

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**DEPARTAMENTOS DE MICROBIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA
DEL INSTITUTO MUNICIPAL DE INVESTIGACIÓN MÉDICA**

***“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN DE LA β -LACTAMASA SHV-1 EN
KLEBSIELLA PNEUMONIAE”***

TESIS

**Que para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Barcelona
presenta:**

José Chaves Puertas

La parte experimental de esta tesis ha sido realizada en los laboratorios de Microbiología y Farmacología del Instituto Municipal de Investigación Médica de Barcelona.

Este trabajo ha sido financiado en parte con las ayudas del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), a través de los proyectos FIS 94/1829SAT y FIS 92/170.

ABREVIATURAS

A	adenina	mM	milimolar
Amox	amoxicilina	MgCl₂	cloruro magnésico
Amox+Ac	amoxicilina + ácido clavulánico	Mz	mezlocilina
Azt	aztreonam	Mz+Ac	mezlocilina + ácido clavulánico
BLEA	β-lactamasas de espectro amplificado	NaOH	hidróxido sódico
C	citocina	NaCl	cloruro sódico
Caz	ceftazidima	nM	nanomolar
Cb	carbenicilina	pb	pares de bases
CMI	concentración mínima inhibitoria	pCMB	para-cloro-mercurio-benzoato
Cro	ceftriaxona	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
CTAB	cetyl-trimethyl ammonium bromide	pI	punto isoelectrónico
Ctn	cefalotina	pKi	constante de ionización
Ctx	cefotaxima	RNA	ácido ribonucleico
DIG-dUTP	digoxina-uracilo trifosfato	RNAm	ácido ribonucleico mensajero
DMSO	dimetil-sulfóxido	RNAsa	enzima hidrolítica del RNA
DNA	ácido desoxirribonucleico	RNAt	ácido ribonucleico de transferencia
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato	rpm	revoluciones por minuto
EDTA	etilen-diamino-acido tetracético	SDS	sodio-decitril-sulfato
G	guanina	SSC (20X)	3M NaCl, 0,3M Na ₃ citrato trisódico X2 H ₂ O pH 7,0
Gtn	gentamicina	ssf	suero salino fisiológico
HCl	ácido clorhídrico	T	timina
IEEA	isoelectroenfoque analítico	TBE	tizma base 45mM ac. bórico pH 8,0, EDTA 1mM
Kb	kilobases	Td	temperatura de disociación
KCl	cloruro potásico	TE	10 mM tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA
Ki	constante de inhibición	Tris	trizma base
Km	constante de afinidad del enzima al sustrato	ufc	unidades formadoras de colonias
λ_{max}	longitud de onda con disminución de absorción máxima	UMA	unidad de masa atómica
Md	megadalton	V	volts
μm	micrometro	V_{max}	velocidad máxima de hidrólisis
μl	microlitro	wt	fenotipo salvaje (<i>wild type</i>)
mA	miliamperios		

ÍNDICE

<u>INTRODUCCION</u>	3
1. EL GÉNERO <i>KLEBSIELLA</i>	4
1.1. SITUACIÓN TAXONÓMICA	4
1.2. ESPECIES INCLUIDAS	4
1.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ESTRUCTURALES, ANTIGÉNICAS Y FISIOLÓGICAS DE <i>K. PNEUMONIAE</i>	6
1.4. HÁBITAT NATURAL Y PAPEL EN PATOLOGÍA HUMANA DE <i>K. PNEUMONIAE</i>	10
2. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS	12
2.1. INTRODUCCIÓN	12
2.2. MECANISMO DE ACCIÓN	14
2.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA	16
2.4. INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS	18
2.5. PREPARADOS ACTIVOS SOBRE <i>K. PNEUMONIAE</i>	20
3. GENERALIDADES SOBRE β -LACTAMASAS	22
3.1. DEFINICIÓN E INTRODUCCIÓN HISTÓRICA	22
3.2. MECANISMO DE ACCIÓN	23
3.3. β -LACTAMASAS BACTERIANAS. CLASIFICACIÓN	24
3.4. β -LACTAMASAS EN EL GÉNERO <i>KLEBSIELLA</i>	38
4. GENERALIDADES SOBRE REGULACIÓN GÉNICA BACTERIANA	41
4.1. INTRODUCCIÓN	41
4.2. MODELOS DE REGULACIÓN DE LAS β -LACTAMASAS	43
<u>OBJETIVOS</u>	50
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	53
1. CEPAS ESTUDIADAS	54
1.1. SELECCIÓN DE LAS CEPAS Y PROCEDENCIA	54
1.2. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE	54
2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS β -LACTAMASAS BACTERIANAS	57
2.1. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	57
2.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS β -LACTAMASAS BACTERIANAS	62
2.3. TRANSMISIÓN DE PLÁSMIDOS POR CONJUGACIÓN	66
3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS β -LACTAMASAS BACTERIANAS	68
3.1. AISLAMIENTO DE DNA	68
3.2. GEN DE LA β -LACTAMASA SHV-1: PREPARACIÓN DE UNA SONDA ESPECÍFICA	71
3.3. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL GEN: PCR	74
3.4. APROXIMACIÓN AL LOCUS GÉNICO: RFLP-SOUTHERN-BLOT	82
3.5. SECUENCIACIÓN	87
<u>RESULTADOS</u>	95
1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	96
1.1. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y PROCEDENCIA DE LAS CEPAS	96
1.2. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN ENZIMÁTICA DE LAS β -LACTAMASAS POR IEEA	98
1.3. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS	100
Correlación de la sensibilidad antibiótica con la expresión de β -lactamasas	100

2. ESTUDIO DE PLÁSMIDOS	109
2.1. FRECUENCIAS Y ESPECTRO DE PLÁSMIDOS.....	109
2.2. ESTUDIOS DE CONJUGACIÓN BACTERIANA.....	116
3. DETECCIÓN POR PCR DE LA PRESENCIA DEL GEN <i>BLA-SHV-1</i>	121
3.1. CORRELACIÓN PCR E IEEA	121
4. DETERMINACIÓN DEL LOCUS GENÉTICO <i>BLA-SHV-1</i> POR RFLP-SOUTHERN-BLOT	125
4.1. ESTRATEGIA MOLECULAR: ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EMPLEADAS	125
4.2. FRAGMENTOS <i>ECO RI</i>	132
4.3. CORRELACIÓN DE LOS DATOS DEL IEEA Y LA PCR CON EL SOUTHERN-BLOTTING	134
4.4. SOUTHERN-BLOT DEL DNA PLASMÍDICO DE LAS CEPAS TRANSCONJUGANTES	137
5. INTEGRIDAD DEL GEN Y DETERMINACIÓN DE VARIABLES ALÉLICAS.....	142
5.1. SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>BLA-SHV-1</i>	142
5.2. ALINEAMIENTOS COMPARATIVOS: DETERMINACIÓN DE MUTACIONES Y VARIANTES ALÉLICAS REPETITIVAS .	143
5.2.1. Comparación del gen <i>bla-SHV-1</i> vs. el patrón utilizado <i>bla-SHV-1_{pMON38}</i>	143
5.2.3. Comparación de <i>bla-SHV-1_{pMON38}</i> con el gen <i>bla-SHV-1</i> amplificado de las cepas productoras de <i>SHV-1</i> por IEEA	146
5.2.4. Comparación de <i>bla-SHV-1_{pMON38}</i> con el gen <i>bla-SHV-1</i> amplificado de las cepas productoras de <i>LEN-1</i> por IEEA.....	147
5.2.5. Comparación de <i>bla-SHV-1_{pMON38}</i> con el gen <i>bla-SHV-1</i> amplificado de las cepas productoras de <i>TEM-1</i> por IEEA.....	149
5.2.6. Variantes alélicas repetitivas	153
<u>DISCUSIÓN</u>	156
1. IMPORTANCIA DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> COMO PATÓGENO HUMANO	158
2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS ESTUDIADAS	161
3. ESPECTRO DE PLÁSMIDOS Y CONJUGACIÓN BACTERIANA	166
4. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA MEDIANTE DETECCIÓN POR PCR DE LA PRESENCIA DEL GEN <i>BLA-SHV-1</i> Y DETERMINACIÓN DEL LOCUS GENÉTICO POR RFLP-SOUTHERN-BLOT	169
5. SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>BLA-SHV-1</i> Y DETERMINACIÓN DE VARIANTES ALÉLICAS	175
<u>CONCLUSIONES</u>	182
<u>ANEXOS</u>	186
ANEXO 1: LISTADO DE ALINEAMIENTOS COMPARATIVOS ENTRE LAS DIFERENTES SECUENCIAS DE DNA ESTUDIADAS.....	187
ANEXO 2: ALINEAMIENTOS COMPARATIVOS ENTRE LAS DIFERENTES SECUENCIAS PROTEÍNICAS DEDUCIDAS A PARTIR DE LAS SECUENCIAS DEL GEN <i>BLA-SHV-1</i> ANALIZADAS	197
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	200

INTRODUCCION

1. EL GÉNERO *Klebsiella*

- 1.1. Situación taxonómica
- 1.2. Especies incluidas
- 1.3. Características morfológicas y estructurales, antigénicas y fisiológicas de *K. pneumoniae*
- 1.4. Hábitat natural y papel en patología humana de *K. pneumoniae*

2. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS E INHIBIDORES DE β -LACTAMASAS

- 2.1. Introducción
- 2.2. Mecanismo de acción
- 2.3. Mecanismos de resistencia
- 2.4. Inhibidores de las β -lactamasas
- 2.5. Preparados activos sobre *K. pneumoniae*

3. GENERALIDADES SOBRE β -LACTAMASAS

- 3.1. Definición e introducción histórica
- 3.2. Mecanismo de acción
- 3.3. β -Lactamasas bacterianas: Clasificación
 - Bacterias grampositivas
 - Bacterias gramnegativas
 - Cromosómicas
 - Extracromosómicas
- 3.4. β -Lactamasas en el género *Klebsiella*

4. GENERALIDADES SOBRE REGULACIÓN GÉNICA BACTERIANA

- 4.1. Introducción
- 4.2. Modelos de regulación de las β -lactamasas
 - Regulación por atenuación en β -lactamasas constitutivas no inducibles
 - Regulación de β -lactamasas inducibles

*Klebsiella planticola**Klebsiella ornithinolytica*

En la tabla 1 se describen las características bioquímicas que permiten diferenciar las distintas especies del género *Klebsiella*, y en la tabla 2 se presentan aquellas que permiten diferenciar las tres subespecies.

Tabla 1. Identificación bioquímica de las diferentes especies del género *Klebsiella* (7, 9-13).

Pruebas bioquímicas	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. ornithinolytica</i>
Indol	- (0%)	+ (100%)	- (0%)	v (15%)	+ (100%)
Urea	+ (95%)	+ (90%)	+ (100%)	+ (98%)	+ (100%)
Rojo de metilo	- (11%)	v (33%)	+ (100%)	v (32%)	+ (96%)
Vogues Proskauer	+ (93%)	+ (96%)	+ (100%)	+ (98%)	v (70%)
Citrato de Simmons	+ (96%)	+ (95%)	+ (100%)	+ (100%)	+ (100%)
Gelatina	- (0%)	v (64%)	- (0%)	- (10%)	- (0%)
Malonato	+ (92%)	+ (100%)	+ (100%)	+ (nd)	+ (100%)
Pectato	- (0%)	+ (100%)	- (0%)	- (0%)	+ (100%)
Dulcitol	v (33%)	v (53%)	v (20%)	v (24%)	v (10%)
Sacarosa	+ (99%)	+ (100%)	+ (100%)	+ (nd)	+ (nd)
Adonitol	+ (89%)	+ (100%)	+ (100%)	v (71%)	+ (100%)
Inositol	+ (97%)	+ (100%)	+ (100%)	+ (nd)	+ (95%)
Inulina	+ (nd)	+ (86%)	v (nd)	v (20%)	v (nd)
Mucato	+ (92%)	+ (95%)	+ (100%)	nd	Nd
Lisina descarboxilasa	+ (97%)	+ (99%)	+ (100%)	+ (100%)	+ (100%)
Arginina dihidrolasa	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
Ornitina descarboxilasa	- (0%)	- (0,3%)	- (0%)	- (0%)	+ (100%)
D-tartrato de Jordán	+ (94%)	+ (96%)	v (73%)	v (27%)	+ (100%)
Melicitosa	+ (nd)	v (36%)	+ (97%)	- (5%)	nd
Gentisato o m-hidroxi-benzoato	+ (6%)	+ (97%)	+ (nd)	- (nd)	nd
Gas de lactosa a 44,5°C	+ (nd)	- (nd)	- (nd)	- (10%)	+ (nd)
Crecimiento a 44,5°C	+ (98%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	nd
41,0°C	+ (nd)	+ (nd)	- (0%)	+ (nd)	nd
10,0°C	- (1%)	+ (100%)	+ (nd)	+ (95%)	nd
4,0°C	- (0%)	- (nd)	+ (91%)	+ (nd)	nd

v= variable, () % de resultados positivos, nd= no determinado.

Tabla 2. Identificación bioquímica de las subespecies de *K. pneumoniae* (7, 10).

Pruebas bioquímicas	Subespecies de <i>K. pneumoniae</i>		
	<i>pneumoniae</i>	<i>ozaenae</i>	<i>rhinoscleromatis</i>
Urea	+ (95%)	- (14%)	- (0%)
Rojo de metilo	- (11%)	+ (97%)	+ (100%)
Voges Proskauer	+ (93%)	- (0%)	- (0%)
Citrato de Simmons	+ (96%)	v (28%)	- (0%)
Malonato	+ (92%)	- (0%)	+ (90%)
Dulcitol	v (33%)	- (0%)	- (0%)
Sacarosa	+ (99%)	- (15%)	v (52%)
Lactosa	+ (98%)	v (26%)	- (6%)
Adonitol	+ (89%)	+ (91%)	+ (98%)
Inositol	+ (97%)	v (54%)	+ (90%)
Mucato	+ (92%)	v (25%)	- (0%)
Lisina descarboxilasa	+ (97%)	v (35%)	- (0%)
Arginina dihidrolasa	- (0%)	- (4%)	- (0%)
Ornitina descarboxilasa	- (0%)	- (1%)	- (0%)
D-tartrato de Jordán	+ (94%)	v (40%)	- (0%)
Alginato sódico	+ (88%)	- (0%)	- (0%)
Reducción de nitratos a nitritos	+ (99%)	v (85%)	+ (98%)
Esculina	+ (99%)	v (79%)	+ (95%)

v= variable, () % de resultados positivos.

1.3. Características morfológicas y estructurales, antigénicas y fisiológicas de *K. pneumoniae*

- Morfología y estructura.

Son bacilos rectos, de 0,3-1,0 μm de diámetro y 0,6-6,0 μm de longitud. Las células se disponen individualmente, en parejas o en cadenas cortas. Son inmóviles, gramnegativas y la mayor parte capsuladas. En los cultivos en medios sólidos, las cepas que producen cápsula permiten observar colonias mucosas de una consistencia viscosa. Estructuralmente al ser gramnegativas, presentan el citoplasma envuelto por una membrana citoplasmática o interna, el peptidoglicano, el espacio periplásmico, y una membrana externa (Figura 1). Adicionalmente, algunas cepas poseen fimbrias (pilis).

La *membrana citoplasmática* actúa de barrera osmótica siguiendo el modelo de bicapa fosfolipídica. Es un importante centro de actividad metabólica debido a la gran cantidad de proteínas que presenta.

El *peptidoglicano* es un heteropolímero de aminoazúcares (N-acetil-glycosamina y N-acetil-murámico), y aminoácidos (D-glutámico, meso-diaminopimédico, L- y D-alanina). Las cadenas peptídicas se unen entre sí mediante la D-alanina de una cadena y el ácido meso-diaminopimédico de otra cadena; a través de la L-alanina se unen al N-acetil-murámico, ambas uniones utilizan un enlace amida. El peptidoglicano está involucrado en el mantenimiento de la forma y la ósmosis celular.

El *periplasma* queda circunscrito entre la membrana celular y la externa. Está formado por una matriz polipeptídica y polisacarídica. Su función estaría centrada en la captación de solutos, la transformación de ciertos compuestos, como los antibióticos, y el control de la presión osmótica.

La *membrana externa* recubre la delgada estructura del peptidoglicano en las bacterias gramnegativas (Figura 2). La importancia fisiológica estriba en que: Delimita externamente al periplasma; su superficie externa cargada negativamente le permite evitar la fagocitosis y la acción del complemento; y actúa a modo de barrera de permeabilidad frente a varios agentes tóxicos (14). Su estructura es típica de una membrana unitaria con proteínas (estructurales y porinas) en la que, en la capa más externa, aparece un lípido especial, el *lipopolisacárido* (LPS). El LPS que reemplaza a los fosfolípidos en la capa más externa de la membrana externa, presenta una estructura anfifílica compuesta por tres regiones: El *lípido A*, la *región central R* (*core*) y la *cadena lateral O*. El lípido A es la región hidrofóbica de anclaje a la membrana y es endotóxico. A esta región se une un núcleo oligosacarídico (*core*) y a éste el polisacárido de características antigénicas (*antígeno O*).

La *cápsula*, que presentan muchas cepas de esta especie, es la capa más externa y está constituida por una trama laxa, hidratada y más o menos amorfa de carácter polisacarídica. Presenta propiedades antigénicas, pudiendo actuar como receptores de virus, mediadores de

interacciones celulares como la adherencia a superficies, y determinar la capacidad de invasión y resistencia a la acción de los fagocitos u otros agentes antibacterianos naturales.

Las *fimbrias* son estructuras protéicas filamentosas. La función principal es la adhesión a superficies (fimbrias tipo I y III). Existen también fimbrias sexuales (fimbrias F) necesarias para el proceso conjugativo.

Figura 1. Esquema de las estructuras de las bacterias grampositivas y gramnegativas.

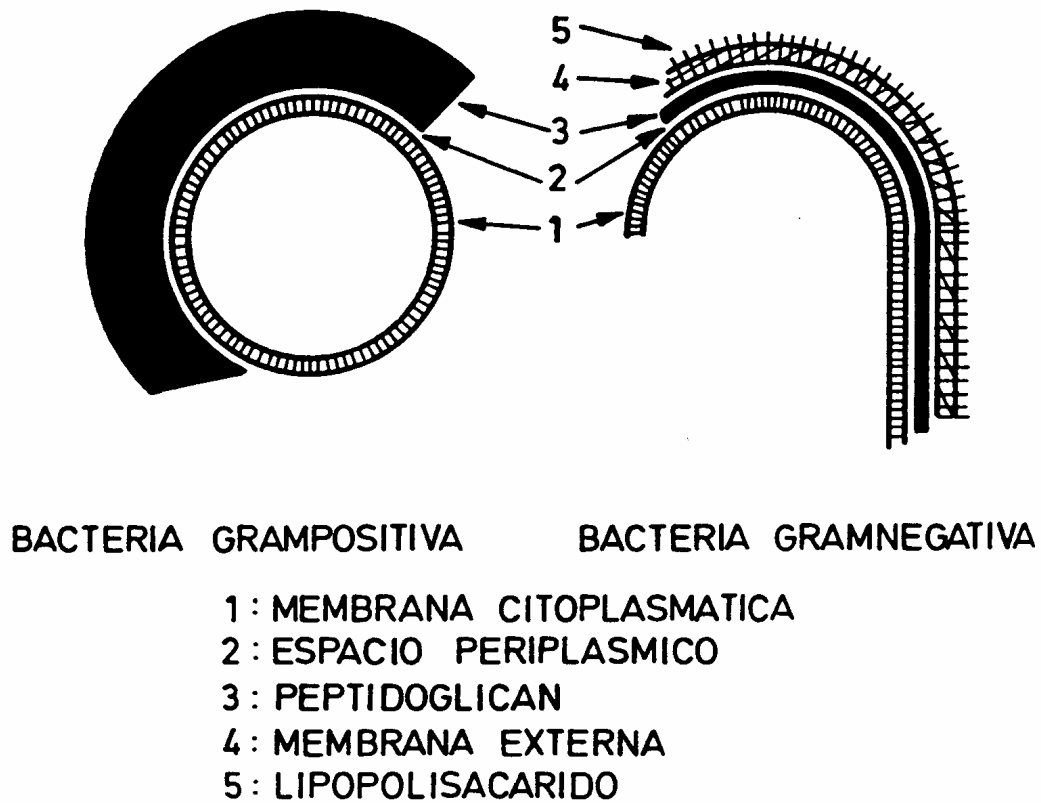
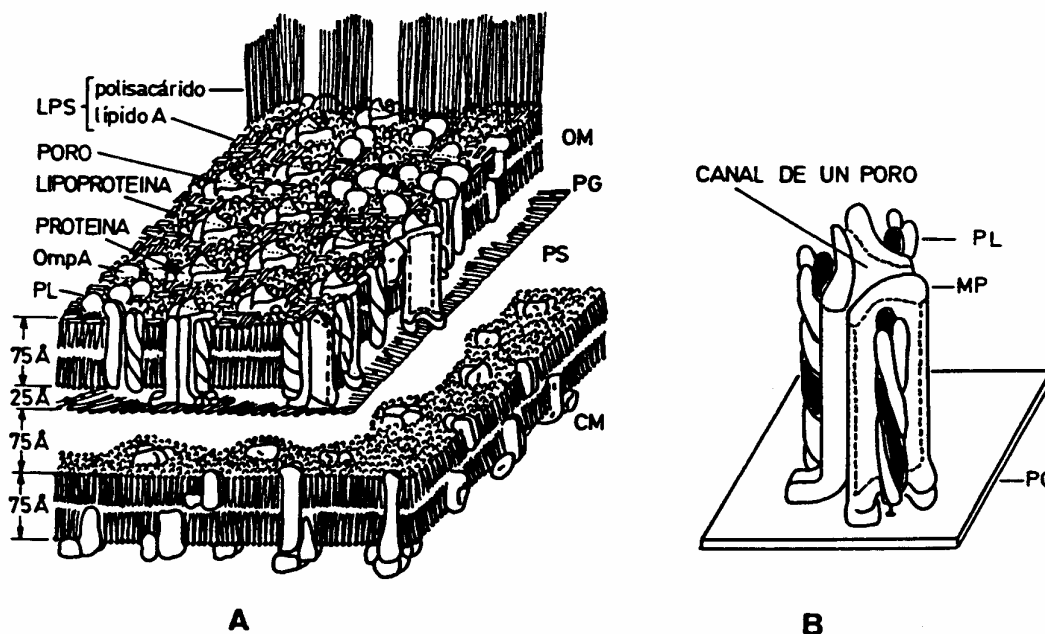


Figura 2. Esquema de la membrana externa.



- Características antigénicas.

Algunas de las estructuras descritas constituyen determinantes antigénicos que se emplean tanto en clasificación como en epidemiología (15). Entre ellas cabe destacar: El antígeno capsular K, el antígeno somático O (LPS) y las fimbrias.

El antígeno capsular K, estable al calor, es el más empleado para el tipado serológico ya que es mayor el número de tipos existentes (entre 75 y 82) con relación al antígeno O (cinco) y presenta menos dificultades técnicas (7, 10).

- Fisiología

Las klebsiellas son bacterias anaerobias facultativas por presentar tanto metabolismo fermentativo como respiratorio. Crecen bien en casi todos los medios de cultivo. Como pueden usar el citrato y la glucosa como única fuente de carbono, se ha empleado este medio selectivo para su aislamiento. La glucosa es fermentada por la vía butanodiólica. La prueba de Vogues-Proskauer es normalmente positiva, pero la acetoina puede desaparecer antes de ser detectada y aparecería como un falso negativo. Fermentan el inositol, hidrolizan la urea y no producen

ornitina descarboxilasa, exceptuando a *K. ornithinolytica*, ni H₂S (Tabla 1) (6, 8, 10, 15). Pueden fijar el nitrógeno en condiciones de anaerobiosis. La nitrogenasa únicamente es capaz de tolerar muy bajas concentraciones de O₂ (10, 16, 17).

La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 30-37°C para todas las especies del género *Klebsiella*. Particularmente *K. pneumoniae* no crece a 10 °C pero sí puede hacerlo a 44,5 °C (11).

Algunas cepas son lisogénicas y algunos fagos aislados de heces se han empleado para el fagotipado (10). Ciertas cepas producen bacteriocinas (klebecinas) (18, 19) y/o enterotoxinas lábiles o estables al calor y exotoxinas (20).

La caracterización bioquímica del porcentaje de guanina más citosina (G+C) en el género *Klebsiella* es del 53-58 mol% y en la especie *K. pneumoniae* del 56-58 mol%.

1.4. Hábitat natural y papel en patología humana de *K. pneumoniae*

El género *Klebsiella* presenta una amplia distribución en la naturaleza (aguas potables, residuales y de fábricas textiles, vegetales, suelos, etc.), de lo que se deriva que la especie *K. pneumoniae* sea un huésped habitual saprófito del hombre y los animales. Se aísla frecuentemente en las vías respiratorias altas, también formando parte de la flora intestinal y en ocasiones en la piel.

Las personas inmunodeprimidas (neonatos, ancianos, pacientes de UCI, etc.) y especialmente el ambiente hospitalario (portadores, presión antibiótica, instrumentación) son los factores más importantes para la colonización y/o el riesgo de sufrir un proceso infeccioso causado por *K. pneumoniae* (21-26).

K. pneumoniae no había sido considerada tradicionalmente como una especie especialmente patógena para el hombre. Sin embargo, quizás debido al incremento del uso de antibióticos y al empleo de procedimientos diagnósticos más agresivos, en los últimos años su papel como agente etiológico responsable de patología inespecífica ha ido en aumento (27), sobre todo de origen nosocomial (28) representando una proporción muy significativa también de las

infecciones del tracto urinario, respiratorio, septicemias e infecciones de tejidos blandos (26). Es causante de entre un 3-10% de todas las bacteriemias hospitalarias (29). Un 3% de las neumonías son atribuibles directamente a este patógeno, pudiendo llegar a representar hasta el 40% de las neumonías nosocomiales (30-32); hay que considerar que del orden del 60 % de los casos en las neumonías comunitarias y del 50% de las nosocomiales no es posible aislar el agente causal de la patología. El principal reservorio de *Klebsiella* lo constituye el tracto gastrointestinal, siendo el más importante vehículo de transmisión las manos del personal hospitalario. Debido a su gran habilidad para extenderse por el ambiente hospitalario, estas bacterias tienden a causar brotes nosocomiales, especialmente en salas de neonatos (en el 50% de los brotes) (33), de cepas multirresistentes productoras de las denominadas β -lactamasas de espectro amplificado (BLEAS) (34-38).

2. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

2.1. Introducción

Los antibióticos betalactámicos representan un amplio grupo de moléculas con actividad antibacteriana. La característica común a todos los miembros de esta familia la determina la presencia de una lactama de cuatro miembros (39). Casi todos los preparados son bicíclicos es decir, el núcleo betalactámico está unido a un segundo anillo que varía en los diferentes grupos; las penicilinas presentan una thiazolidina, mientras las cefalosporinas tienen una thiazina. Existen algunos preparados que carecen de este segundo anillo, los monobactamos, que son compuestos monocíclicos y el N amídico del anillo betalactámico está unido a un radical ácido.

Atendiendo a la estructura del núcleo, los antibióticos betalactámicos, se han clasificado de la siguiente manera (véase figura 3):

- ✓ Penicilinas (núcleos): Penam, penem, clavam, clavem, carbapenam y carbapenem.
- ✓ Cefalosporinas (núcleos): Cefam, cefem, oxacefam, carbacefam y carbacefem.
- ✓ Monobactamos.

Desde el casual descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1929 y la posterior purificación llevada a cabo por Florey y Chain en 1940, han aparecido toda una serie de preparados naturales y semisintéticos que han ido mejorando tanto su espectro de actividad como las características farmacológicas. El uso extendido de los antibióticos betalactámicos radica no sólo en la excelente capacidad antibacteriana, sino en la escasa toxicidad que presentan sobre las células eucariotas. Los antibióticos betalactámicos más frecuentemente empleados en clínica se presentan en la Tabla 3.

Figura 3. Estructura de los núcleos de los antibióticos betalactámicos.

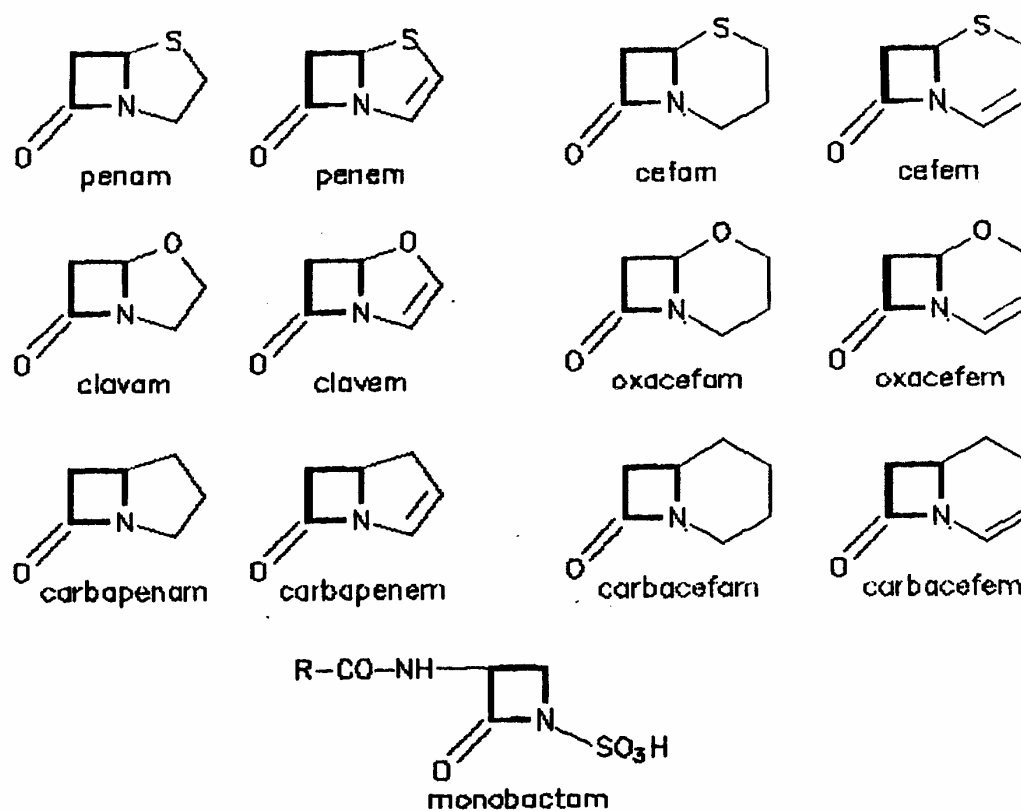


Tabla 3. Antibióticos betalactámicos más frecuentemente empleados en la clínica.

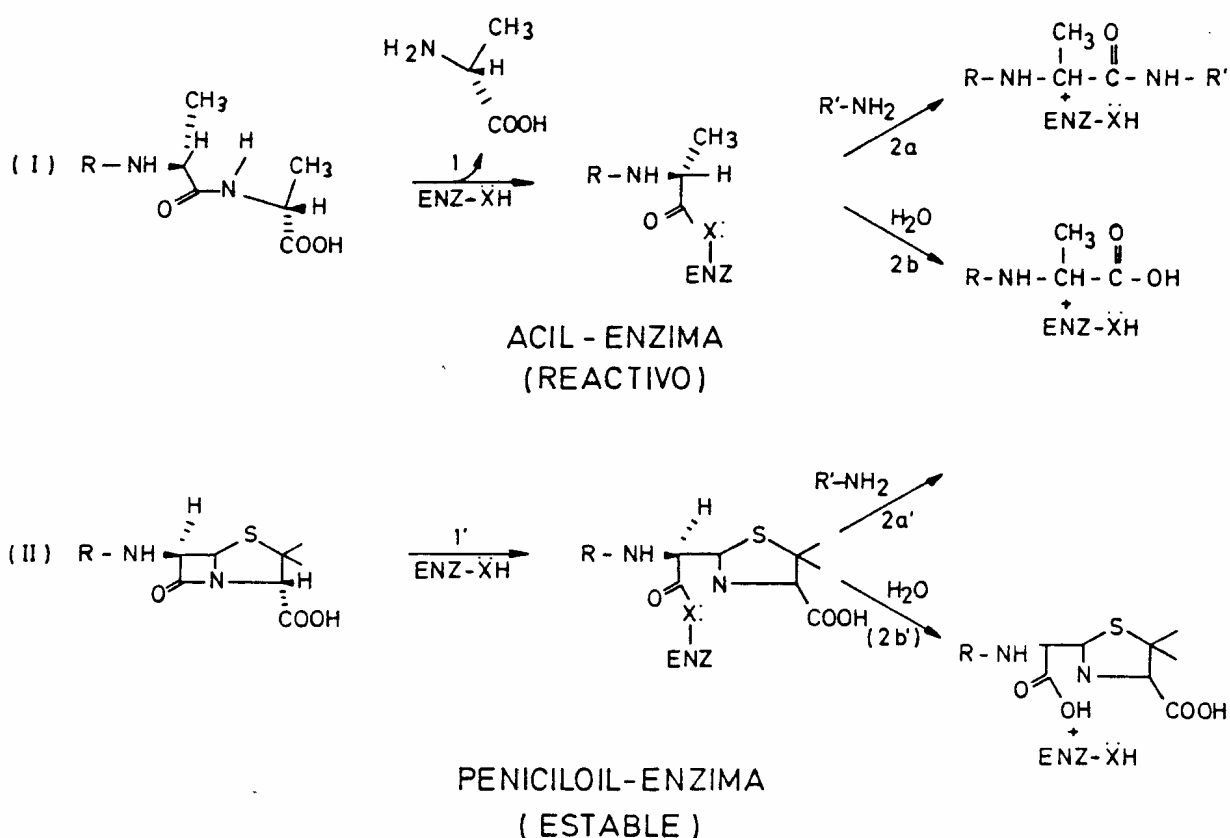
PENICILINAS	
Bencilpenicilina	Penicilina G
Isoxazolilpenicilinas	Oxacilina
Aminopenicilinas	Ampicilina, amoxicilina
Carboxipenicilinas	Carbenicilina, ticarcilina
Acilureidopenicilinas	Azlocilina, mezlocilina
Temocilina	Temocilina
CEFALOSPORINAS	
1ª Generación	Cefazolina, cefalotina
2ª Generación	Cefoxitina, cefuroxima
3ª Generación	Cefotaxima, ceftazidima
4ª Generación	Cefpiroma, cefepime
CARBAPENEMAS	Imipenem, meropenem
MONOBACTAMOS	Aztreonam, carumonam

2.2. Mecanismo de acción

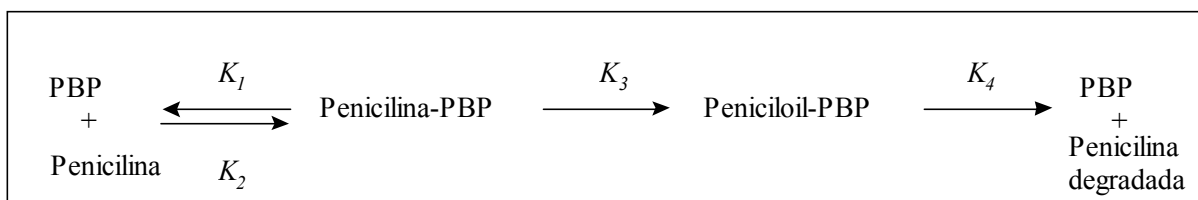
Se han descrito dos mecanismos que intervienen de una manera más o menos directa en la acción antibiótica de los betalactámicos. El primero es la inhibición directa de las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) de la membrana citoplasmática. El segundo mecanismo, inductor de la lisis celular, viene determinado por la acción concomitante de las autolisinas.

Las proteínas **PBPs** son la diana por excelencia de los antibióticos betalactámicos a las que se unen por el residuo de serina análogamente a como lo haría el sustrato natural de las PBPs, los residuos acil-D-alanil-D-alanina del peptidoglicano. La figura 4 muestra el mecanismo de la reacción de estas enzimas con el sustrato y los antibióticos betalactámicos, propuesto en 1965 por Tipper y Strominger (40).

Figura 4. Reacción de las enzimas sensibles a los antibióticos betalactámicos con los sustratos R-D-Ala-D-Ala (I) y con la penicilina (II).



Se han descrito diferentes tipos de PBPs con funciones transpeptidasas y carboxipeptidasas. Algunos betalactámicos actúan inhibiendo específicamente a una sola de estas PBPs, pero la mayoría inhiben a varias de ellas con una afinidad variable siguiendo el siguiente modelo cinético:



En la primera reacción, de carácter reversible, la enzima (PBP) reconoce al sustrato (antibiótico betalactámico) produciéndose una serie de cambios conformacionales en la enzima que acaban

formando un complejo no covalente. En una segunda reacción, que ocurre de una manera rápida, el sustrato acila un residuo de serina del centro activo de la enzima uniéndose covalentemente el antibiótico a la enzima mediante un enlace tipo éster. La reacción final de desacilación libera la enzima y un producto resultante de la inactivación del antibiótico. Un antibiótico betalactámico será considerado mejor, cuanto más rápidamente se una de forma covalente a la enzima (elevada K_3) y, permanezca unido el mayor tiempo posible (baja K_4) bloqueando y saturando las enzimas (41).

Tipper y Strominger hipotetizaron que las β -lactamasas podrían haber evolucionado a partir de enzimas relacionadas con la síntesis del peptidoglicano (PBPs) (40, 42). De la misma forma que ciertas β -lactamasas son inducibles por exposición a los antibióticos betalactámicos, también algunas PBPs son inducibles (43, 44). Sin embargo no ocurre el proceso inverso, ya que no se ha observado ninguna β -lactamasa con una función directa en el metabolismo de la pared bacteriana.

Las **autolisinas** intervienen en el crecimiento de la pared celular generando una serie de rupturas en la estructura del peptidoglicano, en la separación de las células en el momento de la división celular, en el proceso de transformación génica y en la liberación de fagos (45-47). Una vez bloqueado el crecimiento celular por la inhibición de las PBPs parece que la acción lítica de las autolisinas acabaría por completar el proceso.

2.3. Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos son fundamentalmente tres: Disminución de la capacidad del antibiótico para alcanzar su diana, alteraciones de la diana (PBP) y producción de β -lactamasas.

La **resistencia natural** a los antibióticos betalactámicos es característica de género y/o especie, y es debida a la presencia de: Factores relacionados con la permeabilidad, afinidad por las PBPs y presencia de β -lactamasas cromosómicas propias de estos géneros y especies. Por fenómenos de mutación, conjugación, transducción o transformación, se modifican o incorporan genes de resistencia que determinarán la **resistencia adquirida**. A menudo la causa de presentar resistencia a un antibiótico se debe a la combinación de varios factores,

lo que hace difícil asociar un patrón de resistencia fenotípico a una causa concreta y viceversa.

- Disminución de la capacidad del antibiótico para alcanzar la diana: Permeabilidad

La membrana externa juega un papel en la resistencia natural a los antibióticos betalactámicos. Las klebsielas por ejemplo, son naturalmente resistentes frente a la bencilpenicilina, meticilina y las isoxazolilpenicilinas. En las enterobacteriáceas las porinas son la vía de entrada de muchos antibióticos sin embargo, algunas mutaciones o la supresión de alguna porina, limita el acceso de los mismos al espacio periplásmico favoreciéndose la inactivación por las β -lactamasas (48). También es importante tener en cuenta el tamaño, la carga y el grado de hidrofobicidad de las moléculas de antibiótico. En general, una alta hidrofobicidad, un tamaño grande y la presencia de cargas negativas influyen de manera negativa en la penetración (14). Se ha descrito también la presencia de bombas de expulsión como un mecanismo de resistencia a tener en cuenta para este grupo de antibióticos, fundamentalmente en *P. aeruginosa* (49-52).

- Alteraciones de la diana: PBPs

La estructura de las PBP suele estar muy conservada. Sin embargo, hay casos en los que una represión fisiológica o una alteración mutacional sobre algunas porinas puede resultar en una menor funcionalidad y en un incremento de las CIMs para algunos preparados betalactámicos. Este tipo de alteraciones se han descrito con mayor frecuencia, entre otras, en cepas de las especies *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (41, 53, 54).

- Hidrólisis enzimática del antibiótico: β -Lactamasas

Sobre los antibióticos betalactámicos pueden actuar diferentes tipos de enzimas pero sólo las β -lactamasas tienen un papel importante en la determinación de resistencia en estos preparados. Tanto en bacterias grampositivas, donde la enzima es fundamentalmente extracelular, como en gramnegativas, donde las β -lactamasas están ubicadas en el espacio periplásmico, son estas enzimas la causa más importante de resistencia a los antibióticos betalactámicos. Las β -lactamasas hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico impidiéndose así la interacción con las PBPs (véase figura 5).

En algunas bacterias defectivas en la función de las autolisinas, se observa que existe una gran diferencia entre la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM), siendo la CBM muy superior a la CIM. Estos microorganismos pueden vivir en presencia de antibiótico y a este fenómeno se le conoce como tolerancia (55).

2.4. Inhibidores de las β -lactamasas

El término de inhibidores de β -lactamasas engloba a compuestos de estructura química muy diversa y mecanismos de acción variados. En general, los compuestos betalactámicos que pueden actuar como inhibidores, se caracterizan por ser malos sustratos de las β -lactamasas. Aunque la existencia de los inhibidores de las β -lactamasas se conoce desde los años 50, su utilidad terapéutica no fue una realidad hasta el descubrimiento del ácido clavulánico en 1977, cuando fue administrado juntamente con un antibiótico betalactámico favoreciendo la actividad antibacteriana de éste último. Según Bush y Sykes (56-58), los inhibidores de las β -lactamasas se pueden clasificar en las siguientes categorías:

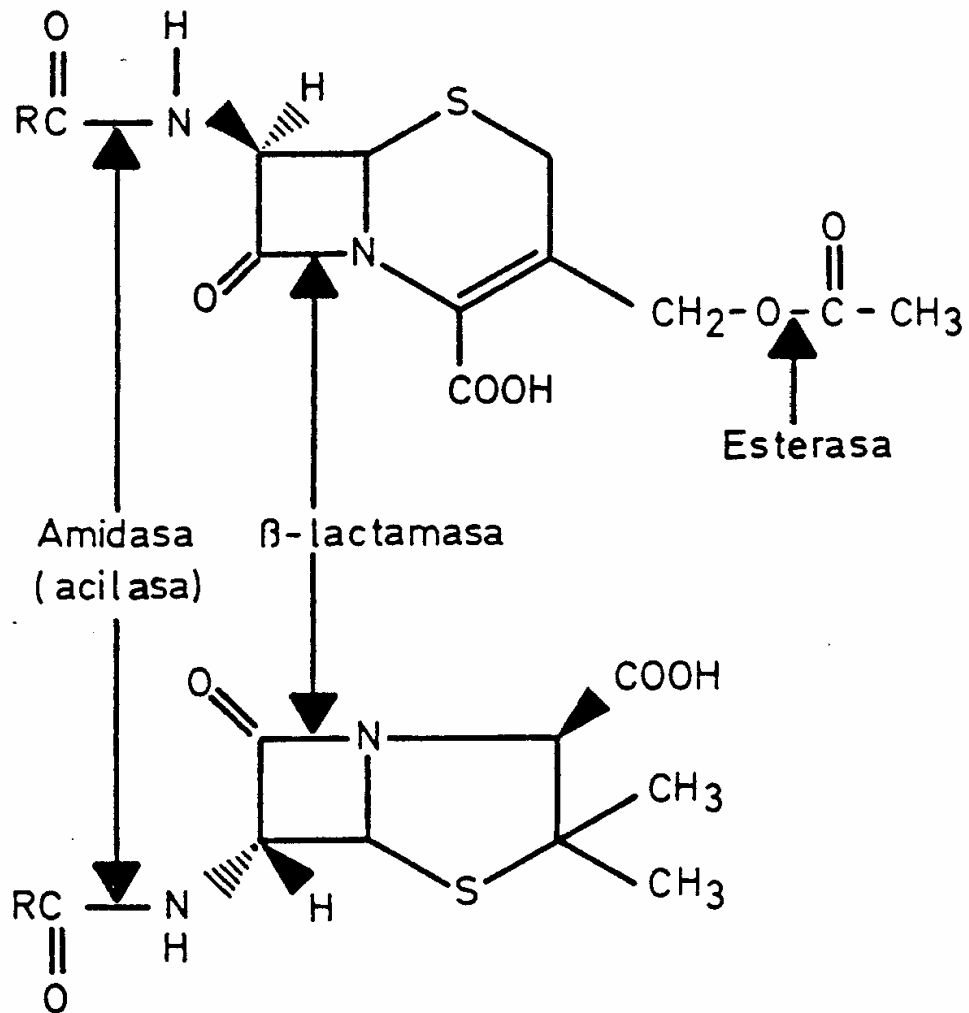
- Inhibidores reversibles

Son aquellos que no modifican la actividad enzimática de la enzima; es decir, no inactivan la enzima una vez se ha retirado el inhibidor. Existen de dos tipos:

a) *I. competitivos*. Son los que compiten por el mismo centro activo que el sustrato; la inhibición desaparece en presencia de elevadas concentraciones de sustrato. Su estructura es muy similar a la del sustrato, pero a diferencia de éstos, no son hidrolizados (p.e. peniciloatos y peniloatos) o lo son muy lentamente (p.e. cefoxitina, moxalactam, cefuroxima, cefotaxima y carbenicilina).

b) *I. no competitivos*. Se unen a un locus diferente del centro activo de la enzima y por ello no revierte su acción aumentando la concentración de sustrato.

Figura 5. Enzimas que pueden actuar sobre los antibióticos betalactámicos.



- Inhibidores irreversibles

Son aquellos que modifican uno o más grupos funcionales de la enzima, de modo que ésta es incapaz de catalizar nuevamente la conversión de sustrato en producto. Los hay de tres tipos diferentes:

- a) Modificadores de aminoácidos.** Reaccionan covalentemente con un aminoácido susceptible de la enzima produciendo la inactivación de la misma (p.e. pCMB).
- b) Inhibidores del centro activo.** Estructuralmente semejantes al sustrato, pero con un grupo funcional muy reactivo que se une a la enzima de forma irreversible (p.e. aztreonam).
- c) Inhibidores suicidas.** Son poco reactivos, pero al unirse al centro activo provocan un cambio catalítico que inactiva la enzima. Su actividad como antibiótico es escasa, pero son potentes inhibidores. El ácido clavulánico, es el ejemplo más representativo, es activo sobre casi todas las β -lactamasas con excepción de las de clase 1, 3 y 4 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, 1995. Otros ejemplos de este tipo de fármacos serían el sulbactam y el tazobactam. El sulbactam es ligeramente más activo sobre las cefalosporinas y sobre las enzimas tipo TEM. El tazobactam presenta una buena actividad inhibitoria frente a enzimas de tipo plasmídico (TEM-1, SHV-1, OXA.1, etc.) y sobre algunas enzimas cromosómicas cefalosporinasas. (59).

2.5. Preparados activos sobre *K. pneumoniae*

Las bacterias del género *Klebsiella* tienen una β -lactamasa cromosómica de amplio espectro, lo que las hace naturalmente resistentes a las amino y carboxipenicilinas. La mayoría de las cepas son sensibles al resto de los preparados betalactámicos, incluidos los monobactamos.

La especie *Klebsiella pneumoniae* se caracteriza por presentar una frecuencia extremadamente elevada de una β -lactamasa denominada SHV-1, reconocida como de codificación plasmídica en la mayoría de especies donde se ha detectado. La presencia de esta enzima las puede hacer resistentes a ureidopenicilinas y cefalosporinas de 1ª y 2ª generación.

En los últimos años están apareciendo cepas con sensibilidad disminuida o resistentes a las cefalosporinas de 3^a generación y a los monobactamos. Esta resistencia viene determinada por la presencia de β -lactamasas plasmídicas, mutantes de las β -lactamasas clásicas, que han extendido su espectro de acción a estos preparados y que se han diseminado de manera horizontal por numerosas especies de enterobacteriáceas.

3. GENERALIDADES SOBRE β -LACTAMASAS

3.1. Definición e introducción histórica

Las β -lactamasas, también llamadas penicilin (cefalosporín) amido-betalactam hidrolasas (EC 3.5.2.6.), son enzimas que pueden hidrolizar el enlace amida característico del anillo betalactámico. Estas enzimas son la causa más frecuente de las resistencias a los antibióticos betalactámicos (60-62).

Nos hemos de remontar a 1940 cuando Abraham y Chain detectaron que, en extractos de una cepa de *E. coli*, desaparecía la actividad antibacteriana de la penicilina (63). Como esta actividad se perdía por acción del calor, concluyeron que el agente causante debía de ser una enzima que denominaron “penicilinasas”. Ya en 1944, Kirby demostró la presencia de la penicilinasas en *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina G (64).

Paralelamente a la introducción de la bencilpenicilina en los años 40, comenzaron a aparecer cepas resistentes lo que obligó al desarrollo por parte de la industria farmacéutica de nuevos preparados activos sobre los estafilococos productores de penicilinasas. En 1960 se comercializó la meticilina, resistente a la acción de la penicilinasas estafilocócica. En los años siguientes se siguieron introduciendo nuevos antibióticos con mayor espectro de actividad, como la ampicilina (1961), la cefaloridina (1964) y la cefalotina, que eran activos frente a bacilos gramnegativos, pero nuevamente empezaron a aislarse cepas resistentes a estos antibióticos.

Las β -lactamasas se han encontrado en prácticamente todas las especies bacterianas que se han buscado (con las excepciones de las divisiones *Mendosicutes* y *Tenericutes*). Aunque son características de los organismos que poseen peptidoglicano en la pared celular, también se han descrito en células eucariotas como *Candida albicans*, *Candida boidinii* y *Pichia pinus* (65). Existe una enzima renal humana, la dihidropeptidasa I, que también es capaz de hidrolizar algunos preparados con núcleo carbapenem.

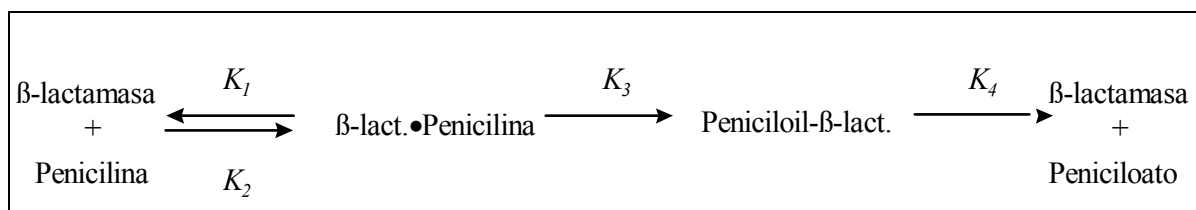
El término “penicilinasas” fue quedando en desuso con la aparición de las cefalosporinas y se acuñó el término “betalactamasas”. Sin embargo, todavía se emplean los términos penicilinasas, para cuando la betalactamasas tiene mayor actividad frente a penicilinas; cefalosporinasas,

cuando la actividad es preferentemente frente a cefalosporinas; o betalactamasas de amplio espectro cuando muestran una actividad similar frente a ambos grupos.

