; Gotuzzo, E.; Bartoloni, A. y Rossolini G. M. (2009) *High prevalence of qnr genes in commensal enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(6):2632-5.
- Partridge, S. R.; Recchia, G. D.; Scaramuzzi, C.; Collis, C. M.; Stokes, H. W. y Hall, R. M. (2000) *Definition of the attI1 site of class 1 integrons*. *Microbiology.* 146:2855–2864.
- Partridge, S.R. y Hall, R.M. (2003) *In34, a complex In5 family class 1 integron containing orf513 and dfrA10*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 342-349.
- Partridge, S.R.; Brown, H.J.; Stokes, H.W. y Hall, R.M. (2001a) *Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 1263-70.
- Partridge, S.R.; Collis, C.M. y Hall, R.M. (2002) *Class 1 integron containing a new gene cassette, aadA10, associated with Tn1404 from R151*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2400-8.
- Partridge, S.R.; Recchia, G.D.; Stokes, H.W. y Hall, R.M. (2001b) *Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3014-20.
- Pasterán, F.; Rapoport, M.; Petroni, A.; Faccone, D.; Corso, A.; Galas, M.; Vázquez, M.; Procopio A.; Tokumoto, M. y Cagnoni, V. (2006) *Emergence of PER-2 and VEB-1a in Acinetobacter baumannii Strains in the Americas*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(9):3222-4.
- Paton, J.H. y Reeves, D.S. (1988) *Fluoroquinolone antibiotics. Microbiology, pharmacokinetics and clinical use*. *Drugs.* 36:193–228.
- Paulsen, I.T.; Littlejohn, T.G.; Radstrom, P.; Sündstrom, L.; Skold, O.; Swedberg, G. y Skurray, R.A. (1993) *The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 761-8.
- Perichon, B.; Courvalin, P. y Galimand, M. (2007) *Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2464–9.

Petersen, T.N.; Brunak, S.; Von Heijne, G. y Nielsen, H. (2011). *SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. Nat. Methods. 8: 785-786.

Petroni, A.; Andrés, P.; Soler Bistué, A. J.C.; Quiroga, P.; Zorreguieta, A.; Centrón, D. y Galas, M. *Transferable Quinolone Resistance (TQR) in Enterobacteria from Argentina: aac(6')-Ib-cr and a Novel qnrB Allele (qnrB6) are Located in a Complex Class 1 Integron*. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago, Estados Unidos de Norteamérica. 17 al 20 de Septiembre de 2007.

Petroni, A.; Corso, A.; Melano, R.; Cacace, M. L.; Bru, A. M.; Rossi, A. y Galas, M. (2002) *Plasmidic extended-spectrum beta-lactamases in Vibrio cholerae O1 El Tor isolates in Argentina*. Antimicrob. Agents Chemother. 46(5):1462-8.

Philippon, L.N.; Naas, T.; Bouthors, A.T.; Barakett, V. y Nordmann P. (1997) *OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 41(10): 2188–2195.

Poirel, L. y Nordmann, P. (2006a) *Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology*. Clin. Microbiol. Infect. 12:826–836.

Poirel, L.; Cattoir, V. y Nordmann, P. (2012) *Plasmid-mediated quinolone resistance, interactions between human, animal, and environmental ecologies*. Front. Microbiol. 3(24): 1-7.

Poirel, L.; Cattoir, V.; Soares, A.; Soussy, C-J. y Nordmann, P. (2007a). *Novel Ambler class A β -lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1*. Antimicrob Agents Chemother. 51, 631–637.

Poirel, L.; Decousser, J. W. y Nordmann, P. (2003) *Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla_{CTX-M} β -lactamase gene*. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47: 2938–4.

Poirel, L.; Gerome, P.; De Champs, C.; Stephanazzi, J.; Naas, T. y Nordmann, P. (2002) *Integron-located bla_{OXA-32} gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 566-569.

Poirel, L.; Heritier, C.; Tolun, V. y Nordmann, P. (2004) *Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 15-22.

Poirel, L.; Lambert, T.; Turkoglu, S.; Ronco, E.; Gaillard, J.L. y Nordmann, P. (2001) *Characterization of class 1 integrons from Pseudomonas aeruginosa that contain the bla_{VIM-2} carbapenem- hydrolyzing β -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 546-52.

Poirel, L.; Leviandier, C. y Nordmann, P. (2006b) *Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital*. Antimicrob Agents Chemother. 50: 3992–7.

Poirel, L.; Marqué, S.; Héritier, C.; Segonds, C.; Chabanon, G. y Nordmann, P. (2005) *OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 49:202–208.

Poirel, L.; Pitout, J.D. y Nordmann, P. (2007b) *Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences*. Future Microbiol. 2:501–512.

Poirel, L.; Naas, T. y Nordmann, P. (2010) *Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases*. Antimicrob. Agents Chemother. 54(1):24-38.

Poirel, L.; Rodriguez-Martinez, J.M.; Mammeri, H.; Liard, A. y Nordmann, P. (2005) *Origin of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrA*. Antimicrob. Agents Chemother. 49(8): 3523–3525.

Pomba, C.; da Fonseca, J. D.; Baptista, B. C.; Correia, J. D. y Martínez- Martínez, L. (2009) *Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent Escherichia coli CTX-M-15-producing clone harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr genes in a dog*. Antimicrob. Agents Chemother. 53:327–328.

Porto, A. *Mecanismos de adquisición de genes de resistencia a antibióticos. Integrones presentes en Enterobacteriaceae* [Tesina de Grado]. Santa Fe: Universidad Nacional del Litoral, 2006.

Porto, A.; Ayala, J.; Gutkind, G. y Di Conza, J. (2010) *A novel OXA-10-like β -lactamase is present in different Enterobacteriaceae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 66: 228-9.

Porto, A.; Vaccari, M.C.; Méndez, E. y Di Conza, J. (2005). *Integrones clase 1 y 2 presentes en aislamientos hospitalarios de enterobacterias*. FABICIB. 9: 141-7.

Power, P.; Di Conza, J.; Rodríguez, M.M.; Ghiglione, B.; Ayala, J.; Casellas, J.M.; Radice, M. y Gutkind, G. (2007) *Biochemical characterization of PER-2 and genetic environment of bla_{PER-2}*. Antimicrob. Agents Chemother. 51:2359-2365.

Power, P.; Galleni, M.; Di Conza, J.; Ayala, J.A. y Gutkind, G. (2005) *Description of In116, the first bla_{CTX-M-2}-containing complex class 1 integron found in Morganella morganii isolates from Buenos Aires, Argentina*. J. Antimicrob. Chemother. 55: 461-465.

Power, P.; Radice, M.; Barberis, C.; de Mier, C.; Mollerach, M.; Maltagliatti, M.; Vay, C.; Famiglietti, A. y Gutkind G. (1999) *Cefotaxime-hydrolysing β -lactamases in Morganella morganii*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18: 743-7.

Pridmore, R.D. (1987) *New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker*. Gene. 56: 309-312.

Queenan, A. M. y Bush, K. (2007) *Carbapenemases: the versatile β -lactamases*. Clin. Microbiol. Rev. 20:440–458.

Quinn, J.P.; Miyashiro, D.; Sahm, D.; Flamm, R. y Bush, K. (1989) *Novel plasmid-mediated β -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 33:1451-1456.

Quinteros, M.; Radice, M.; Gardella, N.; Rodríguez, M.M.; Costa, N.; Korbenfeld, D.; Couto, E.; Gutkind, G. y *Microbiology Study Group*. (2003). *Extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals*. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2864-9.

Quinteros, M.; Radice, M.; Power, P.; Di Conza, J. *et al.* *Detection of extended-spectrum β -lactamases in microorganisms harboring an AmpC β -lactamase*. International Congress on β -Lactamases. L'Aquila, Italia, 1999.

Quiroga, M.P; Andres, P.; Petroni, A.; Soler Bistue, A.; Guerriero, L.; Jorda Vargas, L.; Zorreguieta, A.; Tokumoto, M.; Quiroga, C.; Tolmasky, M.; Galas, M. y Centrón, D. (2007) *Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including aac(6')-Ib-cr, and a novel allele, qnrB10, associated with ISCRI in clinical enterobacterial isolates from Argentina*. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 4466-4470.

Radice, M.; Power, P.; Di Conza, J. y Gutkind, G. (2002). *Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(2):602-4.

Recchia, G.D. y Hall, R.M. (1995) *Gene cassettes: a new class of mobile element*. *Microbiology*. 141: 3015-3027

Recchia, G.D. y Sherrat, D.J. (2002) *Gene acquisition in bacteria by integron mediated site specific recombination*. En: *Mobile DNA II* (Eds.: Craig, N.; Craigie, R.; Gellert, M. y Lambowitz, A.M.) ASM Press, Washington, DC, Estados Unidos de Norteamérica. p. 162-76.

Recchia, G.D.; Stokes, H.W. y Hall, R.M. (1994) *Characterisation of specific and secondary recombinations sites recognised by the integron DNA integrase*. *Nucleic Acids Res*; 22: 2071-8.