Tras la aparición de las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactamos a finales de los 70 y principios de los 80, se pensó que el problema de las resistencias estaba nuevamente resuelto. En 1983 apareció la primera β -lactamasa de espectro ampliado en *K. pneumoniae* y en *Serratia marcescens* (66); en 1985 se volvieron a describir nuevas β -lactamasas con estas características (67). Posteriormente la aparición de más β -lactamasas de este tipo, así como las producidas por cepas hiperproductoras de β -lactamasa cromosómica con actividad hidrolítica sobre estos preparados, alertaron nuevamente del serio problema que plantean estas enzimas. Sin embargo, la gran cantidad de nuevos antibióticos betalactámicos que han ido apareciendo han permitido, al tiempo que una mayor disponibilidad de arsenal terapéutico, una mejor caracterización de las β -lactamasas, siendo actualmente ya más de 190 las β -lactamasas descritas (68, 69).

3.2. Mecanismo de acción

Las β -lactamasas (Enzima) unen el antibiótico betalactámico (Sustrato) formando un complejo no covalente (Enzima•Sustrato). Si el complejo no se disocia, se forma un enlace entre el enzima y el sustrato produciéndose una estructura acil-enzima por unión del antibiótico con el grupo hidroxilo de la serina del centro activo. Finalmente el producto de la hidrólisis se desprende de la enzima quedando ésta nuevamente libre para su acción (56, 60, 70, 71).



Cuando el núcleo betalactámico de las penicilinas es hidrolizado por una β -lactamasa se produce estequiométricamente el correspondiente peniciloato, compuesto inactivo, relativamente estable y fácilmente detectable. El primer producto generado tras el ataque de la β -lactamasa sobre una cefalosporina es, hipotéticamente, un cefalosporato análogo al

peniciloato. Sin embargo, los cefalosporatos son muy inestables y se degradan rápidamente a moléculas más sencillas por lo que son muy difíciles de detectar como tales (72).

Como ya se ha comentado al hablar de los mecanismos de acción de los antibióticos betalactámicos sobre las PBPs, según la hipótesis de Tipper y Strominger (1965) las β -lactamasas habrían evolucionado a partir de las enzimas relacionadas con la síntesis del peptidoglicano como respuesta a la producción de antibióticos betalactámicos por parte de algunas bacterias y hongos (73).

3.3. β -Lactamasas bacterianas. Clasificación

Las β -lactamasas bacterianas son un complejo grupo de enzimas con propiedades diferenciales en función del sustrato que hidrolizan o las inhibe (parámetros cinéticos), su localización (intra o extracelular), su codificación (cromosómica y/o extracromosómica), expresión genética (constitutiva o inducible) y otras propiedades físico-químicas (peso molecular, pI, inmunología). Todas estas características han sido utilizadas para establecer una clasificación funcional de las β -lactamasas.

Sawai y cols., 1968, describieron las penicilinasas y las cefalosporinasas empleando la respuesta a distintos antisueros como un discriminador adicional (74). En 1973, Richmond y Sykes propusieron otro esquema formado por cinco grupos de enzimas basado en sus perfiles de sustrato (75). Sykes y Matthew en 1976, introdujeron a esta clasificación las denominadas enzimas plasmídicas que podían diferenciarse además por su punto isoeléctrico (61). Pero fue Ambler en 1980, quien propuso la primera clasificación basada en la estructura molecular (76): La Clase A, penicilinasas que poseen un residuo de serina en el centro activo; y la Clase B, cefalosporinasas, metalo- β -lactamasas que requieren zinc como cofactor. Jaurin y Grundström en 1981 completaron esta clasificación añadiendo la Clase C (77); cefalosporinasas con una serina en su centro activo. A finales de los años 80, se

Tabla 4. Clasificaciones propuestas para las β -lactamasas bacterianas.

Grupos Bush, Jacoby y Medeiros 1995	Grupos Bush 1989	Clases Richmond y Sykes 1973	Tipos Mitsuhashi-Inoue 1981	Clases Moleculares	Sustratos preferentes	Inhibidos por AC / EDTA	Enzimas representativos
1	1	Ia, Ib, Id	C-asa	C	CFL	- -	AmpC, MIR-1
2a	2a	NI	P-asa V	A	P	+ -	P-asas de bacterias grampositivas
2b	2b	III	P-asa I	A	P, CFL	+ -	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2b'	NI	Cx-asa	A	P, CFL, C3G, MNB	+ -	TEM-3 a 29, TEM-42, TEM-46 a 49, TEM-52 a 57 y TEM-59 a 61 SHV-2 a 9 y SHV-12 <i>K. oxytoca</i> K1
2br	NI	II, V	NI	A	P	± -	TEM-30 a 41, TEM-44 a 45, TEM-50, 51, 58 y 59, SHV-10, TRC-1
2c	2c	V	P-asa IV	A	P, Ca	+ -	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	Ic	P-asa II P-asa III	D	P, CLX	+ -	OXA-1 a OXA-21, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	NI	Cx-asa	A	CFL	+ -	C-asa inducible de <i>P. vulgaris</i>
2f	NI	NI	NI	A	P, CFL, CBP	+ -	NMC-A, Sme-1*
3	3	NI	NI	B	betalact. en gral. incl. CBP	- +	L1, CcrA**
4	4	NI	NI	ND	P	- ?	P-asa***

C-asa: Cefalosporinasa; P-asa: Penicilinas; Cx-asa: Cefuroximasas; P: Penicilinas; CFL: Cefalosporinas; C3G: Cefalosporinas de 3ª generación; CLX: Cloxacilina; CBP: Carbapanems; MNB: Monobactams; betalac: Betalactámicos; Ca: Carbenicilina; NI: No incluido; ND: No determinado; AC: Acido Clavulánico.

* NMC-a de *Enterobacter cloacae* y Sme-1 de *Serratia marcescens*.

** L-1 de *Strenotrophomonas maltophilia* y CcrA de *Bacteriodes fragilis*.

*** Penicilina de *Burkholderia cepacia*.

Modificado de Bush-Jacoby-Medeiros 1995 (69).

segrega la Clase D, enzimas que hidrolizan oxacilina, de otras β -lactamasas tipo serina. Con el fin de establecer una clasificación más homogénea, en 1988 primero (74) y después nuevamente en 1989 (78-80), Bush estableció una clasificación que intentaba unificar los criterios de las clasificaciones anteriormente propuestas por Richmond, Sykes y Ambler. Finalmente la clasificación más reciente ha sido propuesta por Bush-Jacoby-Medeiros en 1995 (69) (Tabla 4). En ella se emplean los criterios de funcionalidad clásicos con los datos moleculares más actuales a la vez que se intenta correlacionar los esquemas de clasificación más frecuentemente citados.

Es importante para clarificar los criterios empleados en la clasificación, establecer las características diferenciales entre las β -lactamasas producidas por especies grampositivas y gramnegativas, así como si éstas son de expresión cromosómica o plasmídica.

- **Bacterias grampositivas**

Incluidas dentro del Grupo 2a (Tabla 4), producen una β -lactamasa de localización fundamentalmente extracelular, de producción inducible, actividad preferentemente penicilinasas que se inhibe por acción del ácido clavulánico; aunque existen excepciones (*Nocardia* y micobacterias) que son intracelulares y de amplio espectro.

Las β -lactamasas de *S. aureus* (A, B, C, y D) representan el estándar de este grupo y sus genes suelen estar codificados por plásmidos. *B. cereus* sin embargo presenta β -lactamasas (I-III) de codificación cromosómica.

- **Bacterias gramnegativas**

Las β -lactamasas producidas por estas bacterias presentan una gran diversidad. Se localizan en el espacio periplásmico. Casi todas las bacterias gramnegativas producen una, o más de una, β -lactamasa codificada por genes cromosómicos y en ocasiones pueden expresar otras de origen extracromosómico.

β -Lactamasas cromosómicas

Las β -lactamasas codificadas por genes cromosómicos son características de género e incluso especie específicas, por lo que se las considera que tienen valor taxonómico (81). El

nivel de expresión de los genes codificantes suele ser bajo (síntesis constitutiva), pero puede verse incrementado de manera importante por diversos factores:

- ✓ Inducción con determinados antibióticos betalactámicos.
- ✓ Mutaciones en genes reguladores de la expresión génica (82).
- ✓ Por alteraciones en la región del promotor o en la atenuadora (83-86).
- ✓ Por amplificación génica (duplicaciones) (87).

Atendiendo a la especificidad del sustrato que hidrolizan y a las sustancias que las inhiben, se han clasificado en diez grupos (ver Tabla 5).

Grupo 1. Cefalosporinasas débilmente inhibidas por ácido clavulánico. Incluye las β -lactamasas de las especies siguientes: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila* (A1), *A. sobria*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Proteus rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* (AmpC, S2).

Grupo 2a. Penicilinasas inhibidas por ácido clavulánico. Incluye la enzima LEN-1 de *Klebsiella pneumoniae*.

Grupo 2b. β -Lactamasas de amplio espectro inhibidas por el ácido clavulánico. Incluye las β -lactamasas de las especies siguientes: *Alcaligenes denitrificans* sub. *xyloxydans*, *Citrobacter diversus* (Form I) y *Klebsiella pneumoniae* (TLE-2).

Grupo 2be. Son β -lactamasas de espectro ampliado inhibidas por ácido clavulánico. Forman parte de este grupo la β -lactamasa K1 de *K. oxytoca*, y PER-1 de *P. aeruginosa*, *B. cepacia* y *P. pseudomallei*.

Grupo 2c. Formado por β -lactamasas con actividad hidrolítica sobre la carbenicilina e inhibidas por ácido clavulánico. *Aeromonas hydrophila* (AER-1), *Moraxella catarrhalis* (BRO-1, BRO-2), *Proteus mirabilis* (BRO-2).

Grupo 2d. Son β -lactamasas con actividad frente a cloxacilina. Se han descrito en *Aeromonas sobria* (OXA-12), *A. denitrificans* (TipoA OXA) y *Pseudomonas* (M-OXA).

Grupo 2e. Cefalosporinasas inhibidas por ácido clavulánico. Incluye: *Bacteriodes fragilis* (CepA), *B. uniformis* (CblA), *B. vulgatus* (CfxA), *Citrobacter diversus* (Form II), *Proteus vulgaris* y *P. penneri* (FPM-1) y *Yersinia enterocolitica* (Bla-I).

Grupo 2f. Formado por no metalo- β -lactamasas de Clase A que hidrolizan carbapenemas. *Enterobacter cloacae* (IMI-1 y NMC-A) y *Serratia marcescens* (Sme-1).

Grupo 3. Metalo- β -lactamasas que hidrolizan carbapenems y no son inhibidas por ácido clavulánico. *Aeromonas hydrophila* (CphA/A2, A2h), *Bacteroides fragilis* y *Flavobacterium odoratum* (CcrA), *Stenotrophomonas maltophilia* (L-1).

Grupo 4. Penicilinasas no inhibidas por ácido clavulánico. En las especies *Burkholderia cepacia*, *A. faecalis* y *B. fragilis*.

Tabla 5. β -lactamasas cromosoma-dependientes.

Grupo	Huésped original	Tasas de hidrólisis relativas ⁽¹⁾							IC ₅₀ μ M		pI
		CLX	CF	P	AZT	CA	AM	CAZ	AC	SUL	
1	<i>A. calcoaceticus</i> (inducible)	ND	100	3	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND
1	<i>A. hydrophila</i> (inducible)	0,3	ND	3	1,5	ND	ND	0,3	40	ND	7
1	<i>E. cloacae</i>	ND	100	3	ND	<1	2	<1	100	5,6	8,2
1	<i>P. aeruginosa</i>	<1	100	29	ND	<1	<1	ND	10 ³	8	8,7
1	<i>E. coli</i>	10 ⁻²	100	35	<0,01	0,01	3,2	ND	190	ND	9,2
2a	<i>K. pneumoniae</i>	ND	27	ND	ND	ND	100	ND	ND	ND	7,1
2b	<i>C. diversus</i>	0,01	160	100	ND	10	21	ND	<80	ND	6,8
2be	<i>K. oxytoca</i>	ND	36	100	15	20	61	0,01	0,1	1,6	6,5
2c	<i>A. hydrophila</i> AER	ND	26	100	ND	98	38	ND	ND	ND	5,9
2d	<i>A. sobria</i> AERM14	190	14	100	ND	160	ND	ND	0,009	0,24	8,6
2e	<i>B. fragilis</i>	ND	100	1	ND	ND	ND	ND	<1	ND	4,9
2f	<i>E. cloacae</i> IMI-1*	ND	10 ³	100	140	ND	540	0,02	0,3	1,8	7
3	<i>S. maltophilia</i> **	42	6	100	ND	46	58	ND	400	400	6,9
4	<i>B. cepacia</i>	ND	3,9	100	<0,1	83	ND	<0,1	50	400	ND

⁽¹⁾ Tasa de hidrólisis relativas a las observadas para cefaloridina o penicilina G.

* Tasa de hidrólisis imipenem 250 μ M.

** Tasa de hidrólisis imipenem 24 μ M.

Abreviaturas: CLX, cloxacilina; CF, cefaloridina; P, penicilina; AZT, aztreonam; CA, carbenicilina; AM ampicilina; AC, ácido clavulánico; SUL, sulbactam; pI, punto isoeléctrico; IC₅₀, concentración que inhibe el 50% de la actividad enzimática.

β-Lactamasas extracromosómicas

Son β-lactamasas codificadas por genes localizados en plásmidos o en transposones. En las bacterias gramnegativas se han descrito un gran número diferente de estas enzimas, que se diferencian entre ellas por su pI, peso molecular y su espectro de hidrólisis e inhibición. En general, son enzimas con actividad hidrolítica de amplio espectro y se inhiben por ácido clavulánico. Suman su actividad, que por lo general es más elevada, a la de la β-lactamasa cromosómica. Se encuentran ampliamente distribuidas entre los diferentes géneros y especies bacterianas. La limitación para su distribución taxonómica radica en la capacidad de transposición, en el grado de incompatibilidad (88) y en la capacidad de autotransferencia de los plásmidos (64). La expresión génica de estas enzimas es constitutiva y su tasa de síntesis depende de:

- ✓ Número de copias del plásmido o transposón en la célula.
- ✓ Eficiencia del promotor.
- ✓ Amplificación génica.

Atendiendo tanto a su espectro de actividad como a su clase molecular, se las clasifica de la siguiente manera:

1. Enzimas de amplio espectro (sin actividad sobre cefalosporinas de 3ª generación), clase molecular A y D

Este grupo está englobado en el Grupo 2b, 2c y 2d de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, 1995, sin embargo, debido a la importancia cuantitativa y a su gran difusión, merecen mención especial TEM-1, TEM-2 y SHV-1 sobre el resto de las enzimas.

➤ TEM-1 y TEM-2.

Deben su nombre a las tres primeras letras del apellido (Temoniera) de la paciente griega de la que se aisló la cepa portadora de esta enzima (TEM-1), en el año 1965 por Datta y Kontomichalou (89). Existen dos variantes, TEM-1 y TEM-2 que se diferencian por su punto isoeléctrico; 5,4 para TEM-1 y 5,6 para TEM-2. Estructuralmente sólo se diferencian en un aminoácido; la lisina que sustituye a la glutamina en posición 37 de la β-lactamasa TEM-2.

La enzima TEM-1 es la más frecuente y aunque se localiza preferentemente en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (90, 91), también se aísla en: *P.*

aeruginosa (92), *H. influenzae* (93), *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* (64), etc. La gran distribución tanto geográfica como específica de esta enzima se debe a que los genes que la codifican se encuentran ubicados en transposones (Tn 1, 2, 3, 4, 401, 801, 901, 902, 1701, 2601, 2602) de alta frecuencia de transposición, entre 10^{-2} a 10^{-4} (94, 95). Además estos transposones se encuentran asociados a plásmidos de muy diversos grupos de incompatibilidad, al menos 18 para TEM-1 y 7 para TEM-2 (96).

➤ SHV-1.

Fue descrita por Pitton en 1972 por lo que también se la conoce como Pit-2 (97). Se la designó SHV (SulfHidril Variable) por su comportamiento frente a la inhibición por para-cloro-mercurio-benzoato (pCMB); el pCMB logra inhibir la hidrólisis de la cefaloridina, pero no de la bencilpenicilina. Si bien esta característica posiblemente fuese un artefacto ya que no ha podido ser remedada posteriormente. Tiene un espectro de hidrólisis similar al de TEM-1, pero con mayor actividad frente a la ampicilina.

La determinación de la localización extracromosómica de esta β -lactamasa la propusieron concomitantemente en 1979 Mattew y cols., y Nugent y Hedges (98, 99). Se ha identificado en varias especies de enterobacteriáceas, pero es *K. pneumoniae* la especie donde aparece con mayor frecuencia, lo que ha llevado a asumir que en esta especie su codificación podría ser fundamentalmente cromosómica. Se volverá a incidir más adelante sobre las particularidades de esta enzima en *Klebsiella pneumoniae*, cuando se hable de las β -lactamasas que se identifican en esta especie.

- Otras β -lactamasas del Grupo 2b: HMS-1, ROB-1, OHIO-1, TLE-1, TLE-2, LXA-1. Poseen actividad similar a TEM-1 pero son mucho menos frecuentes.
- Enzimas tipo OXA. Pertenecen al Grupo 2d. Se conocen 11 variantes con pI diferenciables. Hidrolizan la cloxacilina más rápidamente que la bencilpenicilina.
- Enzimas con actividad carbenicilinasas. Pertenecen al Grupo 2c: PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3, CARB-4 y SAR-1.

2. β -lactamasas de espectro ampliado derivadas de TEM y SHV.

Como se ha comentado previamente en el punto 3.1., en 1983 se describió la primera de estas β -lactamasas (66) en Alemania. Esta β -lactamasa presentaba actividad hidrolítica frente a cefalosporinas de tercera generación y monobactamos. Desde entonces han ido apareciendo numerosas cepas que expresan estas enzimas mutantes derivados fundamentalmente de las enzimas parentales TEM-1 y SHV-1.

Estas enzimas se han incluido en el Grupo 2be, como β -lactamasas de espectro ampliado que se inhiben por ácido clavulánico por el que presentan una gran afinidad. Son inhibidos además por otros inhibidores como el sulbactam y el tazobactam. Esta propiedad se emplea en el laboratorio para su detección mediante la técnica denominada de sinergia en doble disco (100). Inicialmente se les denominó con los términos ceftazidimasas (CAZ) o cefotaximasas (CTX) según su fenotipo de resistencia fuese preferentemente activo frente a ceftazidima o cefotaxima. Actualmente se emplea las iniciales de la β -lactamasa TEM o SHV seguido de un número de orden (TEM-3, TEM-4,..., SHV-2, SHV-3,...). Se han descrito ya hasta la TEM-96 y hasta la SHV-37. En la Tabla 6 se muestran los perfiles de hidrólisis de las β -lactamasas parentales y alguna sus derivadas expresadas en *E. coli* K12. La sensibilidad frente al imipenem permanece inalterable. La mayoría de estas β -lactamasas han sido aisladas en cepas de *K. pneumoniae* de origen hospitalario. En estudios publicados por Philippon y cols. en 1989, se observó que en Francia un 9% de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas son productoras de β -lactamasas de espectro ampliado (101).

Todas las β -lactamasas de espectro ampliado conservan en la estructura de su centro activo un residuo de serina; en las tipo TEM el centro activo está situado en la posición 68, mientras que en las de tipo SHV se encuentra en la posición 66. Las diferentes mutaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos, que provocan cambios tanto en la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) como en la estructura terciaria de la proteína, han hecho posible la aparición de las diferentes β -lactamasas con espectro ampliado (Tabla 7).

Tabla 6. Espectro de hidrólisis ($\mu\text{g/mL}$) de las β -lactamasas de espectro ampliado expresado en *E. coli* K12.

β-lactamasa	Cefaloridina	Cefotaxima	Ceftazidima	Aztreonam	Imipenem
R*	4	0,02	0,2	0,06	0,12
TEM-1	32	0,05	0,2	0,06	0,12
TEM-2	32	0,03	0,2	0,06	0,12
TEM-3 (CTX-1)	64	2,00	8,0	1,00	0,12
TEM-4	256	8,00	16,0	2,00	0,12
TEM-5 (CAZ-1)	128	2,00	32,0	1,00	0,12
TEM-6	8	0,50	128,0	32,00	0,25
TEM-7	16	0,05	32,0	1,00	0,06
TEM-8	32	1,00	128,0	32,00	0,12
TEM-9	64	1,00	32,0	2,00	0,12
SHV-1	16	0,01	0,2	0,06	0,12
SHV-2	256	4,00	2,0	1,00	0,12
SHV-3	128	2,00	2,0	0,50	0,12
SHV-4	256	4,00	64,0	32,00	0,12
SHV-5	256	4,00	32,0	32,00	0,12

* Cepa empleada como receptora, *E. coli* K12.

Según Philippon y cols., 1989 (101).

Tabla 7. Variaciones alélicas de las diferentes β -lactamasas que determinan cambio en la actividad enzimática (Tomado de: <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

β -lactamasa	Posición de los residuos																				pI	Ref.						
	7	8	35	43	48	54	75	80	89	122	126	129	130	140	156	158	173	179	187	188			192	193	205	226	238	240
SHV-1	Y	I	L	R	E	G	V	V	E	L	A	M	S	A	G	N	N	D	A	A	K	L	R	P	G	E	7,6	(102)
SHV-2																									S		7,6	(102)
SHV-2A			Q																						S		7,6	(103)
SHV-3																							L		S		7,0	(104)
SHV-4																								L	S	K	7,8	(105)
SHV-5																									S	K	8,2	(106)
SHV-6																		A									7,6	(107)
SHV-7		F		S																					S	K	7,6	(108)
SHV-8																		N									7,6	(109)
SHV-9							Del						R								N	V		S	K	8,2	(110, 111)	
SHV-10						Del					G	R										N	V	S	K	8,2	(111)	
SHV-11			Q																								7,6	(112)
SHV-12			Q																					S	K	8,2	(112)	
SHV-13			Q																						A		7,6	(113)
SHV-14																												(114)
SHV-15																												(115)
SHV-16																												(116)
SHV-17																												Retirada
SHV-18		F		S																					A	K		(117)
SHV-19																												(118)
SHV-20																												(118)
SHV-21																												(118)
SHV-22																												(118)
SHV-23																												(118)

Continuación Tabla 7.

β-lactamasa	Posición de los residuos																				pI	Ref.						
	7	8	35	43	48	54	75	80	89	122	126	129	130	140	156	158	173	179	187	188			192	193	205	226	238	240
SHV-24																		G										(119)
SHV-25			Q									V																(120)
SHV-26																			T									(121)
SHV-27															D													(122)
SHV-28																												(123)
SHV-29																												(124)
SHV-30																												(125)
SHV-31																												(126)
SHV-32												V			D													(127)
SHV-33																									S			(127)
SHV-34																												(128)
SHV-35																												(129)
SHV-36																												(129)
SHV-37																												(129)

Nota: Las secuencias de las cepas SHV-28 a la SHV-31 y SHV-34 a la SHV-37, todavía no han sido liberadas.

3. β -lactamasas derivadas de TEM y SHV resistentes a los inhibidores.

Se incluyen en el grupo 2br y lo forman las β -lactamasas TEM-30 a la TEM-41, TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-50, TEM-51, TEM-58, TEM-59 y SHV-10. Son β -lactamasas que derivan de las enzimas TEM y sólo una de la enzima SHV que poseen una actividad reducida por los inhibidores de las β -lactamasas. Las cepas portadoras de estas enzimas son resistentes a la combinación de betalactámicos con inhibidores, como el ácido clavulánico, el sulbactam o el tazobactam, son más sensibles a las cefalosporinas de primera generación que la enzima tipo TEM-1 y son también sensibles a las cefalosporinas de tercera generación.

4. β -lactamasas de espectro ampliado no relacionadas con TEM y SHV.

- PER-1, PER-2, CTX-M-1/MEN-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-9, Toho-1, Toho-2, VEB-1.

Pertenece a la clase molecular A. Determina resistencia a penicilinas, cefalosporinas y monobactamos, pero no a carbapenemas y cefamicinas (130). Se inhiben bien con ácido clavulánico. Se definen dos grandes grupos, las enzimas que hidrolizan preferentemente la cefotaxima (cefotaximasas) y las que lo hacen preferentemente sobre la ceftazidima (ceftazidimasas).

Entre las cefotaximasas se encuentran CTX-M-1/MEN-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-9, Toho-1, Toho-2. CTX-M-1 y MEN-1 son la misma enzima (131, 132) con un pI de 8,2. CTX-M-2 tiene una actividad mayor sobre las cefalosporinas de 3ª generación que la anterior (CIMs cuatro a ocho veces superiores) y un pI de 7,9. Se piensa que las diferencias en cuanto a su actividad hidrolítica se deba a una mayor expresión del promotor del gen *bla-CTX-M-2*. Estas enzimas han sido descritas en diferentes enterobacteriáceas y en zonas geográficamente tan alejadas como Alemania (CTX-M-1), Francia (MEN-1) y Argentina (CTX-M-2) (133-135); las dos primeras en *E. coli* y la última en *Salmonella typhimurium*. Posteriormente se han encontrado también en *K. pneumoniae* en Israel (1992) y Paraguay (1994). CTX-M-3, una enzima de pI= 8,4 muy homólogo a CTX-M-1/MEM-1 (sólo cuatro aminoácidos distintos) se identificó más recientemente en un hospital polaco (136). CTX-M-4 (137, 138), enzima de pI= 8,4 identificada en un plásmido transportado en *S. typhimurium* aislada en San Petersburgo. CTX-M-5

(139), se aisló también de *S. typhimurium* en Riga (Letonia). Su pI es de 8,8 y el gen que la codifica difiere solamente en 11 nucleótidos del gen que codifica para CTX-M-2. CTX-M-6 como algunas CTX-M-5 fue aislada en cepas de *Salmonella typhimurium* en Grecia (140). CTX-M-9 ha sido descrita recientemente en España aislandose de una cepa de *E. coli* (141). Toho-1 fue descrita en una cepa de *E. coli* aislada en Japón (142); su pI es de 7,8 y presenta un alto grado de homología con la β -lactamasa cromosómica D488 de *K. oxytoca* y con CTX-M-2. Toho-2 (143), que también fue aislada en Japón, posee una gran homología con Toho-1, pero con una mayor afinidad por el tazobactam como inhibidor.

El grupo de las ceftazidimasas lo forman PER-1, PER-2 y VEB-1. La β -lactamasa PER-1 con un pI de 5,4 parece que está bien establecida en Turquía donde se han detectado numerosos aislamientos de *P. aeruginosa* y *Salmonella* spp. de origen hospitalario (73, 130). Son altamente resistentes a ceftazidima (CIM >256 $\mu\text{g/mL}$), pero son muy sensibles a la combinación de ésta con ácido clavulánico (CIM 1-4 $\mu\text{g/mL}$), una sensibilidad levemente disminuida a piperacilina (CIM 8-16 $\mu\text{g/mL}$) y capaz de hidrolizar el ceftibuteno (cefalosporina oral de 4ª generación estable frente a la mayoría de β -lactamasas de clase molecular A). Los genes que la codifican han sido encontrados en plásmidos distintos lo que sugiere que actúe algún mecanismo de transposición. PER-2 y VEB-1, muestran un pI de 5,4 y 5,35 respectivamente y tienen también un perfil de sensibilidad similar a PER-1. Las cepas productoras de PER-2 han sido descritas en Argentina (144) en *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *S. typhimurium*. VEB-1 (145) ha sido descrita por un grupo francés en un aislamiento único de *E. coli* de un niño vietnamita.

➤ IMP-1, CcrA

Incluidas en la clase molecular B. Son metalo- β -lactamasas. Se caracterizan por que confieren resistencia a carbapenemas, mantienen la sensibilidad a aztreonam y no recuperan la sensibilidad con los inhibidores. IMP-1 es una β -lactamasa que produce resistencia por igual a imipenem y meropenem. Sólo se ha aislado en Japón, país donde se utilizan estos antibióticos de manera muy extendida, en

cepas de *P. aeruginosa* y *S. marcescens* (146-148). La β -lactamasa CcrA (149-152) ha sido descrita en aislamientos únicos en *Bacteriodes fragilis* en Japón, *Acinetobacter calcoaceticus* en Cuba y en una cepa de *K. pneumoniae* en Japón.

- MIR-1, ACT-1, CMY-1, CMY-1a, CMY-2, CMY-3, BIL-1, FOX-1, FOX-2, FOX-3, LAT-1, LAT-2, LAT-3, LAT-4, FEC-1, MOX-1, MOX-2, MOR-1
Clase molecular C. Aisladas en *Klebsiella* y *E. coli*. Codificadas por plásmidos que han incorporado los genes cromosómicos *AmpC* de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. y *Citrobacter freundii*. Causan resistencia a todos los antibióticos betalactámicos excepto las carbapenemas, temocilina y mecilinam. No se recupera la sensibilidad al añadir los inhibidores de β -lactamasas. Representan un problema creciente ya que estas enzimas sufren una distribución geográfica mucho más amplia que las dos anteriores (73, 153-155).

- OXA-11, OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-17
Clase molecular D. Las β -lactamasas OXA-11, OXA-14, OXA-16 y OXA-17 derivan de la enzima OXA-10 (PSE-2). Se aislaron de *P. aeruginosa* en Ankara (156). Su perfil de hidrólisis muestra una alta resistencia a cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y aztreonam y sensibilidad conservada frente a carbapenemas. Son ligeramente inhibidas por los inhibidores. La OXA-15 aislada también de *P. aeruginosa* deriva de OXA-2. En el análisis por IEEA se observan dos bandas con pI de 8,7 y 8,9. Condiciona a resistencia a cefalosporinas de 3ª generación, especialmente ceftazidima y responde mal a los inhibidores. Se diferencia de OXA-2 sólo en un aminoácido, la glicina en posición 150 sustituye al aspartato.

3.4. β -Lactamasas en el género *Klebsiella*.

La expresión de β -lactamasas, tanto de codificación cromosómica como plasmídica, es la causa numéricamente más importante de producción de resistencias a los antibióticos betalactámicos en el género *Klebsiella*.

- **β -lactamasas cromosómicas**

Las bacterias del género *Klebsiella* poseen una β -lactamasa cromosómica constitutiva con actividad generalmente de amplio espectro (Clase 2a, 2b y 2be de Bush-Jacoby-Medeiros). Es sensible a la inhibición por ácido clavulánico y resistente a la inhibición por cloxacilina. Las diferentes enzimas descritas abarcan un abanico muy amplio de pIs que van desde 5,2 a 9,2 (Tabla 8). Las β -lactamasas cromosómicas que con mayor frecuencia se han observado son: La de pI=7,1 en *K. pneumoniae* (73-76%) y la de pI=7,8 en *K. oxytoca* (39-41%) (157, 158). En algunas cepas de *K. oxytoca* se observa con frecuencia la hiperproducción de β -lactamasa cromosómica lo que se refleja en una pérdida de sensibilidad a algunas cefalosporinas de 3ª generación (ceftriaxona, cefotaxima) y al aztreonam (159, 160).

- **β -lactamasas plasmídicas**

Es frecuente la identificación en *Klebsiella* de cepas que expresan una o más de una β -lactamasa de tipo plasmídico. En este punto se debe clarificar que se considerará a la enzima SHV-1 como de “tipo plasmídico”, ya que así es considerada en la literatura actual, independientemente de su posible codificación cromosómica o plasmídica en la especie *Klebsiella pneumoniae*. SHV-1 es la enzima que se identifica con mayor frecuencia seguida de TEM-1 y ocasionalmente de TEM-2, HMS-1, OXA.1, OXA-3, PSE-2, PSE-3, TLE-2, SHV-2, RHH-1, CTX-1 CAZ-1, CAZ-2 (67, 161-164) y otras. En cualquier especie, excepto en *K. pneumoniae*, en las que aparecen combinadas dos β -lactamasas plasmídicas normalmente una de ellas siempre es TEM-1. Sin embargo, en *K. pneumoniae* la β -lactamasa que siempre suele identificarse es la SHV-1 combinada o no con alguna otra, siendo normalmente la β -lactamasa TEM-1.

- **β -lactamasas plasmídicas en *K. pneumoniae***

Mención especial merece *K. pneumoniae* al hablar de β -lactamasas plasmídicas dentro del género *Klebsiella*, ya que es la especie que con mayor frecuencia, alrededor del

90%, expresa este tipo de enzimas, frente a *K. oxytoca* p.e. con algo menos del 10% (157, 158, 165).

La β -lactamasa de tipo plasmídico con diferencia más frecuentemente observada en *K. pneumoniae* es la enzima SHV-1. Globalmente se observa esta β -lactamasa entre el 85-91% de las cepas, apareciendo sola en un 65-69% y combinada entre el 21-22%, normalmente con TEM-1. Esta elevada tasa de detección sugeriría la posibilidad de que en *K. pneumoniae* la β -lactamasa SHV-1 fuese una enzima de codificación fundamentalmente cromosómica en lugar de plasmídica.

Estudios realizados por Nugent y Hedges en 1979 (99) ya demostraron que una cepa de *K. pneumoniae* presentaba dos copias del gen estructural de la enzima SHV-1, localizadas una en un plásmido y otra en un replicón no transmisible, probablemente en el cromosoma bacteriano. Además, en el estudio anterior, en otras dos cepas de *K. pneumoniae*, se sugirió que el gen codificante de SHV-1 sólo podía localizarse en el cromosoma ya que no presentaban plásmidos. Los estudios de transposición demostraron que el gen SHV-1 estaba integrado en un elemento transponible, de unos 9 Md, capaz de transponerse entre plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad. Estos datos sugirieron que en *K. pneumoniae* SHV-1 estaría supuestamente codificado originariamente en el cromosoma de manera no transponible y que, probablemente con posterioridad fue incorporado a plásmidos donde adquirió capacidad de transponerse. La β -lactamasa SHV-1 ha pasado a ser una enzima presente en muchas especies enterobacteriáceas, pero de codificación extracromosómica.

Tabla 8. β -lactamasas cromosómicas del género *Klebsiella*.

Punto isoeléctrico	Especie	Referencia
5,2	<i>K. oxytoca</i>	(166)
5,35 (K-14)	<i>K. pneumoniae</i>	(167)
4/4,9	<i>K. oxytoca</i>	(168)
5,4	<i>K. oxytoca</i>	(81)
5,5	<i>K. oxytoca</i>	(159)
5,7	<i>K. oxytoca</i>	(159, 166)
5,8	<i>K. oxytoca</i>	(169)
6,0	<i>K. oxytoca</i>	(159, 166)
6,3	<i>K. oxytoca</i>	(159, 166)
6,5 (K-1 ó IVc)	<i>K. aerogenes</i>	(167, 168)
7,05	<i>K. pneumoniae</i>	(170)
7,1	<i>K. pneumoniae</i>	(171)
7,2	<i>K. pneumoniae</i>	(172)
7,2/5,4	<i>K. pneumoniae</i>	(168)
7,4/6,8	<i>K. oxytoca</i>	(168)
7,76	<i>K. pneumoniae</i>	(172)
7,8	<i>K. pneumoniae</i>	(81, 172)
7,8	<i>K. oxytoca</i>	-
7,87	<i>K. pneumoniae</i>	(172)
7,9	<i>K. oxytoca</i>	-
8,1	<i>K. oxytoca</i>	(160)
8,2	<i>K. oxytoca</i>	-
8,5	<i>K. oxytoca</i>	-
8,6	<i>K. pneumoniae</i>	-
8,6	<i>K. oxytoca</i>	-
8,8	<i>K. oxytoca</i>	-
8,9	<i>K. pneumoniae</i>	-
9,2	<i>K. oxytoca</i>	(165)

4. GENERALIDADES SOBRE REGULACIÓN GÉNICA BACTERIANA

4.1. Introducción

Las bacterias están sometidas a cambios ambientales que inciden muy directamente sobre la regulación de sus genes. En las células eucariotas esto no sucede de manera tan directa ya que poseen una mayor y más compleja regulación de su medio interno. La regulación génica bacteriana se fundamenta en la obtención de un ahorro energético que puede ocurrir tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. En algún caso puede también tener lugar una modulación previa al proceso de transcripción. Este fenómeno, poco frecuente, se produce modificando la propia estructura del DNA; por ejemplo, la inversión de segmentos de DNA que ocurre en *Salmonella typhimurium* para modificar la producción de diferentes tipos de flagelos.

- Regulación transcripcional

La mayoría de los mecanismos que controlan la expresión génica actúan modulando la frecuencia de transcripción de los genes. Se puede realizar en diferentes fases del proceso: Al inicio de la transcripción, en la elongación y terminación y, por último, regulando la estabilidad del RNA.

Inicio de la transcripción

La regulación a este nivel puede efectuarse por diferentes mecanismos:

- ✓ Factores sigma, que reconocen el promotor correcto donde se unirá la RNA polimerasa.
- ✓ Presencia de activadores o represores, que pueden ser tanto factores metabólicos (p.e. lactosa), como físicos (p.e. calor).
- ✓ El estado conformacional (espacial) de superenrollamiento (W) del DNA. Aunque el “W” normalmente es constante, puede variar frente a factores ambientales (p.e. osmolaridad del medio, temperatura). Los cambios topológicos afectan la expresión de algunos genes.
- ✓ Silenciamiento de genes por proteínas tipo histona (histone-like).
- ✓ Activación a distancia por exaltadores (enhancers). Cuanto mayor distancia exista entre las estructuras de exaltadores y los genes estructurales, también existirá una mayor posibilidad de regulación por diferentes tipos de factores. Sin embargo, esto es

poco frecuente en las bacterias ya que el genoma bacteriano prácticamente carece de genoma no codificante.

Elongación y terminación

- ✓ Atenuación. Fue descubierta en la regulación del operón del triptófano que conduce a la biosíntesis de este aminoácido, pero varios operones biosintéticos están regulados por este sistema. La disponibilidad de un aminoacil-RNAt particular determinará si el ribosoma puede traducir o no un segmento temprano del RNAm. El movimiento de ribosoma es necesario para impedir que se formen ciertas regiones de estructura secundarias del RNAm requeridas para la terminación.
- ✓ Terminación Rho independiente. La terminación de la transcripción comprende el reconocimiento del punto en el cual no deberá añadirse ninguna base más a la cadena. La secuencia de DNA requerida para esta reacción se denomina terminador. Las secuencias terminadoras incluyen regiones palindrómicas que forman horquillas, que varían de longitud desde 7 a 20 pb. La estructura está seguida de una serie de residuos uracilo (U) en los sitios rho independientes.
- ✓ Terminación Rho dependiente. Polaridad y regulación por factores antiterminadores que se unen al RNA o al DNA. La estructura en bucle en este caso no va seguida de la serie de residuos U. La proteína Rho actúa disociando la RNA polimerasa del molde en una reacción dirigida por ATP.

Estabilidad del ARN

Está determinada de acuerdo a las propiedades del RNA específico de cada gen. El RNAm es una molécula de vida media corta (un minuto aproximadamente), mientras que el RNAt tiene una vida media mucho mayor. Como se describirá más adelante, la expresión de la β -lactamasa cromosómica de *E. coli* p.e. depende en gran medida de la disponibilidad y accesibilidad de los ribosomas al RNAm que las codifica. Existe además una gran tasa de renovación de los RNAm mediada por las RNAsas.

- Regulación postranscripcional

Debido a la propia complejidad estructural y organizativa de la célula eucariota este tipo de regulación tiene un mayor peso específico. La presencia además de los sistemas de compartimentalización citoplasmáticos bien diferenciados de la célula eucariota, le

permiten realizar posteriores modificaciones postraduccionales y una regulación más fina de su función.

En bacterias este tipo de regulación no es la más generalizada ya que, la tasa de renovación protéica es baja debido al gran gasto energético que representa para la célula la síntesis de proteína. Sin embargo, la síntesis de las proteínas de los ribosomas bacterianos está regulada a este nivel. Se asegura así que la síntesis de las proteínas ribosómicas esté coordinada con precisión en función de la demanda de producir ribosomas por parte de la célula.

El control después de la traducción implica la modificación enzimática de una proteína que altera su actividad. Existen pocos ejemplos en bacterias, pero uno de los más estudiados es el del control de la actividad de la glutamina sintetasa. Su adenilación o desadenilación, en función de las disponibilidades de NH_4^+ , modula su actividad a la baja o a la alza.

4.2. Modelos de regulación de las β -lactamasas

Se han descrito principalmente dos modelos de regulación génica: β -Lactamasas no inducibles o constitutivas (β -lactamasas cromosómicas de *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella* spp.) e inducibles (β -lactamasas cromosómicas de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*).

- Regulación por atenuación en β -lactamasas constitutivas

El modelo de regulación de la β -lactamasa cromosómica de *Escherichia coli* se ha tomado como ejemplo de regulación en β -lactamasas no inducibles. Esta enzima, clasificada como clase C (Ambler y Jaurin) o clase I (Richmond y Sykes), es una β -lactamasa de producción constitutiva, actúa preferentemente sobre cefalosporinas (cefalosporinasa) y no es inhibida por ácido clavulánico ni sulbactam. El gen estructural es reconocido como *ampC*.

El nivel de expresión génica de esta enzima es muy bajo y no contribuye a la resistencia frente a antibióticos betalactámicos en esta especie. Presentan una CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$ para ampicilina tanto si se expresa constitutivamente la enzima normal, como si se inactiva por

mutación (173). Al igual que ocurre con otros genes, la cantidad de β -lactamasa sintetizada viene regulada por varios parámetros dependientes además de la tasa de crecimiento (μ).

Estos parámetros son:

- Eficacia en la transcripción: Interviene tanto el grado de expresión del promotor, como el grado de control que ejerce el atenuador.
- Estabilidad de RNAm.
- Eficacia en la traducción.

El gen se sitúa localizado en el minuto 93,8 del cromosoma de *E. coli*; de la secuencia nucleotídica del gen cabe destacar cuatro zonas de interés para la regulación (Figura 6):

- Región promotora (P) con las secuencias consenso de -35 y -10, separadas entre si por 16 pb.
- Lugar de reconocimiento del inicio de la transcripción (+1) por la RNA polimerasa.
- Zona atenuadora o de control (*ampA*, terminación Rho independiente).
- Región codificante que incluye el gen estructural *ampC*.

Para intentar elucidar los mecanismos moleculares que regulan la expresión génica de esta enzima se recurrió, como casi siempre, al estudio de mutantes que presenten alteraciones en la producción de la enzima. Sin embargo, debido al grado de compactación del cromosoma bacteriano, existe una dificultad añadida para la obtención de mutantes de la región promotora ya que se afecta a un gen funcional. El promotor del gen codificante para la β -lactamasa se solapa con la parte final de la secuencia codificante para el péptido Fdr D de la fumarato reductasa (Figura 7).

Entre los diferentes tipos de mutantes descritos, cabe destacar los que producen un incremento en el número de copias del gen y los que, por mutación en la región promotora o atenuadora, han incrementado el número de moléculas de β -lactamasa sintetizadas (Figura 8).

Figura 6. Secuencia nucleotídica de la región de control y la parte N-terminal del gen *ampC* que codifica para la β-lactamasa cromosómica de *E. coli*. Se indican las regiones que intervienen en la regulación del gen: Región promotora (-35 y -10), inicio de la transcripción (+1 y flecha ondulada), zonas formadoras de la estructura en horquilla (flechas horizontales), los lugares de terminación mayor y menor (flechas continua y punteada). Tomado de Jaurin y cols. (174).

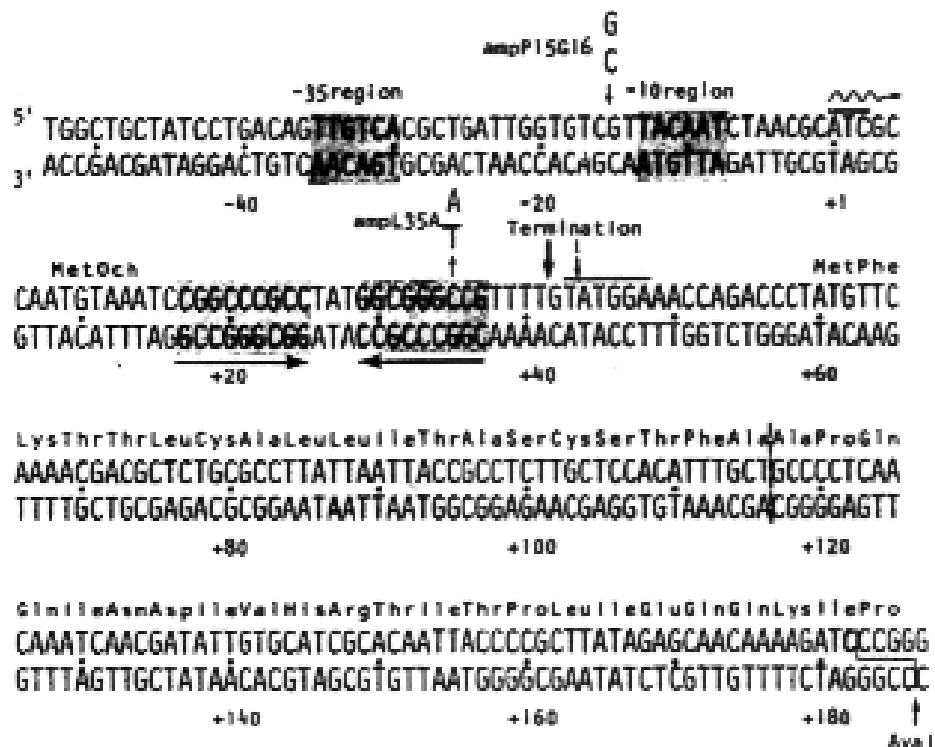
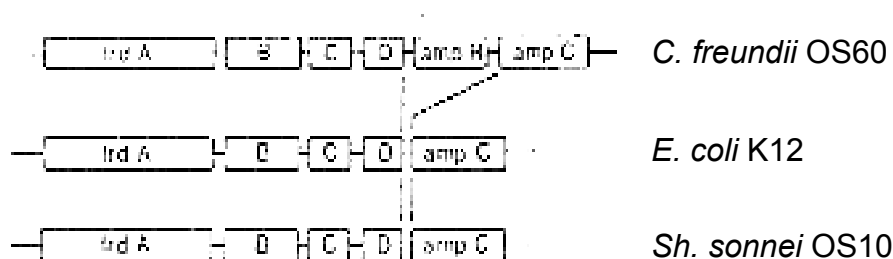


Figura7. Localización del locus del gen *ampC* en serie con el operón de la fumarato reductasa (frd A, B, C y D) en el cromosoma bacteriano de diferentes especies. Tomado de Lindberg y cols. (175).

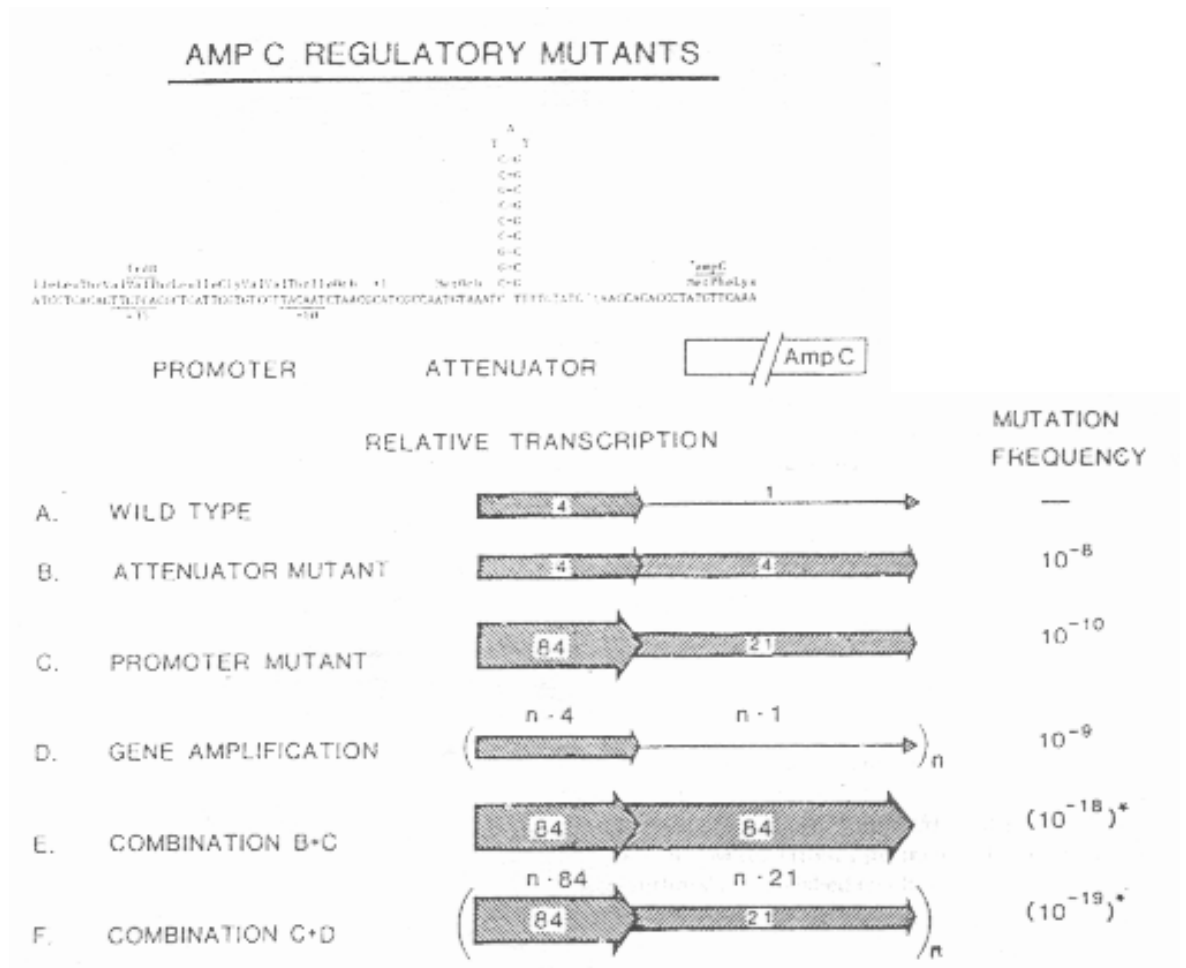


En las células tipo salvaje (*wt*), únicamente una de cada cuatro moléculas de ARNm que empieza a sintetizarse acaba siendo traducida a proteína, debido a la regulación negativa que ejerce la estructura en rizo (*hairpin*) del atenuador. Esta región presenta una secuencia palindrómica de 21 nucleótidos que se aparean entre sí para formar un rizo que acaba por abortar la transcripción. En las bacterias la transcripción y la traducción se producen consecutivamente, de manera que cuando la tasa de crecimiento es muy elevada, el número de ribosomas libres en la célula es alto y pueden unirse rápidamente al RNAm que se está formando. De esta manera la estructura finalizadora, por impedimento físico, no puede formarse con facilidad y el número de moléculas de β -lactamasa que se sintetiza aumenta.

En los mutantes de la región atenuadora (frecuencia de mutación 10^{-8}) la estructura en rizo no se forma y casi todo el RNAm se traduce a proteína, de tal forma que la expresión de la β -lactamasa aumenta del orden de cuatro veces respecto a la célula *wt*. Se ha descrito una transversión C/G por A/T (174) en esta región que elimina la región palindrómica. Naturalmente estos mutantes son incapaces de regular la producción de enzima según la tasa de crecimiento.

Los mutantes de la región promotora hasta ahora descritos (frecuencia de mutación 10^{-10}) aumentan la frecuencia de iniciación de la transcripción. Aunque la fracción de transcritos terminadores permanece constante debido a la acción de la región atenuadora, el resultado final es el aumento del orden de 20 veces de la síntesis de enzima. Para *E. coli* se ha descrito una inserción G/C entre la región -35 y -10 que provoca este efecto (174); en *Shigella sonnei* se ha descrito una transversión C/G por T/A anterior a la región -35 que provoca un desplazamiento del promotor de siete pb y que proporciona un aumento relativo en la síntesis de la β -lactamasa de 40 veces (175).

Figura 8. Mutantes del gen *ampC* descritos en distintas zonas del gen: Atenuador, promotor, amplificación génica y combinaciones de las tres anteriores. Se indica la frecuencia de obtención de mutantes en cada caso. Tomado de Lindberg y cols. (175).



Una tercera forma de aumentar los niveles de expresión de enzima es por amplificación génica (frecuencia 10^{-9}) (85, 176). El nivel de expresión de β -lactamasa dependerá del número de copias génicas que se amplifiquen.

Se podría esperar que, combinaciones de mutaciones en la región atenuadora y promotora o bien amplificación génica y mutaciones en la región promotora producirían un efecto multiplicativo respecto a sus frecuencias individuales.

- Regulación de β -lactamasas inducibles.

Cuando el uso de los antibióticos se realiza de forma racional, la inducción de las enzimas cromosómicas por los antibióticos betalactámicos no ha de representar un problema clínico real. Sin embargo, la regulación de la producción de las β -lactamasas es de gran interés debido a su elevada tasa de mutación 10^{-5} a 10^{-8} (177) y el hecho de que casi todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* codifican para una β -lactamasa cromosómica de tipo AmpC. La principal diferencia entre las especies con β -lactamasa constitutiva e inducible es la presencia adicional de un gen regulador denominado ampR. Los promotores de ampC y ampR fueron definidos por primera vez por Honoré y cols. en 1986 en una cepa de *Enterobacter cloacae* (178). Ambos promotores además de estar solapados se transcriben divergentemente.

El gen ampR codifica una proteína reguladora (AmpR) que se une a una región localizada cadena arriba del promotor de ampC. AmpR presenta un estado activado durante la inducción por un betalactámico (u otro inductor) y otro reprimido bajo condiciones no inductoras. Sin embargo, no se ha descrito una interacción directa entre AmpR y las moléculas inductoras.

Además de los dos genes anteriormente citados existen, al menos, cuatro genes más implicados en la regulación génica de las β -lactamasas: El gen ampD, se encuentra fuera de la región de los genes ampR y ampC y se expresa también en las especies con β -lactamasa no inducible. Su función es la de actuar como regulador negativo en la expresión del gen ampC, aunque no se conoce su mecanismo exacto de actuación. Parece ser que la parte central de su proteína (AmpD) presenta gran homología con los motivos de hélice vuelta hélice (179) que interactúan con el DNA. Sin embargo no se han encontrado uniones DNA-proteína entre la región intercistronica de ampR-ampC y AmpD. Por otro lado Lindquist y col. ya consideraron que podría desempeñar un papel regulador en el metabolismo del peptidoglicano (180). Pero fue Dietz y col. los que en 1997 identificaron la proteína citosólica AmpD como una N-acetil-anhidromuramil-L-alanina amidasa y demostraron que la actividad inhibitoria que ejerce esta enzima sobre AmpC es debida a su actividad hidrolítica sobre un anhidromuropéptido que es el que actúa como molécula señal para la inducción de la β -lactamasa (177).

Otros dos genes, ampE (situado en el mismo operón que ampD) y ampG, codifican para la producción de proteínas de la membrana citoplasmática (permeasas). Su papel podría ser el de actuar como sensores y/o transductores de la señal inductora a través de la membrana.

Se han implicado además algunas PBPs, PBP 1 a 3 (p.e. la PBP2, codificada por el gen pbpA) (181) y que actuarían como sensores en la inducción de ampC mediada por ampR. Aunque no se conoce exactamente su modo de acción, al interactuar el antibiótico betalactámico con las PBPs de la célula provocaría cambios en la estructura del peptidoglicano incrementándose la liberación de unos péptidos disacáridicos (aD-péptidos), que serían detectados por la proteína G e introducidos en el citoplasma. Ya en el citoplasma estos aD-pentapéptidos son degradados a los correspondientes péptidos monosacáridicos (aM-tripéptidos y aM-pentapéptidos) donde podrían actuar directamente sobre AmpR y convertirlo en la forma activada. La inducción es inhibida por AmpD, que actúa hidrolizando al péptido activador (di o monosacáridico). Por otro lado, las PBPs 4, 5 y 6 actúan reduciendo las cantidades de las cadenas de pentapéptidos muy efectivamente. Tuomanen y cols. sugirieron que AmpD actuaría inhiendo la PBP5 (182).

Así, según el modelo propuesto por Normark y cols. (183) y posteriormente matizado por Dietz y cols. (177), un fragmento del peptidoglicano, generado por la acción de los antibióticos betalactámicos sobre las PBPs, actuaría como señal inductora. Este fragmento atravesaría la membrana citoplasmática gracias a la participación de las proteínas AmpG y AmpE. Este fragmento tras sufrir alguna modificación en el citoplasma, y que normalmente interactúa con la proteína AmpD, convertiría la proteína AmpR en su forma activada, permitiendo por tanto una transcripción eficaz del gen estructural de la β -lactamasa.

OBJETIVOS

Entre las distintas especies de la familia *Enterobacteriaceae*, el género *Klebsiella* y en particular la especie *K. pneumoniae*, representa uno de los patógeno oportunistas más importantes causante de más del 7% de las infecciones hospitalarias. Es el agente causal responsable de aproximadamente el 10% de las neumonías, aunque las infecciones más frecuentes causadas por *Klebsiella* son las relacionadas con el aparato urinario, siendo la mayoría de ellas de origen nosocomial. *Klebsiella pneumoniae* presenta asociados unos perfiles de resistencia natural frente a un grupo de antibióticos betalactámicos clásicos: Aminopenicilinas (p.e. ampicilina, amoxicilina) y carboxipenicilinas (p.e. carbenicilina, ticarcilina). Las cepas de esta especie son irregularmente sensibles a los antibióticos betalactámicos más estables como: La combinación de aminopenicilinas con ácido clavulánico, acil-ureidopenicilinas (p.e. mezlocilina) y cefalosporinas de primera generación (p.e. cefalotina). La resistencia a los antibióticos betalactámicos está directamente relacionada con la presencia de β -lactamasas. En *K. pneumoniae* la β -lactamasa que se detecta con mayor frecuencia es la enzima SHV-1 (80-90%). La elevada prevalencia de esta β -lactamasa es un hecho poco común en otras especies, pero característico de esta especie. SHV-1 se considera una β -lactamasa de tipo plasmídico, pero su ubicación en *K. pneumoniae* aunque se infiere por datos indirectos, está todavía poco definida y por ello nos ha llevado a plantearnos los siguientes objetivos:

1. Realizar una caracterización bioquímica clásica de la expresión de las β -lactamasas mediante IEEA, en un grupo de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de productos patológicos humanos.
2. Estudiar la sensibilidad de las cepas a los antibióticos betalactámicos clásicos y algunos más estables, correlacionándola con la expresión de sus β -lactamasas.
3. Determinar la frecuencia y características de los plásmidos aislados de las cepas estudiadas.
4. Evaluar la capacidad de transferencia horizontal de la β -lactamasa SHV-1 por conjugación plasmídica.
5. Detección del gen que expresa la β -lactamasa SHV-1 (*bla-SHV-1*) en el cromosoma de *K. pneumoniae* mediante amplificación específica por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, correlación con la expresión enzimática mediante una caracterización clásica (IEEA).

6. Aproximación al locus genético mediante RFLP-Southern-blot del gen *bla-SHV-1*, tras hibridación con sonda específica.
7. Estudio de la integridad génica: Secuenciación. Identificar mediante alineamientos comparativos de las secuencias de DNA y de las secuencias proteínicas deducidas de éstas, posibles alteraciones en las mismas (mutaciones, deleciones, etc.) y, correlacionarlas con las características del fenotipo de resistencia y con la expresión enzimática detectada.

MATERIAL Y METODOS

1. CEPAS ESTUDIADAS

- 1.1. Selección de las cepas y procedencia
- 1.2. Técnicas de aislamiento e identificación a nivel de especie

2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS β -LACTAMASAS BACTERIANAS

- 2.1. Estudio de la sensibilidad *in vitro*
 - Técnica de difusión
 - Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM): Técnica de dilución
- 2.2. Caracterización bioquímica de las β -lactamasas bacterianas
- 2.3. Transmisión de plásmidos por conjugación

3. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LAS β -LACTAMASAS BACTERIANAS

- 3.1. Aislamiento de DNA
 - DNA plasmídico
 - DNA cromosómico
- 3.2. Gen de la β -lactamasa SHV-1: Preparación de una sonda específica
- 3.3. Analisis de la presencia del gen: PCR
 - Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
 - Definición de los cebadores (primers)
 - Especificidad del producto amplificado: PCR-RFLP
- 3.4. Aproximación al locus génico: RFLP's/Southern-blot
- 3.5. Secuenciación

1. CEPAS ESTUDIADAS

1.1. Selección de las cepas y procedencia

Con la excepción de SHV-1, las β -lactamasas cromosómica y plasmídica que con mayor frecuencia se encuentran en *K. pneumoniae* son LEN-1 y TEM-1, respectivamente. Se han estudiado un total de 97 cepas de la especie *K. pneumoniae* aisladas de productos patológicos humanos, seleccionadas de archivo y distribuidas en dos grupos de cepas:

- **Grupo I:** Setenta y cuatro cepas productoras de β -lactamasa de pI= 7,6 (SHV-1) subdivididas en tres categorías; 34 cepas que expresaron únicamente SHV-1; 20 cepas que expresaron además de SHV-1 la β -lactamasa LEN-1 y otras 20 cepas que expresaron SHV-1 y TEM-1.
- **Grupo II:** Formado por 23 cepas subdivididas en dos categorías; 13 cepas productoras de β -lactamasa cromosómica de pI= 7,1 (LEN-1) y 10 cepas productoras de β -lactamasa plasmídica de pI=5,4 (TEM-1).

Así, mientras las cepas del grupo I se caracterizaban por expresar SHV-1 sola o combinada con otra β -lactamasa, las cepas del grupo II se eligieron aleatoriamente como “grupo control” de cepas en las que no se detectó la producción de la enzima SHV-1 por IEEA, en nuestras condiciones estándar. Todas las cepas habían sido aisladas de productos patológicos humanos, durante un período de cinco años (1979-84) y procedían de cinco laboratorios distintos, tal como se indica en las Tablas 9 y 10. Una vez seleccionadas según el criterio de presencia o ausencia de SHV-1, se procedió a la ulterior caracterización funcional y molecular.

1.2. Técnicas de aislamiento e identificación a nivel de especie.

Las técnicas de aislamiento empleadas han sido las habitualmente utilizadas en los laboratorios de microbiología clínica (184, 185).

Las técnicas de identificación siguen las recomendaciones de Edwards y Ewing (10) y Lennette (186). Las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación se detallan en la tabla 11.

Tabla 9. Procedencia y origen de las muestras de donde se aislaron las 97 cepas estudiadas.

Laboratorio	Nº cepas	Orina	Sangre	Respiratorio	Exudados	Otros
Lab. Dr Foz	48	44	1	1	0	2
H Sant Pau	18	14	1	0	3	0
H Bellvitge	18	10	1	0	2	5
H Clínic	6	3	1	0	0	2
H P de Hierro	7	5	0	0	2	0
Total cepas	97	76	4	1	7	9

Tabla 10. Períodos de aislamiento por centro de las 97 cepas estudiadas.

Laboratorio	Código	Períodos (años)
Lab. Dr. Foz	L1	1979-83
H. Sant Pau	L2	1983
H. Bellvitge	L3	1982-84
H. Clínic	L4	1983
H. P. de Hierro	L5	1984

Tabla 11. Pruebas utilizadas para la identificación a nivel de especie en *K. pneumoniae*

- Presencia de Oxidasa
- Vía de utilización de la glucosa: Fermentación/oxidación
- Reducción de nitratos a nitritos
- Rojo de metilo
- Vogues-Proskauer
- Producción de: ✓ SH₂
 - ✓ indol
 - ✓ ureasa
 - ✓ fenilalanina
 - ✓ lisina descarboxilasa
 - ✓ arginina dihidrolasa
 - ✓ ornitina descarboxilasa
- Movilidad
- Utilización de malonato
- Utilización del citrato como única fuente de carbono (Citrato de Simmons)
- Desoxirribonucleasa
- Hidrólisis de: ✓ esculina en presencia de sales biliares
 - ✓ gelatina
- Producción de ácido a partir de:
 - ✓ lactosa
 - ✓ adonita
 - ✓ manita
 - ✓ inosita
 - ✓ dulcita
 - ✓ arabinosa
- Crecimiento a 10°C
- Hidrólisis del pectato

2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS β -LACTAMASAS BACTERIANAS

Las estrategias empleadas para caracterizar la funcionalidad de las β -lactamasas incluyen: Estudios de su perfil de actividad de hidrólisis (sensibilidad) *in vitro*, tipificación bioquímica por determinación del pI, y por último, estudio de la capacidad de transmisión horizontal de los genes que la codifican (conjugación).

2.1. Estudio de la sensibilidad *in vitro*

- Técnica de difusión

Particularmente se realizó esta técnica en las 54 cepas que expresaban la enzima SHV-1 sola o en combinación con LEN-1. Estas 54 cepas (donadoras) que se utilizaron en los experimentos de conjugación así como sus correspondientes transconjugantes (n=5), también fueron estudiados. Así, en todas ellas se realizó un estudio orientativo de la sensibilidad *in vitro* frente a un amplio grupo de antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol y tetraciclinas, empleando la técnica de difusión en agar (antibiograma).

El estudio de la sensibilidad mediante la técnica de difusión, sigue las recomendaciones de la FDA (Federal Register: Rules and regulations: Antibiotic susceptibility disk. Fed Regist, (37; 20525-29, 1972)) y las del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (187, 188), basadas en la técnica descrita por Bauer y col. (189) que es la utilizada normalmente en los laboratorios de Microbiología Clínica de nuestro país (190).

Protocolo

El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 18 horas en caldo triptosa (Tryptic Soy Broth) haciendo una dilución 1:10.000 en solución salina fisiológica (ssf). Dicho inóculo se sembró por inundación en placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo agar Mueller-Hinton (Institut Pasteur Production). Posteriormente se inclinaron las placas para eliminar el máximo líquido posible. Se dejaron secar unos 15 minutos y se colocaron los discos con la carga de antibiótico correspondiente; es conveniente que la distancia entre discos no sea inferior a 24 mm para que los halos de inhibición del crecimiento no queden solapados. Las placas se dejaron otros 15 minutos antes de colocarlas en la estufa para que los antibióticos empezaron a difundir antes de que se iniciara el crecimiento. Después se incubaron durante 16-18 horas a 35-37 °C.

La lectura de los halos de inhibición se realizó mediante un pie de rey midiendo la zona donde se observaba inhibición del crecimiento, sin valorar las zonas de crecimiento más tenue.

Es importante destacar que los viales que transportan los discos con los antibióticos betalactámicos se han de conservar congelados (-20 °C) hasta el momento de su empleo y que, una vez abiertos, se conservan en nevera (4 °C) hasta 15 días.

La interpretación de los resultados en sensibles, moderadamente sensibles y resistentes, se realizó teniendo en cuenta los criterios del NCCLS (188).

- **Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM): Técnica de dilución**

Se estudió la sensibilidad *in vitro* mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima en todas las cepas (n=97) frente a siete preparados betalactámicos, combinaciones de dos de ellos con el inhibidor ácido clavulánico y un aminoglucósido.

El estudio de la CIM consiste en poner de manifiesto el comportamiento de las cepas ensayadas frente a concentraciones decrecientes de un preparado y hallar la concentración mínima que inhibe el crecimiento *in vitro*. El método empleado para la realización de las CIM ha sido el de las diluciones dobles progresivas en medio sólido, según las técnicas recomendadas por el NCCLS (187).

La gama de antibióticos betalactámicos ensayados comprendió:

- Amino- (amoxicilina), carboxi- (carbenicilina) y ureidopenicilinas (mezlocilina).
- Combinaciones de amoxicilina y mezlocilina con ácido clavulánico, como inhibidor de betalactamasas plasmídicas en proporción 2:1 para la amoxicilina y 4:1 para la mezlocilina.
- Cefalosporinas de 1ª (cefalotina) y 3ª (cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona) generación y un monobactamo (aztreonam).

Además se ha estudiado la sensibilidad a la gentamicina como ejemplo de antibiótico aminoglucósido.

La selección de estos antibióticos ha obedecido a las razones siguientes:

- a) Conocer el grado de sensibilidad de la especie *Klebsiella pneumoniae* frente a los

preparados betalactámicos clásicos y a los preparados más estables a la acción de las β -lactamasas.

- b) Manifestar la eficacia del ácido clavulánico como inhibidor de las β -lactamasas plasmídicas y cromosómicas de *K. pneumoniae*.
- c) Correlacionar el grado de sensibilidad a estos antibióticos con otros estudios fenotípicos y las características genotípicas que codifican las β -lactamasas presentes en nuestra colección de cepas estudiadas.

Protocolo

Se prepararon tubos con 45 ml de agar Mueller-Hinton concentrado (se pesó el medio necesario para preparar un litro y se disolvió en 900 ml de agua destilada) y se esterilizaron. Los tubos preparados de este modo se pueden guardar en nevera hasta su utilización.

Los antibióticos se prepararon partiendo de una solución madre que ha de ser 10 veces superior a la más alta que se quiere ensayar. Para cada preparado se empleó el disolvente recomendado por el NCCLS, Lennette, o por la firma suministradora. Las soluciones se esterilizaron por filtración (filtros Millipore de 0,45 μ m) y se repartieron en viales en volúmenes adecuados. Los antibióticos betalactámicos se conservaron a -20 °C como máximo 15 días. Las soluciones de ácido clavulánico, ceftazidima y aztreonam se prepararon el mismo día del ensayo. Para cada antibiótico se realizaron una serie de diluciones dobles progresivas en ssf; la serie será más o menos amplia dependiendo de la actividad de cada sustancia (Tabla 12).

La preparación de las placas cuadradas de 120 mm de lado se realizó mezclando los 45 ml de agar Mueller-Hinton (concentrado) fundido y mantenido a 55 °C con 5 ml de cada dilución del antibiótico (dilución 1:10). Para cada serie de antibiótico se preparó también una placa blanco sin antibiótico (control positivo de crecimiento) y una placa con los restos de la última dilución efectuada y que se colocó a 37 °C sin inocular (control negativo de crecimiento para la validación interna de la técnica). Una vez las placas se secaron en la cámara de flujo laminar, se envolvieron y se conservaron en la nevera hasta el día siguiente.

Al día siguiente, se procedió en primer lugar a la valoración de la placa que sirve como control interno de la técnica. Para continuar el procedimiento, se verifica que en las placas controles negativos no ha habido crecimiento bacteriano. Si esto no es así, indicaría que en algún

momento se contaminaron las placas y el resultado final no sería valorable.

Tabla 12. Concentraciones y límites superior e inferior ensayados en la técnica de las diluciones dobles progresivas, según el antibiótico empleado.

Antibiótico	Concentración solución madre	Límites (µg/mL)	Nº diluciones ensayadas
Amoxicilina	2560	256-0,5	10
Amoxi + Ác. Clav 2:1	1280	128-0,25	10
Mezlocilina	2560	256-0,5	10
Mezlo + Ác. Clav 4:1	1280	128-0,25	10
Carbenicilina	5120	512-0,5	10
Cefalotina	2560	256-0,12	12
Cefotaxima	1280	128-0,003	16
Ceftazidima	2560	128-0,007	15
Aztreonam	2560	256-0,007	16
Gentamicina	1280	128-0,03	13

El inóculo se preparó partiendo de cultivos de 16-18 horas en caldo triptosa diluidos 1:10 en ssf. La siembra se realizó mediante un multinoculador automático (AM 80 Automatic Inoculator Microtiter®) que depositó 1 µl de la dilución (10^5 ufc), aproximadamente. Se sembró en primer lugar el blanco de antibiótico y después se empieza por la placa de antibiótico más diluida. Cuando se están ensayando varios antibióticos, entre uno y otro se ha de pasar una placa con blanco de antibiótico para eliminar el posible efecto arrastre de las puntas del multinoculador.

En cada serie de CIM se incluyeron cepas patrón de CIM conocida que se emplearon como otro control de calidad de las condiciones de trabajo (Tabla 13.). Una vez sembradas las placas, se dejaron en reposo a temperatura ambiente unos 30 minutos y posteriormente se incubaron a 37°C durante 16-18 horas.

La lectura de las placas se inició por el blanco no valorando aquellas cepas en las que se observe

un menor crecimiento. A continuación se leyeron las CIM de las cepas control y únicamente si los resultados eran los esperados (se admiten variaciones de una dilución mayor o menor) se procedía a la lectura de las cepas en estudio. Se comenzaba a leer por la placa con mayor concentración de antibiótico y se iba descendiendo en las diluciones; se consideró como positiva la concentración máxima de antibióticos con la que se observaba un inicio del crecimiento. No se valoraraba si aparecían entre una y tres colonias aisladas o una sombra débil causada por el inóculo. Los valores críticos de sensibilidad para cada sustancia aparecen detallados en la tabla 14.

Tabla 13. Cepas patrón utilizadas como controles en las determinaciones de sensibilidad en la técnica de dilución. Recomendadas por el NCCLS (187).

Cepas	Referencia
<i>E. coli</i>	ATCC 25922
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213
<i>S. faecalis</i>	ATCC 29212
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853

Tabla 14. Concentraciones críticas de los diferentes antibióticos estudiados, expresados en $\mu\text{g/mL}$, según el NCCLS (187).

Antibiótico	CIM resistente	CIM sensible
Amoxicilina	≥ 32	≤ 8
Amoxi + Ác. Clav 2:1	≥ 32	≤ 8
Mezlocilina	≥ 128	≤ 16
Mezlo + Ác. Clav 4:1	≥ 128	≤ 16
Carbenicilina	≥ 64	≤ 16
Cefalotina	≥ 32	≤ 8
Cefotaxima	≥ 64	≤ 8
Ceftazidima	≥ 32	≤ 8
Aztreonam	≥ 32	≤ 8
Gentamicina	≥ 16	≤ 4

2.2. Caracterización bioquímica de las β -lactamasas bacterianas

Hasta hace relativamente pocos años, el estudio de las β -lactamasas se limitaba a la detección de la enzima por presencia/ausencia de la misma y a su posterior caracterización. Las técnicas más ampliamente utilizadas para la caracterización bioquímica de estas enzimas son: El espectro de hidrólisis y la determinación del punto isoeléctrico (61, 162).

Espectro de hidrólisis

La determinación del espectro de hidrólisis pretende cuantificar la actividad hidrolítica de una β -lactamasa determinada frente a diversos antibióticos betalactámicos. El parámetro más estudiado es la velocidad máxima de hidrólisis (V_{max}), aunque también se pueden emplear otros como la constante de afinidad (K_m) de la enzima por el sustrato. El resultado se expresa en valores relativos al grado de hidrólisis de uno de los preparados, generalmente la bencilpenicilina, a la que arbitrariamente se le da el valor de 100.

El perfil de sustrato como criterio de clasificación presenta algunos problemas que hay que considerar:

- Se ha de tomar como una medida de la actividad global de las β -lactamasas presentes en la célula, a no ser que se aislen individualmente.
- Los valores obtenidos dependen del método de preparación de los extractos, del número

de copias génicas y/o del grado de expresión de los genes que codifican estas enzimas.

Punto isoelectrico

El enfoque isoelectrico analítico es un método de separación de las proteínas. Se genera un gradiente de pH mediante electroforesis y las proteínas se concentran (enfocan) en forma de bandas en su punto isoelectrico (pI); es decir, el punto isoelectrico es el pH en el que la carga neta de la proteína es cero. El pI de una proteína viene determinado por la composición de sus grupos ionizables, de su número y de sus constantes de ionización (pKa) (191).

La técnica de enfoque isoelectrico se diferencia de una electroforesis convencional en que el pH no es constante, sino que los componentes de la muestra migran electroforéticamente en un gradiente de pH orientado de manera que el pH se incrementa hacia el cátodo. Este gradiente se establece mediante una mezcla de sustancias anfóteras (ácidos alifáticos poliaminos y policarboxílicos), con distintos pI (192) y que poseen gran capacidad de tamponar en el estado isoelectrico y una buena conductividad, necesaria para que se establezca el flujo de corriente entre los electrodos.

Los portadores de anfolitos, sometidos a la acción de un campo eléctrico, se situarán de acuerdo a su punto isoelectrico. Aquellos con un pI bajo se situarán cerca del ánodo y los de pI más elevado cerca del cátodo estableciendo, gracias a sus características de tampón, un gradiente estable de pH. Si en este momento se introduce una proteína a un pH inferior a su pI, ésta tendrá una carga neta positiva y por acción del campo eléctrico migrará hacia el cátodo. Si se hace a un pI superior la carga neta será negativa y la proteína migrará hacia el ánodo. A medida que se va acercando a su pI la carga neta irá disminuyendo y finalmente cuando lo alcance la carga neta será cero y cesará la migración.

Las β -lactamasas se enfocan generalmente como una banda principal (más intensa) más un conjunto de bandas satélites (menos intensas) que permiten una comparación visual. Tanto la banda principal como las secundarias poseen características similares. Algunos autores han sugerido que las bandas satélites son isoenzimas que han sufrido pérdida o degradación de algunos aminoácidos que determinan cambios en la carga neta de la enzima (193).

En enfoque isoelectrico permite diferenciar enzimas que no se distinguen bioquímicamente o

inmunológicamente (81, 194-196). Además, no es preciso la purificación de las β -lactamasas de los extractos bacterianos ya que el revelado es específico y, si hay más de una enzima, cada una de ellas se enfocará en su punto isoeléctrico. Esta es una de las técnicas más ampliamente empleada para la identificación y clasificación de las β -lactamasas.

Protocolo:

a) Preparación de los extractos bacterianos.

Se parte de cultivos de 18 horas en medio sólido (Nutrient Agar®, Oxoid©) y con agua destilada se prepara una suspensión bacteriana de una densidad equivalente al tubo 9 de la escala McFarland ($2,7 \times 10^9$) (197). Esta suspensión bacteriana se somete a la acción de ultrasonidos (Sonic Dismembrator Dynatech®) ejecutando tres pulsos de un minuto a máxima potencia, con intervalos de un minuto para evitar el sobrecalentamiento de la muestra (167, 198). El recipiente que contiene el extracto se mantiene sumergido en hielo.

Una vez lisadas las células, se hace un ensayo de la actividad β -lactamasa. Se toman 0,1 ml de extracto lisado y se añaden 0,3 ml de solución de nitrocefina (50 $\mu\text{g/ml}$) en tampón fosfato pH=7. El tiempo que tarda en cambiar de color (amarillo a rojo) se utiliza como indicador de la actividad β -lactamásica del extracto. Cuando la concentración de la enzima es muy elevada (p.e. hiperproducción cromosómica o plasmídica) el viraje de la muestra sucede en unos pocos segundos (20-30 seg.).

Posteriormente se realiza la fase de clarificación del lisado bacteriano (separación de los restos bacterianos) centrifugando los extractos (20 minutos a 20.000 rpm y a 4 °C en centrifuga Sorvall rotor SS34) y recuperando el sobrenadante. En el sobrenadante del centrifugado se vuelve a ensayar la actividad con nitrocefina. Los extractos poco activos se han de concentrar mediante liofilización. Una vez concentrado el extracto se reparte en volúmenes adecuados y se guardan congelados a -20 °C.

b) Isoelectroenfoco analítico (IEEA)

1. Equipo y materiales:

- Unidad básica Multiphor® (Pharmacia-LKB© 2117-301).
- Fuente de alimentación de corriente continua (LKB 2103), potencia 1-110 W, voltaje 10-2.000 V y corriente 2-200 mA.

- Baño termostático Multitemp® (LKB 2209) con sistema de recirculación. Gama de temperaturas -10 a 100 °C.
- Placas de poliacrilamida adicionadas de anfolinas®. Los gradientes de pH ensayados han sido de: 3,5-9,5; 4-6,5 y 5,5-8,5.
- pHmetro con electrodo de superficie (LKB Multiphor® electrode).
- Cámara fotográfica (Rolleiflex SL 35M) equipada con filtro verde (Hoya 49 G (XI)).
- Película Kodalith® de 8 ASA de sensibilidad.

2. Electroforesis y revelado:

Sobre la placa de refrigeración de la unidad básica Multiphor, prerrefrigerada a 10 °C, se añade un poco de agua destilada de manera que se forme una película continua entre la placa y el gel de poliacrilamida que se coloca encima.

En la zona de contacto de los electrodos se colocan unas tiras de papel impregnadas con la solución de los electrodos. Las condiciones eléctricas, el tiempo de electroforesis, así como las soluciones de los electrodos varían según el rango de pH empleado (Tabla 15).

Se conecta la corriente y se deja en funcionamiento 60 minutos para que las anfolinas se enfoquen en sus pIs estableciéndose así el gradiente de pH. A continuación se colocan las muestras. Para ello se utilizan unos pequeños recortes de papel rectangulares (Paratex® LKB) impregnados del extracto bacteriano. La muestra se colocará cerca del cátodo o del ánodo según el pI que se sospeche, intentando evitar que el pI coincida con la zona donde se deposita la muestra dificultándose la lectura. Se vuelve a conectar la corriente, y pasados 20 minutos se retiran las tiras de papel para evitar que se vaya liberando muestra continuamente e interfiera en la lectura. Se vuelve a conectar la corriente, y 10 minutos antes de que concluya el tiempo de la electroforesis se procede a la lectura del gradiente de pH entre los electrodos. Se hace una lectura cada 0,5 cm desde el ánodo al cátodo en los espacios entre muestra. Se vuelve a conectar 10 minutos más la corriente para corregir la posible difusión de las muestras durante la medida del pH. El revelado se efectuó con nitrocefina (500 µg/ml). Se recubría el gel con una hoja de papel Whatman® (N1 54) empapada de la solución de nitrocefina. Las β-lactamasas de visualizaron en forma de finas bandas de color rojo. Debido a las diferencias de

concentración de enzima en los extractos algunas β -lactamasas aparecen rápidamente, a los pocos segundos (p.e. las β -lactamasas plasmídicas, ya que se producen en mayor cantidad), mientras que otras se visualizaron posteriormente (ciertas β -lactamasas cromosómicas de producción baja). Se suelen por tanto realizar dos revelados, uno rápido (5 minutos) y otro durante más tiempo (20 minutos). Se realizaron registros fotográficos después de cada revelado.

El sistema permite ensayar 24 extractos. En cada análisis se realizó primero una electroforesis orientativa en placas de pH 3,5-9,5, en el que se intercalaron extractos de cepas patrón con β -lactamasas de pI conocido y de las más frecuentes en enterobacteriáceas. En un segundo ensayo más específico (placas de pH 4-6,5 y 5,5-8,5) se confirmaron los pIs de las β -lactamasas identificadas en el primer ensayo, colocando al lado de las cepas problema las cepas patrón más probables.

Tabla 15. Soluciones de los electrodos, condiciones eléctricas, temperatura y tiempo empleado en los distintos rangos de pH, utilizados para la determinación del punto isoeléctrico.

<i>Límites pH</i>	3,5-9,5	4-6,5	5,5-8,5
<i>Solución</i>	H ₃ PO ₄ 1M	Ac. glutámico 0,1M en H ₃ PO ₄ 0,5M	HEPES 0,4M
<i>Ánodo</i>			
<i>Solución</i>	NaOH 1M	β -alanina 0,1M	NaOH 0,1M
<i>Cátodo</i>			
<i>Potencia</i>	30 W	25 W	25 W
<i>Voltaje</i>	1500 V	2000 V	1600 V
<i>Intensidad</i>	50 mA	25 mA	50 mA
<i>Temperatura</i>	10°C	10°C	10°C
<i>Tiempo</i>	1,5 horas	2,5 horas	2,5 horas

2.3. Transmisión de plásmidos por conjugación

Se ha ensayado la transferencia por conjugación de los posibles plásmidos en todas las cepas portadoras de la β -lactamasa SHV-1 detectada por IEEA y sensibles al ácido nalidíxico (n=54),

excluyendo aquellas que expresaban TEM-1 concomitantemente a SHV-1. Se ha empleado como cepa receptora la *E. coli* K-12 C600 F-, lac-, thia-, leu-, threo-, nalR. Esta cepa posee una β -lactamasa cromosómica con espectro de cefalosporinasa (clase I) con escasa actividad (presenta sensibilidad a la amoxicilina, CIM= 4 μ g/ml).

Técnica de conjugación sobre filtro

Se partió de cultivos de 18 horas en caldo triptosa (Tryptic Soy Broth®, Difco©) de las cepas donadoras y receptora. Se realizó una resiembra mezclando las dos cepas en una proporción 2:1 (receptora:donadora) que se incubó durante 4 horas a 37°C. Se tomó 0,1 ml de la mezcla y se colocó sobre un filtro Millipore situado sobre una placa de agar Mueller-Hinton® (Difco©). Después de que se secase la gota, se incubó 18 horas a 37 °C.

De la masa bacteriana crecida en la superficie del filtro se hizo una suspensión en un caldo triptosa. Se preparó una dilución 1:10 del caldo inicial. Tanto del caldo directo como del diluido 1:10 se realizó una resiembra por agotamiento en una placa de agar-ácido nalidíxico (40 μ g/ml) suplementado con ampicilina (60 μ g/ml), ya que todas las cepas donadoras eran resistentes a esta concentración de ampicilina. Se incubó a 37°C durante 18 horas.

Las colonias aisladas obtenidas en la placa selectiva se resembraron en estrías en placas de agar Mueller-Hinton colocándoles un disco de ampicilina y otro de ácido nalidíxico para confirmar que eran resistentes a los dos antibióticos. Posteriormente se realizó un antibiograma completo de las cepas transconjugantes para conocer los marcadores de resistencia que se habían transferido.

Los experimentos de conjugación bacteriana se realizaron empleando como cepas donadoras únicamente las portadoras de la enzima SHV-1 sola (n=34) o combinada con la enzima de codificación cromosómica LEN-1 (n=20). Se tuvieron que descartar las cepas productoras de la enzima plasmídica TEM-1 (cepas SHV-1+TEM-1, n=20), por no poderse establecer una selección fenotípica de los transconjugantes de SHV-1 puros *versus* los TEM-1. Como la cepa receptora utilizada fue la cepa *E. coli* K-12 nalR, ampS, la selección de las cepas transconjugantes se realizó por identificación de colonias de *E. coli* resistentes a la ampicilina y al ácido nalidíxico.

3. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LAS β -LACTAMASAS BACTERIANAS

En el transcurso de la última década los estudios clásicos, microbiológicos y bioquímicos, de las β -lactamasas bacterianas se han ido complementando con estudios genéticos.

3.1. Aislamiento de DNA

- Extracción de DNA plasmídico

Se han empleado dos métodos diferentes para extraer DNA plasmídico basado en una lisis alcalina de las células y posterior purificación del DNA. La primera técnica que se describe utiliza resinas de intercambio iónico para purificar el DNA de los restos de lisis celular, de proteínas y de RNA. La otra técnica emplea la extracción con fenol/cloroformo para purificar el DNA.

Técnica 1: Protocolo de lisis alcalina y resina para purificación de DNA.

Para la extracción del DNA plasmídico de cepas en las que se desea realizar una extracción en serie, se ha empleado un kit comercial (Magic Miniprep® DNA Purification System, Promega Corporation©). Uno de los problemas de emplear un kit de extracción como este que separa por resinas, es que las cepas ambientales suelen ser portadoras de plásmidos de gran tamaño (superiores a 60 Kb) que no se eluyen tan bien de las columnas.

Partiendo de un cultivo de 18 horas en caldo LB adicionado de ampicilina (60 μ g/ml), se utilizaron 1,5 ml para recuperar las células. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200 μ l de solución de resuspension celular (50 mM Tris, pH=7,5; 10 mM EDTA; 100 μ g/ml RNAsa A). Se resuspendieron bien las células empleando un vórtex para favorecer la lisis posterior. Se añadieron 200 μ l de solución de lisis celular (0,2 M NaOH; 1% SDS) y se mezcló por inversión del tubo hasta que la solución se aclaraba. Cuando la lisis se había completado, se añadían 200 μ l de solución de neutralización (2,55 M acetato potásico) y se mezclaba invirtiendo el tubo hasta que precipitaban los productos de la lisis bacteriana. Para eliminar todo el material grosero que interfiere en la extracción del DNA, se centrifugó el lisado durante 10 minutos en una centrífuga para tubos Eppendorf a máxima velocidad. Se recogió el sobrenadante con cuidado de no arrastrar partículas (precipitado blanco) y se transfirió a un nuevo tubo.

Se adicionó al sobrenadante recuperado 1 ml de resina y se mezcló invirtiendo el tubo dos o tres

veces. Para recuperar el DNA de la resina, se ha empleado una columna que se insertaba en un procesador de hasta 20 muestras conectado al vacío (Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold, Promega Corporation©). Se colocaron las columnas en el procesador y una jeringa sin émbolo a cada columna. Por la jeringa se añadía la resina mezclada con el DNA y se conectaba el vacío. Para eluir los productos indeseables de la columna (Proteínas, lipo y glucoproteínas), se emplearon 2 ml de solución de lavado (1 volumen de solución 0,2 M NaCl; 20 mM Tris pH=7,5; 5 mM EDTA y 1 volumen de etanol 100%). Se dejaba eluir por la columna y después se desconectaba el vacío. Una centrifugación de 1 minuto, colocando la columna dentro de un tubo Eppendorf, ayudaba a eliminar el exceso de solución de lavado. Para recuperar el DNA, se añadieron 50 µl de tampón TE (10 mM Tris pH=8,0; 1 mM EDTA), precalentado a 70°C, a la columna y se centrifugaba a máxima velocidad durante 30 segundos colocando un tubo Eppendorf colector. El DNA recuperado se pudo conservar refrigerado a 4°C, o guardar congelado a -20°C hasta su utilización.

Técnica 2: Protocolo de lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo.

Es un método muy tedioso para la extracción seriada de DNA, sin embargo es un método que permite recuperar con un mayor rendimiento plásmidos grandes, de origen ambiental, portadores en muchos casos de genes de resistencia a los antibióticos.

Se partía de un cultivo de 18 horas en caldo LB adicionado de ampicilina (60 µg/ml) y se utilizaban 1,5 ml del mismo para recuperar las células, centrifugando un minuto a máxima velocidad. Se eliminaba el sobrenadante y se resuspendía el sedimento en 100 µl de solución I (50 mM de glucosa; 10 mM EDTA; 25 mM Tris, pH=8), a la que se le había añadido momentos antes 5 mg/ml de lisozima. Se mantenía cinco minutos a temperatura ambiente. Para la lisis se añadían 200 µl de solución II (0,2 M NaOH; 1% SDS). Se mezclaba bien por inversión del tubo y se mantenía en hielo durante cinco minutos. Posteriormente se añadían 150 µl de solución III enfriada a 4°C (3 M acetato sódico ajustado a pH=4,8 con acético glacial). Tras mezclar por inversión del tubo y mantener 10-15 minutos en hielo, se centrifugaba 15 minutos y se recogía el sobrenadante en un tubo nuevo. Se añadió RNAsa A hasta alcanzar una concentración final de 100 µg/ml y se dejó una hora a 37°C. Se añadía un volumen de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25:24:1, v/v) y se mezclaba bien por inversión del tubo hasta que la solución adquiera un color blanquecino. Centrifugar durante cinco minutos y recuperar la fase superior. Se repetía la fenolización centrifugando esta vez

únicamente 2-3 minutos. Al recuperar debe tenerse cuidado de no arrastrar la interfase blanca protéica. Tras la fenolización se añadía un volumen de éter etílico y se mezclaba por inversión del tubo. Centrifugar unos segundos y recuperar la fase inferior. Para eliminar restos de éter, se colocaba el tubo abierto en un baño a 65°C durante 5-10 minutos. Precipitar el DNA con dos volúmenes de etanol frío durante una hora como mínimo a -20°C. Centrifugar durante 15 minutos (16.000 g), eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento con etanol al 70% (se añaden 500 µl). Se agitaba en el vórtex hasta despegar el sedimento y se centrifugaba 1 minuto. Secar el sedimento al vacío durante 10 minutos y resuspenderlo en 60 µl de TE. El DNA así de podía guardar a 4°C en la nevera o congelado a -20°C.

- Extracción de DNA cromosómico

La extracción del DNA cromosómico se realizó siguiendo el protocolo que propone K. Wilson (Current protocols in molecular biology, Wiley&Son, Inc 1994, volume I supplement 13) (199). Las células se recuperaron de un cultivo en medio líquido para ser lisadas y desproteinizadas mediante digestión con proteinasa K. Las paredes celulares, polisacáridos y remanentes protéicos son eliminados por precipitación selectiva con bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (CTAB, cetyl-trimethyl ammonium bromide), y el DNA de alto peso molecular es recuperado mediante precipitación con isopropanol.

Protocolo

Inocular una colonia de la cepa de interés en 5 ml de caldo LB adicionado con 60 µg/ml de ampicilina, y dejar crecer a 37°C durante 18 horas. Se centrifugan los tubos a 4000 rpm durante 5 minutos para recuperar las células en el sedimento. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento con 2268 µl de tampón TE. Se añaden 120 µl de SDS al 10% y 12 µl de proteinasa K (20 mg/ml) para obtener una concentración final de 100 µg/ml en 0,5% de SDS. Mezclar suavemente e incubar 1 hora a 37°C. La solución se va volviendo viscosa a medida que el detergente lisa las células y no es necesaria una predigestión de la pared bacteriana con lisozima. Tras la incubación, se adicionan 400 µl de NaCl 5 M y se mezcla cuidadosamente. Es muy importante mantener la concentración de NaCl por encima de 0,5 M ya que se pueden formar precipitados de CTAB-ácidos nucleicos trabajando a temperatura ambiente. Se adicionan 320 µl de solución CTAB/ NaCl (10% CTAB; 0,7 M NaCl), mezclar e incubar durante 10 minutos a 65°C. La función de las sales y del CTAB consiste en eliminar restos de pared celular, desnaturalizar proteínas y formar complejos de polisacárido con CTAB,

dejando libres los ácidos nucleicos en la solución. Tras la incubación se añadió un volumen de cloroformo:isoamilalcohol (24:1), se colocaba el tubo en un agitador rotativo a 25 rpm durante 20 minutos y después se centrifugaba durante 10 minutos a 4000 rpm (centrífuga clínica). Esta extracción eliminaba los complejos de CTAB-proteína / polisacárido apareciendo una interfase blanca tras la centrifugación. Recuperar la fase acuosa que es viscosa y pasarla a un nuevo tubo procurando no arrastrar nada de interfase. En este punto se añadían 30 µl de RNasa A, ribonucleasa pancreática (10 mg/ml), para obtener una concentración final de 100 µg/ml y se incubaba al menos una hora a 37°C. Añadir un volumen de fenol/ cloroformo/ isoamilalcohol (25:24:1) y dejar mezclar bien a 25 rpm durante 20 min. Centrifugar durante 10 minutos a 4000 rpm. Con esta extracción conseguimos eliminar los restos protéicos (RNasa) y de CTAB. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y añadir 0,6 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. No es necesario añadir sales ya que la concentración de NaCl es todavía elevada. Agitar suavemente el tubo para que la madeja de DNA se vaya formando lentamente. Recuperar la madeja de DNA con una pipeta Pasteur calentada al fuego y convertida en palo de golf. Posteriormente lavar la madeja de DNA, con ayuda de un capilar en forma de asa, con etanol al 70% para eliminar sales y residuos de CTAB, y después transferirlo a un tubo de congelación de 2 ml. Dejar evaporar el alcohol durante 5 minutos debajo de una lámpara y luego colocar en el desecador conectado al vacío durante 10 minutos más. Redissolver el sedimento en 200 µl de tampón TE y colocarlo, en cámara fría a 4°C, en un agitador rotativo (10 rpm) un par de días para asegurar su completa disolución.

3.2. Gen de la β-lactamasa SHV-1: Preparación de una sonda específica

El Profesor Dr. George A. Jacoby (Lahey Clinic, Burlington, MA., USA) nos facilitó la cepa *E. coli* HB101 (F-, hsdS20, recA13, ara-14, proA2, leu, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-55, mtl-1, supE44) conteniendo el gen de la β-lactamasa SHV-1 (*bla-SHV-1*) clonado en el plásmido pMON38 (102, 200). El gen se había aislado previamente del plásmido R974 de una cepa de *Klebsiella* sp. (98).

Así, el gen *bla-SHV-1*, fue primeramente subclonado en el plásmido pACYC184 mediante una digestión con BamHI (pMON31). Posteriormente el fragmento subclonado fue seriadamente deleccionado con las enzimas de restricción PvuII y Aval para obtener los plásmidos pMON36

y pMON34 consecutivamente. Una última delección utilizando la enzima ClaI permitió obtener el plásmido pMON38, localizándose el gen de la β -lactamasa SHV-1 en una región ClaI-SmaI (Figura 9). El plásmido pMON38 contiene el gen *bla-SHV-1* (1372 pb) que incluye: 124 pb de la región promotora 5' del gen; 864 pb de región codificante y 384 pb de la zona 3' del gen. Posteriormente pMON38 fue introducido en la cepa *E. coli* HB101.

El gen de la β -lactamasa SHV-1 había sido secuenciado inicialmente por Mercier y Levesque en 1990 y fue posteriormente reconfirmado por Bradford en 1999, identificándose algunos errores de secuencia debido en parte a su elevado contenido de GC (60%) (102). El conocimiento de la secuencia de aminoácidos y nucleótidos que codifican para la β -lactamasa SHV-1 se realizó a través de los trabajos publicados anteriormente (102, 200) y mediante el acceso a bancos de datos (EMBL y GenBank, M59181 y AF148850, respectivamente). En la actualidad existe una página web en la que se recogen las β -lactamasas SHV, TEM y OHIO (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) y cuya nomenclatura está bajo la dirección de los Profesores Dr. G. A. Jacoby y Dra. K. Bush.

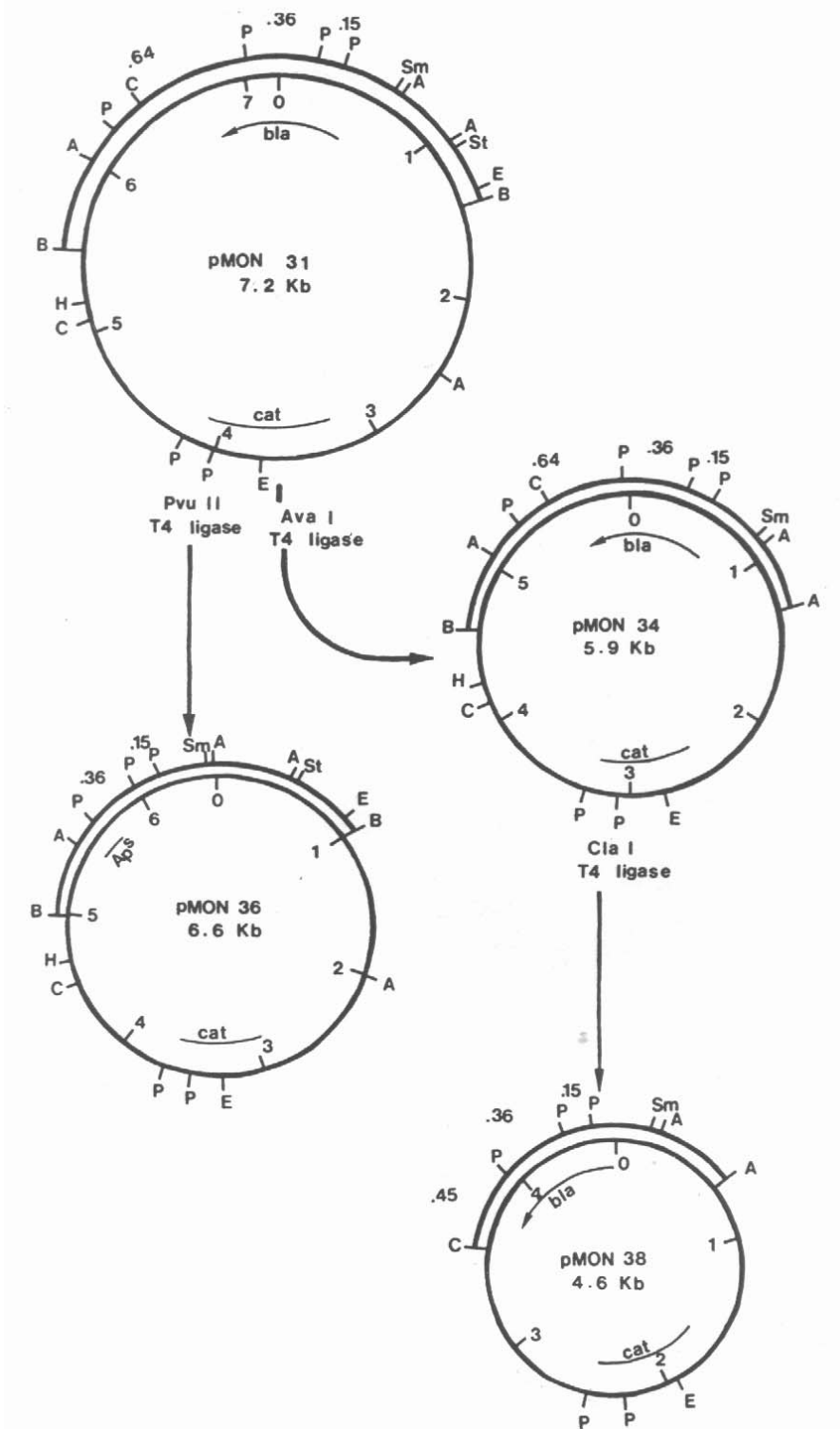
Así pues, recuperando de los bancos de datos la secuencia de SHV-1 y de otras β -lactamasas relacionadas con ella (LEN-1 y OHIO-1, GenBank XO4515 y M33655, respectivamente), y con el empleo de programas informáticos (GCG package, Wisconsin University) se pudieron realizar:

- Mapas de restricción empleando diferentes enzimas de restricción.
- Validación de la especificidad de los cebadores en bancos de datos.