Revathi, G.; Shannon, K. P.; Stapleton, P. D.; Jain, B. K. y French, G. L. (1998) *An outbreak of extended-spectrum, β -lactamase-producing Salmonella senftenberg in a burns ward*. *J. Hosp. Infect.* 40(4):295-302.

Richter, S.; Frasson, I.; Bergo, C.; Manganelli, R.; Cavallaro, A. y Palù, G. (2010) *Characterisation of qnr plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae from Italy: association of the qnrB19 allele with the integron element ISCR1 in Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35: 578–583.

Robicsek, A.; Strahilevitz, J.; Jacoby, G.A.; Macielag, M.; Abbanat, D.; Park, C.H.; Bush, K. y Hooper, D.C. (2006) *Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase*. *Nat Med.* 12:83–8.

Rodríguez-Martínez, J. M.; Poirel, L.; Canton, R. y Nordmann, P. (2006) *Common region CR1 for expression of antibiotic resistance genes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2544-2546.

- Rodríguez-Martínez, JM.; Cano, ME.; Velasco, C.; Martínez-Martínez, L.; Pascual, A. (2011) *Plasmid-mediated quinolone resistance: an update*. J. Infect Chemother. 17:149-82.
- Rodríguez-Martínez; J.M.; Velasco, C.; Pascual, A.; García, I. y Martínez-Martínez, L. (2006) *Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three qnrA-containing plasmids*. Clin. Microbiol. Infect. 12(5):440-5.
- Romanstchuk, M.; Richter, G.Y.; Mukhopadhyay, P. y Mills, D. (1991) *IS801, an insertion-sequence element isolated from Pseudomonas syringae pathovar phaseolicola*. Mol. Microbiol. 5(3): 617–622.
- Ruiz, J. (2003) *Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection*. J. Antimicrob. Chemother. 51: 1109–17.
- Sabate, M.; Navarro, F.; Miró, E.; Campoy, S.; Mirelis, B.; Barbé, J. y Prats, G. (2002) *Novel Complex sul1-Type Integron in Escherichia coli carrying bla_{CTX-M-9}*. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 2656-2661.
- Sabaté, M.; Navarro, F.; Miró, E.; Campy, S.; Mirelis, B.; Barbé, J. y Prats, G. (2002) *Novel complex sul1-type integron in Escherichia coli carrying bla_{CTX-M-9}*. Antimicrob. Agents Chemother. 46 (8): 2656-2661.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987) *The neighboring-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol. Biol. Evol. 4:406–425.
- Salyers, A.A.; Shoemaker, N.B.; Li, L.Y. y Stevens, A.M. (1995) *Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements*. Microbiol. Rev. 59: 579-590.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA*.
- Sanchez-Céspedes, J.; Blasco, M.D.; Martí, S.; Alba, V.; Alcaide, E.; Esteve, C.; y Vila, J. (2008). *Plasmid-mediated QnrS2 determinant from a clinical Aeromonas veronii isolate*. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 2990–2991.

Sandvang, D.; Aarestrup, F.M. y Jensen, L.B. (1997) *Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant Salmonella enterica Typhimurium DT104*. FEMS Microbiol. Lett. 157:177–181.

Sanschagrin, F.; Couture, F. y Levesque, R. C. (1995) *Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamases*. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 887-893.

Santos, C.; Caetano, T.; Ferreira, S.; Ramalheira, E. y Mendo, S. (2011) *A novel complex class I integron found in a Klebsiella pneumoniae isolate from Portugal*. Clin. Microbiol. Infect. 17(7):1036-9.

Scoulica, E.; Aransay, A y Tselentis, Y. (1995). *Molecular characterization of the OXA-7 β lactamase gene*. Antimicrob. Agents Chemother. 39:1379–1382.

Sennati, S.; Santella, G.; Di Conza, J.; Pallecchi, L.; Pino, M.; Ghiglione, B.; Rossolini, G. M.; Radice, M. y Gutkind, G. (2012) *Changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15*. Antimicrob Agents Chemother. 56 (11): 6003-5.

Shao, Y.; Xiong, Z.; Li, X.; Hu, L.; Shen, J.; Li, T.; Hu, F. y Chen, S. (2011) *Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Citrobacter freundii isolates from Anhui province, PR China*. J. Med. Microbiol. 60(Pt 12):1801-5.

Sirot, D.; Sirot, J.; Labia, R.; Morand, A.; Courvalin, P.; Darfeuille-Michaud, A.; Perroux, R. y Cluzel, R. (1987) *Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae: identification of CTX-1, a novel β -lactamase*. J. Antimicrob Chemother. 20:323-334.