- Fragmento específico del gen *bla-SHV-1*

Numerosos autores han utilizado el fragmento de 150 pb recuperado por restricción con PvuII como sonda específica para detectar el gen *bla-SHV-1* (201, 202). Este fragmento de DNA se ha definido como uno de los más específicos para la detección de SHV-1, aun así su elevada homología de secuencia con LEN-1 y OHIO-1 no permite evitar una hibridación cruzada con estos genes. En nuestro estudio definimos una pareja de cebadores para amplificar esta región en los análisis de PCR y, además, emplearla como sonda en los análisis de RFLP's. Por cuestiones de estrategia en la definición de los cebadores, el fragmento amplificado tenía un tamaño de 178 pb (a partir de ahora denominada **SHV₁₇₈**) en las que quedaban incluidas las 150 pb referidas anteriormente y contenía una única diana NotI específica de SHV-1.

Figura 9. Esquema del clonaje del gen *bla-SHV-1* en pMON38.



Nota: Tomado de Mercier y cols. (200).

3.3. Análisis de la presencia del gen: PCR

Para poder identificar si las cepas de *K. pneumoniae* eran portadoras del gen codificante de la β -lactamasa SHV-1, se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- Definición de los cebadores ("primers")

Los cebadores elegidos delimitan el fragmento mencionado del gen, que abarca 178 pb codificante para 58 aminoácidos y que incluye el centro activo de la enzima. La mayor parte de este fragmento es utilizado frecuentemente por numerosos autores debido a su gran especificidad respecto al resto de β -lactamasas (201). Únicamente se ha encontrado hibridación cruzada con las β -lactamasas plasmídicas SHV-like (mutantes derivados de SHV-1 que han ampliado su espectro de actividad a cefalosporinas de tercera generación y monobactamos). Así, al comparar la zona a amplificar de las secuencias de las β -lactamasas con mayor grado de homología con dicho fragmento, se observó lo siguiente:

	SHV₁₇₈
SHV-1	100,0 % (178/178)
OHIO-1	95,5 % (170/178)
LEN-1	88,7 % (158/178)
TEM-1	60,1 % (108/178)

Con el resto de β -lactamasas existen mayores diferencias en la homología de secuencia.

Además de delimitar la zona que nos interesaba amplificar, cuando se han definido los cebadores, se han tenido en cuenta los parámetros de interés siguientes:

A) *Longitud de los cebadores*: Se han definido iniciadores de 20 pb sobre la base que se estima que la longitud de los mismos debe moverse entre 15 y 30 pb. La longitud mínima define el número de nucleótidos que, debido al tamaño del genoma del organismo, se prevé que únicamente tengan una copia. Delimitar el número máximo de nucleótidos del cebador se justifica por los problemas que en la reacción de amplificación se crean al tener fragmentos relativamente grandes de DNA.

- B) *Porcentaje de G+C*: A fin de obtener un buen balance de hibridación, conviene que se ajuste lo más posible al 50%. Los triples enlaces que se establecen entre guanina y citosina confieren una gran estabilidad a la doble cadena y pequeñas homologías con otras secuencias crearían problemas de amplificaciones inespecíficas.
- C) *Validación de la especificidad* de las secuencias de los cebadores en los bancos de datos existentes: Este es quizás el punto más importante de la definición de los cebadores. Es necesario conocer si los cebadores que vamos a utilizar presentan homología estructural con secuencias conocidas e introducidas en los bancos de datos (GenBank y EMBL). Usando el programa GCG (Wisconsin University), hemos procedido a la búsqueda de secuencia homóloga con nuestros cebadores. Dicho programa utiliza el comando "fasta" basado en una modificación del algoritmo de Wilbur y Lipman, 1983 (203). Entre los resultados obtenidos en la búsqueda en los bancos de datos, hemos puesto especial énfasis en las secuencias que se referían a bacterias. Es necesario destacar que la extracción del DNA se ha realizado a partir de cultivos puros y reidentificados de *Klebsiella pneumoniae*. Únicamente se han tenido en consideración, aunque en algunos casos se encontró una elevada homología de secuencia con otros organismos, las secuencias de DNA bacteriano. Como era previsible, las secuencias de las β -lactamasas plasmídicas tipo SHV y la β -lactamasa plasmídica OHIO-1, hibridaban con un 100% de identidad con los 20 pb de nuestros iniciadores (Tabla 16). La β -lactamasa OHIO-1 fue identificada en *Enterobacter cloacae* y está íntimamente relacionada con la familia SHV. La β -lactamasa cromosómica de *Klebsiella pneumoniae* LEN-1 hibridaba con un 100% de identidad en 19 de los 20 pb en sólo uno de los dos cebadores; mientras que el otro cebador solamente presentó 13 nucleótidos en común con la zona de hibridación.
- D) *Temperatura de disociación (Td)*: La Td es la temperatura a la que las cadenas de DNA se encuentran al 50% en cadena sencilla. Conocer este valor proporciona la temperatura máxima de hibridación de la PCR. La experiencia de laboratorio aconseja el empleo de una temperatura de siete grados por debajo de la Td. Esta temperatura viene determinada por la longitud y composición de bases de los cebadores. Conviene trabajar a la temperatura más alta posible para asegurar el mayor grado de especificidad de la reacción.
- E) *Otros factores que pueden comprometer el rendimiento o practicabilidad de los cebadores*:
- E.1.) Complementariedad en los extremos 3'OH: La presencia de dicha complementariedad provoca la formación de dímeros de cebadores (*primers-dimers*) con la consecuente pérdida de rendimiento en la reacción.

E.2.) Complementariedad interna: Formación de estructuras internas tipo bucles, que no favorecen la hibridación correcta con el DNA a amplificar.

E.3.) Presencia de G+C en el extremo 3'OH: Se ha de evitar que el número de G+C del extremo 3'OH sea excesivamente elevado ya que podrían aparecer problemas de hibridación y posterior amplificación inespecífica. Esto sucede así porque la Taq polimerasa reconoce este extremo y es por el que elongará posteriormente la cadena a sintetizar de novo.

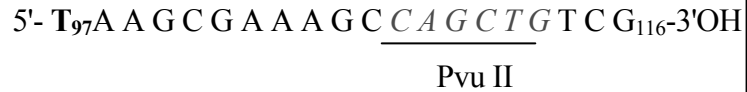
Muchas veces sin embargo, se han de elegir secuencias que no cumplen con la mayoría de los postulados aquí expuestos. En cierto modo, esto puede ser aceptable siempre que se tenga en cuenta el resultado de la búsqueda de secuencias homólogas en los bancos de datos y el margen de maniobra que quedaría al ajustar las condiciones de restricción en la reacción de amplificación.

Tabla 16. Homologías de los iniciadores y las secuencias de algunas de las β -lactamasas más similares a SHV-1. Cebador 1 (cebador directo); cebador 2 (cebador reverso).

β-lactamasas	Nº acceso	% Homología con	
		Cebador 1	Cebador 2
SHV-1	M59181/AF148150	100	100
SHV-2a	X62115	100	100
SHV-5	X55640	100	100
LEN-1	X04515	95	65
OHIO-1	M33655	100	100

Secuencias de los cebadores para amplificar el gen bla-SHV-1 por PCR.

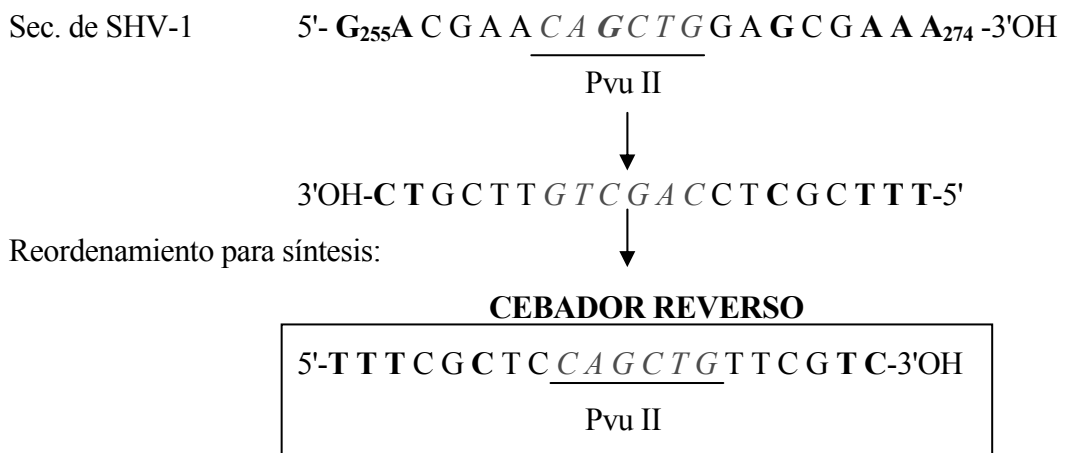
1.- Cadena directa: La síntesis sigue la dirección 5' →3' de la secuencia de SHV-1. El cebador está situado entre la posición T₉₇ y G₁₁₆ de la región codificante del gen de SHV-1 (GenBank AF 148850). El peso molecular es de 6147 UMA (Unidades de Masa Atómica).



La secuencia consta de 20 pb (A=6, C=5, T=3, G=6) y presenta un 45% de A+T y un 55% de G+C. La Td del oligonucleótido es: $Td = 4(G+C) + 2(A+T) = 62^{\circ}C$.

Incluye la diana de restricción Pvu II que permitiría recuperar la sonda de 150 pb. Desde un punto de vista práctico, representa una gran ventaja el poder disponer de una diana de restricción dentro del cebador. Con ello podríamos recuperar el fragmento amplificado y subclonarlo en un vector para una posible secuenciación. Sin embargo, este cebador presenta además una secuencia altamente homóloga con la β-lactamasa cromosómica LEN-1 de *K. pneumoniae*, diferenciándose únicamente en un nucleótido (resaltado en negrita) con la secuencia a amplificar.

2.- Cadena reversa: La síntesis sigue la dirección 3' →5' de la secuencia de SHV-1. El cebador está situado entre la posición G₂₅₅ y A₂₇₄ de la región codificante del gen de SHV-1. El peso molecular es de 6022 UMA (Unidades de Masa Atómica).



La secuencia tiene 20 pb (A=1, C=7, T=8, G=4) y presenta un 45% de A+T y un 55% de G+C.

La Td del oligonucleótido es: $Td = 4(G+C) + 2(A+T) = 62^{\circ}\text{C}$

Incluye también la diana de restricción Pvu II que permitía recuperar la sonda de 150 pb y su empleo para subclonaje. Este cebador presenta 7pb no homólogos (en negrita) con la β -lactamasa LEN-1. Esta característica permite una discriminación de hibridación entre SHV-1 y LEN-1. Desde un punto de vista teórico ambos iniciadores (directo y reverso) tienen una longitud de 20 pb, no presentan complementariedad en sus extremos 3'OH (presuntamente no formarán *primer-dimers*) ni complementariedad interna (presuntamente no formarán bucles) y el número de G+C en los extremos 3'OH no evidencia que se vayan a crear problemas de hibridación inespecífica.

Tal y como se muestra en la Tabla 16, estos iniciadores presentaban homología con β -lactamasas dentro de la especie *K. pneumoniae*. Sin embargo, estos problemas serán fácilmente solventados empleando la siguiente metodología:

- Trabajar con cultivos puros. Eliminando así el problema de hibridación con secuencias de DNA que no sean de *K. pneumoniae*.
- Análisis previo de los pl de las β -lactamasas de cada una de las cepas.
- Empleo de altas temperaturas de hibridación de los cebadores. Se intentó evitar la amplificación por apareamiento incorrecto (*mispriming*) de la β -lactamasa cromosómica LEN-1 de *K. pneumoniae*.
- PCR-RFLP's con la enzima Not I. Esta enzima presenta una diana de restricción exclusiva para SHV-1 y que no está presente en la correspondiente región de LEN-1 ni de OHIO-1. Así con una técnica de PCR-RFLP se podrá validar la especificidad de todos los productos de las reacciones de PCR.

- Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Fundamento de la reacción, especificidad:

Se propone establecer una reacción de PCR-RFLP's específica para un área codificante del gen de la β -lactamasa SHV-1 que discrimina, a través de una diana específica determinada por la enzima de restricción Not I, del resto de β -lactamasas. La positividad de las reacciones de amplificación determinarán, sin lugar a dudas, la integridad del fragmento que codifica el centro activo de la enzima, lo que no implica necesariamente la funcionalidad del gen, ni su correcta expresión. Constituye pues una reacción altamente específica y sensible que nos indica la

presencia del gen.

Condiciones de la reacción.

Para poder trabajar con un elevado rendimiento en la reacción de amplificación y, al mismo tiempo trabajar con las condiciones mayores de especificidad posibles, es necesario ajustar todos los parámetros que van a influir en la misma. Dichos parámetros se pueden resumir en: Temperatura de hibridación, tiempos de los ciclos, número de ciclos, concentración de iones magnesio, cantidad de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), cantidad de cebadores y de DNA a amplificar.

Validación de la reacción usando el plásmido portador de SHV-1

En una primera fase se ha trabajado con la temperatura a la que tienen unión los cebadores con el DNA molde (pMON 38). Como los cebadores elegidos presentaban una temperatura de fusión (Td) de 62 °C, se decidió trabajar, como está descrito, siete grados por debajo de esta temperatura como punto de partida. Se disponía de un termociclador 9600 Perkin Elmer® que permitió realizar los siguientes ciclos de la PCR:

X 30 ciclos	{	- Desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 minuto.
		- 92 °C durante 10 segundos. DESNATURALIZACION.
		- 55 °C durante 10 segundos. HIBRIDACION.
		- 72 °C durante 10 segundos. EXTENSION.
		- Extensión final de un minuto a 72 °C.
		- Guardar refrigerado a 4°C.

Para trabajar con estas condiciones se ensayaron las siguientes concentraciones y cantidades de reactivos:

1. PCR MASTER® Boehringer© (Mannheim, Alemania), es una mezcla comercial estabilizada de reactivos a las concentraciones siguientes: Taq (2,5 U en Brij 35), Tris HCl (10 mM), KCl (50 mM), MgCl₂ (1,5mM), dNTP's (0,2 mM). Este tipo de preparados

se emplea como estándar de reacción no pudiéndose variar excesivamente estos parámetros. El volumen añadido es de 25µL.

2. DNA molde: En este caso el plásmido que lleva clonado el gen *bla-SHV-1*.
3. Los cebadores fueron obtenidos comercialmente y disueltos en tampón TE y se conservan a -20 °C. Se preparó una solución madre de 20µM y de aquí se cogen 0,5µL de cada uno. La concentración final en la reacción es de 0,2 µM, correspondiente a 10 pmoles de DNA.
4. Agua bidestilada estéril hasta 50µL.

La primera prueba dió como resultado una buena amplificación del fragmento de longitud esperada de 178 pb, a las tres concentraciones probadas de pMON 38. A la vista de los resultados, se eligió trabajar con la concentración intermedia (0,1 ng) de pMON 38 y pasar a probar diferentes temperaturas de hibridación de los cebadores con nuestra sonda. La experiencia previa de laboratorio indica que la amplificación específica del DNA en una PCR se comporta como una distribución Normal respecto a la temperatura de hibridación. Es necesario conocer en qué momento la curva de la temperatura empieza a caer por los dos extremos para poder trabajar en la zona de máxima eficiencia de amplificación. Las siguientes temperaturas que se probaron fueron de 50, 60, 45 y 65 °C. Hasta las dos últimas no se empezó a ver una disminución en el rendimiento de la PCR, así que la ventana de trabajo quedó delimitada entre 50 y 60 °C. Con el fin de reoptimizar la especificidad en muestras problema, se eligió la temperatura de 55 °C que comportaba mayor astringencia y rendimiento eficaz en la PCR.

Validación de las condiciones de la PCR en muestras problema.

Conseguidas unas buenas condiciones de amplificación para el clon portador de la sonda, se procedió con muestras de DNA cromosómico y plasmídico de cepas procedentes de aislamientos clínicos. Se probaron cinco extractos de DNA cromosómico, uno de DNA plasmídico (todos ellos de cepas en las que se determinó la β-lactamasa SHV-1 por IEEA). Como controles negativos se usaron: Un extracto de DNA cromosómico de una cepa portadora de la β-lactamasa cromosómica LEN-1 y, dos extractos más de DNA plasmídico de cepas sin SHV-1. En una primera fase, se emplearon las mismas condiciones de partida que las utilizadas para la amplificación de pMON 38, usando como temperatura de hibridación 55 °C. Únicamente se varió la cantidad de DNA cromosómico añadido a la reacción que se estimó en 100 ng. Con el fin de reoptimizar el método, en una segunda fase se desestimó la mezcla

comercial (PCR master®) de reactivos para PCR, lo cual nos permitió variar ciertas condiciones y aumentar más la especificidad de la reacción. La estrategia a seguir se basó en la comprobación de los siguientes parámetros:

- ◆ Corregir la cantidad de DNA cromosómico añadido, teniendo en cuenta la dificultad de pipeteo que presenta debido a su viscosidad. Añadir unos 100 ng, partiendo de una dilución del “stock” de DNA.
- ◆ Temperatura de hibridación. Se probaron las muestras a las temperaturas de 50, 52, 54, 55, 56 y 58 °C.
- ◆ Concentración de MgCl. Fueron ensayadas a 0,9 mM, 1 mM, 1,1 mM, 1,2 mM, 1,3 mM, 1,4 mM y 1,5 mM en todas las muestras.
- ◆ Porcentaje de DMSO añadido. Se sabe que el DMSO favorece la hibridación de los iniciadores y por ello se probaron concentraciones de 0, 3, 5 y 10%.

De todas estas variaciones posibles se definió una reacción que permitiendo una buena amplificación, al mismo tiempo mantenía unas condiciones notables de especificidad teórica.

1.- DNA.....100 ng
2.- MgCl.....1,3 mM
3.- DMSO.....5%
4.- T ^a de hibridación.....55°C

- Especificidad del producto amplificado: PCR-RFLP

Como punto final a la puesta a punto de la metodología hubo que valorar la especificidad del producto amplificado (fragmento SHV₁₇₈) que presentaba una diana interna de restricción para Not I. Es una enzima de corte “raro” ya que reconoce una diana de 8 pb (GC GGCC GC), y divide al fragmento de 178 pb en dos de 56 pb y 118 pb respectivamente. Como Not I no corta dejando extremos romos, ambos fragmentos presentan una cola de cadena sencilla en sus extremos de 4 bases.

Se sabe que Not I no corta al fragmento del gen de la β-lactamasa LEN-1 por ello es un buen control de calidad de amplificación de SHV-1, cuando existe la posibilidad de que ambos genes

estén presentes en el cromosoma.

3.4. Aproximación al locus génico: RFLP-Southern-blot

Con el fin de analizar los fragmentos de restricción que iban a definir la localización del locus génico de la β -lactamasa SHV-1, se realizaron los RFLP-Southern-blot de las muestras siguiendo los siguientes pasos:

Marcaje de la sonda

La sonda SHV₁₇₈ se marcó con digoxigenina unida al uracilo (DIG-dUTP) empleando un kit de marcaje no radioactivo de Boehringer® (Mannheim, Alemania) mediante PCR de manera que, al mismo tiempo que se amplificaba la sonda se lograba un intenso marcaje de la misma. Una de las ventajas de usar este sistema frente al de las técnicas tradicionales de marcaje de “nick translation” y “random priming”, es que permitió obtener los fragmentos de DNA del tamaño esperado (178 pb) y al mismo tiempo con una alta intensidad de marcaje. Este tipo de marcaje por PCR es muy útil para sondas, especialmente de las características de la que hemos empleado, con pocas pb.

Estrategia de aproximación: Fragmentos de restricción polimórfica (RFLPs)

Para realizar un primer cribado de las cepas se emplearon diferentes tipos de enzimas de restricción según (Tabla 17):

- No cortasen a los genes *bla-SHV-1*, *bla-LEN-1* ni a *bla-OHIO-1*.
- Una única diana en todos los genes.
- No cortasen al gen *bla-SHV-1* pero sí el gen *bla-LEN-1*.
- Diana específica para el gen *bla-SHV-1* y no para el gen *bla-LEN-1*.

La cantidad de DNA cromosómico añadido fue de 3 μ g llevándose a un volumen final de 25 μ l con agua destilada estéril. De cada enzima se añadieron 3 U/ μ g de DNA y se dejaron actuar toda la noche a la temperatura y condiciones que recomienda la casa comercial. Al día siguiente y para asegurar una digestión completa se añadió a cada muestra 0,7 μ l adicionales de enzima y se dejó actuar durante al menos cuatro horas más.

Para finalizar se paró la reacción enzimática empleando: 2 μ l de EDTA 0,5 M y 4,5 μ l de

solución de carga de electroforesis (azul de bromofenol 0,25% en 10X TBE, 50% de glicerol). Estas muestras, así preparadas, se podían guardar congeladas hasta el momento de su análisis electroforético.

Tabla 17. Enzimas de restricción susceptibles de ser utilizados en el análisis de las cepas de *K. pneumoniae* productoras de las β -lactamasas SHV-1 y LEN-1. Se incluye comparativamente el gen *bla-OHIO-1*.

Enzimas de Restricción	<i>bla-SHV-1</i> (n° de dianas)	<i>bla-LEN-1</i> (n° de dianas)	<i>bla-OHIO</i> (n° de dianas)
Apa I, Eco RI, Eco RV, Hind III, Sca I, Xba I	0	0	0
Pst I	1	1	1
Not I	1	0	0
Bam HI, Kpn I, Sma I	0	1	0

Electroforesis

La electroforesis se realizó empleando geles de agarosa al 0,5% ó al 0,7% en 1x TBE (45 mM Tris; 45 mM ácido bórico; 1 mM EDTA pH>8,0) suplementado con 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio) según se esperase observar fragmentos de DNA de mayor o menor tamaño. El tampón de electroforesis fue TBE 1X. Los moldes para realizar los geles eran de 20X20 cm y se emplearon peines de 22 pocillos donde se podrían cargar hasta 40 μ l de muestra. Las condiciones de electroforesis fueron de 35 voltios, constantes durante 24 horas. Con este bajo voltaje se conseguían unas condiciones de separación lenta que al mismo tiempo reducía el “efecto sonrisa” (*smiling*) de las bandas y una mejor resolución en la separación. En cada electroforesis se dispuso un marcador de tamaños de DNA lineal (Lambda \perp HindIII) para identificar fragmentos desde 0,5 a 23 Kb.

Acabada la electroforesis se realizaba una impresión fotográfica de la misma exponiendo el gel a un transiluminador de luz ultravioleta para geles y realizando una fotografía con una máquina polaroid DS34 acoplada a una cámara oscura (hood SV-12) y usando una película Polaroid 667®. Antes de tomar la foto, en los lados del gel se disponía una cinta de papel milimetrado para estimar la migración relativa de las bandas. Esto permitió establecer el rango de separación en virtud de la migración de los fragmentos del marcador de DNA.

Transferencia del gel a soporte sólido, membrana de nylon

La transferencia se realizó mediante el sistema Vacu-Gene XL® de Pharmacia© (Uppsala, Suecia), empleando como soporte membrana de nylon cargada positivamente Boehringer© (Mannheim, Alemania). La presión de vacío empleada para la transferencia fue de 55 mbar.

Fases de la transferencia:

1. Acondicionamiento de la membrana de nylon 20X20 cm en 20xSSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-citrato pH=7,0). El gel se coloca encima de la membrana de nylon en la plataforma del sistema Vacu-Gene XL.
2. Tratamiento de los geles:
 - 2.1. Proceso de depurinación con 0,25 M de HCl. Duración 20 min.
 - 2.2. Proceso de desnaturalización con 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH. Duración 20 min.
 - 2.3. Proceso de neutralización con 1M Tris-HCl (pH= 5), 2M NaCl. Duración 20 min.
 - 2.4. Proceso de transferencia con 20X SSC. Duración 60 min.

Es muy importante que todas las soluciones se empleen filtradas y que durante los períodos de transferencia la superficie del gel esté bañada continuamente, a demanda.

Finalizada la transferencia se marcaban los pocillos y se retiraban los geles observándolos nuevamente en el transiluminador como medida indirecta de que la transferencia fue completa. La membrana se dejó secar bajo una luz a temperatura ambiente. Cuando estaba seca se colocaba entre dos hojas de papel Whatman 3 MM-CHR y se dejaba en el horno a 90 °C durante 2 horas para fijar el DNA a la membrana.

Hibridación y detección de las membranas

La última fase del Southern-blot incluye tres sub-apartados adicionales: Prehibridación, hibridación y detección del fragmento de DNA. Para la realización de estos pasos se ha utilizado un método descrito por Engler-Blum y cols. (204) al que se le han realizado pequeñas variaciones. Estos autores, optimizaron un protocolo de hibridación para sondas marcadas no radioactivamente, reduciendo los problemas de ruido de fondo (background) obteniendo al mismo tiempo, una sensibilidad comparable a las sondas radioactivas.

Prehibridación

Este paso se realiza previo a la hibridación con la sonda, para bloquear el filtro e impedir que se den uniones inespecíficas de la misma.

En primer lugar se rehidrató la membrana en 30 ml de 2X SSC precalentado a 68 °C, y se colocó dentro del horno de hibridación rotando a 5 rpm, a la misma temperatura durante 15 min. Transcurrido el tiempo se eliminó la solución y se añadieron 10 ml de solución de prehibridación, dejándola actuar en el horno cuatro horas a rotación lenta.

Sol. prehibridación:

0,25M Na ₂ HPO ₄
1mM EDTA
20% SDS
0,5% Agente de bloqueo Boehringer© (Mannheim, Alemania)

Hibridación

Se han empleado unas altas condiciones de astringencia jugando con la temperatura (horno de hibridación a 68 °C) para conseguir trabajar con la mayor especificidad posible.

Transcurridas las cuatro horas de la prehibridación, se eliminó la solución y se sustituyó por otros 10 ml de solución de prehibridación nueva a la que se le había añadido la sonda marcada previamente desnaturalizada.

Para desnaturalizar la sonda (25 ng de DNA marcados en 10 µl) se disponían 10 µl + 40 µl de agua destilada estéril y se llevaban a ebullición (100°C) durante 10 minutos. Se colocó en hielo para evitar que las cadenas se reasocien y luego se añadió a la solución de hibridación previamente calentada a 68°C. Rápidamente se colocaba la botella a rotar en el horno, que se mantenía a 68 °C, y se dejaba que la sonda hibridara toda la noche (12-14 h).

Una vez la hibridación había concluido, se retiraba la solución de hibridación y se realizaban una serie de lavados posthibridación para eliminar los restos de sonda. Con 50 ml de tampón de

lavado cada vez, se efectuaban tres lavados de 20 minutos de duración con el horno a 68 °C y en rotación lenta (5 rpm).

Tampón de lavado: 20mM Na₂HPO₄
1mM EDTA
1% SDS

Detección

El fundamento de la técnica empleada se basa en una detección inmunológica empleando un sustrato quimioluminiscente. Para ello se realizó un bloqueo previo de la membrana seguido de una incubación con el anticuerpo antidigoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina; seguidamente una serie de lavados antes de añadir el sustrato y finalmente la detección por impresión en una película fotográfica.

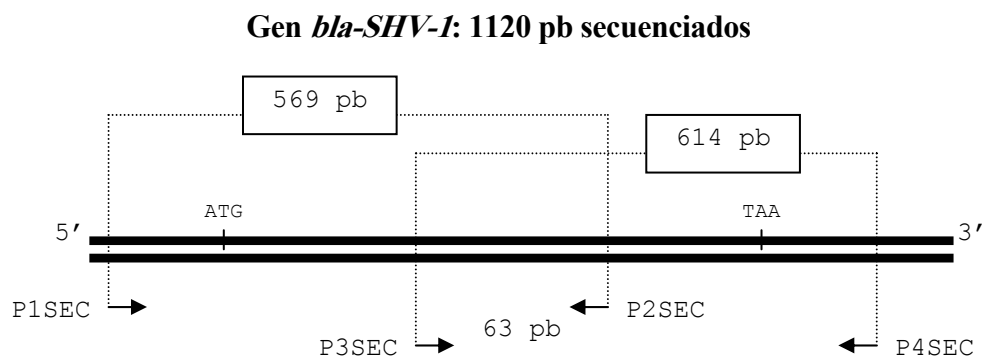
Protocolo de detección:

- ◆ Lavar la membrana con 50 ml de tampón 1: 0,1 M Tris-HCl, pH=7,5, 3M NaCl, 0,3% Tween 20.
- ◆ Incubar con 100 ml de tampón de bloqueo: Tampón 1 + 0,5% agente de bloqueo (Boehringer Mannheim).
- ◆ Diluir el anticuerpo antidigoxigenina a 1:15000 en 40 ml de tampón de bloqueo e incubar durante 30 minutos.
- ◆ Eliminar el exceso de anticuerpo lavando dos veces con 100 ml de tampón 1 durante 20 minutos.
- ◆ Equilibrar la membrana durante 5 minutos con 50 ml de tampón sustrato: 0.1 M Tris-HCl, pH= 9,5, 0,1M NaCl, 50mM MgCl₂.
- ◆ Incubar la membrana con 10 ml de CSPD (disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}] decan}-4-yl) phenylphosphate), Boehringer© (Mannheim, Alemania); dilución 1:100 durante 5 minutos.
- ◆ Secar la membrana eliminando el exceso de líquido, colocarla entre dos transparencias y envolver todo el conjunto en film de plástico Saram® (Dow©, EEUU). Incubar a 37°C durante 15 minutos para exaltar la reacción enzimática.
- ◆ Exponer la membrana a una película fotográfica (Hyperfilm MP®, Amersham, Inglaterra) durante tres horas. Revelar la película.

3.5. Secuenciación

Se ha secuenciado un fragmento de 1120 pb del gen de la β -lactamasa SHV-1 (1372 pb, EMBL M59181). Debido al alto contenido de GC del gen, se ha utilizado un método automático de secuenciación basado en PCR tal como recomienda Bradford (102). El método empleado para la secuenciación se basa en secuenciar fragmentos del gen que se amplifican selectivamente en una primera reacción de PCR. Se procede después a la reacción propiamente dicha de secuenciación de los fragmentos amplificados según el método de Sanger (205) usando terminadores marcados con fluorescencia y una polimerasa específica que permite trabajar a altas temperaturas ($>37^{\circ}\text{C}$) usando el equipo de PCR (reacción automática en ciclos). Así, este tipo de secuenciación en ciclos resulta óptimo para secuenciar DNA de doble cadena, inclusive si éste tiene un alto contenido de GC que precisa una desnaturalización completa. Se procedió con el uso del kit ABI PRISMTM Dye Terminator (Perkin Elmer©) para PCR, optimizado para secuenciar unas 700 pb, y acoplado a un secuenciador ABI PRISM 377 (Perkin Elmer©). Dicho kit contiene una Taq polimerasa especialmente modificada y optimizada (Amplitaq DNA polymerase FS, Perkin Elmer©), así como la inclusión en los terminadores de dITP en lugar de dGTP para minimizar zonas de compresión de bandas debido al alto contenido de GC en la secuencia.

Se estimó oportuno secuenciar el gen en dos ensayos encadenados, obteniéndose dos fragmentos de DNA de unas 600 pb (569 y 614 pb respectivamente) con una parte común solapada de 63 pb para asegurar la continuidad de la zona secuenciada. Se secuenciaron ambas cadenas de DNA (directa y reversa) mediante el uso de dos pares de cebadores. Ver esquema adjunto:



La optimización del protocolo de trabajo seguido en la secuenciación del gen consta de las siguientes etapas: Diseño de los cebadores, puesta a punto del método de PCR para amplificar los

fragmentos a secuenciar, purificación de los fragmentos amplificados, reacciones de secuenciación de cada cadena de DNA molde en ambas direcciones (5'→3' y 3'→5'), preparación y análisis de las muestras en el gel.

- Diseño de los cebadores

Se generaron cuatro cebadores, dos para cada fragmento, que garantizaban la obtención de la secuencia de todo el gen incluyendo la región codificante (864 pb), 117 pb anteriores al triplete de inicio y 139 pb posteriores al triplete de stop.

Tras la definición de los cebadores se realizó una búsqueda de secuencias con el comando FASTA para determinar su especificidad respecto a secuencias bacterianas almacenadas en los bancos de datos GenBank y EMBL.

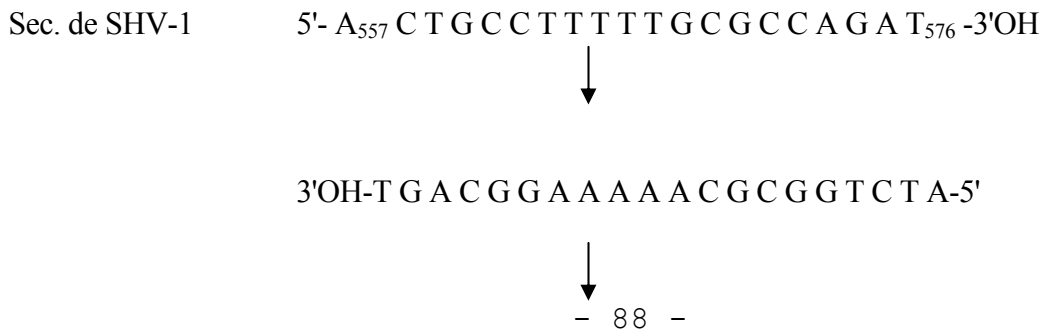
El primer par de cebadores amplifica desde la región 5' del gen un fragmento de 569 pb y sus secuencias son la siguientes:

1.- Cadena directa (P1SEC): La síntesis seguía la dirección 5'→3' respecto de la secuencia de SHV-1. El cebador está situado entre las posiciones de los nucleótidos G₈ y A₂₇ incluidos en zona no codificante del gen de SHV-1.



La secuencia, de 20 pb (A=11, C=0, T=3, G=6), presentaba un 70 % de A+T y un 30% de G+C. La Td del oligonucleótido fue: Td= 4(G+C) + 2(A+T)= 52°C.

2.- Cadena reversa (P2SEC): La síntesis seguía la dirección 3'→5' respecto de la secuencia de SHV-1. El cebador está situado entre las posiciones de los nucleótidos A₅₅₇ y T₅₇₆ en la región codificante del gen de SHV-1.



Reordenamiento para síntesis:

CEBADOR REVERSO P2SEC

5'-A₅₇₆ T C T G G C G C A A A A G G C A G T₅₅₇-3'OH

La secuencia, de 20 pb (A=7, C=4, T=3, G=6), presentaba un 50% de A+T y un 50% de G+C. La Td del oligonucleótido fue: $Td = 4(G+C) + 2(A+T) = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$

El segundo par de cebadores amplifica desde la región 3' del gen un fragmento de 614 pb y sus secuencias son la siguientes:

1.- Cadena directa (P3SEC): La síntesis seguía la dirección 5'→3' respecto de la secuencia de SHV-1. El cebador está situado entre las posiciones de los nucleótidos C₅₁₄ y A₅₃₃ incluidos en región codificante del gen de SHV-1.

5'- C₅₁₄G C C A A T C T G C T A C T G G C C A₅₃₃-3'OH

La secuencia, de 20 pb (A=4, C=8, T=4, G=4), presentaba un 40 % de A+T y un 60% de G+C. La Td del oligonucleótido fue: $Td = 4(G+C) + 2(A+T) = 64\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.- Cadena reversa (P4SEC): La síntesis seguía la dirección 3'→5' respecto de la secuencia de SHV-1. El cebador está situado entre las posiciones de los nucleótidos A₁₁₀₈ y C₁₁₂₇ en zona no codificante del gen de SHV-1.

Sec. de DNA 5'- A₁₁₀₈ C G C C A T A A A C G T G G C C A C C₁₁₂₇ -3'OH



3'OH-T G C G G T A T T T G C A C C G G T G G -5'



Reordenamiento para síntesis:

CEBADOR REVERSO P4SEC

5'-G₁₁₂₇ G T G G C C A C G T T T A T G G C G T₁₁₀₈-3'OH

La secuencia, de 20 pb (A=3, C=4, T=5, G=8), presentaba un 40% de A+T y un 60% de G+C. La Td del oligonucleótido fue: $Td = 4(G+C) + 2(A+T) = 64\text{ }^{\circ}\text{C}$

• Puesta a punto del método de PCR

Para los cebadores P1SEC-P2SEC se probó una reacción de amplificación de 30 ciclos con una

temperatura de hibridación de 55°C que resultó en un rendimiento bajo para alguna de las muestras ensayadas. Por ello se optimizó la reacción bajando la temperatura de hibridación a 50°C. La reacción final quedó determinada de la siguiente forma:

- | | | |
|--------------------|---|--|
| X 30 ciclos | { | - Desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 minuto. |
| | | - 94 °C durante 15 segundos. DESNATURALIZACION. |
| | | - 50 °C durante 20 segundos. HIBRIDACION. |
| | | - 72 °C durante 30 segundos. EXTENSION. |
| | - Extensión final de 2 minutos a 72 °C. | |
| | | - Guardar refrigerado a 4°C. |

Los cebadores P3SEC-P4SEC permitieron un gran rendimiento al amplificar con una temperatura de hibridación de 65°C durante 30 ciclos. La reacción quedó determinada de la siguiente forma:

- | | | |
|--------------------|---|--|
| X 30 ciclos | { | - Desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 minuto. |
| | | - 94 °C durante 15 segundos. DESNATURALIZACION. |
| | | - 65 °C durante 20 segundos. HIBRIDACION. |
| | | - 72 °C durante 30 segundos. EXTENSION. |
| | - Extensión final de 2 minutos a 72 °C. | |
| | | - Guardar refrigerado a 4°C. |

Ambas reacciones de amplificación se optimizaron para obtener un producto específico en las siguientes condiciones de reacción, ajustada a un volumen final de 50 µL:

1.- Agua.....	26,8 μ L
2.- Tampón II® 10X...	5,0 μ L
3.- MgCl ₂	5,0 μ L
4.- DMSO	1,0 μ L
5.- PXSEC	0,5 μ L
6.- PYSEC	0,5 μ L
7.- dNTPs.....	0,8 μ L
8.- Ampli Taq (5U/ μ L).	0,4 μ L
9.- DNA (100 ng).....	10,0 μ L

Las concentraciones finales de cada reactivo quedaron definidas de la siguiente forma: Tampón II® 1X (50 mM KCl, 10 mM tris-HCl pH=8.3), MgCl₂ (1mM), DMSO (2%), cebadores PXSEC y PYSEC (125nM), dNTPs (200 μ M) y Ampli Taq (2 U).

- Purificación de los fragmentos amplificados

La purificación de los productos procedentes de una PCR ha de realizarse necesariamente antes de proceder con su secuenciación. Se han de eliminar los dNTPs y los cebadores. Los productos de la amplificación se purificaron usando columnas microspin Sephacryl-300® de Pharmacia© (Uppsala, Suecia), que permiten eliminar el DNA inferior a 200 pb. Se siguió el siguiente proceso:

- 1.- Homogeneizar las columnas en un vórtex.
- 2.- Centrifugar 1 minuto a 3000 rpm con una microcentrífuga tipo Eppendorf (Heraeus), colocando un Eppendorf vacío para recoger el tampón.
- 3.- Añadir 10-100 μ L del producto de PCR a purificar en el centro de la columna.
- 4.- Centrifugar 1 minuto a 3000 rpm recogiendo el material en un tubo Eppendorf limpio.

Nota: Se recuperan aproximadamente unos 80 μ L si se utilizan 50 μ L de producto de PCR. Se diluye un poco la muestra inicial.

- Reacciones de secuenciación

Cada producto de PCR amplificado y purificado se sometió a ulterior amplificación en dos reacciones distintas. La reacción directa y la inversa. Las reacciones directas, para cada uno de los fragmentos, se realizaron con los cebadores P1SEC y P3SEC, mientras que las inversas se realizaron con los cebadores P2SEC y P4SEC. Se aseguró con este procedimiento que se secuenciaba

correctamente cada fragmento del gen en ambos sentidos ($5' \rightarrow 3'$ y $3' \rightarrow 5'$), es decir las dos cadenas de DNA, directa y reversa.

El kit original de secuenciación (Taq Dye-Deoxy Terminator™ Cycle Sequencing Kit) de la casa comercial Perkin Elmer©, utilizaba la enzima termoestable AmpliTaq® DNA polimerasa. Esta enzima trabaja bien, pero requiere concentraciones muy altas de los terminadores marcados ya que los discrimina claramente frente a la incorporación de los dideoxinucleótidos. Por esta razón al completarse la reacción hay una gran cantidad de terminadores marcados no incorporados junto a los productos de la extensión marcados. Para eliminar los terminadores marcados se precisa el uso de columnas u otros métodos menos rigurosos como la precipitación con etanol.

El kit empleado en los experimentos de secuenciación de este trabajo utiliza una nueva enzima, AmpliTaq DNA Polimerasa FS (*Fluorescent Sequencing*). Esta enzima ha sido desarrollada específicamente para reacciones de secuenciación que emplean la fluorescencia bien en los cebadores o en los terminadores. Esta enzima es una mutante de la Taq DNA polimerasa que carece esencialmente de actividad $5' \rightarrow 3'$ nucleasa y ha reducido drásticamente su pobre afinidad por los dideoxinucleótidos. Esto permite el uso de concentraciones menores de terminadores marcados en la reacción y simplifica la eliminación posterior de los mismos no incorporados. La mezcla de los dNTPs incluye desoxyinosina trifosfato (dITP) en lugar de la desoxiguanidina trifosfato (dGTP) para minimizar la compresión de las bandas. La casa comercial suministra en el kit “Terminator Ready Premix” que consta de:

- Terminadores de A-marcada, C-marcada, G-marcada y T-marcada.
- dITP, dATP, dCTP y dTTP.
- Tris-HCl (pH 9,0).
- $MgCl_2$.
- Pirofosfatasa termoestable.
- AmpliTaq DNA polimerasa, FS.

Para secuenciar DNA de doble cadena procedente de una PCR, se recomienda usar una cantidad de 30-90 ng (a una concentración de 10-30 ng/ μ L). Para los cebadores se aconseja trabajar con 3,2 pmoles. La reacción de secuenciación se ajustó a un volumen final de 10 μ L, fijando las cantidades de los diferentes componentes según las recomendaciones de la casa comercial:

Terminator Ready Reaction Mix.....	4,0 μ L
DNA molde.....	2,0 μ L
Cebador (12,5 μ M).....	0,128 μ L
Agua destilada estéril.....	3,872 μ L
$V_T = 10 \mu\text{l}$	

Para llevar a cabo la amplificación se utilizó un termociclador Perkin Elmer 9600 que permitió el siguiente programa de reacciones, según recomienda el kit, y que resultaron ser eficaces:

x 25 ciclos	}	<ul style="list-style-type: none">➤ Rampa térmica rápida a 96°C➤ 96°C durante 10 segundos➤ Rampa térmica rápida a 50°C➤ 50°C durante 5 segundos➤ Rampa térmica rápida a 60°C➤ 60°C durante 4 minutos➤ Conservar a 4°C
-------------	---	---

Una vez terminada la reacción, el exceso de terminadores marcados se eliminó mediante una precipitación con etanol.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">✓ Acetato sódico (3 M, pH 5,2)).....1μL✓ Etanol 99% a -20°C.....25μL✓ Añadir los 10μL de la reacción✓ Mezclar en el vórtex y colocar en hielo 10 minutos✓ Centrifugar al máximo (13000 rpm) durante 30 minutos✓ Aspirar el etanol✓ Lavar el sedimento con 250μL de etanol al 70% y guardado a -20°C✓ Eliminar el etanol y secar el sedimento al vacío |
|--|

- Preparación y análisis las muestras

Las muestras se han de resuspender en 6-9 μ L de tampón de carga.

Tampón de carga:	Formamida desionizada (5 partes). 25 mM EDTA (pH 8,0) conteniendo 50mg/mL de dextrán azul (1 parte).
------------------	--

Después de mezclar bien se recoge la muestra y se calienta a 90°C durante 2 minutos para desnaturalizarla. Luego se coloca en hielo hasta cargarla en el gel. El análisis de las secuencias se realizó mediante un secuenciador ABI PRISM 377.

- Análisis de las secuencias

Las secuencias así obtenidas fueron ensambladas para obtener las secuencias completas de todo el gen. Posteriormente fueron analizadas a través de un programa informático (Align v. 1.02) que permitió tanto la realización de los alineamientos comparativos de las secuencias de DNA, como su traducción a proteína y posteriores comparaciones de las secuencias aminoacídicas deducidas del DNA.

RESULTADOS

1. Caracterización fenotípica

- 1.1. Identificación bioquímica y procedencia de las cepas
- 1.2. Caracterización de la expresión enzimática de las β -lactamasas por IEEA.
- 1.3. Estudio de la sensibilidad a los antibióticos

2. Estudio de plásmidos

- 2.1. Frecuencias y espectro de plásmidos
- 2.2. Estudios de conjugación bacteriana

3. Detección por PCR de la presencia del gen *bla-SHV-1*

4. Determinación del locus genético *bla-SHV-1* por RFLP-Southern-blot

- 4.1. Estrategia molecular: Enzimas de restricción empleados
- 4.2. Fragmentos Eco RI.
- 4.3. Correlación de los datos de IEEA y PCR con el Southern-blotting
- 4.4. Southern-blot del DNA plasmídico de las cepas transconjugantes

5. Integridad del gen y determinación de variables alélicas

- 5.1. Secuenciación del gen *bla-SHV-1*
- 5.2. Alineamientos comparativos: Determinación de mutaciones y variantes alélicas repetitivas

1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

1.1. Identificación bioquímica y procedencia de las cepas

Se han estudiado un total de 97 cepas, todas ellas fueron aisladas de productos patológicos humanos entre los períodos de 1979-84 y procedían de cinco laboratorios distintos, tal como se indicó en las tablas 9 y 10 del apartado 1.1 de material y métodos.

La mayoría de las cepas procedían del laboratorio L1 (49,5%). El resto se distribuyeron en menor proporción de la siguiente forma: 18,5% del laboratorio L2, 18,5% del L3, 7,2% del L5 y 6,2% del laboratorio L4. Por producto patológico la orina fue el más frecuente (79,2%), seguido de los exudados (7,2%), sangre (4,1%), respiratorio (1 %), y otros (9,3%).

La identificación a nivel de especie de las 97 cepas estudiadas se ha realizado mediante una batería de 26 pruebas bioquímicas descritas previamente en el apartado 1.2. de material y métodos. Los resultados de las 26 pruebas estudiadas para identificación a nivel de especie se exponen en la tabla 18. Así, según sus características bioquímicas las 97 cepas se identificaron como de la especie *Klebsiella pneumoniae*.

Adicionalmente, atendiendo al comportamiento frente a urea, adonita, malonato, gelatina y el crecimiento a 10 °C, se han caracterizado seis biotipos diferentes en las cepas identificadas como *K. pneumoniae* (Tabla 19). El biotipo I ha sido el más frecuente con 81 cepas (83,5%); todos los centros aportaron cepas de este biotipo. El resto de cepas se ha distribuido de forma mucho más discreta entre los 5 biotipos restantes. El biotipo VI, segundo en frecuencia, estuvo representado por cepas de tres laboratorios distintos, el biotipo V por otros tres laboratorios; y el biotipo IV por dos laboratorios. Sólo los biotipos II y III identificados en cinco cepas, dos y tres respectivamente, los aportaron un único laboratorio en cada caso. Las dos cepas del biotipo II (K63 y K299) fueron aisladas de muestras de orina en años distintos, 1980 y 1983 respectivamente. Las tres cepas del biotipo III (K251, K263 y K273) fueron aisladas en el mismo año.

Tabla 18. Resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación a nivel de la especie *K. pneumoniae*, en las 97 cepas estudiadas.

Prueba bioquímica	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=97)	
	Resultado esperado	Pruebas positivas
Oxidasa	(-)	0 %
Gas en fermentación de la glucosa	(+)	96,9 %
Reducción de nitratos	(+)	100 %
Rojo de metilo	(-)	10,3 %
Voges-Proskauer	(+)	93,8 %
Producción de : SH ₂	(-)	0 %
ureasa	(+)	97,9 %
lisina descarboxilasa	(+)	99 %
arginina dihidrolasa	(-)	0 %
ornitina descarboxilasa	(-)	0 %
Desaminación de la fenilalanina	(-)	0 %
Movilidad	(-)	0 %
Utilización de malonato	(+)	97,9 %
Utilización de citrato (Simmons)	(+)	100 %
Fermentación de: lactosa	(+)	100 %
adonita	(+)	97,9 %
manita	(+)	100 %
inosita	(+)	100 %
dulcita	variable	33%
arabinosa	(+)	100 %
Desoxirribonucleasas	(-)	0 %
Hidrólisis de esculina	(+)	100 %
Producción de indol	(-)	0 %
Licuación de la gelatina	(-)	3,1 %
Hidrólisis del pectato	(-)	0 %
Crecimiento a 10 °C	(-)	6,1 %

Tabla 19. Perfil de biotipos de las 97 cepas de *K. pneumoniae* estudiadas.

Biotipo	UREA	ADONITA	MALONATO	GELATINA	CREC. 10°C	N° CEPAS	%
I	+	+	+	-	-	81	83,5
II	-	+	+	-	-	2	2,1
III	+	-	+	-	-	3	3,1
IV	+	+	-	-	-	2	2,1
V	+	+	+	+	-	3	3,1
VI	+	+	+	-	+	6	6,1

1.2. Caracterización de la expresión enzimática de las β -lactamasas por IEEA

Se analizaron las 97 cepas por la técnica de IEEA tal como se especifica en el apartado 1.1. de material y métodos; una vez caracterizadas las β -lactamasas por IEEA, las 97 cepas se distribuyeron en dos Grupos según expresasen o no la β -lactamasa SHV-1 (Tabla 20).

Tabla 20. Expresión enzimática de β -lactamasas en las 97 cepas de *K. pneumoniae* seleccionadas.

Grupo de cepas (n)	Punto isoeléctrico	β -lactamasas detectadas (n)
SHV-1 \oplus Grupo I (74)	7,6	SHV-1 (34)
	7,6+7,1	SHV-1+LEN-1 (20)
	7,6+5,4	SHV-1+TEM-1 (20)
SHV-1 \ominus Grupo II (23)	7,1	LEN-1 (13)
	5,4	TEM-1 (10)

En una distribución por centros, las cepas expresaron las β -lactamasas de la forma mostrada en la figura 10.

Figura 10. Distribución por centros de las diferentes β -lactamasas identificadas en cada cepa.

Todos los laboratorios excepto uno (L4) aportaron cepas del grupo I. Las cepas del grupo II no productoras de SHV-1 están representadas en todos los centros. Sólo dos de los cinco laboratorios (L1 y L2) aportaron cepas que expresaron los cinco patrones distintos de β -lactamasas observados: SHV-1 sola (pI=7,6), SHV-1 combinada con LEN-1 (pI=7,6,+7,1) ó TEM-1 (pI=7,6+5,4), LEN-1 sola (pI=7,1) y TEM-1 sola (pI=5,4).

1.3. Estudio de la sensibilidad a los antibióticos

Correlación de la sensibilidad antibiótica con la expresión de β -lactamasas

De acuerdo a lo expuesto en el punto 2.1. del apartado de material y métodos, se ha estudiado el comportamiento de las 97 cepas frente a los antibióticos seleccionados. Los resultados se muestran agrupados atendiendo al tipo de β -lactamasa detectada por IEEA.

En las cepas del **Grupo I**, productoras de la β -lactamasa SHV-1, el perfil de sensibilidad de los antibióticos ensayados se ha distribuido de acuerdo a lo que se observa en la figura 11. Los antibióticos menos activos han sido la amoxicilina y la carbenicilina, con CIM₉₀ de 512 μ g/mL (rangos 32-512 μ g/mL) para ambos, no presentándose ninguna cepa sensible a estos preparados. La mezlocilina con CIM₉₀ de 512 μ g/mL (rango 4-512 μ g/mL), se mostró activa en aproximadamente la mitad de las cepas (51,4%); de manera similar a poblaciones descritas previamente por otros autores (157, 158). La adición del ácido clavulánico tanto a la amoxicilina como a la mezlocilina mejora claramente la acción de los compuestos, bajando las CIM₉₀ del orden de 4 diluciones. Un 21,6% de las cepas se mostró resistente a la combinación de amoxicilina + ácido clavulánico y sólo un 1,4% de las cepas permaneció resistente a la combinación de mezlocilina + ácido clavulánico.

Grupo I: Cepas productoras de SHV-1		
Antibióticos	CIM₉₀ (μg/ml)	Rango (μg/ml)
Amoxicilina	512	32-512
Amoxi + Ac. clav.	16	1-32
Mezlocilina	512	4-512
Mezlo + Ac. clav.	16	1-64

Figura 11. Patrón de resistencia de las cepas del Grupo I productoras de SHV-1 por IEEA.

La cefalotina (CIM₉₀= 128 µg/ml, rango 0,25-512 µg/ml) y la gentamicina (CIM₉₀= 64 µg/ml, rango 0,06-256 µg/mL) han sido activas frente al 51,4% y el 83,8% de las cepas respectivamente.

El 100% de las cepas del Grupo I presentaron CIM < 8 µg/ml, tanto a las cefalosporinas de 3^a generación ensayadas (cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona) como al aztreonam. Se identificaron 9 cepas (10,8%, 9 de 74) con CIM para ceftazidima ≥1 µg/ml (Tabla 21).

Grupo I: Cepas productoras de SHV-1		
Antibióticos	CIM₉₀ (µg/ml)	Rango (µg/ml)
Cefotaxima	0,5	0,015-0,5
Ceftazidima	2	≤0,007-4
Ceftriaxona	0,25	≤0,03-0,25
Aztreonam	0,5	≤0,007-0,5

Tabla 21. Características de las 9 cepas con CIMs para ceftazidima ≥1 µg/ml. Nd: No determinado.

Cepas	IEEA (pI)	Amox	Amox+Ac	Mez	Mez+Ac	Cb	Azt	Ctx	Caz	Cro	Ctn
K059	7,6 + 5,4	512	16	512	8	512	0.12	0.06	1	0,06	64
K063	7,6 + 7,1	512	32	512	16	512	0.5	0.12	4	0,12	512
K075	7,6	512	16	512	8	512	0.25	0.12	2	0,06	32
K079	7,6	128	8	32	16	512	0.25	0.25	1	0,25	16
K099	7,6 + 5,4	256	8	32	16	512	0.25	0.25	1	0,12	16
K108	7,6	512	8	512	8	512	0.12	0.06	1	Nd	16
K226	7,6	256	8	16	16	512	0.12	0.25	1	Nd	16
K285	7,6	256	16	16	8	512	0.25	0.5	2	Nd	128
K288	7,6	128	16	16	8	512	0.25	0.5	2	Nd	128

Para estudiar en detalle los perfiles de sensibilidad respecto a la expresión de β -lactamasas en las 74 cepas (79,5%) incluidas en el Grupo I se han establecido tres categorías, en función que dichas cepas expresaran la β -lactamasa SHV-1 sola o combinada con otra: Cepas productoras de la β -lactamasa SHV-1 sola (Figura 12), cepas que expresan SHV-1+LEN-1 (Figura 13) y cepas que expresan SHV-1+TEM-1 (véase figura 14).

Los resultados de los grupos de cepas productoras de SHV-1 sola o combinada con la β -lactamasa cromosómica LEN-1 (figuras 12 y 13) no presentan diferencias estadísticamente significativas, luego son comparables entre sí y su perfil de sensibilidad está de acorde a lo descrito en el apartado anterior para las cepas del Grupo I en general. La co-expresión enzimática de las β -lactamasas SHV-1 y LEN-1 no confiere un fenotipo de resistencia antibiótica mayor que el observado para SHV-1 sola.

Las cepas productoras de SHV-1+TEM-1 en cambio, sí que presentan algunas diferencias significativas con las cepas del grupo anterior (figura 14). La resistencia a amoxicilina y carbenicilina se mantiene de manera uniforme como se describió globalmente para las cepas del Grupo I. Sin embargo, la presencia de un 40% de cepas resistentes a amoxicilina+ácido clavulánico muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,043$) con las cepas del grupo anterior. Lo mismo ocurre con el 35% de cepas resistentes a gentamicina ($p=0,015$). Es destacable además que la única cepa (K159) resistente a la combinación de mezlocilina + ácido clavulánico perteneció a este grupo. Así, la co-expresión enzimática de SHV-1 con TEM-1 significativamente confiere un fenotipo de resistencia antibiótica mayor que el observado para SHV-1 sola.

Las cepas del **Grupo II** (23 cepas, 23,7%), donde no se encontró por IEEA la expresión de la β -lactamasa SHV-1, se subdividieron en dos grupos:

- Cepas que expresan la β -lactamasa cromosómica LEN-1 (13 cepas, 56,5%), (Figura 15).
- Cepas que expresan la β -lactamasa plasmídica TEM-1 (10 cepas, 43,5%), (Figura 16).

Figuras 12 y 13. Patrón de resistencia en las cepas productoras de la β -lactamasa SHV-1.

Figura 14. Patrón de resistencia de las cepas productoras de la β -lactamasa SHV-1 combinada con la β -lactamasa plasmídica TEM-1

Las cepas productoras de únicamente β -lactamasa cromosómica tipo LEN-1 (Figura 15) han presentado resistencia alta a amoxicilina y carbenicilina, con sólo una cepa (K51) sensible a la carbenicilina. Únicamente dos cepas (15,38%) fueron resistentes a mezlocilina, además la CIM₉₀ para mezlocilina es más baja que en las cepas del Grupo I (64 μ g/ml vs. 512 μ g/ml). Todas las cepas fueron sensibles a la combinación de la amoxicilina y la mezlocilina con el ácido clavulánico reduciendo la CIM₉₀ del orden de cinco y dos diluciones, respectivamente. Dos cepas (15,38%) fueron resistentes a cefalotina y ninguna a gentamicina. Así pues el perfil de resistencia es sensiblemente menor que el observado para las cepas que expresan SHV-1 sola o en combinación.

Grupo II: Cepas productoras de LEN-1		
Antibióticos	CIM₉₀ (μg/mL)	Rango (μg/mL)
Amoxicilina	512	16-512
Amoxi + Ac. clav.	8	1-8
Mezlocilina	64	4-256
Mezlo + Ac. clav.	8	2-8

Las cepas del **Grupo II** productoras de la β -lactamasa TEM-1 (Figura 16) tienen un perfil muy semejante a la de las cepas del Grupo I productoras de SHV-1+TEM-1, no presentando diferencias estadísticamente significativas en ningún caso; aunque existe una dificultad evidente debido al escaso tamaño muestral (n=10 para TEM-1). Estas cepas son altamente resistentes a amoxicilina, carbenicilina y mezlocilina. Sólo una cepa fue sensible a mezlocilina, pero respondieron bien a la combinación de amoxicilina o mezlocilina con ácido clavulánico, bajando las CIM₉₀ entre tres y cinco diluciones, respectivamente. Ocho cepas (80%) fueron resistentes a cefalotina y seis (60%) a gentamicina.

Grupo II: Cepas productoras de TEM-1		
Antibióticos	CIM₉₀ (μg/mL)	Rango (μg/mL)
Amoxicilina	512	128-512
Amoxi + Ac. Clav.	32	32
Mezlocilina	512	8-512
Mezlo + Ac. Clav.	8	4-16

Todas las cepas del **Grupo II** fueron sensibles tanto a las cefalosporinas de 3^a generación ensayadas (cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona) como al aztreonam.

Grupo II: Cepas productoras de TEM-1		
Antibióticos	CIM₉₀ (µg/ml)	Rango (µg/ml)
Cefotaxima	0,25	0,03-0,25
Ceftazidima	0,12	0,12-0,5
Ceftriaxona	Nd	≤0,03-0,06
Aztreonam	0,12	0,03-0,12

Grupo II: Cepas productoras de LEN-1		
Antibióticos	CIM₉₀ (µg/ml)	Rango (µg/ml)
Cefotaxima	0,06	0,03-0,06
Ceftazidima	0,5	0,03-0,5
Ceftriaxona	Nd	Nd
Aztreonam	0,12	≤0,007-0,5

Así pues, la presencia de la β-lactamasa plasmídica TEM-1 seguida de SHV-1 son, por este orden, las enzimas que proporcionan un mayor poder hidrolítico frente a los antibióticos betalactámicos ensayados, siendo la β-lactamasa cromosómica LEN-1 la de menor actividad. De la misma forma, la presencia concomitante de dos enzimas, especialmente SHV-1 más TEM-1, proporciona una mayor CIM frente a los antibióticos betalactámicos ensayados. Este hecho se podría explicar en parte por las características intrínsecas de cada β-lactamasa, pero sin duda el grado de expresión de los genes que codifican estas enzimas es uno de los factores que más influye para modificar las CIMs. Por ello nos planteamos el estudio de plásmidos como agentes potenciales para transportar genes que codifican β-lactamasas y responsables del aumento del número de copias génicas de estas β-lactamasas codificadas en su secuencia de DNA.

Figuras 15 y 16. Patrón de resistencia de las cepas del Grupo II productoras de las β -lactamasas LEN-1 o la β -lactamasa TEM-1

2. ESTUDIO DE PLÁSMIDOS

2.1. Frecuencias y espectro de plásmidos

El estudio de los plásmidos se realizó en las cepas del **Grupo I** para estudiar su frecuencia y tamaño, así como su distribución atendiendo a la producción de β -lactamasa (Figura 17). La mayor parte de las cepas presentó al menos un plásmido (76,7%), con rangos de cero a cinco. El grupo más frecuente fue el de uno, con casi un 37 % de representatividad. En 17 cepas (23,3%) no se observó la presencia de ningún plásmido. Es destacable que la aparición de hasta tres plásmidos puede ser relativamente frecuente (13,7%), pero la presencia de más de tres plásmidos es un fenómeno raro. Sólo se han observado tres cepas con estas características, una con cuatro y dos con cinco plásmidos respectivamente.

En las figuras 18 y 19 se muestra la distribución de las frecuencias de plásmidos por grupos de cepas, según su expresión enzimática. En una cepa del grupo SHV-1+TEM-1 no se realizó el análisis de los plásmidos (K312) y en otras dos de este mismo grupo no se encontraron evidencias (K228 y K379). Sin ser significativo, es destacable que las cepas de este grupo son las que más plásmidos tenían (una media de 1,9 por cepa frente a 1,1 en el resto). Este dato se hace mucho más visible cuando se observa la curva de la distribución de plásmidos normalizada. Se puede identificar un desplazamiento de la curva hacia la derecha, indicativo de que en estas cepas donde se expresa TEM-1 es más frecuente hallar un mayor número de plásmidos. Sólo una cepa (K242) del grupo que expresaba únicamente SHV-1 presentó cuatro plásmidos.

Por tamaños, la frecuencia de los plásmidos identificados se distribuye de una forma bimodal. Aparecen dos grupos mayoritarios; los plásmidos muy grandes (superiores a 60 Kb) y los pequeños (inferiores a 7 Kb). Estos dos grupos representaron el 70% del total de plásmidos observados y se identificaron en 30 y 28 cepas, respectivamente. El 20% correspondió para los plásmidos que se separaron entre la banda de 60 Kb y la banda que correspondería al DNA cromosómico (aislados en 17 cepas) y los plásmidos que se distribuyeron entre el DNA cromosómico y la banda equivalente a 7 Kb estaban representados por menos del 10% y fueron observados únicamente en 7 cepas (Figura 20).

Figura 17. Frecuencias de plásmidos identificados en las cepas del Grupo I

Figuras 18 y 19. Frecuencias distribución normalizada de los plásmidos en las cepas del Grupo I

Figura 20. Frecuencias de los plásmidos identificados en las cepas del Grupo I categorizados por tamaños.

Al agrupar la frecuencia de los tamaños plasmídicos y la producción de β -lactamasa se observó, que las cepas productoras de SHV-1+TEM-1 fueron las que significativamente ($p=0,004$) presentaron un mayor número de plásmidos de tamaño superior a 60 Kb en relación con el resto de cepas que no tiene TEM-1 asociado a SHV-1. De hecho más del 73% de las cepas productoras de SHV-1+TEM-1 presentan este tipo de plásmidos de gran tamaño, comparado con el 40% y el 23,5% del resto de cepas SHV-1+LEN-1 y SHV-1 sola, respectivamente. Así mismo en las cepas donde se asoció TEM-1 a SHV-1 también fueron las que más plásmidos de tamaño inferior a 7 Kb presentaron, más del 52% de las mismas, pero sin alcanzar la significación estadística ($p=0,23$). El resto de plásmidos se distribuyeron de igual forma entre los tres grupos de cepas (figuras 21 y 22).

La posibilidad de que un plásmido transporte los genes necesarios para que la conjugación bacteriana pueda darse, está íntimamente ligado a que tenga el tamaño adecuado para que codifique en su secuencia al DNA dichos genes. El tamaño mínimo requerido ronda las 30 Kb (206-208), por ello nos hemos planteado conocer cual sería la potencialidad de transportar plásmidos de tipo conjugativo en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* del Grupo I estudiadas.

La figura 23 muestra la distribución de plásmidos potencialmente conjugativos (tamaño superior a 30 Kb) que se observaron en las cepas del grupo I. Se puede observar también que las cepas que expresan únicamente la β -lactamasa SHV-1 ($n=16$, 47,1%) tienen menos plásmidos de más de 30 Kb, mientras que las que expresaron adicionalmente otra β -lactamasa presentaron más plásmidos de este tipo. Así, un 60% ($n=12$) de las cepas que expresaban SHV-1+LEN-1 y un 78,9% ($n=15$) de las SHV-1+TEM-1 tuvieron plásmidos de tipo conjugativo, respectivamente.

La presencia de esta importante cantidad de plásmidos grandes sugeriría una gran probabilidad de transmisión horizontal de la información codificada por estos plásmidos y por tanto, un alta tasa de diseminación de resistencias, en el caso que éstas estuviesen codificadas en ellos.

Figuras 21 y 22. Comparación entre la frecuencia de plásmidos por tamaño y producción enzimática de β -lactamasa.

Figura 23. Detección de plásmidos conjugativos (>30 Kb) en las distintas cepas del Grupo I (n=73) según la expresión de β -lactamasas.

2.2. Estudios de conjugación bacteriana

Entre las cepas del Grupo I se seleccionaron las no productoras de β -lactamasa plasmídica tipo TEM-1 (n=54), y se realizaron los experimentos de conjugación bacteriana para observar qué tipo de cepas de *K. pneumoniae* eran potencialmente capaces de transferir la β -lactamasa SHV-1 al receptor *E. coli* K12, y por lo tanto indicaría que está codificada en plásmidos. Por lo observado en la figura 23 se diría que al menos 31 cepas tendrían la potencialidad de conjugar al haberse detectado plásmidos mayores de 30 Kb. De las 54 cepas parentales ensayadas, únicamente cinco (9,26%, figura 24) transfirieron el gen SHV-1 de naturaleza plasmídica a la cepa receptora. Estas frecuencias de transferencia se han definido en la figura 25 como *transferencia real*, ya que es la transferencia observada entre el total de cepas estudiadas. Es destacable que la mayoría de estas cepas parentales (80%, n=4) de las que se obtuvieron transconjugantes pertenecían al grupo de cepas productoras de dos enzimas (SHV-1+LEN-1). Así, cuatro de las 20 cepas productoras de SHV-1+LEN-1 (20%) pudieron transferir el gen SHV-1 a la cepa receptora; mientras que únicamente una cepa de 34, menos del 3% de las cepas productoras de SHV-1 sola, fue capaz de transferir el gen SHV-1. Estas diferencias, sin lograr por poco la significación estadística (p=0,052), no sólo se mantuvieron sino que aumentaron valorando conjuntamente estos resultados con los obtenidos en los estudios de plásmidos. Estos últimos datos se han indicado en la figura 25 como *transferencia predecible* ya que, para calcular la tasa de transferencia, se han descontado tanto las cepas en las que no se detectó presencia de plásmidos como las que no tenían plásmidos conjugativos y que supuestamente no podían conjugar. Así, la eficiencia en la transferencia del gen SHV-1 por conjugación aumenta a un 6,2% en las cepas productoras de SHV-1 sola, mientras que se convierte en un 33,3% en las cepas productoras de SHV-1+LEN-1 (p=0,08), con un porcentaje global cercano al 18% (Figura 25). Estos datos de tan bajo rendimiento de transferencia de SHV-1 por conjugación unido al alto porcentaje de cepas en las que no se pudieron detectar plásmidos (28%, n=15/54), sugerirían que la β -lactamasa SHV-1 podría ser una enzima de codificación mayoritariamente cromosómica en nuestra colección de cepas de *K. pneumoniae*.

Figuras 24. Transferencia plasmídica y eficiencia en la obtención de transconjugantes.

Figuras 25. Transferencia plasmídica y eficiencia en la obtención de transconjugantes.

En la tabla 22 se recogen los perfiles de resistencia de las cinco cepas dadoras (parentales) que se caracterizaron por ser resistentes tanto a amoxicilina, carbenicilina y a la mezlocilina, mostrando al mismo tiempo unas CIM elevadas para la cefalotina (rango de 8-64 $\mu\text{g/mL}$) y relativamente altas también para la ceftazidima (rango de 0,25-2 $\mu\text{g/mL}$). Así mismo, en la tabla 23 se muestran las características de éstas cinco cepas que fueron capaces de transferir por conjugación los plásmidos portadores del gen de la β -lactamasa SHV-1.

Tabla 22. Perfil de resistencia de las cepas parentales expresado en valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$).

Cepas parentales	AMOX	AMOX_AC	MZ	MZ_AC	AZT	CTX	CAZ	CRO	CB	CTN	GTN
K75	512	16	512	8	0,25	0,12	2	0,06	512	32	0,5
K167	512	8	512	8	0,03	0,06	0,25	-	512	64	0,5
K136	512	8	512	8	0,12	0,06	0,5	0,06	512	16	4
K175	512	8	128	4	0,03	0,06	0,25	-	512	8	0,25
K198	512	8	256	8	0,06	0,06	0,5	-	512	16	0,25

Tabla 23. Características de las cinco cepas parentales capaces de transferir por conjugación el plásmido portador del gen *bla-SHV-1*.

CEPAS PARENTALES					
	K75	K167	K136	K175	K198
Procedencia (año)	L1 (1980)	L2 (1983)	L1 (1981)	L2 (1983)	L2 (1983)
Prod. Patol.	Orina	Orina	Orina	Exudado	Orina
IEEA	SHV-1	SHV-1+LEN-1	SHV-1+LEN-1	SHV-1+LEN-1	SHV-1+LEN-1
Plásmidos	>60 Kb + 3.5 Kb	50 Kb + 3.5 Kb	>60 Kb	>>60 Kb + >60 Kb+7.2 Kb	>60 Kb + 5.2Kb + 5.4 Kb
Plásmido transferido	3.5 Kb	3.5 Kb	>60 Kb	>60 Kb	>60 Kb
Resistencia a Mz transferida	Sí	Sí	No	No	No

Como se muestra en la tabla 23, todas las cepas presentaron plásmidos. Cuatro de ellas tenían más de uno, pero únicamente se transfirió uno de ellos. En tres de los casos se transfirió un plásmido de gran tamaño (>60 Kb) mientras que en los dos restantes se trataba de un plásmido pequeño de (3,5Kb); si bien en este último caso las cepas parentales tenían además un plásmido de gran tamaño de tipo conjugativo. El método de aislamiento de DNA plasmídico utilizado para poder visualizar estos plásmidos fue una lisis alcalina seguida de una extracción con fenol/cloroformo/isoamilalcohol.

Marcadores de resistencia transferidos

En las cinco cepas transconjugantes se estudió el fenotipo de resistencia transferido mediante la técnica del antibiograma en disco-placa. El perfil de resistencia de las cepas parentales se muestra en la tabla 22. Todas las cepas transconjugantes fueron seleccionadas por su doble resistencia a la ampicilina y al ácido nalidíxico.

1. De 5 cepas parentales resistentes a la MZ, sólo 2 transconjugantes fueron resistentes a la MZ (TK 75 y TK 167).
2. La resistencia al cloramfenicol siempre fue transferida; apareció en cuatro cepas parentales y sus cuatro cepas transconjugantes (TK75, TK167, TK175, TK198).
3. No se transfirió resistencia a aminoglicósidos. Una cepa parental (K198) fue resistente a amikacina y kanamicina, pero no su transconjugante.

La detección enzimática por IEEA, la determinación de la CIM y el estudio de plásmidos son métodos clásicos empleados de caracterización de las β -lactamasas, pero son métodos simplemente aproximativos y no proporcionan información molecular precisa sobre la localización génica. Por ello se realizó el estudio de la presencia del gen *bla-SHV-1* en DNA cromosómico empleando la técnica de la PCR.

3. DETECCIÓN POR PCR DE LA PRESENCIA DEL GEN *BLA-SHV-1*

3.1. Correlación PCR e IEEA

La detección del gen de la β -lactamasa SHV-1 (*bla-SHV-1*) se realizó partiendo de DNA cromosómico extraído de las cepas y conservado a -20°C .

La cantidad media de DNA obtenida en cada extracción fue de 232 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con una desviación estándar de 215 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El ratio medio de absorción $\text{DNA}_{260}/\text{proteína}_{280}$ fue de 1,73 (Tabla 24). Únicamente en 2 muestras se observó un cociente $\text{DNA}_{260}/\text{proteína}_{280} < 1,5$; no siendo un problema ni para la amplificación ni para los posteriores análisis de Southern-blotting. Una vez aislado el DNA se procedió a la amplificación génica mediante PCR de un fragmento de 178 pb del gen *bla-SHV-1*.

Tabla 24. Rendimiento en la extracción del DNA cromosómico en las 97 cepas de *K. pneumoniae*.

N=97 cepas	DNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Ratio (Abs.260/280)
Media	232,54	1,73
Desv. Estándar	215,54	0,13
Rango	67,03-2091,68	1,16-2,31

En la figura 26 se muestran los resultados tras comparar la PCR con el IEEA. Las 74 cepas del **Grupo I** productoras de SHV-1 sola, o en combinación con LEN-1 ó TEM-1 por IEEA, mostraron también una PCR positiva indicativo de que se amplificaba el gen codificante para SHV-1 (Figura 27).

Respecto a las cepas del **Grupo II**, elegidas como controles negativos para la PCR por no haber encontrado expresión de la β -lactamasa SHV-1 en las condiciones estándar descritas en los métodos, los resultados obtenidos fueron sorprendentes. Todas las cepas productoras de LEN-1 y seis de las 10 cepas productoras de TEM-1 presentaron la PCR positiva para SHV-1. Todas ellas fueron confirmadas por una PCR-RFLP con la enzima de restricción NotI que corta específicamente el fragmento amplificado de 178 pb de SHV-1 (Figura 28). Con ello se

aseguraba que el fragmento amplificado era realmente el del gen *bla-SHV-1* y no cualquier otro fragmento que hubiese amplificado de manera inespecífica. Para intentar confirmar estos datos por IEEA se realizó una re-concentración por liofilización de los extractos bacterianos antes de volver a realizar la electroforesis. Esta nueva tentativa permitió en alguno de los casos identificar bandas de enzimas que en los primeros experimentos no se observaron. Así en las 10 cepas productoras de sólo TEM-1 se pudieron re-identificar 5 casos de co-expresión de SHV-1 (K39, K117, K154, K368, K541), uno de co-expresión con LEN (K263), permaneciendo 4 cepas sin cambios (K8, K251, K273, K534). En las 13 cepas LEN-1 incluso tras re-concentrar los extractos no se observó nada distinto a la banda correspondiente a $pI=7,1$.

Luego, todas las muestras que presentaron una PCR positiva y reconfirmada por la digestión del fragmento amplificado con Not I serían indicativas de la presencia del gen SHV-1 en el DNA estudiado; sin embargo, no se conocía nada acerca de su expresión, que podría estar alterada por mutaciones en el promotor u otras zonas de la secuencia. Finalmente, sólo en cuatro cepas no se pudo detectar el gen SHV-1 por PCR así que no presentaban el gen en su cromosoma.

Atendiendo a estos resultados los dos Grupos de cepas quedarían redistribuidos por frecuencias de la siguiente manera, como se refleja en la figura 26:

- **Grupo I.** Formado por 34 cepas únicamente productoras de SHV-1, 33 cepas SHV-1+ LEN-1 y 26 cepas SHV-1+TEM-1. A este nuevo grupo le denominaremos a partir de ahora **Grupo Ia**, compuesto por cepas que contienen el gen *bla-SHV-1* en el cromosoma.
- **Grupo II.** El grupo control negativo únicamente quedaría integrado por 4 cepas productoras de TEM-1 ya que el resto de cepas presentaba el gen *bla-SHV-1*. A este nuevo grupo le denominaremos a partir de ahora **Grupo IIa**, compuesto por cepas en las que no se detectó el gen *bla-SHV-1* en el cromosoma.

Figura 26. Resultados comparativos de la detección de la β -lactamasa SHV-1 por IEEA y del gen *bla-SHV-1* por PCR.

Figura 27 y 28. Detección del gen *bla-SHV-1* por PCR y PCR-RFLP con la enzima de restricción NotI que corta específicamente el fragmento amplificado de 178 pb de SHV-1.

4. DETERMINACIÓN DEL LOCUS GENÉTICO *BLA-SHV-1* POR RFLP-SOUTHERN-BLOT

4.1. Estrategia molecular: Enzimas de restricción empleadas

Para realizar una aproximación al locus genético del gen *bla-SHV-1*, se hizo una búsqueda de dianas en la secuencia con diferentes enzimas de restricción de los que se sabía que, o bien no cortaban o únicamente cortaban una vez al gen *bla-SHV-1*, respecto a los otros dos genes con mayor homología de secuencia: Los genes *bla-LEN-1* y *bla-OHIO-1*. De entre el listado de enzimas de restricción empleados (Tabla 25) se obtuvo información sobre:

- a) El número de fragmentos generado, que permite por ejemplo saber si hay copias génicas.
- b) El tamaño de los fragmentos, cuanto mayores más posibilidad de tener incluidos varios genes en tándem; hecho importante cuando hablamos de cepas que expresan más de una β -lactamasa al mismo tiempo.

Tabla 25. Enzimas de restricción empleadas para la aproximación al locus genético del gen *bla-SHV-1* por RFLP-Southern-blot.

	Enzimas de restricción	<i>bla SHV-1</i> (n° de dianas)	<i>bla LEN-1</i> (n° de dianas)	<i>bla OHIO</i> (n° de dianas)
Búsqueda de fragmentos grandes (potencialmente locus entero)	Apa I, Eco RI, Eco RV, Hind III, Sca I	0	0	0
Especificidad gen SHV-1	Not I	1	0	0
Especificidad gen LEN-1	Bam HI, Kpn I, Sma I	0	1	0
Enzima común	Pst I	1	1	1

Tabla 26. Fragmentos de restricción generados sobre diferentes muestras de DNA cromosómico aislado de cepas seleccionadas, tras hibridar con la sonda SHV₁₇₈.

Cepas estudiadas	IEEA	PCR (SHV-1)	Digestión enzimática	Nº de fragmentos	Tamaño fragmentos
K75	SHV-1	+	Eco RI	2	8,5 + 8 Kb
			Hind III	2	9 + 10 Kb
			Eco RV	1 (+2 débiles)	4 (+4,5+9) Kb
			Apa I	2	7 + >23 Kb
			Sca I	2	4 + 4,3 Kb
			Not I	3	2,3+5+>23 Kb
			Bam HI	1	4 Kb
			Kpn I	2	10 + 9 Kb
			Sma I	1 (+2 débiles)	3,5 (7+>23) Kb
			Pst I	1	1,8 Kb
K48	SHV-1	+	Eco RI	1	7 Kb
			Bam HI	1	16 Kb
			Not I	2	2,3 + 5 Kb
			Pst I	1	1,8 Kb
K53	SHV-1 + LEN-1	+	Eco RI	1	8,5 Kb
			Hind III	1	10 Kb
			Eco RV	1 (+1 débil)	4,2 (+9) Kb
			Apa I	1	>23 Kb
			Sca I	1	4 Kb
			Bam HI	1	4 Kb
			Not I	2	2,3 + 23 Kb
			Pst I	1	1,8 Kb
K51	LEN-1	+	Eco RI	1	8,5 Kb
			Bam HI	1	10 Kb
			Not I	2	2,3 + 23 Kb
			Pst I	1	1,8 Kb

Cepas estudiadas	IEEA	PCR (SHV-1)	Digestión enzimática	Nº de fragmentos	Tamaño fragmentos
K567	LEN-1	+	Eco RI	1	8,5 Kb
			Hind III	1	10 Kb
			Bam HI	1	4 Kb
			Kpn I	1	9 Kb
			Sma I	1	3,5 Kb
			Pst I	1	1,8 Kb
K263	TEM-1 (+ <i>LEN-1</i>) ^a	-	Eco RI	1	8,5 Kb
			Hind III	1	10 Kb
			Bam HI	1	1,8 Kb
			Kpn I	1	2,4 Kb
			Sma I	1	3,5 Kb
			Not I	1	2,3 Kb
			Pst I	1	1,8 Kb
K251	TEM-1 (+ <i>LEN-1</i>) ^a	-	Eco RI	1	8,5 Kb
			Hind III	1	10 Kb
			Bam HI	1	1,8 Kb
			Kpn I	1	4,5 Kb
			Not I	1	2,3 Kb
K273	TEM-1 (+ <i>LEN-1</i>) ^a	-	Eco RI	1	8,5 Kb
			Hind III	1	10 Kb
			Bam HI	1	1,8 Kb
			Kpn I	1	4,5 Kb
			Not I	1	2,3 Kb

^a Al haberse detectado fragmentos de hibridación positivos al hibridar con la sonda *SHV*₁₇₈, presuponemos que dichos fragmentos contienen un gen muy homólogo a *SHV-1*. Probablemente se trate del gen *bla-LEN-1* o una de sus variantes, que debería confirmarse por secuenciación.

Una vez se seleccionaron las enzimas apropiadas, en una primera etapa se eligieron ocho cepas (K75, K48, K53, K51, K567, K263, K251 y K273), cinco con PCR positiva y tres negativa,

para hacer un cribaje general de los fragmentos que podrían obtenerse utilizando una estrategia de digestiones simples (Tabla 26 y 27) y posteriormente una estrategia de digestiones múltiples (ver Tabla 28).

Tabla 27. Aproximación al gen de SHV-1 mediante el perfil de RFLP Southern blotting ^a empleando digestiones simples, tras hibridar con la sonda SHV₁₇₈.

Gen SHV-1	Cepas	IEEA (pI)	Fragmentos por endonucleasas (Kb) ^b					
			EcoRI	HindIII	NotI	BamHI	KpnI	PstI
PCR +	K75	7,6	8,5+8	10+9	>23+5+2,3	4	10+9	1,8
	K48	7,6	7	Nd	5+2,3	16	Nd	1,8
	K53	7,6+7,1	8,5	10	23+2,3	4	Nd	1,8
	K51	7,1	8,5	Nd	23+2,3	10	Nd	1,8
	K567	7,1	8,5	10	Nd	4	9	1,8
PCR -	K263 ^c	5,4	8,5	10	2,3	1,8	2,4	Nd
	K251	5,4	8,5	10	2,3	1,8	4,5	Nd
	K273	5,4	8,5	10	2,3	1,8	4,5	Nd

Nd: No determinado. ^a Se empleó DNA cromosómico total para el análisis por RFLP. ^b EcoRI y HindIII no cortan los genes de SHV-1, LEN-1 y OHIO; mientras que NotI, BamHI y KpnI son endonucleasas específicas de un solo corte para los genes SHV-1 (NotI) y LEN-1 (BamHI, KpnI). Finalmente, PstI tiene una diana en todos los genes. ^c El ulterior análisis de secuenciación detectó una nueva variante del gen LEN-1 (ver Tablas 29 y 31), así como una β-lactamasa de pI=7,1 en el IEEA tras reconcentración de los extractos bacterianos (ver texto pág. 124).

Digestiones múltiples empleando Eco RI más Not I y/o Bam HI

Con el fin de poder establecer una mejor aproximación al locus génico se realizó un segundo ensayo utilizando digestiones múltiples (dobles y triples). Utilizando primero aquella enzima de restricción que en las digestiones simples ofrecía un fragmento de hibridación mayor, y así por orden decreciente. En la tabla 28 se muestran los datos de los ensayos que se realizaron con algunas de las muestras estudiadas.

Tabla 28. Aproximación al gen de SHV-1 mediante el perfil de RFLP Southern blotting ^a empleando digestiones múltiples, tras hibridar con la sonda SHV₁₇₈.

Cepas ^a	PCR (SHV-1)	IEEA (pI)	Eco RI ^b	Eco RI + BamHI ^b	Eco RI + Not I ^b	Eco RI + BamHI + NotI _b
K75	+	7,6	8,5+8	4	2,3+1,8	ND
K621	+	7,6	8,5+8	ND	2,3	ND
K108	+	7,6	8,5+>23	ND	2,3	ND
K128	+	7,6+7,1	8,5+8	ND	2,3	ND
K136	+	7,6+7,1	8,5+8	ND	2,3	ND
K150	+	7,6+7,1	8,5+8	ND	2,3	ND
K167	+	7,6+7,1	8,5+8	ND	2,3	ND
K206	+	7,6	8,5	ND	ND	2,3
K226	+	7,6	8,5	ND	ND	2,3
K234	+	7,6	8,5	ND	ND	2,3
K235	+	7,6	8,5	ND	ND	2,3

ND: No determinado. ^a Se empleó DNA cromosómico total para el análisis por PCR y RFLP. ^b Los fragmentos por endonucleasas se indican como Kb.

Con la información obtenida acerca del número y tamaño de los fragmentos observados tras la hibridación con la sonda SHV₁₇₈, se pudo establecer un mapeo de las dianas de restricción en el gen *bla-SHV-1* (ver Esquema 1) así como una estrategia definitiva para la localización del gen en el resto de las 97 cepas empleando una enzima (EcoRI) que garantizase una cierta reproducibilidad de datos.

En la figura 29 se muestra una imagen de un gel de agarosa tras haber separado las muestras de DNA previamente digeridas y, la subsiguiente imagen de la película revelada sobre los filtros una vez hibridados con la sonda SHV₁₇₈ marcada no radioactivamente mediante DIG-dUTP y detectado por acoplamiento mediante anticuerpos anti-DIG acoplados a la enzima fosfatasa alcalina que permite un revelado quimioluminiscente.

Figura 29. Estrategia del Southern-blot RFLP empleada en diferentes muestras de DNA cromosómico. A) Electroforesis en gel de agarosa al 0,5%. Pocillos: 1. K251 \perp BamHI; 2. K273 \perp BamHI; 3. K534 \perp BamHI; 4. P111 \perp BamHI; 5. K51 \perp EcoRI; 6. K51 \perp BamHI; 7. K51 \perp PstI; 8. K51 \perp NotI; 10. K48 \perp EcoRI; 11. K48 \perp BamHI 12. K48 \perp PstI; 13. K48 \perp NotI; 14. K53 \perp EcoRI; 15. K53 \perp BamHI; 16. K53 \perp PstI; 17. K53 \perp NotI; 19. K75 \perp EcoRI; 20. K75 \perp BamHI; 21. K75 \perp PstI; 22. K75 \perp NotI. \perp : restricción con la enzima indicada; pocillos 9 y 18 marcador de peso molecular λ \perp HindIII; K seguida de un número indica cada cepa de *K. pneumoniae* ensayada; P111, cepa de *E. coli* productora de TEM-1, empleada como patrón control negativo. B) Correspondiente blot tras la hibridación con la sonda SHV-1 marcada por fluorescencia como se describió en material y métodos.

Esquema 1.

4.2. Fragmentos Eco RI

El empleo de la enzima EcoRI era indicado ya que no presentaba una diana interna que cortara los genes de estudio y además, proporcionaba unos fragmentos de restricción grandes, que hacen suponer que las dianas están bastante alejadas de los extremos del mismo. Supuestamente, al no presentar dianas ni para SHV-1 ni para LEN-1 y cortar lejos del gen, en las cepas en las que SHV-1 y LEN-1 aparecen conjuntamente, el fragmento podría incluir a ambos genes. De este modo, cuando apareciese más de 1 fragmento de restricción de EcoRI seguramente sería debido a la presencia de más de un gen. De hecho, se había observado que algunas muestras presentaban más de un fragmento tras la hibridación lo que hacía pensar en la posibilidad de detectar duplicaciones génicas del gen *bla-SHV-1* o bien de los genes *bla-SHV-1* y *bla-LEN-1*.

Los resultados de los análisis EcoRI-Southern-blot, tras hibridar con la sonda SHV₁₇₈ en las 97 muestras de DNA cromosómico, se muestran en la figura 30 separados en tres categorías de datos en función del número de fragmentos encontrados.

Casi la totalidad de las muestras estudiadas presentaron algún fragmento de restricción EcoRI. Ochenta y ocho cepas presentaron un único fragmento, ocho muestras dos fragmentos (K75, K108, K126, K128, K136, K150, K167, K621) y sólo en una no se identificó fragmento alguno (K534). Esta última muestra provenía de una cepa productora únicamente de TEM-1 por IEEA. Entre las ocho muestras con dos fragmentos de restricción EcoRI, cuatro eran productoras por IEEA de SHV-1+LEN-1, 3 de SHV-1 y 1 de SHV-1+TEM-1 (Figura 30).

Figura 30. Análisis por Southern-blotting de los fragmentos de restricción EcoRI-EcoRI.

4.3. Correlación de los datos del IEEA y la PCR con el Southern-blotting

En el gráfico de la figura 31 se muestran analizadas las 97 cepas según su detección enzimática por IEEA y número de fragmentos identificados en el RFLP (EcoRI)-Southern-blot; mientras que en el gráfico de la figura 32 se muestran las cepas analizadas según el resultado de la PCR para el gen *bla-SHV-1*. Los datos son ligeramente distintos al integrarse todas las cepas que expresan LEN-1 por IEEA en las SHV-1+LEN-1 y parte de las TEM-1 en las SHV-1+TEM-1 ya que en esas muestras se obtuvo una PCR positiva.

Globalmente un 8,2% de las cepas presentaron dos fragmentos que hibridaron con el gen SHV-1 tras digerir con EcoRI. Analizando por grupos representaron, el 8,8% de las que poseen SHV-1, un 12,1 % de las SHV-1+LEN-1 y sólo un 3,8% de las SHV-1+TEM-1. Estas diferencias no son estadísticamente significativas. Estos resultados hacen pensar en la posibilidad de que existan copias génicas en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae* que permiten la detección de dos fragmentos de un mismo locus génico.

Todas las cepas productoras de LEN-1 presentaron un único fragmento EcoRI. Este dato, combinado con los resultados de la PCR, confirma que en estas cepas también estaba presente el gen *bla-SHV-1* posiblemente en el mismo fragmento de 8,5 Kb identificado.

Entre las 10 cepas productoras de TEM-1 estudiadas, únicamente una cepa (K534, laboratorio L5) no presentó fragmentos de restricción para EcoRI, el resto presentó un único fragmento. Combinando estos datos con los de PCR, se observó que la cepa K534 que no hibridó en el RFLP-Southern-blot tampoco amplificó para la PCR, luego es razonable pensar que no codifica para el gen *bla-SHV-1* y posiblemente tampoco para *bla-LEN-1*, por ello fue considerada como un control negativo para los estudios PCR y RFLP. Sin embargo hay tres cepas más (K251, K263, K273, laboratorio L4) que sin dar positivo para la PCR de SHV-1, sí que presentaron fragmentos de hibridación Eco RI de 8,5 Kb. Al ser la PCR más específica que la hibridación con la sonda, sería razonable pensar que los fragmentos observados no fuesen SHV-1 estrictamente, sino que correspondan a un gen muy homólogo con SHV-1 (posiblemente *bla-LEN*, detectándose la presencia de este gen en los fragmentos de restricción de Eco RI). Las seis cepas restantes presentaron tanto la PCR como la hibridación positiva para SHV-1, luego serían catalogables como SHV-1+TEM-1.

Figuras 31. Análisis por RFLP (EcoRI)-Southern-blot de las 97 cepas estudiadas y analizadas según su producción enzimática por IEEA o el resultado de la PCR para el gen *bla-SHV-1*.

Figuras 32. Análisis por RFLP (EcoRI)-Southern-blot de las 97 cepas estudiadas y analizadas según su producción enzimática por IEEA o el resultado de la PCR para el gen *bla-SHV-1*.

El gráfico siguiente de la figura 33 muestra el tamaño de los fragmentos Eco RI que se encontraron tras hibridar con la sonda de SHV-1. Fueron cuatro los tipos distintos de fragmentos observados. El patrón de 8,5 Kb fue el más frecuente (88,5%, fragmento principal), seguido del de 8 Kb con 6,7%, 7 Kb con el 2,9% y un fragmento de tamaño superior a 23 Kb con el 1,9%. Es de destacar que el fragmento de 8 Kb, detectado en siete casos, nunca se presentó solo ya que en todos los casos fue acompañando al fragmento principal de 8,5 Kb. No ocurrió así con el fragmento de 7 Kb presente en tres casos. El fragmento >23 Kb se detectó en dos casos y en uno de ellos fue acompañando también al fragmento principal de 8,5 Kb (Figura 34).

En las figuras 35 y 36 se muestra la distribución de los fragmentos encontrados en las 97 cepas según su producción de β -lactamasa (IEEA) o la presencia del gen *bla-SHV-1* (PCR). Los datos más reseñables fueron los siguientes:

- En el grupo de SHV-1 sola se detectaron todos los tipos de patrones de fragmentos.
- En el grupo SHV-1+LEN-1 se observó el mayor porcentaje de cepas con el fragmento de 8 Kb (10,8%).
- En casi todos los grupos hay al menos dos patrones de restricción EcoRI distintos. Es una excepción el grupo de cepas TEM-1 (análisis PCR de la figura 36).

4.4. Southern-blot del DNA plasmídico de las cepas transconjugantes

Se realizó una extracción del DNA plasmídico de las cinco cepas de *E. coli* transconjugantes productoras de SHV-1 (TK75, TK167, TK136, TK175, TK198), con objeto de poder estudiar mediante RFLP-Southern-blot con Eco RI las características del locus que presentaba el gen *bla-SHV-1* cuando estaba codificado en un plásmido.

En los cinco casos, únicamente se detectó una banda de hibridación. Correspondió a 8,5 Kb en dos casos (TK198 y TK175) y a 8 Kb en tres casos (TK75, TK167 y TK136) (Figura 37).

Figura 33. Tipos de fragmentos Eco RI encontrados tras la hibridación con la sonda SHV-1₁₇₈ para detectar el gen *bla-SHV-1*.

Figura 34. Número de cepas con fragmentos EcoRI identificados tras la hibridación con la sonda SHV-1₁₇₈ para detectar el gen *bla-SHV-1*.

Figura 35 y 36. Distribución de los patrones de restricción EcoRI en las 97 cepas estudiadas según el análisis por IEEA y PCR.

Figura 37. RFLP Southern-blot del DNA plasmídico de las 5 cepas transconjugantes.

5. INTEGRIDAD DEL GEN Y DETERMINACIÓN DE VARIABLES ALÉLICAS

5.1. Secuenciación del gen *bla-SHV-1*

Con el fin de clarificar las discrepancias halladas entre el grado de expresión y detección del gen *bla-SHV-1*, se planteó la necesidad de secuenciar algunas cepas seleccionadas. El estudio de la secuencia génica permite identificar posibles anomalías (mutaciones, deleciones, etc.) que distorsionen la expresión correcta del gen, bien anulándola o bien regulando al alza o a la baja el nivel de expresión del mismo; y en algunos casos, cambios de aminoácidos que alteren la estructura secundaria o las regiones implicadas en la catálisis de la enzima.

Se han secuenciado 1120 pb en los que se pueden diferenciar las siguientes regiones:

1. La región codificadora del gen *bla-SHV-1* que comprendía 864 pb.
2. Una región, anterior al codon de inicio, que incluyó las secuencias consensus -35 y -10, así como la zona putativa de unión del ribosoma al RNAm. Dicha región está formada por 117 pb.
3. Los 139 pb siguientes al triplete de finalización de la transcripción.

El total de cepas secuenciadas ha sido de 18 distribuidas de la siguiente manera:

- Patrón pMON38 (*SHV-1_{pMON38}*). Para comprobar qué grado de fidelidad presentaba con otras secuencias de *bla-SHV-1* conocidas (*SHV-1_{R974}*: núm. acc. M59181 y, *SHV-1_{HB101}*: GenBank núm. acc. AF148850).
- Las cinco cepas transconjugantes. Para observar el grado de diferencia que podía existir entre las secuencias del gen *bla-SHV-1* de *K. pneumoniae* de codificación plasmídica transferido y el de origen cromosómico.
- Tres cepas productoras de SHV-1 por IEEA; una sensible (K280) y dos resistentes (K48 y K 237) a la mezlocilina, con el fin de identificar algún tipo asociación entre resistencia fenotípica a la mezlocilina y la secuencia génica.
- Cuatro cepas productoras únicamente de LEN-1 y cinco cepas productoras únicamente de TEM-1 por IEEA y que presentaron PCR positiva para el gen *bla-SHV-1*. Sólo una cepa TEM-1 (K263), que no tuvo una PCR positiva para SHV-1, se

incluyó en este análisis ya que se consiguió su amplificación con los primers de secuenciación.

5.2. Alineamientos comparativos: Determinación de mutaciones y variantes alélicas repetitivas

En el Anexo 1 se presenta el listado de alineamientos comparativos entre las diferentes secuencias de DNA analizadas. En el anexo 2 se han recogido los alineamientos comparativos entre las secuencias protéicas deducidas de las secuencias del Anexo1.

Nota aclaratoria: Los aminoácidos están codificados de la siguiente manera; A, alanina; C, cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptófano; Y, tirosina; + aminoácido insertado.

5.2.1. Comparación del gen *bla-SHV-1* (*SHV-1*_{R974}: Mercier y Levesque, 1990, núm. acc. EMBL M59181 y, *SHV-1*_{HB101}: Bradford, 1999, núm. acc. GenBank AF148850) vs. el patrón utilizado *bla-SHV-1*_{pMON38}

La primera secuencia de SHV-1 fue publicada por Mercier y Levesque en 1990 con el número de acceso de EMBL M59181. Aunque posteriormente, Bradford en 1999 volvió a analizar la secuencia del mismo gen utilizando una tecnología de secuenciación más avanzada y detectó una serie de errores respecto a la secuencia anterior (número de acceso de GenBank AF148850), hemos mantenido ambas con fines comparativos.

El grado de homología está referido a *SHV-1*_{pMON38}:

Secuencia	Apareamiento	Total	Porcentaje
<i>SHV-1</i> _{R974}	1079	1094	98.63
<i>SHV-1</i> _{HB101}	864	871	99.20

Las dos secuencias (SHV-1_{R974} y SHV-1_{pMON38}) deberían de haber sido idénticas ya que el plásmido vector empleado para este estudio fue proporcionado por el Prof. G. Jacoby como pMON38, que es el mismo plásmido que estos autores describen en un estudio en 1990 (200). Sin embargo, nuestra secuencia presentó diferencias tanto en la secuencia nucleotídica como en la deducción de la secuencia de los aminoácidos:

Nucleótido	Secuencia	Cambio de Aminoácidos	
CA.....GC	(427-428 nt)	A ₁₁₆	G ₁₁₆
ACGTTGGCC....A-GCTG--C	(655-660 nt)	N ₁₉₂ VG	K ₁₉₂ L+
AA....GC	(924-926 nt)	K ₂₈₄	A ₂₈₄
TA....AT	(933-934 nt)	Y ₂₈₇	I ₂₈₇
C--G....GCG	(957-960 nt)	Región no codificante	
C--C...CCGC	(965-968 nt)	Región no codificante	
A-G.....AGG	(997-999 nt)	Región no codificante	

La homología encontrada entre estas dos secuencias ha sido de 98,63%. Todos los aminoácidos que cambian, son cambios que también se han observado previamente en la β-lactamasa de espectro amplificado SHV-2. Sin embargo, no todas las diferencias que existen entre SHV-1_{R974} y SHV-2 aparecen en la secuencia SHV-1_{pMON38}. Por ejemplo, un importante aminoácido (G₂₃₈) integrante de una región codificadora de 15-mer que se ha empleado como oligosonda específica de SHV-2 (G₇₈₇GAGCTGGCGAGCGG₈₀₀) (200), no aparece en la secuencia SHV-1_{pMON38}. Se ha postulado que estas diferencias podrían ser errores de secuenciación derivados del método utilizado por Mercier y Levesque.

Por el contrario, la secuencia que se empleó como patrón (SHV-1_{pMON38}) mostró una mayor homología (99.20 %) con AF148850 (SHV-1_{HB101}). Solo siete nucleótidos fueron diferentes, todos ellos fuera de la región codificante del gen.