Sirot, J.; Chanal, C.; Petit, A.; Sirot, D.; Labia, R. y Gerbaud, G. (1988) *Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated β -lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiological studies*. Rev. Infect. Dis. 10:850-859.

Siu, L. K.; Lo, J. Y. C.; Yuen, K. Y.; Chau, P. Y.; Ng, M. H.; Ho, P. L. (2000) *β -lactamases in Shigella flexneri isolates from Hong Kong and Shanghai and a novel OXA-1-like beta-lactamase, OXA-30*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2034-2038.

- Soler Bistue, A.J.; Martin, F.A.; Petroni, A.; Faccone, D.; Galas, M.; Tolmasky, M.E. y Zorreguieta, A. (2006) *Vibrio cholerae* InV117, a class 1 integron harboring *aac(6')-Ib* and *bla_{CTX-M-2}*, is linked to transposition genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1903-7.
- Stokes, H.W. y Hall, R.M. (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3: 1669-1683.
- Stokes, H.W.; O’Gorman, D.B.; Recchia, G.D.; Parsekhian, M. y Hall, R.M. (1997) Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol.* 26: 731-45
- Stokes, H.W.; Tomaras, C.; Parsons, Y. y Hall, R.M. (1993) The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. *Plasmid.* 30: 39-50.
- Strahilevitz, J.; Jacoby, G; Hooper, D.C. y Robicsek, A. (2009). *Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat.* *Clin. Microbiol. Rev.* 22: 664–689.
- Sung, J. Y.; Kwon, K. C.; Park, J. W.; Kim, Y. S.; Kim, J. M.; Shin, K. S.; Kim, J. W.; Ko, C. S.; Shin, S. Y.; Song, J. H.; Koo, S. H. (2008) Dissemination of IMP-1 and OXA type beta-lactamase in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Korean J. Lab. Med.* 28: 16-23.
- Szabo, D.; Kocsis, B.; Rokusz, L.; Szentandrassy, J.; Katona, K.; Kristof, K. y Nagy, K. (2008) First detection of plasmid-mediated, quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in Budapest, Hungary. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:630–632.
- Tavakoli, N.; Comanducci, A.; Dodd, H.M.; Lett, M.C.; Albiger, B. y Bennett, P. (2000) *IS1294*, a DNA element that transposes by RC transposition. 44(1):66-84.
- Tenover, F.D. (2006) *Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria.* The American J. Med. 119 (6A), S3–S10.
- Teo, J. W.; Ng, K. Y. y Lin, R. T. (2009) Detection and genetic characterisation of *qnrB* in hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 33(2):177-80.

- Toleman, M.A., Bennett, P.M. y Walsh T.R. (2006b). *Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons*. J. Antimicrob. Chemother. 58(1):1-6.
- Toleman, M.A.; Bennett, P.M. y Walsh, T.R. (2006a). *ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?* Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70: 296-316.
- Toleman, M.A.; Rolston, K.; Jones, N.R. y Walsh, T.R. (2003) *Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d β -lactamase in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 47:2859–2863.
- Tolmasky, M. E. y Crosa, J. H. (1993). *Genetic organization of antibiotic resistance genes (aac(6')-Ib, aadA, and oxa9) in the multiresistance transposon Tn1331*. Plasmid. 29: 31-40.
- Tran, J. H.; Jacoby, G.A. y Hooper, D.C. (2005a) *Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with Escherichia coli DNA gyrase*. Antimicrob. Agents Chemother. 49:118–125.
- Tran, J. H.; Jacoby, G.A. y Hooper, D.C. (2005b) *Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with Escherichia coli topoisomerase IV*. Antimicrob. Agents Chemother. 49:3050–3052.
- Vakulenko, S.B. y Mobashery, S. (2003). *Versatility of aminoglycosides and prospects for their future*. Clin. Microbiol. Rev, 16: 430-450.
- van der Bij, A. K. y Pitout, J. D. (2012) *The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae*. J. Antimicrob. Chemother. (aceptado, disponible en la web).
- Veldman, K.; Cavaco, L.M.; Mevius, D.; Battisti, A.; Franco, A.; Botteldoorn, N.; Bruneau, M.; Perrin-Guyomard, A.; Cerny, T.; De Frutos Escobar, C.; Guerra, B.; Schroeter, A.; Gutierrez, M.; Hopkins, K.; Myllyniemi, A.L.; Sunde, M.; Wasyl, D. y Aarestrup, F.M. (2011). *International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in Salmonella enterica and Escherichia coli isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries*. J. Antimicrob. Chemother. 66, 1278–1286.