Nucleótido	Secuencia	Cambio de Aminoácidos
TGG....GGC	(88-90 nt)	Región no codificante
CCCGG....AAGCC	(954-958 nt)	Región no codificante

Estos datos garantizan un excelente control de calidad de la metodología, confirmando que la técnica de secuenciación empleada mediante termociclador mantuvo una gran especificidad y fidelidad. Hecho que queda demostrado al comparar nuestra secuencia con las previamente

validadas y publicadas en los bancos de datos, particularmente la AF148850 que empleaba una técnica similar a la descrita en el presente trabajo.

5.2.2. Comparación de *bla-SHV-1*_{pMON38} con el gen plasmídico *bla-SHV-1* amplificado de las cepas transconjugantes.

El grado de homología está referido a SHV-1_{pMON38}

Secuencia	Apareamiento	Total	Porcentaje
TK75	1094	1094	100.00
TK136	1094	1094	100.00
TK167	1094	1094	100.00
TK176	1094	1094	100.00
TK198	1093	1094	99.91

Todas las cepas transconjugantes obtenidas se secuenciaron después de extraer el DNA plasmídico transferido y amplificar el gen SHV-1. De las 5 cepas, 4 mostraron total identidad con la secuencia patrón SHV-1_{pMON38}, y únicamente una cepa, TK198, mostró un nucleótido diferente de las demás. El nucleótido fue la A₄₉₄ respecto del fragmento secuenciado, que se convirtió en una G₄₉₄. Sin embargo, cabe destacar que este desapareamiento (*mismatching*) no supone un cambio en la secuencia de aminoácidos de la enzima.

5.2.3. Comparación de *bla-SHV-1*_{pMON38} con el gen *bla-SHV-1* amplificado de las cepas productoras de SHV-1 por IEEA (sensibles o resistentes a mezlocilina)

Se eligieron tres cepas productoras de enzima activo para comprobar que el gen secuenciado de cepas salvajes no difería significativamente del gen clonado en pMON38 (SHV-1_{pMON38}). Además dos de las cepas se eligieron por su resistencia a la mezlocilina (K48 y K 237) con el fin de poder explorar si esta característica fenotípica se correlaciona con alguna característica en la secuencia nucleotídica.

El grado de homología está referido a SHV-1_{pMON38}

Secuencia	Apareamiento	Total	Porcentaje
K280	1085	1094	99.54
K48	1077	1094	98.80
K237	1090	1094	100.0

Una de las cepas resistentes a mezlocilina (K237) se correlacionó con un 100 % de identidad con el patrón de SHV-1_{pMON38}. La otra cepa (K48) presentó diferencias puntuales que únicamente influyeron en la secuencia de aminoácidos en una ocasión provocando un cambio de L₃₅ (Leucina) por Q₃₅ (Glutamina). Estos cambios han sido anteriormente descritos en la β -lactamasa SHV-11 que no tiene un perfil de amplio espectro amplificado (112).

La cepa sensible a mezlocilina (K280) también presentó cambios puntuales y una delección de un nucleótido (T₈₅) en región no codificante. En ningún caso se vió afectada la identidad de la secuencia de aminoácidos.

5.2.4. Comparación de *bla*-SHV-1_{pMON38} con el gen *bla*-SHV-1 amplificado de las cepas productoras de LEN-1 por IEEA

Al comparar la secuencia de estas cepas con las secuencias patrón SHV-1_{pMON38} y LEN-1 (núm. acc. X04515), se reconfirmó que la secuencia amplificada correspondía únicamente a SHV-1, no habiendo contaminación cruzada con secuencias de LEN-1. Se ratificó una vez más la especificidad del método de PCR usado para detectar el gen SHV-1

El grado de homología está referido a SHV-1_{pMON38}

Secuencia	Apareamiento	Total	Porcentaje
LEN-1	985	1095	89.95
K51	537	540 (*)	99.44
K103	1084	1095	99.36
K218	1083	1095	99.27
K299	1085	1095	99.18

(*) En una de las 4 cepas (K51) la reacción de secuenciación de la parte 3' del gen no produjo un producto de suficiente calidad, ya que la electroforesis posterior no permitió un análisis correcto de la secuencia. De esta muestra únicamente se tuvo en consideración la parte 5' del gen determinada por las primeras 540 pb.

Las mutaciones comunes observadas en todas las muestras estudiadas de este grupo de cepas, referidas a SHV-1_{pMON38} se detallan en la tabla adjunta:

MUTACIONES DE NUCLEOTIDOS	POSICIÓN EN LA CADENA	AFECTACIÓN DE LA SECUENCIA DE A.A.
Cambio de C por T	416 nt	-
Cambio de C por T	449 nt	-
Cambio de A por G	494 nt	-
Cambio de G por A	547 nt	Cambio de G ₁₅₆ por D ₁₅₆
Cambio de C por T	983 nt	-
Cambio de C por T	986 nt	-
Cambio de A por G	1034 nt	-

Estos cambios en la secuencia de aminoácidos de SHV-1 no habían sido anteriormente descritos en la literatura así que representan nuevas variantes de SHV (véase tabla 7, 29 y 30). Sin embargo, durante el proceso de aprobación del artículo que sirvió para describir estas secuencias, se nos comunicó que acababan de ser publicadas en la página web de β -lactamasas (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) como SHV-27 (122).

Adicionalmente, se muestran las mutaciones que únicamente se observaron en algunas de las cepas de este grupo:

CEPAS	MUTACIONES DE NUCLEOTIDOS	POSICIÓN EN LA CADENA	AFECTACIÓN DE LA SECUENCIA DE A.A.
K299	Cambio C por T Cambio C por G	457 nt 878 nt	Cambio de A ₁₂₆ por V ₁₂₆
K218	Cambio C por G	878 nt	-

El cambio en la K299 supone otra nueva variante de SHV que no ha sido descrita en la literatura (véase tabla 7, 29 y 30). Esta cepa nos ha sido reconocida como SHV-32 (nº de acceso AY037778).

5.2.5. Comparación de bla-SHV-1_{pMON38} con el gen bla-SHV-1 amplificado de las cepas productoras de TEM-1 por IEEA

De las cinco cepas amplificables para realizar la secuenciación, cuatro de ellas presentaron una elevada homología con el patrón de SHV-1_{pMON38}. Estas cuatro cepas son las que amplificaron bien por PCR y además concentrando el extracto proteínico se pudo identificar SHV-1 en 3 de ellas). La otra cepa (K263), que no fue amplificable por PCR para el fragmento específico, sin embargo si que amplificó para la reacción de secuenciación, aunque con dificultades en la reacción inversa. En esta cepa se reconcentró el extracto proteínico y se observó una banda inferior a SHV-1 (probable LEN-1). La secuenciación mostró efectivamente, una mayor homología con LEN-1 que con SHV-1.

El grado de homología está referido a SHV-1_{pMON38}

Secuencia	Apareamiento	Total	Porcentaje
K8	1086	1095	99.63
K39	1083	1095	99.35
K117	1065	1095	99.53
K154	1086	1095	99.34
K263	972	1095	90.92
LEN-1	985	1095	89.95

Las mutaciones observadas se han agrupado en tres tablas distintas en función de que dichas mutaciones fuesen comunes a todas las cepas o particulares de cada una. Mención especial merece la cepa K263 que se comparó con la secuencia nucleotídica de LEN-1 (núm. acc. X04515) aunque se refirió también a SHV-1_{pMON38}. Cuando el grado de homología de K263 está referido a LEN-1, el resultado fue el siguiente:

Secuencia	Apareamiento	Total	Porcentaje
K263	1050	1089	96,42

- Cambios comunes vs. SHV-1_{pMON38}:

MUTACIONES DE NUCLEOTIDOS	POSICIÓN EN LA CADENA	COMENTARIO
Cambio A por G	494 nt	Hallazgo común con la cepa patrón LEN-1

- Cambios específicos de cepa vs. SHV-1_{pMON38}:

CEPAS	MUTACIONES DE NUCLEOTIDOS	POSICIÓN EN LA CADENA	AFECTACIÓN DE LA SECUENCIA DE A.A.
K8	Cambio C por T	449 nt	-
	Cambio C por T	756 nt	Cambio de P ₂₂₆ por S ₂₂₆
	Cambio G por A	796 nt	-
	Cambio A por G	1035 nt	-
K39	Cambio T por A	184 nt	Cambio de L ₃₅ por Q ₃₅
	Cambio C por T	608 nt	-
	Cambio G por A	796 nt	-
	Cambio CCGC por TCGT	983-986 nt	-
	Cambio A por G	1035 nt	-
K117	Cambio C por T	449 nt	-
	Cambio G por A	698 nt	-
	Cambio C por G	878 nt	-
	Cambio T por A	1057 nt	-
K154	Cambio A por T	100 nt	Cambio de Y ₇ por F ₇
	Cambio C por T	416 nt	-
	Cambio G por A	125 nt	-
	Cambio G por A	796 nt	-
	Cambio T por C	854 nt	-
	Cambio A por G	1035 nt	-

La secuencia de K8 y K154 suponen nuevas variantes de SHV no descritas previamente. La secuencia de la cepa K8 nos fue reconocida como SHV-33 (nº de acceso AY037779). Con la secuencia de la cepa K154 ocurrió lo mismo que con las secuencias de K103 y K218, ya que fueron descritos durante el proceso de aprobación del artículo donde se documentó este trabajo. La β -lactamasa de la K154 ha sido finalmente asignada como SHV-28 (123). La K39 al igual que la K48 concuerdan con la variante SHV-11 descritas anteriormente (véase tabla 7, 29 y 30).

- Cambios en K263 vs. LEN-1:

MUTACIONES DE NUCLEOTIDOS	POSICIÓN EN LA CADENA	AFECTACIÓN DE LA SECUENCIA DE A.A.
Cambio A por C	84 nt	
Cambio TGGTAT por CGGTAG	145-150 nt	Cambios de V ₂₂ por A ₂₂ e Y ₂₄ por D ₂₄
Cambio A por G	239 nt	Cambio de N ₅₃ por S ₅₃ manteniendo diana NotI como SHV-1
Cambio CGGGC por AGGGG	338-342 nt	Cambios de N ₅₃ por S ₅₃
Cambio C por T	534 nt	Cambios de L ₈₈ por V ₈₈
Añadir una G	924 nt	Provoca un desplazamiento de la pauta de lectura incorporando siete AAs iguales a los de SHV-1 (A ₂₈₄ ALIEHW ₂₉₀)
Delección G	979 nt	
Cambio G por G	994 nt	
Cambio C por G	1008 nt	

La secuencia de K263 supone también una nueva variante de LEN no descrita previamente (véanse tablas 7, 29 y 31). A esta variante se le ha dado el nombre de LEN-2 (nº de acceso AY 0377780).

Tabla 29. Homologías de los alineamientos del DNA y de las secuencias de aminoácidos deducidas. La homología está expresada respecto al patrón SHV-1_{pMON38} empleado en el estudio.

<i>Muestras</i>	<i>Homología</i>	<i>Homología</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Resultados</i>	<i>Fragmentos</i>
	<i>% DNA</i>	<i>% proteína</i>	<i>Sustituídos^a</i>	<i>PCR</i>	<i>EcoRI RFLP</i>
TK75	100.00	100.00	-	+	8 Kb
TK136	100.00	100.00	-	+	8 Kb
TK167	100.00	100.00	-	+	8 Kb
TK175	100.00	100.00	-	+	8.5 Kb
TK198	99.91	100.00	-	+	8.5 Kb
K280 (Mz-S)	99.54	100.00	-	+	8.5 Kb
K48 (Mz-R)	98.80	99.65	Leu35Gln	+	7 Kb
K237 (Mz-R)	100.00	100.00	-	+	8.5 Kb
K103	99.36	99.65	Gly156Asp	+	8.5 Kb
K218	99.27	99.65	Gly156Asp	+	8.5 Kb
K299	99.18	99.30	Ala126Val Gly156Asp	+	8.5 Kb
K8	99.63	99.65	Pro226Ser	+	8.5 Kb
K39	99.35	99.65	Leu35Gln	+	7 Kb
K117	99.53	100.00	-	+	8.5 Kb
K154	99.34	99.65	Phe7Tyr	+	8.5 Kb
			Val22Ala Tyr24Asp		
K263 ^b	90.92	90.91	Asn53Ser Leu88Val	-	8.5 Kb
			284AlaAlaLeulleGluHisTrp290		
<i>SHV-1^c</i>	<i>99.20</i>	<i>100.00</i>			
<i>LEN-1^d</i>	<i>89.95</i>	<i>87.76</i>			
<i>OHIO-1^e</i>	<i>94.88</i>	<i>94.41</i>			

^a Números de las secuencias aminoacídicas según Ambler y cols.(209) . ^bLas sustituciones de aminoácidos para K263 se compararon con la secuencia consenso de LEN-1. Secuencias de ^cGenBank (AF148850) y ^{d,e} EMBL (X04515 y M33655, respectivamente).

Tabla 30. Comparación de las secuencias de aminoácidos que presentaron las variantes derivadas de SHV-1. Se incluye a modo clarificador SHV-11 como una variante no-BLEA previamente descrita. Nd: No detectado por IEEA después de concentrar los extractos.

Cepa o β -lactamasa	Nueva β -lactamasa	Posición de los residuos						PI
		7	35	126	156	226		
SHV-1	-	I	L	R	E	G	7,6	
SHV-11	-		Q				7,6	
K48	-		Q				Nd	
K39	-		Q				7,6	
K299	SHV-32			V	D		Nd	
K103	SHV-27				D		Nd	
K218	SHV-27				D		Nd	
K8	SHV-33					S	Nd	
K154	SHV-28	F					7,6	

Tabla 31. Comparación de la secuencia aminoacídica que presentó la nueva variante derivada de LEN-1 y a la que se la designado como LEN-2. Se incluye SHV-1 a modo comparativo.

Cepa o β -lactamasa	Posición de los residuos											pI
	22	24	53	88	284	285	286	287	288	289	290	
LEN-1	V	Y	N	L	-	-	-	-	-	-	-	7,1
SHV-1	A	H	S	D	A	A	L	I	E	H	W	7,6
K263	A	D	S	V	A	A	L	I	E	H	W	7,1

5.2.6. Variantes alélicas repetitivas

Entre las distintas secuencias del gen *bla-SHV-1* analizadas se han podido establecer una serie regiones comunes, mutadas respecto a la secuencia original, que hemos denominado “variantes alélicas repetitivas” (VAR). Estas 12 regiones se han señalado en los análisis de alineamientos compartivos de las secuencias del Anexo 1.

- VAR1 (T₁₈₄A) está presente en la secuencia patrón de *bla-LEN-1* y en la de la cepa K263; también se ha podido observar en 2 secuencias más de cepas productoras de SHV-1 (K48 y K39). provoca un cambio de la secuencia de aminoácidos Leucina L₃₁ por Glutamina Q₃₁ (L₃₅Q según la nomenclatura de Ambler y col. (209))
- VAR2 (C₄₁₆T), se identificó en todas las cepas productoras de LEN-1 y en una de TEM-1 (K154). Es una mutación conservativa.
- VAR3 (C₄₄₉T), en una mutación que presenta la secuencia OHIO-1. Se identificó en todas las cepas LEN-1 y en dos TEM-1 (K8 y K117).
- VAR4 (A₄₉₄G), es una mutación común para los patrones LEN-1 y OHIO-1. Se identificó en todas las secuencias estudiadas de DNA cromosómico, excepto en la K237. También se detectó en la secuencia plasmídica TK198.
- VAR5 (G₅₄₇A), sólo se detectó en las 3 secuencias de las cepas productoras de LEN-1, en la K51 no se pudo determinar su presencia por la imposibilidad de realizar el análisis. Determina un cambio de secuencia de aminoácidos, Glicina G₁₅₂ por Aspártico D₁₅₂ (G₁₅₆D según nomenclatura de Ambler y col.)
- VAR6 (C₆₀₈T), representa una transición C por T que solamente se observó en 2 secuencias, K48 y K39.
- VAR7 (G₇₉₈A), es una mutación común para los patrones LEN-1 y OHIO-1. Se identificó en las secuencias TEM-1, excepto la K117. También la presentó la cepa resistente a la Mz, K48.
- VAR8 (G₈₁₂C), es una mutación conservativa común al patrón LEN-1 y a la secuencia K263; se observó además únicamente en la cepa Mz sensible (K280).
- VAR9 (C₈₇₈G), transición C por G que se observa en el patrón OHIO-1. Se identificó en 4 secuencias más, la cepa Mz sensible (K280), 2 cepas LEN-1 (K218 y K 299), y una cepa TEM-1 (K117). Es una mutación conservativa.
- VAR10 (T₉₈₃C) y VAR11 (T₉₈₆C), situadas en zona no codificante. Son dos variantes alélicas que van ligadas, se observaron siempre las dos conjuntamente. Representan dos transiciones C por T típicas de la secuencia patrón OHIO-1. Se identificó en 5 secuencias, K48, las secuencias de las cepas productoras de LEN-1 (K103, K218 y K299) y una cepa TEM-1 (K117).
- VAR12 (A₁₀₃₄G), transición A por G situada en zona no codificante. Presente en la mayoría de las secuencias cromosómicas estudiadas, excepto dos (K237 y K117). Es una

mutación compartida con el patrón de OHIO-1 pero no con LEN-1 que la convierte en una transversión A por C.

En determinados casos las VAR determinan un cierto grado de especificidad por grupo de cepas, pero en otros casos son comunes entre varios grupos. Muy posiblemente estas mutaciones repetitivas en esas 12 áreas representen una evolución selectiva del gen de la β -lactamasa SHV-1.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Importancia de *Klebsiella pneumoniae* como patógeno humano
2. Caracterización fenotípica de las cepas estudiadas
3. Espectro de plásmidos y conjugación bacteriana
4. Caracterización genotípica mediante detección por PCR de la presencia del gen *bla-SHV-1* y determinación del locus genético por RFLP-Southern-blot
5. Secuenciación del gen *bla-SHV-1* y determinación de variantes alélicas

1. IMPORTANCIA DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* COMO PATÓGENO HUMANO

Entre las distintas especies del género *Klebsiella*, la primera que se describió como patógeno humano fue *K. pneumoniae*. Es el agente causal responsable de aproximadamente el 3-5% de las neumonías. Cada vez más ha ido adquiriendo un papel importante como agente patógeno oportunista causante de procesos infecciosos inespecíficos (27). Sin embargo, las infecciones más frecuentes causadas por *Klebsiella* son las relacionadas con el aparato urinario, siendo la mayoría de ellas de origen nosocomial (28). *K. pneumoniae* se aísla como saprófita del hombre y de los animales, principalmente en heces y en secreciones respiratorias. El aislamiento de *K. pneumoniae* en hábitats naturales (aguas de ríos y lagos, alimentos, suelos, etc.), se debe fundamentalmente a contaminación de origen fecal humana y/o animal.

Aunque las klebsiellas no constituyen un componente significativo de la flora saprófita humana, sin embargo la hospitalización y el empleo de antibióticos favorece su colonización (21-24, 210-212) y ésta puede derivar a su vez en un proceso infeccioso dado su comportamiento como oportunista (213). Entre los factores que más favorecen la colonización del hombre por estas bacterias destacan (22): el estado físico del individuo, edad, estancia hospitalaria, administración de antibióticos, necesidad de emplear técnicas exploratorias y terapéuticas agresivas/invasoras (intubación, cateterismos, implantes, etc..) y el ambiente hospitalario en general.

Los antibióticos más ampliamente utilizados para el tratamiento de las infecciones causadas por *Klebsiella* spp. son los betalactámicos (cefalosporinas de 2ª y 3ª generación o aztreonam) por su gran eficacia y escasa toxicidad; como alternativa se podría considerar el empleo de amoxicilina asociada al ácido clavulánico, el imipenem o una fluoroquinolona. La asociación de un betalactámico con un aminoglucósido suele comportarse de forma sinérgica y su uso está indicado en caso de infección grave (bacteriemia, neumonía necrotizante, endocarditis) o si el huésped está inmunodeprimido (granulopénico). Especialmente en el ambiente hospitalario se aíslan cada vez más frecuentemente cepas de *K. pneumoniae* resistentes a los antibióticos betalactámicos y aminoglucósidos.

Los mecanismos clásicos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos son: (a) modificación de las PBPs de la membrana citoplasmática, (b) utilización de PBPs (transpeptidasas) alternativas, (c) impermeabilidad por alteración de porinas, y por último y más importante (d) la producción de β -lactamasas. Se ha descrito también la presencia de bombas de expulsión como un mecanismo de resistencia a tener en cuenta para este grupo de antibióticos, fundamentalmente en *P. aeruginosa* (49-52).

Sin embargo, el mecanismo más importante y el que más eficazmente contribuye al desarrollo de resistencias entre los antibióticos betalactámicos es, sin duda, la presencia de β -lactamasas. En *K. pneumoniae* la β -lactamasa más frecuentemente identificada es SHV-1, que pertenece a la Clase Molecular A de la clasificación de Ambler por poseer un residuo de serina en su centro catalítico. También perteneciente a esta clase de enzimas se identifica, aunque menos frecuentemente, una β -lactamasa de codificación cromosómica denominada LEN-1. Entre las β -lactamasas plasmídicas se encuentra con cierta frecuencia la enzima TEM-1, y en ocasiones también la SHV-1 codificada por plásmidos.

Las β -lactamasas específicas de *K. pneumoniae* codificadas por el cromosoma, presentan un bajo nivel de expresión en la mayoría de cepas, sin embargo confieren resistencia a aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina) y carboxipenicilinas (ticarcilina, carbenicilina). La resistencia a ureidopenicilinas (mezlocilina) y cefalosporinas de espectro reducido (1ª generación) puede también observarse cuando el inóculo bacteriano empleado es elevado, pero raramente se observan con un inóculo adecuado (10^4 - 10^5 UFC). Estas resistencias revierten en presencia de ácido clavulánico u otros inhibidores de estas β -lactamasas (tazobactam). Tanto SHV-1 como LEN-1 presentan una mínima actividad frente a las cefalosporinas de amplio espectro, mostrando una muy baja V_{max} y mínima afinidad (alta K_m) independientemente de su nivel de expresión (214).

Las β -lactamasas codificadas por plásmidos tienen la potencialidad de provocar una transmisión horizontal de las resistencias, creando problemas epidemiológicos importantes en los ambientes hospitalarios y con difusión también al medio extrahospitalario. En los últimos años y de manera creciente, se han ido identificando en diversas especies de enterobacteriáceas y especialmente en *K. pneumoniae*, la aparición de resistencias a cefalosporinas de 3ª generación

y monobactamos. Este fenómeno está causado por la aparición de β -lactamasas de espectro amplificado, de codificación plasmídica, que son mutantes fundamentalmente de las enzimas de tipo SHV y TEM. Este es, sin duda, un paso más en el proceso de evolución por presión selectiva derivado del empleo masivo de antibióticos, tanto dentro del ambiente hospitalario (Unidades de Cuidados Intensivos, etc.) como extrahospitalario (mal cumplimiento del tratamiento, automedicación, etc.) y facilitado por la gran capacidad de distribución horizontal que poseen estas β -lactamasas. Se han descrito también, tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*, un incremento en las CIM en cepas hiperproductoras de β -lactamasa SHV-1 (215, 216).

Así pues, nos planteamos en este trabajo la caracterización molecular de la β -lactamasa SHV-1 en *Klebsiella pneumoniae* ya que es uno de los patógenos más importantes causantes de graves problemas tanto en ambientes intra como extrahospitalario. Además la β -lactamasa SHV-1 y sus distintas variantes genéticas representan las β -lactamasas de mayor importancia en *Klebsiella pneumoniae*, pudiendo ser asimismo una fuente potencial de selección y transmisión horizontal de resistencias a otras especies.

2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS ESTUDIADAS

Todas las cepas estudiadas fueron aisladas de productos patológicos humanos y procedían de cinco laboratorios de microbiología distintos. La mayor parte de los aislamientos provenían de infecciones urinarias, lo que constata el hecho que esta especie es una de las que con mayor frecuencia provoca este tipo de patología. Se dedicó un particular esfuerzo para garantizar que ninguna de las cepas tuviera un origen clonal que pudiera sesgar los resultados obtenidos. El prolongado período de cinco años de donde se seleccionaron las cepas, la procedencia de cinco laboratorios distintos, así como los ulteriores análisis de sensibilidad a antibióticos, los estudios bioquímicos y enzimáticos y los análisis genéticos confirman que se ha trabajado con cepas de origen no clonal.

La caracterización fenotípica de las distintas cepas estudiadas se planteó como uno de los objetivos de la tesis incluyendo: La identificación bioquímica de las cepas, la expresión enzimática de sus β -lactamasas y los perfiles de sensibilidad a los distintos antibióticos ensayados. El pI de las β -lactamasas cromosómicas en cierto modo no es más que un complemento a la identificación bioquímica de la especie ya que está considerado como una característica de género, especie y subespecie (81). No se ha planteado el tipado antigénico de las cepas porque en el género *Klebsiella* no se ha demostrado una correlación entre el serotipo capsular y la especie (en *K. pneumoniae* se pueden identificar casi todos los tipos capsulares), ni tampoco con la sensibilidad a los antibióticos (10, 193)

Identificación bioquímica y biotipos

El primer paso tras la identificación bioquímica de la especie *K. pneumoniae* (Tabla 18), fue la diferenciación de los seis biotipos descritos, siendo el más frecuente el biotipo I con cerca del 84% de las cepas (Tabla 19). El resto de los biotipos, mucho menos frecuentes, sin embargo mayoritariamente provinieron de diferentes laboratorios lo que contribuye a reforzar una vez más su origen no clonal. Sólo el biotipo II y III identificados en cinco cepas, dos y tres respectivamente, los aportaron un único laboratorio en cada caso. Las dos cepas del biotipo II (K63 y K299) aisladas en años distintos, presentaron también expresión diferencial de sus β -lactamasas (SHV-1+LEN-1 y SHV-1 respectivamente) y perfiles de sensibilidad distintos. Las otras tres cepas del biotipo III (K251, K263 y K273) fueron más similares entre sí, ya que tanto

sus β -lactamasas (TEM-1) como sus perfiles de sensibilidad fueron iguales y aparentemente se podría pensar en un origen clonal. De estas tres cepas del biotipo III se volverá a incidir más adelante sobre lo que revelaron los análisis genéticos de PCR y Southern-blot.

No se ha desprendido una correlación clara entre un determinado biotipo y patrones de resistencia particulares, ni tampoco con la presencia de determinados perfiles electroforéticos en sus β -lactamasas; exceptuando lo comentado para el biotipo III donde las tres cepas expresaban inicialmente la enzima TEM-1.

Caracterización de las β -lactamasas por IEEA

La caracterización de las β -lactamasas mediante IEEA, es una herramienta muy utilizada y fiable para detectar la expresión de estas enzimas determinando su punto isoeléctrico (pI). En cierta manera, puede ser también una forma de ayudar a discernir un cierto grado de relación epidemiológica entre las cepas, detectando la expresión diferencial de sus enzimas, y a su vez permite especular sobre el tipo de resistencia esperado a los antibióticos betalactámicos. Sin embargo, es una técnica que presenta limitaciones cuantitativas para determinar el grado de expresión enzimático, ya que su límite de detección depende de la concentración de las enzimas en los extractos bacterianos. Los extractos bacterianos se han de preparar mediante un proceso que requiere unos ajustes de la muestra concentrando y/o diluyendo, en función de la actividad enzimática que se detecta previamente a la electroforesis. Por ello, sin ser consciente, se puede estar infravalorando la presencia de una enzima o, dicho en otros términos, no permitiendo la detección de ciertas enzimas de actividad baja o de escasa síntesis, sobretodo cuando su presencia es concomitante con otras enzimas de mayor actividad intrínseca o un más óptimo grado de expresión. Es decir, el grado de expresión enzimática viene determinado directamente por la codificación cromosómica o plasmídica; de forma que enzimas de expresión constitutiva codificadas en el cromosoma pueden estar infravalorados respecto a los codificados por plásmidos.

Como la mayoría de enterobacteriáceas, las bacterias del género *Klebsiella* y en particular *K. pneumoniae*, por las características de la membrana externa, son resistentes a la bencilpenicilina, meticilina e isoxazolilpenicilinas (oxacilina); por la presencia de β -lactamasa cromosómica son resistentes a las amino- (ampicilina, amoxicilina) y carboxipenicilinas

(carbenicilina, ticarcilina). El comportamiento más variable frente a preparados β -lactámicos más activos como ureidopenicilinas (mezlocilina), cefalosporinas de 1^a (cefalotina), 2^a (cefuroxima) y 3^a (cefotaxima, ceftazidima) generación y monobactamos (aztreonam), está determinado fundamentalmente por un mayor grado expresión de sus β -lactamasas (presencia de plásmidos, sistemas de hiperproducción y/o multicopia génica) y/o también, por una mayor capacidad hidrolítica (mutantes de espectro amplificado). Asimismo, la alteración de los mecanismos de penetración como las mutaciones en las porinas, contribuyen a la disminución de la sensibilidad antibiótica, y aunque juegan un papel menos importante, en ocasiones son de tipo aditivo.

La resistencia a aminoglucósidos está frecuentemente ligada a la de los antibióticos betalactámicos ya que, las enzimas modificantes causantes de la misma suelen estar codificadas en los mismos plásmidos que las β -lactamasas plasmídicas. También se han descrito resistencias por alteraciones en los mecanismos de transporte hacia el interior de la bacteria y alteraciones en el ribosoma. La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido ampliamente utilizado para el tratamiento de infecciones nosocomiales. Se ha de destacar que se han descrito brotes epidémicos causados por cepas de *K. pneumoniae* resistentes a este fármaco con capacidad de diseminación horizontal mediante plásmidos conjugativos (217-219). En el presente estudio, un 16,2% de las cepas productoras de SHV-1 por IEEA (**Grupo I**) fueron resistentes a gentamicina. Únicamente la presencia de la β -lactamasa TEM-1, en co-expresión con SHV-1 o de manera aislada, aumentó significativamente la frecuencia de resistencias entre un 35% (en co-expresión en el **Grupo I**, $p=0,015$) y un 60% (en las cepas del **Grupo II** productoras de TEM-1 sola identificada por IEEA, $p=0,0006$). Así, la presencia de la β -lactamasa plasmídica TEM-1 sería un marcador del incremento de la frecuencia de resistencias a gentamicina, probablemente por la co-expresión de enzimas modificadores de aminoglucósidos que estarían codificados en los mismos plásmidos de la β -lactamasa TEM-1. Por el contrario, la escasa relación encontrada entre la presencia de la β -lactamasasa SHV-1 y la resistencia cruzada a gentamicina, evidenció: a) una cierta independencia de SHV-1 de los mecanismos de resistencia de codificación plasmídica ligados a los antibióticos aminoglucósidos y, b) una mayor tendencia a la codificación de SHV-1 en el cromosoma bacteriano de las cepas estudiadas.

Estudios de sensibilidad frente a penicilinas y combinaciones con ácido clavulánico

K. pneumoniae es resistente a la amoxicilina y carbenicilina (7, 61, 169, 172). Todas las cepas estudiadas presentaron dicha resistencia, excepto una cepa del **Grupo II** (K51), productora de LEN-1 por IEEA, que fue sensible a la carbenicilina con una CIM de 8 µg/mL. La mezlocilina, como el resto de ureidopenicilinas, es un antibiótico con un marcado efecto inóculo (220-222) y es poco estable frente a las β-lactamasas; su mayor virtud en cuanto a eficacia la proporciona la capacidad para atravesar la membrana externa y su elevada afinidad por las enzimas diana (PBPs 1 y 3). El 48,6% de cepas del **Grupo I** fueron resistentes a la mezlocilina, mientras que en las cepas del **Grupo II** las productoras de LEN-1 fueron más sensibles (15,4% resistentes, p=0,054) y las productoras de TEM-1 más resistentes (90% resistentes, p=0,034). La resistencia a la mezlocilina podría ser debida a varias causas: Una producción de β-lactamasa superior a la habitual (promotor más activo, codificación plasmídica, genes multicopia); o a la presencia de una β-lactamasa más activa (TEM-1 vs. SHV-1 ó LEN-1), o bien a una disminución de la permeabilidad que dificultaría la penetración de este preparado; o una combinación de varios de estos factores.

El ácido clavulánico que presenta una escasa actividad antibiótica, se comporta como un excelente inhibidor de las β-lactamasas de *K. pneumoniae*. La combinación de ácido clavulánico con amoxicilina o mezlocilina ha permitido un incremento de la eficacia de dichos compuestos. El 78,4% de las cepas del **Grupo I** recuperaron la sensibilidad a la amoxicilina en presencia de ácido clavulánico. Entre las cepas del **Grupo II**, el 100% de las LEN-1 fue sensible, y el 60% de las TEM-1. Solamente una cepa (K159) del **Grupo I** productora de SHV-1+TEM-1, permaneció resistente a la combinación de mezlocilina y ácido clavulánico (CIM= 64µg/mL). Dicha cepa también fue resistente a la combinación de amoxicilina + ácido clavulánico (CIM= 32µg/mL). Aunque no se han realizado estudios adicionales, probablemente en esta cepa existan alteraciones en las proteínas de la membrana externa (porinas) que modifican la permeabilidad a estos fármacos y/o alteraciones en las PBPs.

Estudios de sensibilidad frente a cefalosporinas y monobactamos

Las cefalosporinas son un grupo de antibióticos betalactámicos que muestran un excelente perfil de actividad sobre *K. pneumoniae*. La cefalotina es una cefalosporina de 1ª generación

activa sobre *Klebsiella*, aunque ha ido creciendo paulatinamente el porcentaje de cepas resistentes. En nuestros datos, casi la mitad de las cepas del **Grupo I** fue resistente a cefalotina, mientras que lo fue el 80% de las cepas del **Grupo II** productoras de TEM-1 y sólo el 15,4% de las LEN-1. Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. Únicamente 9 cepas, todas del **Grupo I**, presentaron CIMs para ceftazidima $\geq 1\mu\text{g/mL}$. Ninguna de estas cepas se consideró como posible mutante de amplio espectro amplificado ya que las pruebas de sinergia en doble disco con cefalosporinas de 3^a generación y ácido clavulánico no mostraron un aumento del halo de inhibición característico de estas cepas. Aunque no se ha estudiado la actividad enzimática hidrolítica de las cepas incluídas en este estudio, no es descartable la posibilidad de que en algunas de ellas existiera algún mecanismo que permitiera una mayor expresión enzimática y por lo tanto una mayor capacidad hidrolítica. Por ejemplo: Codificación plasmídica del enzima, de manera similar a lo descrito por otros autores en cepas hiperproductoras de la β -lactamasa SHV-1 en *Klebsiella pneumoniae* (216) y en *E.coli* (215); y/o duplicaciones génicas en el cromosoma, como se demostró en dos cepas K75 y K108.

En términos generales se puede concluir que, la co-expresión enzimática de las β -lactamasas SHV-1 y LEN-1 no confiere un fenotipo de resistencia antibiótica mayor que el observado para SHV-1 sola (Figuras 12 y 13). Sin embargo, la presencia de TEM-1 sola o la co-expresión enzimática de SHV-1 con TEM-1, significativamente confiere un fenotipo de resistencia antibiótica mayor que el observado para SHV-1 sola (Figuras 14 y 16). Además, el perfil de resistencia en las cepas que sólo expresan LEN-1 es sensiblemente menor que el observado para las cepas que expresan SHV-1 sola o en combinación (Figuras 12, 13 y 15). En general, en las cepas estudiadas, un patrón de resistencia más eficaz se corresponde con un nivel de expresión de β -lactamasa mayor y/o con una mejor actividad hidrolítica de la enzima; lo que permite hidrolizar más eficientemente a los antibióticos betalactámicos.

3. ESPECTRO DE PLÁSMIDOS Y CONJUGACIÓN BACTERIANA

Aislamiento de DNA plasmídico y cromosómico

Los plásmidos son elementos clave en la transmisión horizontal de la información genética y por tanto, son capaces de propagar rápidamente las resistencias a los antibióticos entre los individuos de una misma o diferente especie. Asimismo, la transmisión de la información mediante la conjugación bacteriana proporciona una información adicional sobre la ubicación de los genes de resistencia que se desean estudiar.

Con el fin de documentar tanto la presencia y el tipo de plásmidos presentes en *K. pneumoniae* como la ubicación de los genes que codifican para la β -lactamasa SHV-1, se realizó el estudio de plásmidos en todas las cepas productoras de SHV-1 (**Grupo I**, n=74). Para los experimentos de conjugación únicamente se consideraron las 54 cepas de dicho grupo que no expresaban ninguna otra β -lactamasa plasmídica. Así, las 20 cepas del **Grupo I** que expresaban conjuntamente la β -lactamasa TEM-1 no se incluyeron en los experimentos de conjugación ya que, nos interesaba estudiar la frecuencia y características de los transconjugantes que expresaban únicamente la β -lactamasa SHV-1 de presunta codificación plasmídica. La presencia de TEM-1 era pues un elemento “contaminante” y no deseado.

Los resultados del estudio de plásmidos reflejan que la gran mayoría de cepas de *K. pneumoniae* presentan al menos un plásmido (76,7%). La presencia de más de un plásmido es también un hecho bastante frecuente (38,4%), llegando a detectarse hasta cinco en dos cepas (Figura 17). La presencia de plásmidos en las cepas portadoras de TEM-1 es ligeramente superior que en las cepas que no presentan esta enzima de codificación plasmídica. Este hecho se muestra claramente en las figuras 18 y 19, donde se observa que existe una tendencia a desplazar la curva del número de plásmidos hacia la derecha en las cepas que expresan TEM-1. Entre las 17 cepas en las que no se detectó plásmidos hay dos (11,7%) que expresaban SHV-1 + TEM-1 conjuntamente. Al ser portadoras de TEM-1 debería de haberseles detectado algún plásmido. Muy posiblemente se trate de un problema en la técnica de extracción, el procesado de las muestras, o bien que el plásmido codificante fuese de gran tamaño y escaso número de copias, lo cual facilitaría su fragmentación y/o un bajo rendimiento de extracción de su DNA. Sin embargo la gran mayoría de cepas (15 cepas de 17, 88,2%) en las que no se identificaron

plásmidos corresponden a cepas que expresaban SHV-1 sola o combinada con la β -lactamasa cromosómica LEN-1, lo que indicaría la probable codificación cromosómica de estas enzimas.

El análisis de los tamaños plasmídicos observados mostró una clara distribución en dos grupos muy polarizados (Figuras 20, 21 y 22) de plásmidos muy grandes y muy pequeños, como se ha descrito en la bibliografía (206, 223). El menor porcentaje de plásmidos (casi un 10%, $n=10/104$) correspondió a los contemplados entre la banda de DNA cromosómico fragmentado y 7 Kb. El 19% ($n=20/104$) de los plásmidos se distribuyó entre 60 Kb y el DNA cromosómico. Los dos grupos mayoritarios representaron el 70%, el 35% ($n=36/104$) para los plásmidos mayores de 60 Kb y el 36% ($n=38/104$) para plásmidos inferiores a 7 Kb. Una vez más la presencia de TEM-1 determinó una tendencia a tener no sólo un mayor número de plásmidos sino además plásmidos de mayor tamaño, como lo muestran las figuras 19 y 22. De la misma forma, las cepas productoras de SHV-1 sola o combinada con LEN-1 fueron las que presentaron un menor porcentaje de plásmidos potencialmente conjugativos (47 y 60 % respectivamente) frente al grupo de las TEM-1, con casi el 79% de las cepas (Figura 23).

Con los experimentos de conjugación bacteriana se pretendió identificar el porcentaje de casos en los que el gen *bla-SHV-1* podía ser transferido por conjugación y por lo tanto, demostrar su codificación plasmídica de manera biológicamente efectiva. Únicamente en 5 de los 54 casos probados (transferencia real 9,3%) fue demostrable la naturaleza plasmídica del gen *bla-SHV-1* (Figura 24). Curiosamente las cepas que expresaron dos enzimas (SHV-1+LEN-1) presentaron una mayor eficiencia en la conjugación de SHV-1, sin alcanzar la significación estadística. Se ha analizado también el término transferencia predecible, considerando únicamente las cepas que realmente tenían la potencialidad de transferir el gen por conjugación. Para ello eliminamos las cepas en las que o bien no se detectaron plásmidos, o bien no presentaron plásmidos potencialmente conjugativos (>30 Kb). Este análisis corregido permitió observar que aunque el porcentaje de transferencia seguía siendo bajo representaba el doble del observado inicialmente (18%), llegando a ser del 33,3% para el grupo de cepas productoras de SHV-1+LEN-1 (Figura 25).

Las cinco cepas parentales que permitieron la conjugación de *bla-SHV-1*, fueron resistentes a la mezlocilina y piperacilina; cuatro resistentes al cloranfenicol y una resistente a aminoglicósidos

(amikacina y kanamicina). Se observó que todas transportaban plásmidos de gran tamaño (potencialmente conjugativos) y, en la mayoría de casos, otros plásmidos más pequeños. Sin embargo únicamente se identificó un plásmido en las cepas receptoras. En tres casos eran plásmidos grandes (TK136, TK175 y TK198; >60 Kb) y en dos casos pequeños (TK75 y TK167; 3,5 Kb). Justamente éstas dos cepas transconjugantes con los plásmidos pequeños fueron las únicas en las que se transfirió la resistencia a la mezlocilina. Una explicación razonable induciría a pensar en el mayor número de copias que un plásmido de pocas Kb puede generar en el huésped, lo que se traduce en una mayor cantidad de enzima y consecuentemente en una mayor eficacia hidrolítica frente al antibiótico. También representa un hecho curioso el que no se detectasen los plásmidos grandes en dos de las cepas transconjugantes (TK75 y TK167), aparentemente estos plásmidos actuaron como facilitadores para el proceso de la conjugación permitiendo el paso de los plásmidos pequeños. Sin embargo, es posible que también se hubiesen transferido. Tratándose en este caso simplemente de un problema de la técnica de aislamiento, que fragmentó a los plásmidos muy grandes y no permitió su correcta identificación y/o, que el nuevo huésped no ofrecía un ambiente propicio para el correcto mantenimiento estos plásmidos y permanecían con un muy bajo número de copias, lo que dificultó aún más su aislamiento y posterior detección.

Todos los experimentos expuestos hasta ahora muestran que en *K. pneumoniae*, aunque la presencia de plásmidos es importante y sus características mayoritariamente permitirían la conjugación bacteriana, las cepas que expresan SHV-1 y ninguna β -lactamasa plasmídica tienen tendencia a ofrecer un peor escenario para la transmisión horizontal que las cepas que expresan TEM-1. Estas últimas presentan un mayor número de plásmidos y con mayor potencialidad de conjugación. Además los experimentos de conjugación demuestran que la ubicación del gen *bla-SHV-1* parece no tener una localización plasmídica en la mayoría de los casos, debido a la escasa frecuencia de transconjugantes obtenida. Según nuestros datos, en el mejor de los casos (transferencia predecible) menos de dos de cada diez cepas de *K. pneumoniae* sería capaz de transferir el gen *bla-SHV-1* por conjugación. La presencia de LEN-1 asociada a SHV-1 parece que incrementaría este porcentaje a tres de cada diez. Sería razonable pensar entonces en una ubicación mayoritariamente cromosómica del gen *bla-SHV-1*. Para responder a la doble pregunta del ¿dónde y cómo? localizar al gen *bla-SHV-1* se abordaron estudios de PCR y del locus génico mediante RFLP Southern-blot.

4. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA MEDIANTE DETECCIÓN POR PCR DE LA PRESENCIA DEL GEN *BLA-SHV-1* Y DETERMINACIÓN DEL LOCUS GENÉTICO POR RFLP-SOUTHERN-BLOT

DetECCIÓN del gen *bla-SHV-1* por PCR

La puesta a punto de la PCR incluyó varias fases. Sin embargo, se dedicó especial interés al establecimiento de un control de calidad lo más eficaz posible. Se comprobaron los iniciadores empleados mediante el comando FASTA (203) para determinar su especificidad respecto a secuencias bacterianas almacenadas en los bancos de datos GenBank y EMBL. Se encontraron secuencias altamente homólogas, incluso con β -lactamasas dentro de la especie *K. pneumoniae*. Aunque en algunos casos se encontró una elevada homología de secuencia con DNA de organismos eucariotas, únicamente se tuvieron en consideración las secuencias de DNA bacteriano gracias al empleo de una metodología apropiada, basada en la utilización de cultivos puros para descartar posibles hibridaciones con secuencias de DNA que no fuesen de *K. pneumoniae*. Adicionalmente a esta medida, se han seguido los siguientes controles de calidad:

- Aislamiento del DNA: cNdiciones optimizadas para DNA cromosómico (199) y plasmídico.
- Empleo de altas temperaturas de hibridación de los iniciadores. Se intentó evitar la amplificación inespecífica por apareamiento incorrecto (*misspriming*) de la β -lactamasa cromosómica LEN-1 de *K. pneumoniae*.
- PCR-RFLP's con la enzima endonucleasa Not I. El fragmento amplificado (SHV-1₁₇₈) del gen *bla-SHV-1* presenta una diana interna de restricción exclusiva para Not I que permitió valorar la especificidad del producto amplificado. Se pudieron validar todos los productos de las reacciones de PCR. Se sabe que Not I no corta al fragmento del gen de la β -lactamasa LEN-1, ni a OHIO-1, por ello es un buen control específico de calidad de amplificación de SHV-1 cuando existe la posibilidad de que estos genes estén presentes.

Utilizando DNA cromosómico, la técnica de la PCR permitió detectar la presencia del gen *bla-SHV-1* en todas las cepas en las que se identificó la expresión de la β -lactamasa SHV-1 (**Grupo I**) por IEEA. La correlación entre las dos técnicas en este caso fue absoluta. Sin embargo, en las cepas del **Grupo II** en las que no se identificó la expresión de la β -

lactamasa SHV-1, se observaron unos resultados que no concordaban con los del IEEA. Así, la PCR fue positiva en todas las cepas productoras de la β -lactamasa LEN-1 y en seis de las 10 cepas productoras de TEM-1. Estos datos se comprobaron mediante PCR-RFLP digiriéndose el fragmento amplificado con la enzima de restricción Not I, ya que existe una diana interna específica para el fragmento amplificado de SHV-1. Únicamente en cuatro de las 26 cepas del **Grupo II** (no productoras de SHV-1 por técnica de IEEA) hubo concordancia entre los resultados del IEEA y la PCR, resultando la amplificación negativa. Al ser la PCR una técnica más sensible y más específica, permitió no sólo confirmar los datos del IEEA, sino mejorar la detección ya que se pudieron detectar un total de 19 falsos negativos del gen *bla-SHV-1* (Figura 26), que no implica expresión funcional de la enzima necesariamente. De todas formas, tras la re-concentración de los extractos mediante liofilización y el nuevo análisis electroforético se pudieron re-identificar en algunas cepas productoras de TEM-1 bandas de $pI= 7,6$ compatibles con SHV-1 en 5 casos (K39, K117, K154, K368, K541) y, una banda de $pI= 7,1$ en otra cepa (K263), compatible inicialmente con LEN-1 y que correspondió finalmente a la variante LEN-2. No revelaron nuevos datos los extractos re-concentrados de las cepas LEN-1, de forma que el gen detectado por PCR en estas cepas aparentemente no presentaría co-expresión funcional con LEN-1, según la técnica de IEEA y sus limitaciones. Finalmente, el **Grupo I** (n=74 cepas) quedó reconvertido en el **Grupo Ia** (n=93 cepas) después de los datos aportados por la PCR (Figura 26).

Así en el caso de las cepas productoras de TEM-1 al ser ésta de codificación plasmídica, permite una sobreexpresión en los extractos bacterianos respecto a la expresión del gen *bla-SHV-1* de codificación cromosómica. Sólo en una cepa (K8) de estas características no se pudo reidentificar SHV-1 por IEEA habiendo amplificado la PCR. En cuanto a las cepas productoras de LEN-1 con PCR positiva para SHV-1 y datos negativos para IEEA incluso tras reconcentración de los extractos, cabría esperar que el gen *bla-SHV-1* cromosómico por alguna razón molecular o de influencia del medio externo, no se expresa adecuadamente. Se volverá a insistir en este punto en el apartado del locus.

Como se comentó anteriormente en el apartado 2 de esta discusión (caracterización fenotípica), se correlacionaron los análisis bioquímicos realizados para determinar los

distintos biotipos con los resultados de la PCR. Se detectó que las tres cepas del biotipo III (K251, K263 y K273) procedentes del mismo laboratorio (L4), productoras de TEM-1 y con perfiles de sensibilidad similares, fueron las que presentaron una PCR negativa para SHV-1. Curiosamente tres de las cuatro cepas PCR negativas pertenecieron a este biotipo, que se caracterizó fundamentalmente por no fermentar la adonita. Se podría hipotetizar que el gen *bla-SHV-1* podría residir en el cromosoma de *K. pneumoniae* muy próximo al locus que codifica para la metabolización de este azúcar. Así, el fenotipo mostrado por estas tres cepas podría estar ligado a un defecto de ambos genes. La cuarta cepa en la que no se pudo amplificar el gen *bla-SHV-1* fue la K534 del laboratorio L5, perteneciente al biotipo IV. Dicho biotipo, caracterizado por la imposibilidad de utilizar el malonato como fuente de carbono, estaba únicamente representado por 2 cepas; pero la otra cepa (K226) expresaba SHV-1 y la PCR fue positiva.

La PCR nos informa fielmente sobre la presencia/ausencia del gen, mientras que el IEEA nos da una información aproximada y cualitativa sobre la expresión de la enzima, considerando las limitaciones que dicha técnica tiene en cuanto al nivel de detección. Cabe señalar que la presencia de un gen no siempre equivale a funcionalidad del mismo; sin embargo, la PCR es una técnica que proporciona una alta especificidad para detectar la presencia, en este caso, del gen *bla-SHV-1* y permitiría ser de gran utilidad en estudios de propagación horizontal de resistencias.

Los resultados obtenidos mostraron la alta frecuencia de expresión de la β -lactamasa SHV-1 y sorprendentemente, la aún mayor tasa de detección del gen *bla-SHV-1* en el cromosoma de *K. pneumoniae*, incluso en aquellos casos donde no se logró detectar la expresión enzimática. Nuestros resultados están en concordancia con los publicados por Babini y cols. (224). Utilizando técnicas de PCR, los autores lograron detectar la presencia del gen *bla-SHV-1* en 19 de las 20 cepas estudiadas. La cepa que no amplificó se pudo re-identificar como *K. oxytoca*. En ese trabajo se comenta también que únicamente se pudo detectar la enzima SHV-1 por IEEA en 16 de las cepas, indicando que la expresión estaba ausente o bien por debajo de los límites de detección de la técnica, de forma similar a nuestros datos.

Adicionalmente, sería especialmente interesante el estudio de los mecanismos de regulación y expresión génica en las cepas productoras de LEN-1 y no productoras de SHV-1, que no ha podido ser abordado en el presente trabajo.

Localización del locus del gen *bla-SHV-1* por RFLP-Southern-blot

El análisis por RFLP-Southern-blot permitió realizar un estudio aproximativo del locus génico mediante el empleo de diferentes endonucleasas de restricción. La estrategia empleada consistió en la utilización de enzimas que: a) no cortasen los genes *bla-SHV-1*, *LEN-1* y *OHIO-1* (EcoRI y HindIII), b) fuesen específicos para *bla-SHV-1* (Not I), *bla-LEN-1* (BamHI y KpnI) o, c) comunes para ambos (PstI) (Tabla 25). Debido a la gran homología genética, función y a la propia estructura de empaquetamiento del cromosoma bacteriano, si dichos genes están presentes en el cromosoma, podrían compartir un mismo locus genético. Así, las endonucleasas que no cortasen nos podrían determinar el locus de los genes que hipotéticamente estarían localizados en tándem; las endonucleasas con diana específica y única, la presencia del gen; y las endonucleasas con dianas comunes y únicas, la confirmación de la situación que ocupan los genes en el locus (Esquema 1).

La utilización de la endonucleasa EcoRI en las muestras de DNA cromosómico de las 97 cepas de *K. pneumoniae*, permitió detectar en 96 de ellas como mínimo una banda de hibridación positiva. La mayoría de las 96 cepas con hibridación positiva mostraron un único fragmento EcoRI-EcoRI (88 casos). En 8 casos (8,2%) la evolución génica de esta región ha permitido la doble copia génica como muestran los resultados de los dos fragmentos de hibridación detectados (Figura 30). Como se describió anteriormente para las cepas en las que se identificó SHV-1 en plásmidos transferibles, también estas 8 cepas fueron resistentes a la mezlocilina. Además 2 de estas cepas (K75, K108) mostraron cierta pérdida de sensibilidad a ceftazidima con CIMs de 2 µg/mL y 1 µg/mL, respectivamente. Curiosamente entre las 8 cepas con doble copia génica en el cromosoma, 3 de ellas (K75, K136, K167) fueron cepas en las que se pudo confirmar la presencia de SHV-1 en plásmidos por los experimentos de conjugación. Muy probablemente el incremento del número de copias génicas cromosómicas y/o plasmídicas funcionantes esté jugando un papel en el aumento global de las resistencias, como en este caso se demuestra para la mezlocilina y en algunas cepas en la ceftazidima.

Únicamente en una cepa productora de TEM-1 (K534) la hibridación fue negativa; en esta cepa, como se ha descrito previamente, la PCR también fue negativa. Así que, definitivamente no codificaría ni para *bla-SHV-1* ni para *bla-LEN-1*. Así pues parece evidente que el fragmento EcoRI detectaría específicamente el locus de SHV-1 y otros genes emparentados y con alta homología (*bla-LEN-1*), pero no otras secuencias menos homólogas. Curiosamente las otras 3 cepas con PCR negativa presentaron un fragmento de hibridación positivo en el Southern-blot de 8,5 Kb. Sería razonable pensar que en estos 3 casos lo que se estaba detectando no era SHV-1 sino algo muy homólogo, probablemente LEN-1. Lo que indicaría la posibilidad de que el gen *bla-LEN-1* pudiese presentarse solo en el cromosoma de *K. pneumoniae*. De acuerdo con estos datos, y aunque se utilizaron condiciones de astringencia extremas en la hibridación (véase material y métodos), cabría esperar la detección de falsos positivos de hibridación debido al alto porcentaje de homología entre las secuencias hibridadas de estos genes (158/178 pb, 88,7 %), no siendo pues la técnica del Southern-blot absolutamente discriminatoria mientras sí lo sería la PCR-RFLP. Adicionalmente la presencia del fragmento de 8,5 Kb en estas cepas falsos positivos indicaría la presencia de un locus único, con genes posiblemente en tándem dentro del fragmento EcoRI de 8,5 Kb. Se planteó entonces la realización de los subsecuentes análisis de secuenciación con el fin de comprobar qué secuencias estaban hibridando.

Las cepas del **Grupo II** productoras únicamente de LEN-1 por IEEA inclusive tras concentración de los extractos y en las que la PCR fue positiva para SHV-1, también presentaron un único fragmento de hibridación con EcoRI y con otras endonucleasas, lo que añade más evidencia la presencia conjunta en tándem de los dos genes en el mismo fragmento de 8,5 Kb (Esquema 1).

También se pudo clarificar algún dato epidemiológico en las tres cepas pertenecientes al biotipo III (K251, K263 y K273) y que por los datos de aislamiento, procedencia de las cepas, sus características bioquímicas e incluso el resultado de la PCR, parecían tener un origen clonal. Finalmente, por el análisis de los Southern-blot-RFLPs, se pudo determinar que al menos la cepa K263 no tenía un origen clonal ya que se detectó un fragmento KpnI de 2,4 Kb, frente al de 4,5Kb de las otras dos cepas.

Los resultados observados tras el estudio del DNA plasmídico por Southern-blot de las cepas de *E. coli* transconjugantes (TK75 y TK167) en los que se detectaron fragmentos de hibridación de 8 Kb, indicaría la localización del gen en plásmidos más grandes. Estos plásmidos de gran tamaño, presentes en las cepas parentales, no se detectaron en el análisis de plásmidos de los transconjugantes (sólo plásmidos de 3,5 Kb). Probablemente, por la problemática ya comentada anteriormente (plásmidos de escaso número de copias por célula, fragmentación del DNA plasmídico y/o bajo rendimiento de la extracción del DNA), no se hayan detectado los plásmidos en los geles de agarosa, sin embargo, una técnica más sensible como la hibridación en Southern-blot permitió su detección indirecta.

En resumen, el análisis por RFLP-Southern-blot mostró que el gen *bla-SHV-1* reside en una zona altamente conservada del cromosoma bacteriano de *K. pneumoniae* (91/97 aislamientos, 93,8%). Dicha zona está determinada por un fragmento de 8,5 Kb flanqueada por dianas de restricción EcoRI. Adicionalmente en algunos casos (8/97 aislamientos, 8,2%), los fragmentos de hibridación permiten detectar la presencia de doble copia génica en el cromosoma de *K. pneumoniae*, independientemente de la presencia de los genes transportados por plásmidos. Esta región de 8,5 Kb puede incluir al gen de la β -lactamasa LEN-1 colocado en tándem como se deduce por el perfil de RFLPs encontrado en las cepas productoras de TEM-1, que fueron PCR negativas, y en las que los reanálisis de IEEA y los ulteriores análisis de secuenciación permitieron identificar una β -lactamasa de pI=7,1 y al gen *bla-LEN-2*, respectivamente. Sin embargo para poder confirmar este hallazgo, sería necesario realizar un análisis de PCR específico para LEN-1.

5. SECUENCIACIÓN DEL GEN *BLA-SHV-1* Y DETERMINACIÓN DE VARIANTES ALÉLICAS

Consideraciones generales

De manera similar a lo expuesto para la PCR, también en la secuenciación se dedicó un especial interés al establecimiento de un control de calidad lo más eficaz posible. El control de calidad que se empleó en la secuenciación se fundamentó en los siguientes puntos:

- Se comprobaron los iniciadores empleados (P1SEC, P2SEC, P3SEC y P4SEC) mediante el comando FASTA para determinar su especificidad respecto a secuencias bacterianas almacenadas en los bancos de datos GenBank y EMBL. Como era de esperar se encontraron secuencias altamente homólogas, sobretodo con β -lactamasas de la familia SHV incluyendo también a LEN-1 y OHIO-1. En algunos casos se encontró también cierta homología de secuencia con otras enzimas de especies bacterianas diversas que no suponían ningún problema limitante para la utilización de los iniciadores elegidos.
- Los productos procedentes de la PCR fueron necesariamente procesados por una columna, como las descritas en material y métodos, que permitió eliminar antes de la secuenciación, al menos: Los dNTPs, los cebadores y cualquier producto de la amplificación inferior a 200 pb.
- Control de calidad del producto amplificado por PCR realizando una digestión con la enzima de restricción NotI específica del gen *bla-SHV-1*.
- Secuenciación de las dos cadenas de DNA empleando una reacción directa y la inversa. La reacción directa se realizó con los cebadores P1SEC y P3SEC, mientras que la inversa se realizó con los cebadores P2SEC y P4SEC. Se aseguró con este procedimiento que se secuenciara correctamente de forma encadenada cada fragmento en ambos sentidos ($5' \rightarrow 3'$ y $3' \rightarrow 5'$).

Secuenciación del gen *bla-SHV-1*

El estudio completo de la secuencia nucleotídica de un gen y de sus regiones limítrofes en 3' y 5', permite identificar posibles anomalías (mutaciones, deleciones, etc.) o regiones (*enhancers*, estructuras complementarias que formen bucles, etc.) que medien en la correcta expresión del gen, bien anulándola o bien regulándola al alza o a la baja; y en algunos casos,

se generan cambios de aminoácidos que pueden alterar la estructura secundaria o las regiones implicadas en la catálisis de la enzima que están codificando.

Con el fin de intentar dar una explicación a alguna de las distintas variantes fenotípicas observadas (p.e. grados de sensibilidad a Mz), establecer comparaciones entre genes plasmídicos y cromosómicos, clarificar algunas de las discrepancias halladas entre el grado de expresión y detección del gen *bla-SHV-1*, así como los resultados de las PCR negativas con hibridación positiva en el RFLP-Southern-blot, se planteó la necesidad de seleccionar algunas cepas para secuenciarlas.

Alineamientos comparativos

El plásmido pMON38 (4,6 Kb) que transporta el gen que codifica para la β -lactamasa SHV-1 en una región de 1,77 Kb ClaI-AvaI, es un derivado del plásmido pMON31 (7,2 Kb) obtenido por deleciones sucesivas empleando enzimas de restricción (Figura 9). Así mismo, el plásmido pMON31 incluye un fragmento de 3,2 Kb BamHI-BamHI derivado del plásmido R974 que es el que incluye al gen *bla-SHV-1*.

Las secuencias de los genes *bla-SHV-1_{pMON38}* y *bla-SHV-1_{R974}* deberían de haber sido idénticas ya que una derivó de la otra. Sin embargo, la secuencia *SHV-1_{pMON38}* utilizada presentó ciertas diferencias (1,4%) que afectaron tanto en la secuencia nucleotídica como a la secuencia de aminoácidos deducida de ésta. La secuencia de *SHV-1_{pMON38}* mostró cierta similitud con la secuencia de la β -lactamasa de amplio espectro amplificado SHV-2. Todos los aminoácidos que cambian son comunes a los que se observan en SHV-2. Sin embargo, todavía existen diferencias muy importantes que discriminan entre *SHV-1_{pMON38}* y SHV-2. La serina (S₂₃₈), descrita como un aminoácido importante dentro de la región codificante, empleada como oligosonda específica (15-mer) de SHV-2 (G₇₈₇GAGCTGGCGAGCGG₈₀₀) (200), no aparece en la secuencia *SHV-1_{pMON38}* que sigue manteniendo una glutamina (G₂₃₈). Sin embargo, recientemente la secuencia del gen *bla-SHV-1_{R974}* publicada en EMBL con el número de acceso M59181 ha sido enmendada tras una nueva y parcial secuenciación empleando la metodología de secuenciación por termociclador. Dicha secuencia, que hemos recogido en este trabajo con el nombre *SHV-1_{HB101}*, fue publicada por Bradford en 1999 y está disponible en GenBank con el número de acceso AF148850 (102). Debido al alto

contenido de GC del gen, estos autores utilizaron un método automático de secuenciación basado en PCR que permitió detectar algunos errores en las secuencias previamente publicadas por otros autores (200). En nuestro caso se empleó el kit ABI PRISM™ Dye Terminator (Perkin Elmer©) para PCR y acoplado a un secuenciador ABI PRISM 377 (Perkin Elmer©). Tras comparar nuestra secuencia con la de Bradford hallamos un mayor grado de homología, como cabía esperar inicialmente. Sólo siete nucleótidos fueron diferentes (0,8%), todos ellos de región no codificante y coincidiendo con los extremos de la secuencia del gen (dos nucleótidos en la zona 3' y 5 en la región 5' terminal). Luego podemos garantizar que el patrón *bla-SHV-1_{pMON38}* utilizado se correspondía perfectamente con el que actualmente se considera aceptado por la comunidad científica.

La técnica que se ha empleado en el presente trabajo utilizó las mismas bases de secuenciación por termociclador que la utilizada por Bradford (102). Nuestros resultados confirmaron la alta especificidad y fidelidad de la metodología, garantizando un excelente control de calidad de las secuencias posteriormente analizadas.

Las cepas transconjugantes (TK75, TK136, TK167, TK175 y TK 198) se secuenciaron amplificando el gen SHV-1 del DNA plasmídico que se había transferido previamente. Se comprobó que el gen *bla-SHV-1* codificado por los plásmidos de las cepas transconjugantes se mantiene muy conservado al compararlo con el patrón *bla-SHV-1_{pMON38}*, aislado originariamente también de un plásmido de *Klebsiella* sp. y subclonado en pMON38. De las 5 cepas, únicamente la cepa TK198, mostró una mutación en un solo nucleótido. En este caso, la transición de purinas las A₄₉₄ por G₄₉₄ no se tradujo en ningún cambio sobre la secuencia de aminoácidos de la enzima. Interesantemente, esta mutación se repitió de forma muy frecuente en alguna de las subsiguientes muestras de DNA cromosómico analizadas, denominándola VAR4. Quizás esta VAR4 sea uno más de los eslabones que ligan el origen de la β-lactamasa SHV-1 en el cromosoma de *K. pneumoniae* y su posterior salto evolutivo pasando a plásmidos. Es conocido que la β-lactamasa SHV-1 puede estar codificada por plásmidos de grupos de compatibilidad muy diversos, lo que claramente sugiere que gen *bla-SHV-1* pudo ser transportado por un transposón (98, 99).

El resto de secuencias génicas estudiadas provenían de amplificaciones de DNA cromosómico de las cepas de *K. pneumoniae*. Entre ellas, las 3 cepas productoras de enzima SHV-1 detectable por IEEA, dos resistentes (K48 y K237) y una sensible (K280) a Mz. Al comparar estas secuencias con el gen plasmídico *SHV-I_{pMON38}* se comprobó que el gen secuenciado de cepas salvajes no difería significativamente del gen clonado. Sin embargo, sólo una de las cepas presentaba una secuencia exactamente igual al gen plasmídico *SHV-I_{pMON38}*. Incluso la VAR4, mutación en A₄₉₄ por G₄₉₄, que parece ser común para todas las secuencias de DNA cromosómico no se observó en dicha cepa. Curiosamente esta cepa (K237) era resistente a Mz. La otra cepa (K48) resistente a Mz fue la menos homóloga al patrón *SHV-I_{pMON38}* y consecuentemente presentó varias mutaciones, siendo todas ellas muy comunes a las encontradas en otras secuencias y por tanto consideradas VAR. Especialmente destacable fue la VAR1, común con LEN-1, que provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos (Leucina L₃₅ por glutamina Q₃₅) pero que no parece ser determinante en el perfil de sensibilidad frente a Mz. Esta variante alélica que determina este cambio de la secuencia de aminoácidos ha sido anteriormente descrita como SHV-11 (112). Esta enzima es de las pocas variantes de SHV descritas que no es una β-lactamasa de amplio espectro amplificado.

El análisis de las tres secuencias de DNA no mostró diferencias en las regiones promotoras que pudiesen explicar un alto o bajo nivel de expresión génica y su relación con el perfil hidrolítico de las cepas, de forma similar a lo descrito en la literatura (225). Recientemente, se ha descrito una mutación A→C en la segunda posición de la región -10 del promotor capaz de conferir un alto grado de expresión del gen cromosómico SHV-1 y, consecuentemente resistencia a ceftazidima y a la combinación de piperacilina-tazobactam (226). En nuestros datos, únicamente existiría una zona potencial que podría explicar las diferencias en perfil fenotípico de sensibilidad entre las cepas resistentes y sensibles. La cepa sensible (K280) presentó una delección de un nucleótido (T₈₅) entre la región que codifica para el péptido líder donde unirá el ribosoma (RBS) y el triplete de inicio (A₉₃TG). El efecto de esta delección posiblemente sería el de actuar como modulador a la baja de la expresión de la enzima, lo que podría en parte explicar las diferencias de perfil de resistencia. Este hallazgo debería ser comprobado realizando mutagénesis dirigida, que no ha podido ser realizada, sobre las secuencias de las cepas resistentes para determinar si también pierden esta característica al deleccionar el nucleótido T₈₅. Existen además otros mecanismos posibles (modificaciones en las PBPs, modificaciones en

la permeabilidad por cambios en las porinas o un incremento en la extrusión del antibiótico) que no se han planteado en este trabajo y que por sí mismos o combinados también podrían contribuir a dar una explicación razonable a este hecho.

El análisis de las secuencias de las cepas productoras de la β -lactamasa LEN-1 o TEM-1 permitió demostrar, como ya lo había detectado la PCR, que aún en aquellos casos en los que no se pudo identificar la enzima SHV-1, el gen *bla-SHV-1* se podía identificar y secuenciar partiendo del DNA cromosómico de las cepas.

Las secuencias del DNA cromosómico de las cepas LEN-1 (K51, 103, 218 y 299) determinaron que el gen *bla-SHV-1* no presentaba ningún problema aparente que le impidiese a la bacteria sintetizar la enzima de manera correcta. Sin embargo, en estas cepas no se pudo identificar la enzima mediante el IEEA de ninguna forma (ni reconcentrando los extractos bacterianos). Sería razonable postular la hipótesis que estuviesen interviniendo mecanismos de regulación post-transcripcional que impidiesen que el RNAm pudiera ser traducido con éxito a proteína. Existen en las secuencias dos zonas mutadas (VAR2 y VAR5) comunes a las 4 cepas estudiadas. La VAR 2 (C₁₀₆ por T₁₀₆) también la presenta la cepa K154 productora de TEM-1 donde sí que se pudo identificar la enzima tras reconcentrar el extracto; pero la VAR 5 (G₅₄₇ por A₅₄₇) es exclusiva de estas cepas y provoca también un cambio en la secuencia aminoácidos de la proteína (glicina G₁₅₆ por aspártico D₁₅₆). Dichas VAR de manera individual o conjunta podrían jugar algún papel en la inestabilidad del RNAm. Adicionalmente y fijándonos en las secuencias de aminoácidos de las β -lactamasas SHV secuenciadas en su totalidad, resulta sorprendente que en las tres cepas se han podido identificar dos nuevas variantes de SHV no descritas previamente; una en K103 y K218 y la otra en K299. Las secuencias de K103 y K218 han sido denominadas como SHV-27 y resulta destacable que otros autores hayan encontrado las mismas variantes en otros lugares del mundo. La secuencia de K299 nos ha sido reconocida como SHV-32 en la web de β -lactamasas y aceptada en GenBank con el n° de acceso AY037778.

En las cepas productoras de TEM-1 secuenciadas (K8, 39, 117 y K154) que amplificaron el fragmento del gen SHV-1 por PCR, se confirmó la presencia de la secuencia génica de *bla-SHV-1* con una homología superior al 99% comparada con *SHV-1_{pMON38}*. En 3 de estas cuatro cepas se identificó una enzima de pI=7,6 (como SHV-1) reconcentrando los extractos

bacterianos, pero no ocurrió así en la cepa K8. En la secuencia de esta cepa existe una mutación no observada en ninguna otra muestra, C₇₅₆ por T₇₅₆, y que se traduce en un cambio en la secuencia de aminoácidos (prolina P₂₂₆ por serina S₂₂₆). Para confirmar o rechazar esta hipótesis, se debería determinar por mutagénesis dirigida la importancia de esta variante alélica para la estabilidad del RNAm. Lo que sí que genera esta mutación es una variante de SHV no descrita anteriormente (véase tablas 29 y 30). A esta secuencia se le asignó en la web de β-lactamasas el nombre de SHV-33 y nos ha sido aceptada en GenBank con el n° de acceso AY037779.

La secuencia de aminoácidos de K39, de forma similar a la K48, determina una variante de SHV previamente descrita como SHV-11 (112). En la K154 se describe una mutación que altera la secuencia de aminoácidos y que genera otra nueva variante de SHV no descrita previamente a la realización de este trabajo (véase tablas 29 y 30). A esta secuencia se le asignó en la web de β-lactamasas el nombre de SHV-28.

Aunque los cebadores no fueron diseñados para ello, en una cepa TEM-1 (K263) que no amplificó por PCR, se logró secuenciar el gen de su β-lactamasa cromosómica resultando ser de gran homología con LEN-1. La concentración del extracto bacteriano permitió identificar una banda inferior a SHV-1 (probablemente una variante de LEN). Con ello se reconfirmó el resultado negativo de la PCR y la certeza de que una variante alélica de la β-lactamasa LEN-1 puede localizarse sola en el cromosoma de *K. pneumoniae*. La hibridación positiva en el Southern-blot de ésta y las otras dos cepas TEM-1 (K251, K273) que no amplificaron por PCR, se explicaría por una probable hibridación cruzada debida a la gran homología con la secuencia de la β-lactamasa LEN-1 que todas estas cepas codificarían en su cromosoma. Sin embargo, la secuencia descrita para K263 todavía presenta algunas diferencias con *bla-LEN-1* y mantiene muchos elementos comunes con *bla-SHV-1*. La conservación de la A₂₃₉, le permite mantener la Serina (S₅₃) y al mismo tiempo conservar la diana NotI específica de SHV-1. De forma similar, conservar la G₉₂₄ le permite mantener los 7 aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína como ocurre en SHV-1. Posiblemente esta secuencia, que ha de ser considerada como una variante de LEN, sea un elemento que ponga de manifiesto el origen común del locus génico de ambas enzimas en *K. pneumoniae*. A esta secuencia se le ha asignado el nombre de LEN-2 y nos ha sido aceptada en GenBank con el n° de acceso AY037780.

Como resultado al combinar los análisis genéticos realizados (PCR, RFLP y secuenciación) se podría postular que a menudo los genes *bla-SHV-1* y *bla-LEN-1* suelen hallarse conjuntamente en una región muy conservada del cromosoma bacteriano de 8,5 Kb en tándem. Si bien en ocasiones el gen *bla-LEN-1* puede hallarse solo en el cromosoma de *K. pneumoniae* (cepas TEM-1, PCR negativas y RFLP positivo), no se ha podido demostrar que a *bla-SHV-1* le ocurra lo mismo. Para demostrarlo sería necesario realizar experimentos de PCR específicos para LEN-1. La presencia de VARs indican una evolución del gen de la β -lactamasa SHV-1 seleccionándose ciertas mutaciones que probablemente mejoran la capacidad hidrolítica de las bacterias que las presentan. En el presente trabajo se describen ciertas VAR que se traducen en cambios en la secuencia de aminoácidos, que en muchos casos no han sido publicados previamente y que representan variantes de SHV o LEN. En otros casos parece que se ha observado la misma tendencia por la coincidencia con otros estudios donde se han identificado las mismas variantes alélicas en lugares geográficamente muy alejados como Brasil y Oriente (122, 123). Las variantes descritas en este estudio no son β -lactamasas de amplio espectro amplificado, quizás en parte por eso no han sido publicadas previamente por otros autores, sin embargo, aportan datos interesantes sobre la evolución de los genes de SHV y LEN.

CONCLUSIONES

Klebsiella pneumoniae es la especie dentro del género *Klebsiella* que más frecuentemente se aísla en clínica como responsable de procesos infecciosos. Es causante de entre un 3-5% de las neumonías bacterianas y, se le considera un patógeno oportunista que provoca procesos inespecíficos en pacientes normalmente hospitalizados. Su creciente interés en la clínica como agente infeccioso en procesos graves, la particular respuesta a los antibióticos betalactámicos, alta frecuencia con la que se detecta la β -lactamasa SHV-1, así como la evolución que ha sufrido el gen que codifica esta β -lactamasa, nos llevó a plantearnos este trabajo. Como conclusiones del estudio realizado destacamos las siguientes agrupadas en tres categorías:

Fenotipo y herencia extracromosómica

1. La caracterización bioquímica de las β -lactamasas por IEEA es una herramienta cualitativa útil para detectar la expresión enzimática y su correlación con el perfil de resistencia. La β -lactamasa SHV-1 es más activa que la LEN-1, pero menos activa que TEM-1. La presencia de la β -lactamasa plasmídica TEM-1 incrementa en general los porcentajes de resistencia sobre los antibióticos betalactámicos, proporcionando también un efecto añadido cuando se co-expresa con la β -lactamasa SHV-1.
2. La mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas presentan plásmidos (76,7%). La presencia de plásmidos en las cepas productoras de TEM-1 es sensiblemente superior que en aquellas cepas que no expresan esta enzima. La gran mayoría de cepas que no presentaron plásmidos correspondieron a cepas que expresaban SHV-1 sola o combinada con la β -lactamasa cromosómica LEN-1.
3. Los plásmidos se agruparon mayoritariamente en dos grupos atendiendo a su tamaño, mayores de 60 Kb (35%) y menores de 7Kb (36%). La presencia de TEM-1 está asociada a plásmidos de gran tamaño (79% potencialmente conjugativos), mientras que las cepas SHV-1 ó SHV-1+LEN-1 fueron las que presentaron un porcentaje menor de plásmidos de gran tamaño (47-60%).
4. La baja proporción de transconjugantes (9,3%, 5 de 54 casos) sugiere que, en *K. pneumoniae*, el gen *bla-SHV-1* se encuentra codificado fundamentalmente en el cromosoma bacteriano. Las cinco cepas parentales que lograron transferir plásmidos portadores de SHV-1 fueron resistentes a mezlocilina probablemente debido a que el incremento del número de copias génicas facilita la hidrólisis del antibiótico de manera más eficaz.

Sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares: detección del gen (PCR) y aproximación al locus (Southern-blot)

5. El análisis por PCR del DNA cromosómico evidenció la presencia del gen *bla-SHV-1* en el cromosoma bacteriano en 93 de las 97 cepas de *Klebsiella pneumoniae* estudiadas, ratificando la codificación cromosómica de esta enzima en esta especie.
6. La PCR-RFLP es una técnica más sensible y específica que el IEEA y permitió no sólo confirmar los datos del IEEA, sino que detectó un 19,6% de falsos negativos funcionales (19 de 97 cepas). Dichas cepas del Grupo II no expresaban SHV-1 por IEEA, mientras que el gen *bla-SHV-1* estaba presente en el cromosoma. Cuatro cepas, que expresaban TEM-1, no amplificaron el fragmento de PCR del gen *bla-SHV-1*. Estas cuatro cepas pertenecían a los biotipos III (no fermentación de la adonita) y IV (no usan malonato como fuente de carbono) muy minoritarios porcentualmente.
7. El análisis del locus génico de *bla-SHV-1* mediante RFLP-Southern-blot confirmó la presencia de un fragmento de hibridación EcoRI-EcoRI en 96 de las 97 muestras de DNA cromosómico analizadas. Sólo una cepa TEM-1 (K534) y que tampoco amplificó por PCR, no presentó fragmento de hibridación.
8. Las otras tres cepas con PCR negativa y fragmento de hibridación en Southern-blot, posiblemente presentan un gen homólogo a LEN-1 o una variante con gran homología de secuencia con SHV-1 (88,7%). Así, el gen *bla-LEN-1* o sus variantes alélicas pueden hallarse solos en el cromosoma.
9. El incremento del número de copias génicas cromosómicas y/o plasmídicas juega un papel en el aumento de resistencia a los antibióticos que son sensibles al incremento de producción de estas enzimas. En ocho casos (8,2%) se detectaron dos fragmentos correspondientes a un fenómeno de duplicación génica. Estas ocho cepas fueron resistentes a mezlocilina.
10. El gen *bla-SHV-1* reside en una zona del cromosoma bacteriano de *K. pneumoniae* altamente conservada, determinada por un fragmento de 8,5 Kb flaqueada por dianas de restricción EcoRI. La detección de este fragmento en las cepas que expresan LEN-1 + SHV-1 sugiere que ambos genes se encuentran localizados en tándem en el cromosoma. Se observó que el gen *bla-LEN-1* puede hallarse sólo, pero no pudo confirmarse si todas las cepas que presentan el gen *bla-SHV-1* tienen o no asociado siempre el gen *bla-LEN-1*.

Secuenciación del gen SHV-1: Alineamientos comparativos para detección de VAR y nuevas variantes enzimáticas

- 11.** Los alineamientos comparativos de las secuencias de muestras de DNA de cepas sensibles y resistentes a MZ no mostraron diferencias en la región promotora capaces de explicar el diferente grado de sensibilidad frente a este antibiótico. Únicamente se observó que la cepa sensible presentaba una delección de un nucleótido entre la región que codifica para el péptido líder y el triplete de inicio.
- 12.** Se pudo secuenciar el gen *bla-SHV-1* y sus variantes alélicas, incluso en aquellas cepas en las que no se detectó SHV-1 por IEEA y eran PCR positivas (cuatro cepas LEN-1 del Grupo II). La secuencia del gen no presentó alteraciones que explicasen su no traducción a proteína. Probablemente intervengan otros mecanismos reguladores de la expresión génica, o bien mecanismos postranscripcionales, que impidan que el RNAm se traduzca a proteína. Las VAR 2 y/ó 5, presentes en estas secuencias, podrían tener un papel en la inestabilidad posterior del RNAm.
- 13.** En el trabajo se han determinado las secuencias de cinco nuevas variantes de SHV (SHV-27, SHV-28, SHV-31, SHV-32 y SHV-33) y otra nueva de LEN (LEN-2). Las variantes de SHV presentadas no son enzimas con actividad extendida a cefalosporinas de tercera generación ni a monobactams (no-BLEAS).
- 14.** La presencia de VAR indica una evolución génica mediante selección de ciertas mutaciones que probablemente tiendan a mejorar el comportamiento de estas cepas frente a la presión antibiótica a la que son sometidas.

ANEXOS

**ANEXO 1: LISTADO DE ALINEAMIENTOS COMPARATIVOS ENTRE LAS
DIFERENTES SECUENCIAS DE DNA ESTUDIADAS**

**ANEXO 2: ALINEAMIENTOS COMPARATIVOS ENTRE LAS DIFERENTES
SECUENCIAS PROTEÍNICAS DEDUCIDAS A PARTIR DE LAS
SECUENCIAS DEL GEN *BLA-SHV-1* ANALIZADAS**

BIBLIOGRAFÍA

1. Austrian R. The Gram stain and the etiology of lobar pneumoniae, an historical note. *Bacteriol Rev* 1960;24:261-265.
2. Klebs E. Beiträge zur Kenntniss der pathogen Schystomyceten, VII. Die Mondanien. *Arch Exptt Pathol Pharmacol* 1960;4:409-488.
3. Friedländer C. Mikkrokken der pneumonie. *Fortschr Med* 1883;1(715-733).
4. Reinlein AJ, Zornoza-Boy E, Cachon García F. El grupo *Klebsiella-Enterobacter*. *Rev Clin Esp* 1972;126:286-296.
5. Breed RS, editor. *Klebsiella Trevisan*. 7th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1957; 1985.
6. Kelly MT, Brenner DJ, Farmer JJI. *Enterobacteriaceae*. In: Lennette EH, Balows A, Hausles WJ, Shadomy HJ, editors. *Manual of clinical microbiology*. 4th ed. Washington: Am Soc Microbiol; 1985. p. 263-277.
7. Brenner DJ. *Enterobacteriaceae*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1984. p. 408-420.
8. Sakazaki R, Tamura K, Kosako Y, Yoshizaki E. *Klebsiella ornithinolytica* sp. nov., formerly known as ornithine-positive *Klebsiella oxytoca*. *Curr. Microbiol.* 1989;18:201-206.
9. Bagley ST, Seider RJ, Brenner dJ. *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. *Curr Microbiol* 1981;6:105-109.
10. Ewing WH. The genus *Klebsiella*. In: Edwards PR, Ewing WH, editors. *Identification of Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing; 1986. p. 365-380.
11. Gavini F, Leclerc H, Lefebvre B, Ferragut C, Izard D. Étude taxonomique d'entérobactéries appartenant ou apparentées au genre *Klebsiella*. *Ann Microbiol (Inst Pateur)* 1977;128:45-59.
12. Izard D, Ferragut C, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. *Int j Syst Bacteriol* 1981;31:116-127.
13. Gilchrist MJ. *Enterobacteriaceae: oportunistic pathogens and other genera*. Washington, D.C.: ASM Press; 1998.
14. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1983;49:1-32.
15. Ewing WH. The antigens of *Enterobacteriaceae*. In: Edwards PR, Ewing WH, editors. *Identification of Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing; 1986. p. 73-91.

16. Hill S. Influence of atmospheric oxygen concentration on acetylene reduction and efficiency of nitrogen fixation in intact *Klebsiella pneumoniae*. J Gen Microbiol 1976;93:335-345.
17. Neilson aH, Parell L. Acetylene reduction (nitrogen fixation) by Entorobacteriaceae isolated from papaer mill process waters. Appl Environ Microbiol 1976;32:197-205.
18. Castillo Pérez AM. Espectro bacteriológico de la bacteriocinas de *Klebsiella pneumoniae*. Laboratorio 1982;73:241-260.
19. Walia S, Madhavan T, Reuman P, Tewari R, Duckworth D. Plasmid profiles and klebocin types in epidemiologic studies of infections by *Klebsiella pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988;7(2):279-84.
20. Koo FCW, Stein MD. Detection of an extracellular toxin produced by burn isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Curr Microbiol 1986;13:23-27.
21. Thom BT. *Klebsiella* in faeces. Lancet 1970;ii:1033.
22. Selden R, Lee S, Wang WLL, Bennett JV, Eickoff TC. Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. Ann Intern Medicine 1971;74:657-64.
23. Pollack M, Charache P, Nieman RER, Reinhardt JA, Jett MP, Hardy PHJ. Factors influencing colonisation and antibiotic-resistance patterns of gramnegative bacteria in hospital patients. Lancet 1972;ii:668-71.
24. Montgomerie JZ. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. Rev Infec Dis 1979;1:736-53.
25. Sander J, Mädler U. [Nosocomial infection of hospitalised patients with chemotherapy-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* (author's transl)]. Dtsch Med Wochenschr 1978;103(41):1593-7.
26. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998;11(4):589-603.
27. Bergogne Bérézin E, Decré D, Joly Guillou ML. Opportunistic nosocomial multiply resistant bacterial infections- -their treatment and prevention [published erratum appears in J Antimicrob Chemother 1994 Dec;34(6):1083]. J Antimicrob Chemother 1993;32 Suppl A:39-47.
28. Bergogne Bérézin E. [Nosocomial infections: new agents, incidence, prevention]. Presse Med 1995;24(2):89-97.
29. Vázquez F, Mendoza MC, Villar MH, Pérez F, Méndez FJ. Survey of bacteraemia in a Spanish hospital over a decade (1981-1990). J Hosp Infect 1994;26(2):111-21.
30. Yu L, Chen YL, Zhu YJ. [Clinical analysis of 60 cases of nosocomal pneumonias]. Chung Hua Chieh Ho Ho Hu Hsi Tsa Chih 1994;17(5):303-4, 320.

31. Lu WX, Lo WC, Zhu YJ. [Evaluation of the causative bacteria of pneumonia in the elderly in recent years]. *Chung Hua Nei Ko Tsa Chih* 1989;28(8):482-5, 510-1.
32. Watanabe A, Oizumi K, Motomiya M, Sato T, Shoji M. [Studies on respiratory infections in primary care clinic (II). Distribution and antibiotic sensitivity to 45 agents of bacteria isolated from patients with respiratory infections visiting a doctor in private practice]. *Kansenshogaku Zasshi* 1990;64(1):66-75.
33. Jarvis WR, Munn VP, Highsmith AK, Culver DH, Hughes JM. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control* 1985;6(2):68-74.
34. French GL, Shannon KP, Simmons N. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 1996;34(2):358-63.
35. Arlet G, Sanson le Pors MJ, Rouveau M, Fournier G, Marie O, Schlemmer B, et al. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4 beta-lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9(11):797-803.
36. Coovadia YM, Johnson AP, Bhana RH, Hutchinson GR, George RC, Hafferjee IE. Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery: the importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. *J Hosp Infect* 1992;22(3):197-205.
37. Nouvellon M, Pons JL, Sirot D, Combe ML, Lemeland JF. Clonal outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* demonstrated by antibiotic susceptibility testing, beta-lactamase typing, and multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1994;32(10):2625-7.
38. Asensio A, Oliver A, González Diego P, Baquero F, Pérez Díaz JC, Ros P, et al. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis* 2000;30(1):55-60.
39. Aoki H. Natural β -lactam antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 1980;34:159-181.
40. Tipper DJ. Mode of action of β -lactam antibiotics. *Rev Infec Dis* 1979;1(39-53).
41. Tomasz A. Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of β -lactam antibiotics. *Rev Infec Dis* 1986;8:S260-S278.
42. Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem* 1983;52:825-869.
43. Chambers HF, Hartman BJ, Tomasz a. Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. *J Clin Invest* 1985;76:325-331.

44. Ubukata K, Yamashita N, Konno M. Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:851-857.
45. Shockman GD, Pooley HM, Thompsn JS. Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*. III Localization of the autolysin at the sites of cell wall synthesis. *J Bacterol* 1967;94:1525-1530.
46. Tomasz A. On the mechanism of the irreversible antimicrobial affects of β -lactams. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)* 1980;289:303-308.
47. Tomasz A. Penicillin tolerance and the control of murein hydrolases. In: Salton MRJ, Shockman GD, editors. *β -Lactam antibiotics*. New York: Academic Press; 1981. p. 227-247.
48. Reynolds PE. Inhibitors of bacterial cell wall synthesis. In: Greenwood G, O'grady F, editors. *The scientific basis of antimicrobial chemotherapy*. Cambridge: Cambridge University Press; 1985. p. 13-40.
49. Poole K. Bacterial multidrug resistance: emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1994;34:453-56.
50. Li XZ, Livermore DM, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloranphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1734-41.
51. Li XZ, Ma D, Livermore DM, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to β -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1742-52.
52. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1948-53.
53. Ghuysen JM. Penicillin-sensitive enzymes of peptidoglycan metabolism. In: Schlessinger D, editor. *Microbiology-1977*. Washington: Am Soc Microbiol; 1977. p. 195-202.
54. Malouin F, Bryan LE. Modification of penicillin-binding protein as mechanisms of β -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:1-5.
55. Shockman GD, Daneo-Moore L, McDowell TD, Wong W. The relationship between inhibition of cell wall synthesis and bacterial lethality. In: Morin RB, Gorman M, editors. *The chemistry and biology of β -lactam antibiotics*. London: Academic Press; 1981. p. 303-338.
56. Bush K, Sykes RB. Methodology for the study of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:6-10.
57. Brown C, Seidler RJ. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl Microbiol* 1975;25:900-4.

58. Brown AG. β -lactam nomenclature. *J Antimicrob Chemother* 1982;10:365-72.
59. Roy C, Teruel D, Reig R, Hermida M, Tirado M, Ràfols M. Piperacilina associada a tazobactam frente a cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasa plasmídica. *Rev Esp Quimioterap* 1990;1:54-9.
60. Frère JM, Joris B. β -lactamase induced resistance. In: Actor P, Daneo-Moore L, Higgins ML, Salton MRJ, Shockman GD, editors. Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function. Washington DC: Am Soc Microbiol; 1988. p. 468-80.
61. Sykes RB, Matthew M. The β -lactamases of gramnegative bacteria and their role in resistance to β -lactams antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976;2:115-57.
62. Dudley M. Bacterial resistance mechanisms to beta-lactam antibiotics: assessment of management strategies. *Pharmacotherapy* 1995;15(1 Pt 2):9S-14S.
63. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940;146:837.
64. Medeiros AA, Jacoby GA. Betalactamase-mediated resistance. In: Queener SF, Webber JA, Queener SW, editors. Betalactam antibiotics for clinical use. New York: Marcel Dekker Inc; 1986. p. 49-84.
65. Mehta RJ, Nash CH. β -lactamase activity in yeast. *Jpn J Antibiot* 1978;31:239-40.
66. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983;11(6):315-7.
67. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28(2):302-7.
68. Nordmann P. Trends in beta-lactam resistance among Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis* 1998;27 Suppl 1:S100-6.
69. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -Lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-1233.
70. Acar JF, Minozzi C. Role of β -lactamases in the resistance of gramnegative bacilli to β -lactam antibiotics. *Rev Infec Dis* 1986;8(Suppl 5):S482-6.
71. Bush K, Sykes RB. Interaction of β -lactam antibiotics with β -lactamases as a cause for resistance. In: Bryan LE, editor. Antimicrobial drug resistance. Orlando (Florida): Academic Press; 1984. p. 1-31.
72. Hamilton-Miller JMT. An historical introduction to β -lactamase. In: Hamilton-Miller JMT, Smith JT, editors. Beta-lactamases. London: Academic Press; 1979. p. 1-16.

73. Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol rev 1995;8:557-84.
74. Bush K. Recent developments in β -lactamase research and their implication for the future. Rev Infect Dis 1988;10:681-90.
75. Richmond MH, Sykes RB. The β -lactamases of gramnegative bacteria and their possible physiological role. Adv Microb Physiol 1973;9:31-87.
76. Ambler RP. The structure of β -lactamases. Phil Trans R Soc Lond B 1980;289:321-31.
77. Jaurin B, Grunsdtröm T. Amp c cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:4897-901.
78. Bush K. Characterization of β -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1989;33:259-263.
79. Bush K. Classification of β -Lactamases: Groups 1, 2a, 2b, and 2b'. Antimicrob Agents Chemother 1989;33:264-270.
80. Bush K. Classification of β -Lactamases: Groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. Antimicrob Agents Chemother 1989;33:271-276.
81. Matthew M, Harris AM. Identification of β -lactamases by analytical isoelectric focusing: correlation with bacterial taxonomy. J Gen Microbiol 1976;94:55-67.
82. Gootz TD, Sanders CC, Goering VR. Resistance to cefamandole: derepression of β -lactamases by cefoxitin and mutation in *Enterobacter cloacae*. J Infec Dis 1982;146:34-42.
83. Podbielski A, Schönling J, Melzer B, Haase G. Different promoters of SHV-2 and SHV-2a beta-lactamase lead to diverse levels of cefotaxime resistance in their bacterial producers. J Gen Microbiol 1991;137(Pt 7):1667-75.
84. Jacoby GA, Sutton L. β -lactamases and β -lactam resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1985;28:703-5.
85. Normark S, Edlund T, Grundtröm T, Bergström S, Wolf-Watz H. *Escherichia coli* K-12 mutants hyperproducing chromosomal β -lactamase by gene repetitions. J Bacteriol 1977;132:921-22.
86. Normark S, Lindquist S, Lindberg F. Chromosomal β -lactam resistance in enterobacteria. Scand J Infec Dis 1986;49:38-45.
87. Xiang X, Shannon K, French G. Mechanism and stability of hyperproduction of the extended- spectrum beta-lactamase SHV-5 in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 1997;40(4):525-32.

88. Hedges RW, Datta N, Kontomichalou P, Smith JT. Molecular specificities of R factor-determined β -lactamases: correlation with plasmid compatibility. *J Bacteriol* 1974;117:56-62.
89. Datta N, Kantomicholau P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* 1965;208:239-41.
90. Roy C, Segura C, Tirado M, Reig R. Determinación orientativa del espectro de hidrólisis de las β -lactamasas de enterobacteriáceas y de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev diag Biol* 1984;33:27-32.
91. Simpson IM, Knothe H, Plested SJ, Harper PB. Qualitative and quantitative aspects of β -lactam resistance in a survey of clinical isolates from faecal samples. *J Antimicrob Chemother* 1986;1986:17.
92. Tirado M, Roy C, Segura C, Reig R, Hermida M, Foz A. Incidence of strains producing plasmids determined β -lactamases among carbenicillin resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1986;18:453-8.
93. Doern GV. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Branhamella catarrhalis*. *Clin Microbiol Newsletter* 1988;10:185-7.
94. Hedges RW, Jacob AE. Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Mol Gen Genet* 1974;132:31--40.
95. Nakazawa H, Mitsuhashi S. Tn2011, a new transposon encoding oxacilling-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;23:407-12.
96. Matthew M. Plasmid-mediated β -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J Antimicrob Chemother* 1979;5:349-358.
97. Pitton JS. Mechanism of bacterial resistance to antibiotics. In: Adrian RH, editor. *Reviews of physiology*. Berlin: Springer Verlag; 1972. p. 15-93.
98. Matthew M, Hedges RW, Smith JT. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram- negative bacteria. *J Bacteriol* 1979;138(3):657-62.
99. Nugent ME, Hedges RW. The nature of the genetic determinant for the SHV-1 beta-lactamase. *Mol Gen Genet* 1979;175(3):239-43.
100. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10(4):867-78.
101. Philippon A, Ben Redjeb S, Fournier G, Ben Hassen A. Epidemiology of extended spectrum beta-lactamases. *Infection* 1989;17(5):347-54.
102. Bradford PA. Autothermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla_{SHV}* genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2960-3.

103. Podbielski A, Schönling J, Melzer B, Warnatz K, Leusch HG. Molecular characterization of a new plasmid-encoded SHV- type beta-lactamase (SHV-2 variant) conferring high-level cefotaxime resistance upon *Klebsiella pneumoniae*. J Gen Microbiol 1991;137(Pt 3):569-78.
104. Nicolas MH, Jarlier V, Honore N, Philippon A, Cole ST. Molecular characterization of the gene encoding SHV-3 beta- lactamase responsible for transferable cefotaxime resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1989;33(12):2096-100.
105. Peduzzi J, Barthelemy M, Tiwari K, Mattioni D, Labia R. Structural features related to hydrolytic activity against ceftazidime of plasmid-mediated SHV-type CAZ-5 β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1989;33:2160-3.
106. Billot-Klein D, Gutmann L, Collantz E. Nucleotic sequence of the SHV-5 β -lactamase gene of a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:20439-41.
107. Arlet G, Roveau M, Philippon A. Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum beta-lactamase. FEMS Microbiol Lett 1997;152(1):163-7.
108. Bradford PA, Urban C, Jaiswal A, Mariano N, Rasmussen BA, Projan SJ, et al. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients [published erratum appears in Antimicrob Agents Chemother 1995 Jul;39(7):1646]. Antimicrob Agents Chemother 1995;39(4):899-905.
109. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, et al. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(3):647-53.
110. Prinarakis EE, Tzelepi E, Gazouli M, Mentis AF, Tzouvelekis LS. Characterization of a novel SHV beta-lactamase variant that resembles the SHV-5 enzyme. FEMS Microbiol Lett 1996;139(2-3):229-34.
111. Primarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouvelekis LS. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(8):838-40.
112. Nüesch Inderbinen MT, Kayser FH, Hächler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV- 11 and SHV-12. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(5):943-9.
113. Yuan M, Hall LM, Savelkoul PH, Vandenbroucke Grauls CM, Livermore DM. SHV-13, a novel extended-spectrum beta-lactamase, in *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients in an intensive care unit in Amsterdam. Antimicrob Agents Chemother 2000;44(4):1081-4.
114. Yuan M, Livermore MD. In.; 1998.
115. Child J. In.; 1998.

116. Arpin C, Tessier F, El Harrif Z, Quentin C. In:; 1998.
117. Rassheed JK, Swenson JM, Yigit H, Ferraro MJ, Biddle JW, Anderson GJ, et al. GenBank AF132290 .
118. Essack S, Livermore DM. In:; 1999.
119. Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, Shibayama K, Kamachi K, Arakawa Y. A new SHV-derived extended-spectrum β -lactamase (SHV-24) that hydrolyzed ceftazidime through a single-amino-acid substitution (D179G) in the omega-loop. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1725-7.
120. Siu LK, Chang FY, Huang MH, inventors; .
121. Siu LK, Chang FY, Huang MH, inventors; .
122. Corkill JE, Cuevas LE, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:463-5.
123. Zhou W. Variante alélica SHV-28. Comunicada en la web de β -lactamasas <http://www.lahey.org/studies.webt.htm>. 2000.
124. Yigit H. Variante alélica SHV-29. Comunicada en la web de β -lactamasas <http://www.lahey.org/studies.webt.htm>. 2000.
125. Rasheed K. Variante alélica SHV-30. Comunicada en la web de β -lactamasas <http://www.lahey.org/studies.webt.htm>. 2001.
126. Chia J. Variante alélica SHV-31. Comunicada en la web de β -lactamasas <http://www.lahey.org/studies.webt.htm>. 2001.
127. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanés C. SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(10):2856-61.
128. Heritage J. Variante alélica SHV-34. Comunicada en la web de β -lactamasas <http://www.lahey.org/studies.webt.htm>. 2001.
129. Alobwede I. Variantes alélicas SHV-35 a 37. Comunicadas en la web de β -lactamasas <http://www.lahey.org/studies.webt.htm>. 2001.
130. Danel FL, Hall MC, Gur D, Akalin HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 β -lactamase amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Ankara, Turkey. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:281-94.
131. Bauernfeind A, Casellas JM, Broger C, Stemplinger J. Novel plasmidic β -lactamase of *Salmonella typhimurium*. In: Program and Abstracts of the 34th Interscience Conference on antimicrobial Agents and Chemotherapy; 1994; Washington, D. C.: American Society of Microbiology; 1994.

132. Bernard H, Tancrede C, Livrelli v, Morand A, Bathelemy m, Labia R. A novel extended expectrum plasmid mediated β -lactamase not dereived from TEM- or SHVclass enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;29:427-33.
133. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 1990;18:294-98.
134. Barthélémy M, Péduzzi J, Bernard H, Tancrede C, Labia R. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochim Biophys Acta* 1992;1122(1):15-22.
135. Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* 1992;20:158-163.
136. Gniadkowski M, Schneider I, Palucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(4):827-32.
137. Gazouli M, Sidorenko SV, Tzelepi E, Kozlova NS, Gladin DP, Tzouvelekis LS. A plasmid mediated betalactamase conferring resistance tp cefotaxime in a *Salmonella typhimurium* clone found in St. Petersburg, Russia. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:119-21.
138. Gazouli M, Tzelepi E, Sidorenko SV, Tzouvelekis LS. Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(5):1259-62.
139. Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing betalactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1980-84.
140. Gazouli M, Tzelepi E, Markogiannakis A, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing betalactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett* 1998;165:289-93.
141. Sabaté M, Tarragó R, Navarro F, Miró E, Vergés C, Barbé J, et al. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(7):1970-3.
142. Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime- hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(10):2269-75.

143. Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H, Yamaguchi K. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A beta-lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(5):1181-6.
144. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, et al. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(3):616-20.
145. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(3):573-81.
146. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:147-51.
147. Arakawa Y, Ito H, Oshuka S, Kato N, Ohta M. Genetic analyses of an enterobacterial metallo- β -lactamase carried by a large plasmid of *Serratia marcescens*. In: Program and abstracts of the 34th interscience conference of antimicrobial agents and chemotherapy. Washington, D. C.: American society of microbiology; 1994.
148. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankum R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(71-8).
149. Rasmussen BA, Gluzman Y, Tally FP. Cloning and sequencing of the class B beta-lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34(8):1590-2.
150. Yang Y, Rasmussen BA, Bush K. Biochemical characterization of the metallo-beta-lactamase CcrA from *Bacteroides fragilis* TAL3636. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(5):1155-7.
151. Yang Y, Keeney D, Tang X, Canfield N, Rasmussen BA. Kinetic properties and metal content of the metallo-beta-lactamase CcrA harboring selective amino acid substitutions. *J Biol Chem* 1999;274(22):15706-11.
152. Yanchak MP, Taylor RA, Crowder MW. Mutational analysis of metallo-beta-lactamase CcrA from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry* 2000;39(37):11330-9.
153. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34(11):2200-9.
154. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1989;17(5):316-21.