Vercheval, L (2010). *Etude des facteurs structuraux influençant la carbonatation de la lysine 70 chez la β -lactamase OXA-10 de Pseudomonas aeruginosa*. Tesis doctoral. Centro de Ingeniería de Proteínas, Facultad de Ciencias, Universidad de Liege, Bélgica.

Verdet, C.; Benzerara, Y.; Gautier, V.; Adam, O.; Ould-Hocine, Z. y Arlet, G. (2006) *Emergence of DHA-1-producing Klebsiella spp. in the Parisian region: genetic organization of the ampC and ampR genes originating from Morganella morganii*. Antimicrob. Agents Chemother. 50(2):607-17.

Vetting, M.W.; Hedge, S.S.; Fajardo, J.E.; Fiser, A.; Roderick, S.L.; Takiff, H.E. y Blanchard, J.S. (2006). *Pentapeptide repeat proteins*. Biochemistry. 45: 1–10.

Vignoli, R.; Varela, G.; Mota, M. I.; Cordeiro, N. F.; Power, P.; Ingold, E.; Gadea, P.; Sirok, A.; Schelotto, F.; Ayala, J. A. y Gutkind, G. (2005) *Enteropathogenic Escherichia coli strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum β -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay*. J. Clin. Microbiol. 43(6):2940-3.

Vila, J.; Navia, M.; Ruiz, J.; Casals, C. (1997) *Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 2757-2759.

Villa, L.; Visca, P.; Tosini, F.; Pezzella, C. y Carattoli, A. (2002) *Composite integron array generated by insertion of an orf341-type integron within a Tn21-like element*. Microb. Drug Resist. 8: 1-8.

Wang, M.; Guo, Q.; Xu, X.; Wang, X.; Ye, X.; Wu, S.; Hooper, D.C. y Wang, M. (2009) *New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of Proteus mirabilis*. Antimicrob. Agents Chemother. 53:1892–1897.

Wang, M.; Tran, J.H.; Jacoby, G.A.; Zhang, Y.; Wang, F. y Hooper, D.C. (2003). *Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of Escherichia coli from Shanghai, China*. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2242-8.

Waters, V.L. (1999) *Conjugative transfer in the dissemination of β -lactam and aminoglycoside resistance*. Front. Biosci. 4: 416-439.

Weber, P.C.; Ohlendorf, D.H.; Wendoloski, J.J. and Salemme, F. R. (1989) *Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin*. Science. 243(4887):85-8.

Wu, C.M.; Wang, Y.; Cao, X. Y.; Lin, J. C.; Qin, S. S.; Mi, T. J.; Huang, S. Y. y Shen, J. Z. (2009) *Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from chickens in China*. J. Antimicrob. Chemother. 63(2):408-11.

Wu, J. J.; Ko, W. C.; Wu, H. M. y Yan, J. J. (2008) *Prevalence of Qnr determinants among bloodstream isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a Taiwanese hospital, 1999–2005*. J. Antimicrob. Chemother. 61:1234–1239.

Xu, X.; Wu, S.; Ye, X.; Liu, Y.; Shi, W.; Zhang, Y. y Wang, M. (2007) *Prevalence and expression of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA1*. Antimicrob. Agents Chemother. 51(11):4105-10.

Yamane, K.; Wachino, J.; Suzuki, S.; Kimura, K.; Shibata, N.; Kato, H.; Shibayama, K.; Toshifumi, K. y Arakawa, Y. (2007) *New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an Escherichia coli clinical isolate*. Antimicrob Agents Chemother. 51:3354–60.

Yan, J. J.; Tsai, S. H.; Chuang, C. L. y Wu, J. J. (2006) *OXA-type beta-lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates in a university hospital in southern Taiwan*. J Microbiol Immunol Infect. 39: 130-4.

Yang, H.; Chen, H.; Yang, Q.; Chen, M. y Wang, H. (2008) *High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes qnr and aac(6')-Ib-cr in clinical isolates of Enterobacteriaceae from nine teaching hospitals in China*. Antimicrob. Agents Chemother. 52:4268–4273.

Zamble, D.B.; Miller, D.A.; Heddle, J.G.; Maxwell, A.; Walsh, C.T. y Hollfelder, F. (2001) *In vitro characterization of DNA gyrase inhibition by microcin B17 analogs with altered bisheterocyclic sites*. Proc. Natl. Acad. Sci. 98(14):7712-7.

Zatyka, M. y Thomas, C.M. (1998). *Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements*. FEMS Microbiol. Rev. 21: 291-319.

Zhao, X.; Xu, C.; Domagala, J. y Drlica, K. (1997) *DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance*. Proc Natl Acad Sci USA. 94:13991–6.