155. Payne DJ, Woodford N, Amyes SG. Characterization of the plasmid mediated beta-lactamase BIL-1. *J Antimicrob Chemother* 1992;30(2):119-27.
156. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(8):1637-44.
157. Hermida M. Resistencia a los antibióticos betalactámicos en *Klebsiellas* de procedencia hospitalaria y no hospitalaria . Barcelona: Universidad de Barcelona; 1990.
158. Reig R. Estudio de las betalactamasas plasmídicas en el género *Klebsiella*. Bellaterra (Barcelona): Universidad Autónoma de Barcelona; 1988.
159. Labia R, Morand A, Guionie M, Heitz m, Pitton JS. β -Lactamases de *Klebsiella oxytoca*: Etude de leur action sus les céphalosporines de troisième génération. *Pathologie et Biologie* 1986;34:611-61.
160. Then RL, Glauser MP, Angehrn P, Arisawa M. Cephalosporin resistance in strains of *Klebsiella oxytoca* isolates during antibiotic therapy. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig A* 1983;254:469-79.
161. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille Michaud A, et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1987;20(3):323-34.
162. Spencer RC, Wheat PF, Winstanley TG, Cox DM, Plested SJ. Novel beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* conferring unusual resistance to beta-lactam antibiotics [letter]. *J Antimicrob Chemother* 1987;20(6):919-21.
163. Livermore DM, Maskell JP, Williams JD. Detection of PSE-2 β -lactamase in enterobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;25:268-72.
164. Petit A, Sirot DL, Chanal CM. Novel plasmid-mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chamother* 1988;32:626-30.
165. Reig R, Roy C, Hermida M, Teruel D, Coira A. A survey of beta-lactamases from 618 isolates of *Klebsiella* spp. *J Antimicrob Chemother* 1993;31(1):29-35.
166. Labia R, Pitton JS, Heitz M. Resitance of *Klebsiella* to cephalosporins. Particular properties of β -lactmases isolated from *K. oxytoca*. *Experientia* 1986;42:97.
167. Simpson IN, Harper PB, CH OC. Principal beta-lactamases responsible for resistance to beta-lactam antibiotics in urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;17(6):929-36.
168. Hart CA, Percival A. Resistance to cephalosporins among gentamicin resistant *Klebsiellae*. *J Antimicrob Chamother* 1982;9:275-86.

169. Pitton JS, Heitz M, Labia R. Characterization of two new betalactamases from *Klebsiella* spp. In: Biegentaler W, Lüthy R, editors. Current Chemotherapy. Washington: Am Soc Microbiol; 1978. p. 482-84.
170. Labia R, Peduzzi J. Augmentine and β -lactamases: inactivation of β -lactamase by clavulanic acid. In: Croydon EAP, Michel MF, editors. Augmentine. Amsterdamn: Excerpta Medica; 1983. p. 11-20.
171. Arakawa Y, Ohta M, Kido N, Fujii Y, Komatsu T, Kato N. Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM β -lactamase gene mediated by R plasmids. FEBS Lett 1986;207:69-74.
172. Labia R, Fabre C, Masson JM, Bathélemy M, Heintz ZM, Pitton JS. *Klebsiella pneumoniae* strains moderately resistance to ampicillin and carbenicillin: characterization of a new β -lactamase. J Antimicrob Agents Chemother 1979;5:375-82.
173. Burman LG, Park JT, Lindström EB, Boman HG. Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. Identification of the structural gene for the chromosomal penicillinase. J Bacteriol 1973;116:123-30.
174. Jaurin B, Grundström T, Edlund T, Normark S. The *E. coli* β -lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. Nature 1981;290:221-5.
175. Lindberg F, Normark S. Contribution of chromosomal β -lactamases to betalactam resistance in enterobacteria. Rev Infect Dis 1986;3(Suppl 3):293-304.
176. Edlund T, Grundström T, Normark S. isolation and characterization of DNA repetitions carrying the chromosomal β -lactamase of *Escherichia coli* K-12. MGG 1979;173:115-25.
177. Dietz H, Pfeifle D, Wiedemann B. The signal for β -lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2113-20.
178. Honoré N, H. NM, T. CS. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. EMBO J 1986;5:3709-14.
179. Pabo CO, Sauer RT. Protein DNA-recognition. An Rev Biochem 1984;53:293-321.
180. Linquist S, Galleni M, Lindberg m, Normark S. Signalling protein in enterobacterial β -lactamase regulation. Mol Microbiol 1989;3:1090-1102.
181. Oliva B, Bennett PM, Chopra I. Penicillin-binding protein 2 is required for induction of the *Citrobacter freundii* Class I chromosomal β -lactamase in *Escherichi coli*. Antimicrob Agent Chemother 1989;33:1116-7.

182. Tuomanen E, Lindquist S, Sande S, Galleni M, Light K, Cage D, et al. Coordinate regulation of β -lactamase induction and peptidoglycan composition by the amp regulon. *Science* 1991;251(201-4).
183. Normark S, Bartowsky E, Erickson J, Jacobs C, Lindberg F. Mechanism of chromosomal β -lactamase induction in gram-negative bacteria. In: Ghuyssen JM, Hakenberg R, editors. *Bacterial cell wall*. Amsterdam: Elsevier; 1994. p. 485-504.
184. Isenberg HD, Washington II JA, Balows A, Sonnenwirth AC. Collection, handling and processing of specimens. In: Lennette EH, editor. *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. Washington: Am Soc Microbiol; 1980. p. 52-82.
185. Washington II JA, Martin WJ, Karlson AG. Bacteriology. In: Washington II Ja, editor. *Laboratory procedures*. Boston: Little, Brown and Co; 1974. p. 11-139.
186. Martin WJ, Washington II JA. *Enterobacteriaceae*. In: Lennette EH, editor. *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. Washington: Am Soc Microbiol; 1984. p. 195-219.
187. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, M7-A5*. Wayne, PA: NCCLS, 2000.
188. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. 7th ed. Approved standard, M2-A7. Wayne, PA: NCCLS, 2000.
189. Bauer AW, Kirby VMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45:493-96.
190. Actas. In: *I Simposio internacional de antibiogramas*; 1969; Madrid; 1969.
191. Vesterberg O. Isoelectric focusing and separation of proteins. In: Norris JR, Ribbons DW, editors. *Methods in microbiology*. Londres: Academic press; 1971. p. 595-614.
192. Haglund H. Properties of ampholine. In: Arbuthnott JP, Beeley JA, editors. *Isoelectric focusing*. Londres: Butterworths and Co.; 1975. p. 3-22.
193. Livermore DM, Moosdeen F, Lindbridge MA, Kho P, Williams JD. Behaviour of TEM-1 β -lactamase as a resistance mechanism to ampicillin, mezlocillin and azlocillin in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1986;17:136-46.
194. Matthew M, Harris AM, Marshall mJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J Gen Microbiol* 1975;88:169-78.
195. Plested SJ, Simpson IN, James M. The detection of bacterial β -lactamases and their identification by analytical isoelectric focusing. In: Russell AD, Quesnell LB, editors. *Antibiotics: assessment of antimicrobial activity and resistance*. Londres: Academic press; 1983. p. 11-126.

196. Sykes RB, Bush K. Physiology, biochemistry and activation of β -lactamases. In: Morin RB, Gorman M, editors. The chemistry and biology of betalactam antibiotics. Londres: Academic press; 1981. p. 155-207.
197. Roy C, Segura C, Reig R. Aplicación de la ultrafiltración para la clarificación, concentración y desionización de extractos bacterianos. Rev Diag Biol 1982;31:180-185.
198. Simpson IN, James M. Comparison of routine techniques for cell breakage and release of β -lactamase activity. J Antimicrob Chemother 1982;9:119-23.
199. Wilson K. In: Ausubel M, editor. Current protocols in molecular biology: Wiley&Son, Inc; 1994.
200. Mercier J, Levesque RC. Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 beta-lactamases and cloning and sequencing of SHV-1 beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 1990;34(8):1577-83.
201. Huovinen S, Huovinen P, Jacoby GA. Detection of plasmid-mediated beta-lactamases with DNA probes. Antimicrob Agents Chemother 1988;32(2):175-9.
202. Haeggman S, Löfdahl S, Burman LG. An allelic variant of the chromosomal gene for class A beta-lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(12):2705-9.
203. Wilbur WJ, Lipman DJ. Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. Proc Natl Acad Sci 1983;80:726-30.
204. Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Muller GA. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ^{32}P -based hybridizations. Anal Biochem 1993;210(2):235-44.
205. Sanger F, S. N, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74(12):5463-7.
206. Broda P. Plasmids. Oxford: Freeman, W.H. and Co.; 1979.
207. Barbé J, Guerrero R. Mecanismos de conjugación bacteriana. In: Jiménez AS, Guerrero R, editors. Genética molecular bacteriana. Barcelona: Reverté; 1982. p. 99-139.
208. Hardy K. Bacterial plasmids. 2 ed. Wokingham: Molly Millars Lane; 1984.
209. Ambler RP, Coulson AFW, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the Class A betalactamases. Biochem J 1991;276:269-70.
210. Guenther SH, Henley JO, Wenzel RP. Gramnegative bacilli as non-transient flora on the hands of hospital personnel. J Clin Microbiol 1987;25:488-90.
211. Montgomerie JZ, Doak PB, Taylor DEM, North JDK. *Klebsiella* in faecal flora of renal transplant-patients. Lancet 1970;ii:787-91.

212. Sakata H, Fujita K, Yoshioka H. The effect of antimicrobial agents of faecal flora of children. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;29:225-9.
213. Orskow J. the genus *Klebsiella* (medical aspects). In: Starr HP, Stolph H, Tüper HC, Balows A, Schlegel HC, editors. *The procaryotes*. Berlin: Springer-Verlag; 1981. p. 1160-65.
214. Livermore DM, Williams JD. β -Lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In: Loria V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins Co.; 1996. p. 502-78.
215. Miró E, del Cuerdo M, Navarro F, Sabaté M, Mirelis B, Prats G. Emergence of clinical *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. *J Antimicrob Chemother* 1998;42(4):535-8.
216. Petit A, Ben Yaghlane Bouslama H, Sofer L, Labia R. Does high level production of SHV-type penicillinase confer resistance to ceftazidime in Enterobacteriaceae? *FEMS Microbiol Lett* 1992;71(1):89-94.
217. Gerding DN, Buxton AE, Hughes RA, Cleary PP, Arbaczawski J, Stamm WE. Nosocomial multiply resistant *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology of an outbreak of apparent index case origin. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;15(4):608-15.
218. Rennie RP, Duncan BR. Emergence of gentamicin-resistant *Klebsiella* in a general hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;11:179-84.
219. Fernandez-Rodriguez A, Canton R, Pérez-Díaz JC, Martínez-Beltrán J, Picazo JJ, Baquero F. Aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates harboring extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2536-2528.
220. Fu K, Neu HC. Azlocillin and mezlocillin: new ureido penicillins. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;13:930-38.
221. Gootz TD, Sanders CC, Sanders EJ. In vitro activity of furazlocillin (Bay K4999) compared with those of mezlocillin, piperacillin, and standard β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;15:783-91.
222. Wiedemann B. Summary of pre-clinical data: microbiology and pharmacokinetics. *J Antimicrob Chemother* 1982;9(Suppl A):289-90.
223. Chaves J, Roy C, Fuster C, Reig R, Coira A. Caracterización de los plásmidos en cepas de *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993;11(7):352-8.
224. Babini GS, Livermore DM. Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrobial Agents Chemother* 2000;44(8):2230.
225. Nüesch Inderbinen MT, Hächler H, Kayser FH. New system based on site-directed mutagenesis for highly accurate comparison of resistance levels conferred by SHV beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(8):1726-30.

226. Rice LB, Carias LL, Hujer AM, Bonafede M, Hutton R, Hoyen C, et al. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta- lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(2):362-7.

Figura 10. Distribución por centros de las diferentes β -lactamasas identificadas en cada cepa.

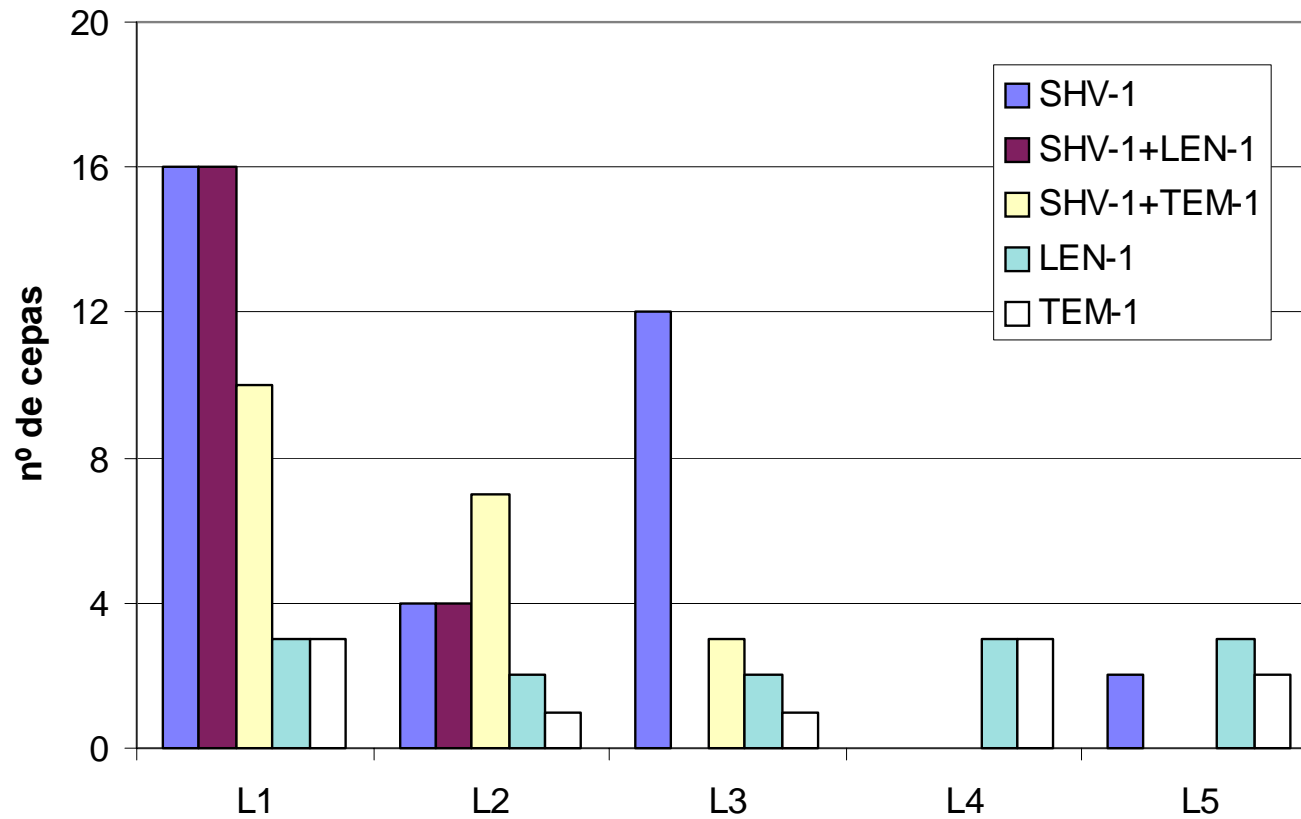


Figura 11. Patrón de resistencia de las cepas del Grupo I productoras de SHV-1 por IEEA.

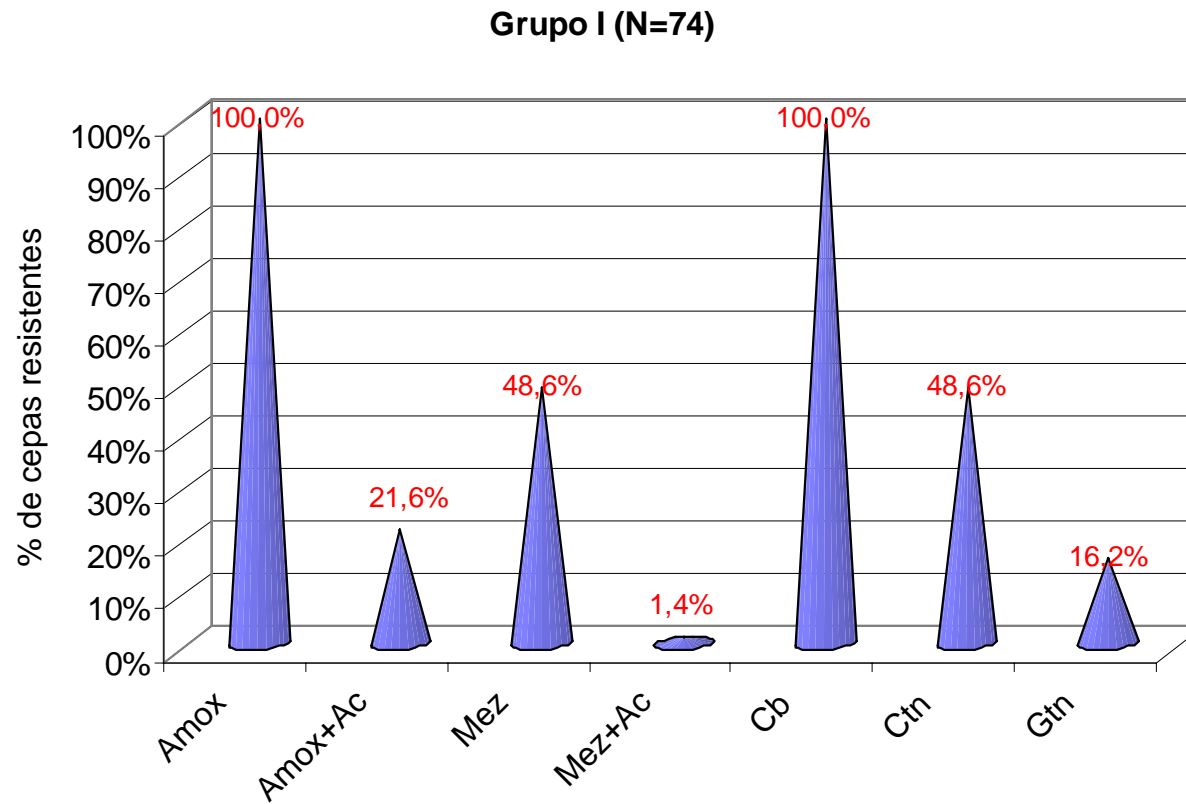


Figura 12. Patrón de resistencia en las cepas productoras de la β -lactamasa SHV-1.

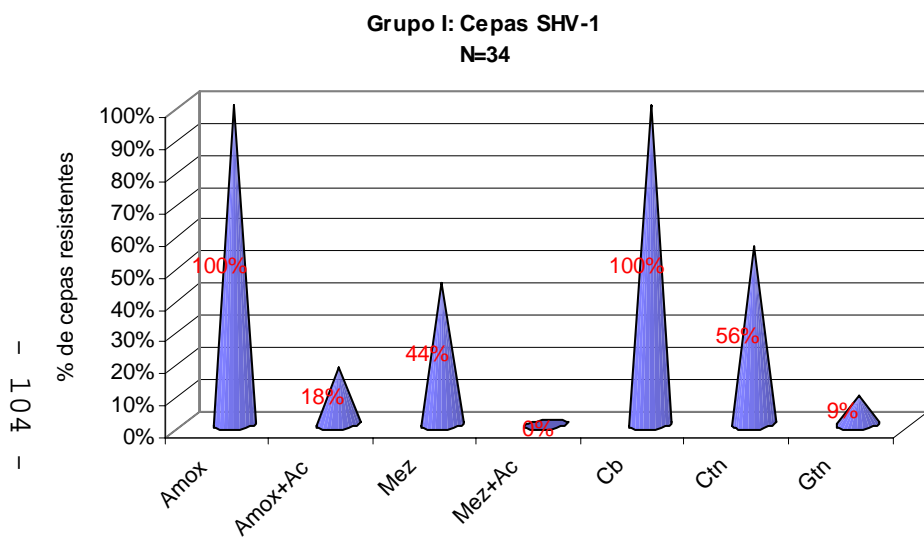


Figura 13. Patrón de resistencia en las cepas productoras de la β -lactamasa SHV-1 combinada con LEN-1

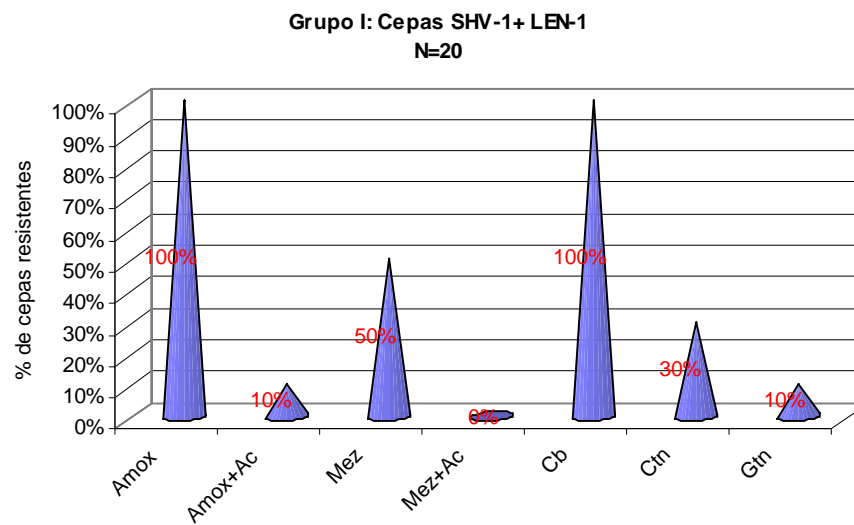


Figura 14. Patrón de resistencia de las cepas productoras (por IEEA) de la β -lactamasa SHV-1 combinada con la β -lactamasa plasmídica TEM-1.

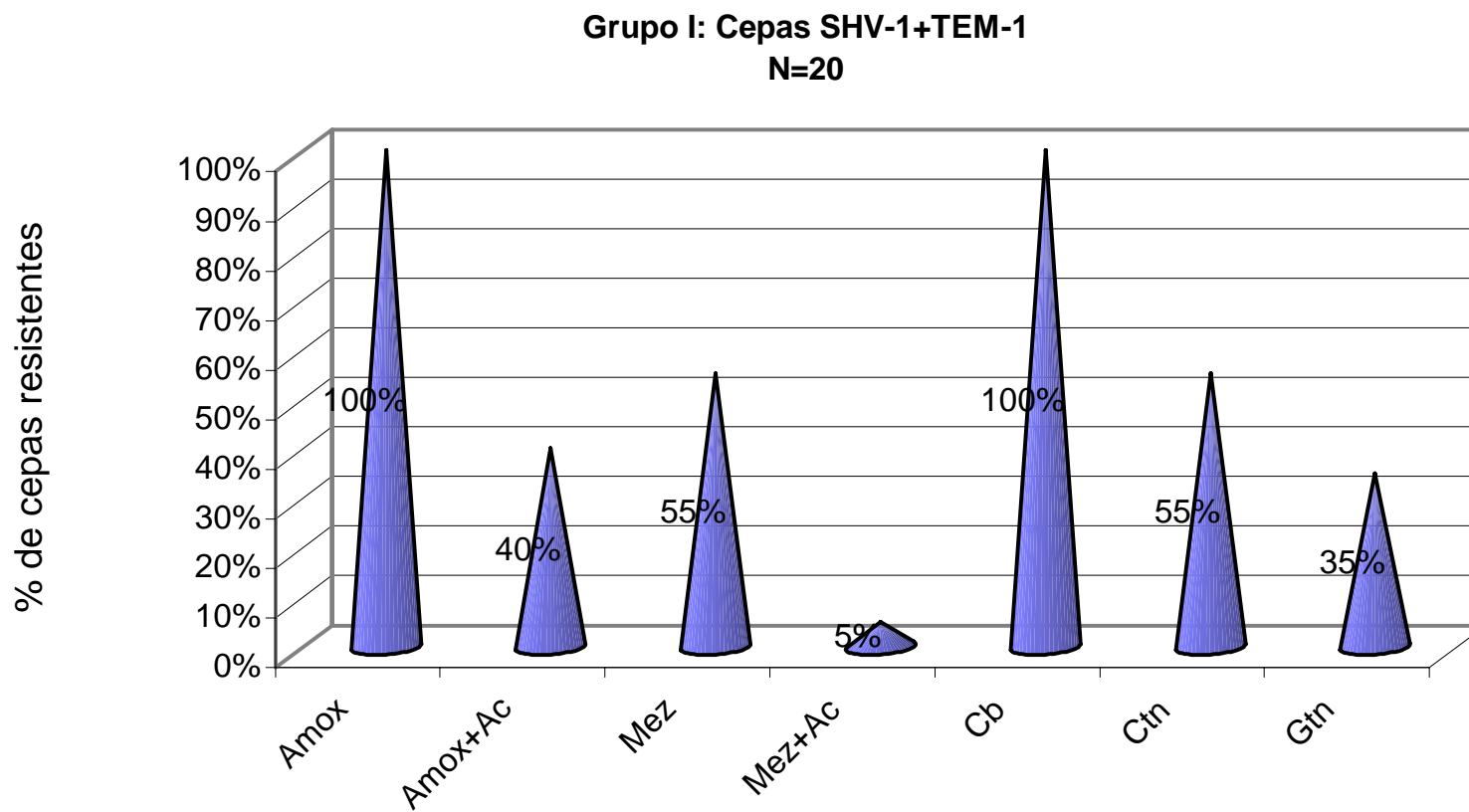


Figura 15. Patrón de resistencia en las cepas del Grupo II productoras de la β -lactamasa LEN-1.

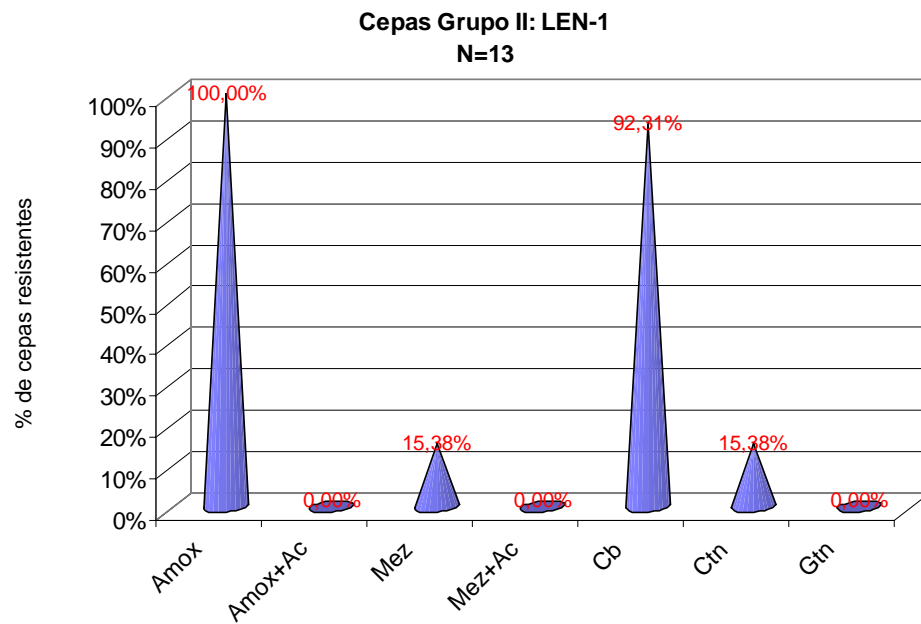


Figura 16. Patrón de resistencia en las cepas del Grupo II productoras de la β -lactamasa TEM-1

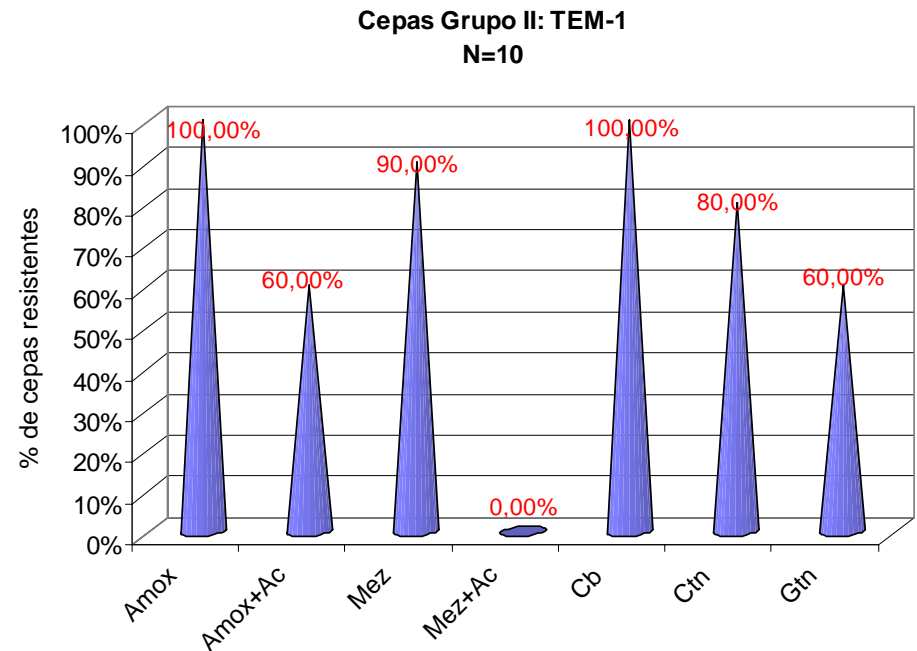


Figura 17. Frecuencias de plásmidos identificados en las cepas del Grupo I

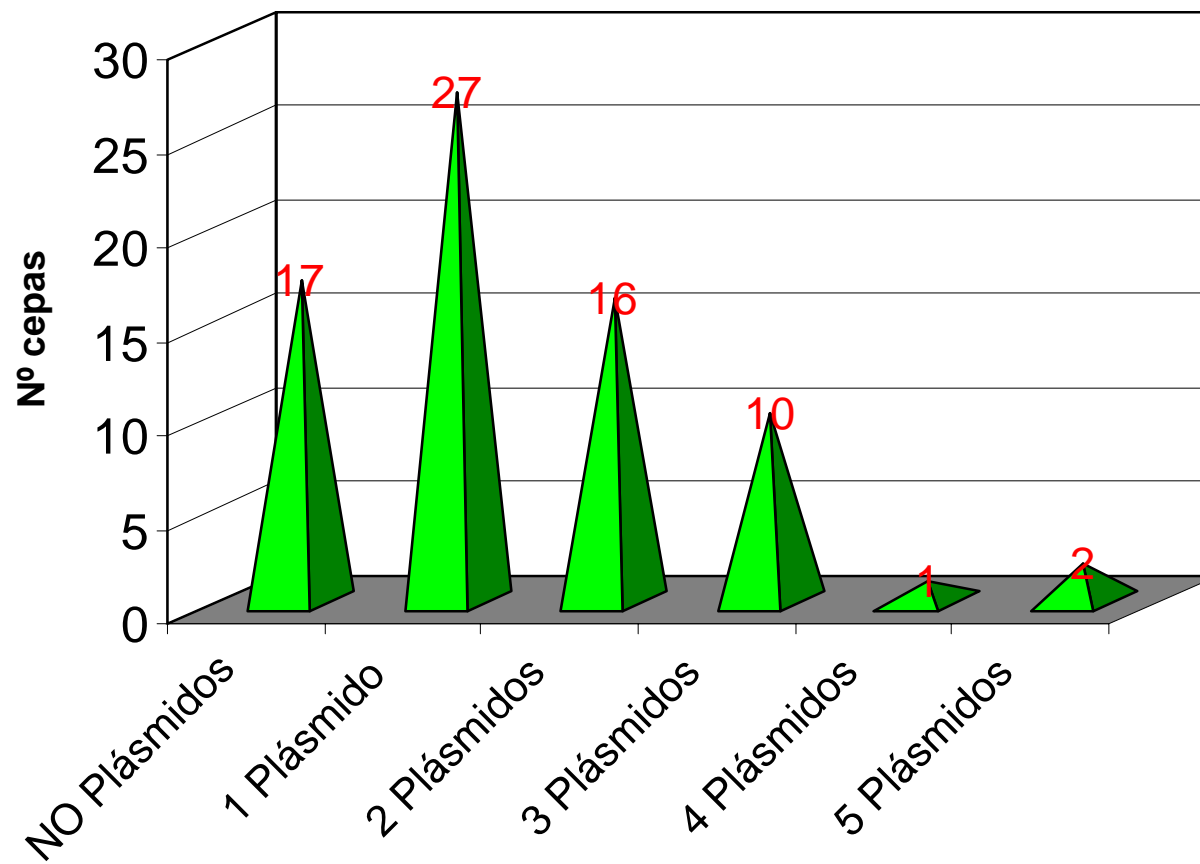


Figura 20. Frecuencias de los plásmidos identificados en las cepas del Grupo I categorizados por tamaños.

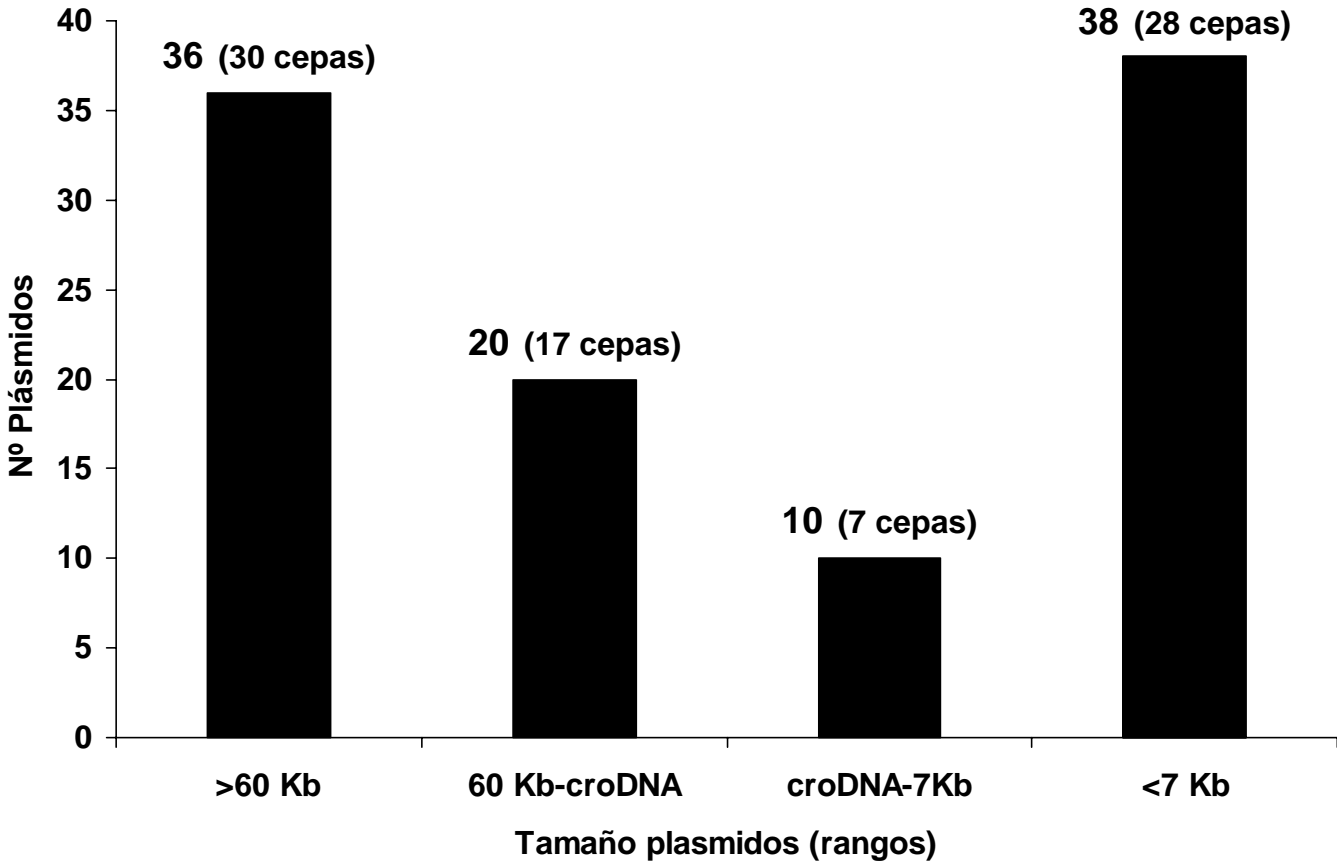


Figura 18. Distribución de frecuencias de los plásmidos en las cepas del Grupo I.

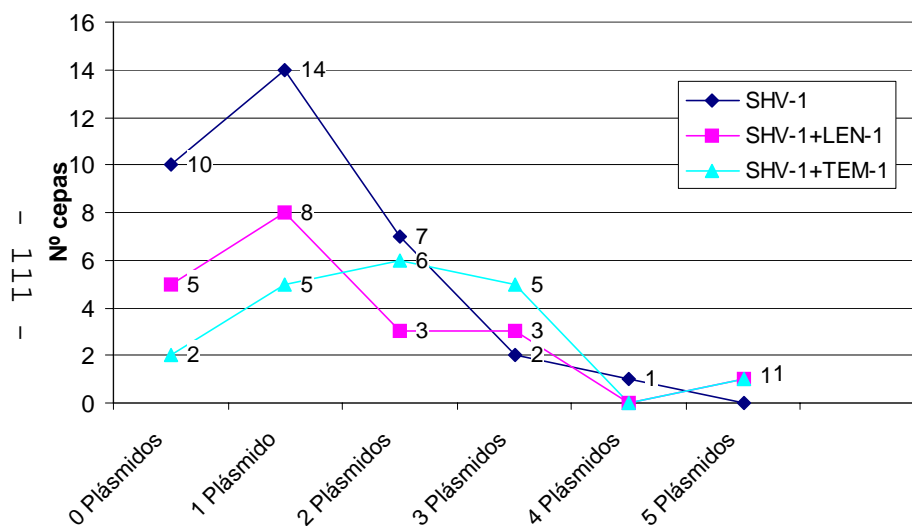


Figura 19. Distribución porcentual de las frecuencias normalizadas para los plásmidos en las cepas del Grupo I.

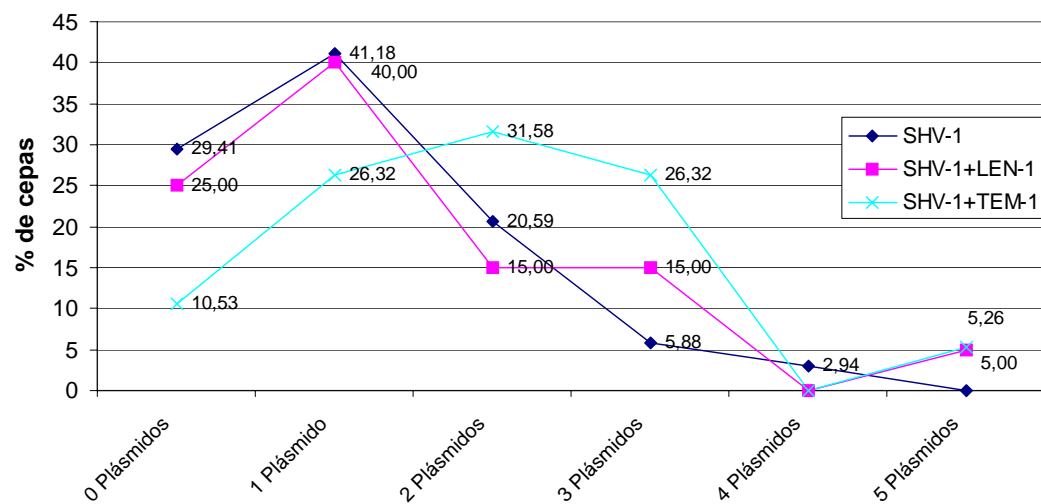


Figura 21. Distribución de frecuencias de los plásmidos en las cepas del Grupo I, según tamaño.

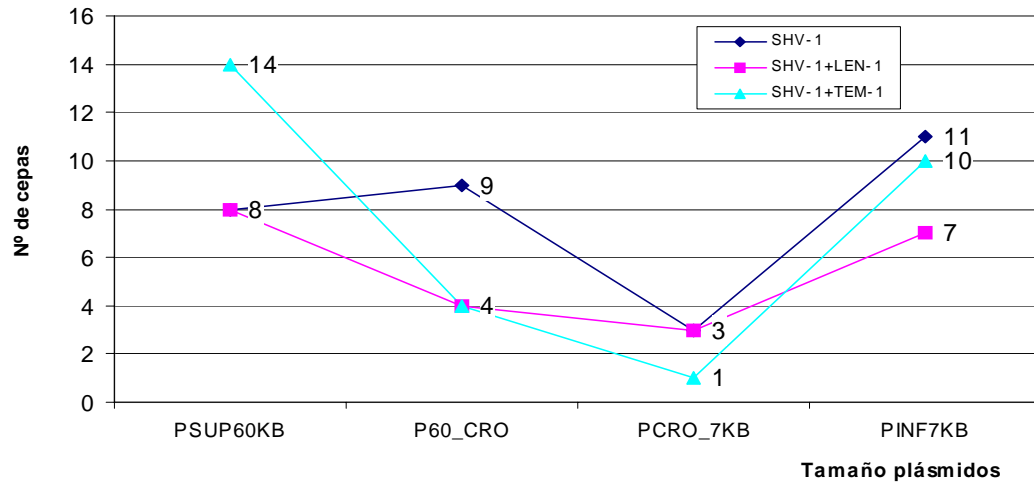


Figura 22. Distribución porcentual de las frecuencias normalizadas para los plásmidos en las cepas del Grupo I, según tamaño.

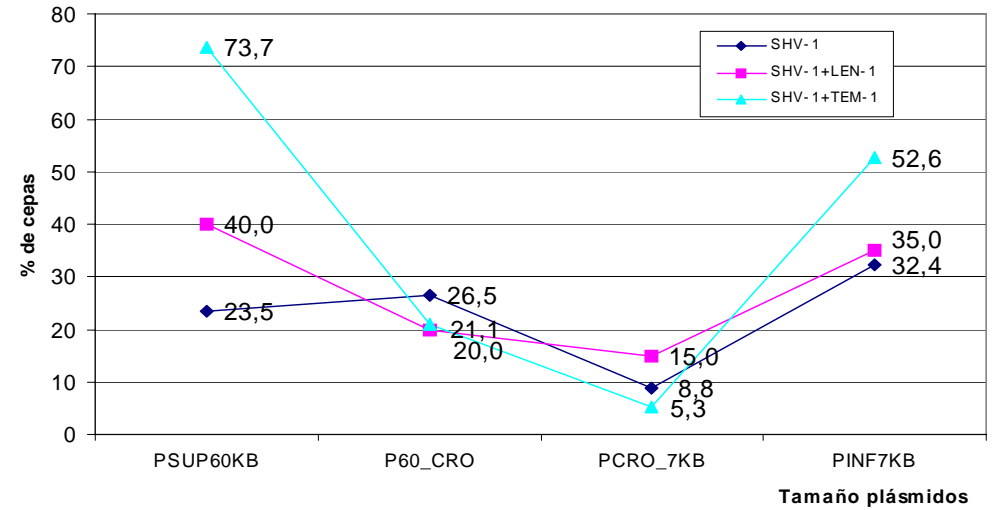


Figura 23. Detección de plásmidos conjugativos (>30 Kb) en las cepas del Grupo I, según la expresión de β -lactamasas detectadas por IEEA.

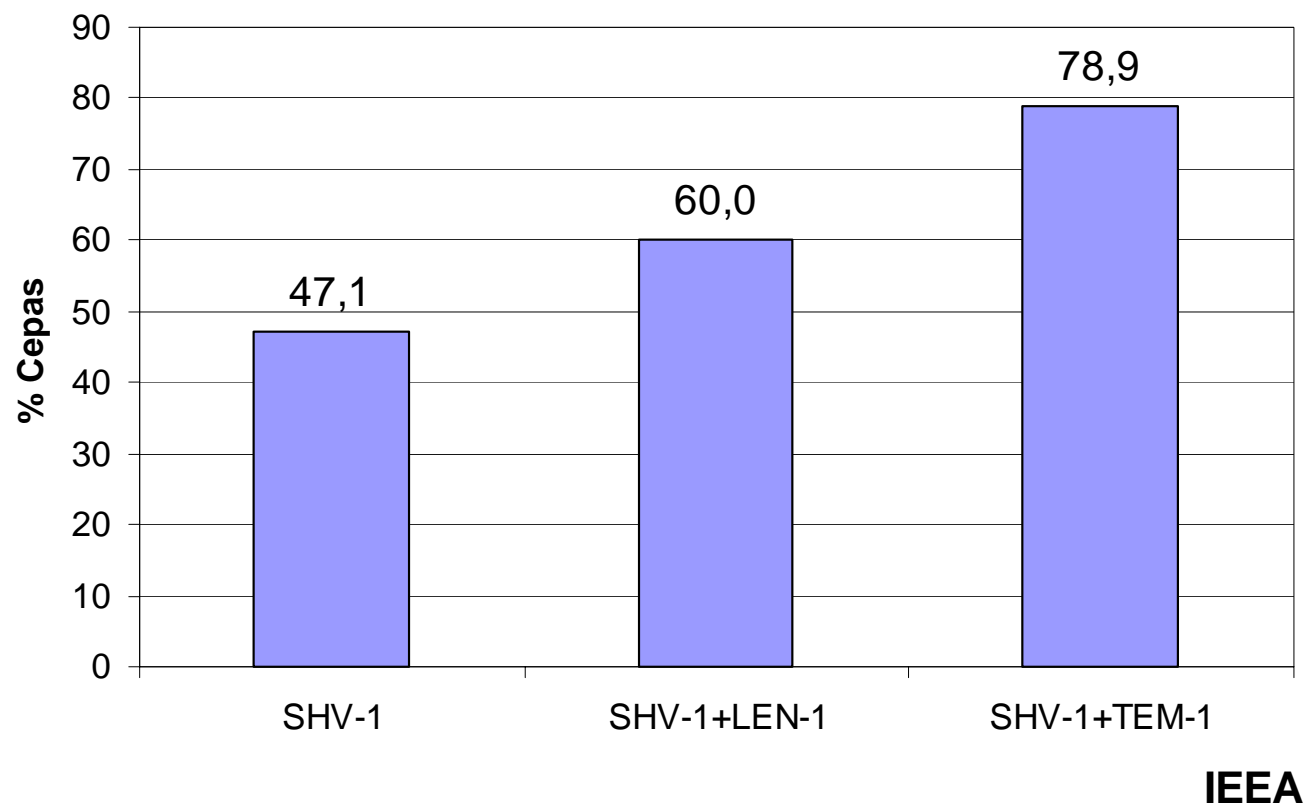


Figura 24. Transferencia plasmídica en las cepas del Grupo I productoras de SHV-1 solo o combinado con LEN-1 y detectado por IEEA.

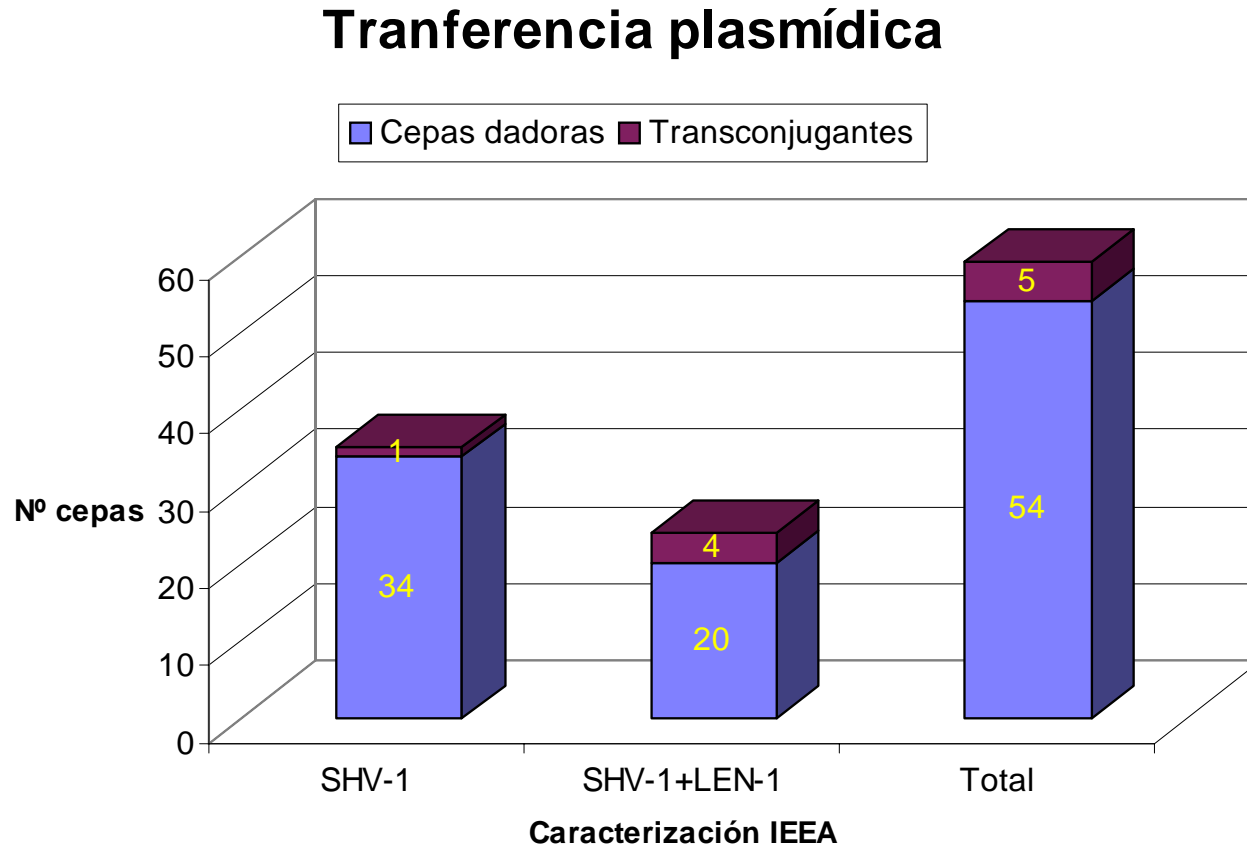


Figura 25. Transferencia plasmídica real y predecible en las cepas del Grupo I productoras de SHV-1 detectado por IEEA.

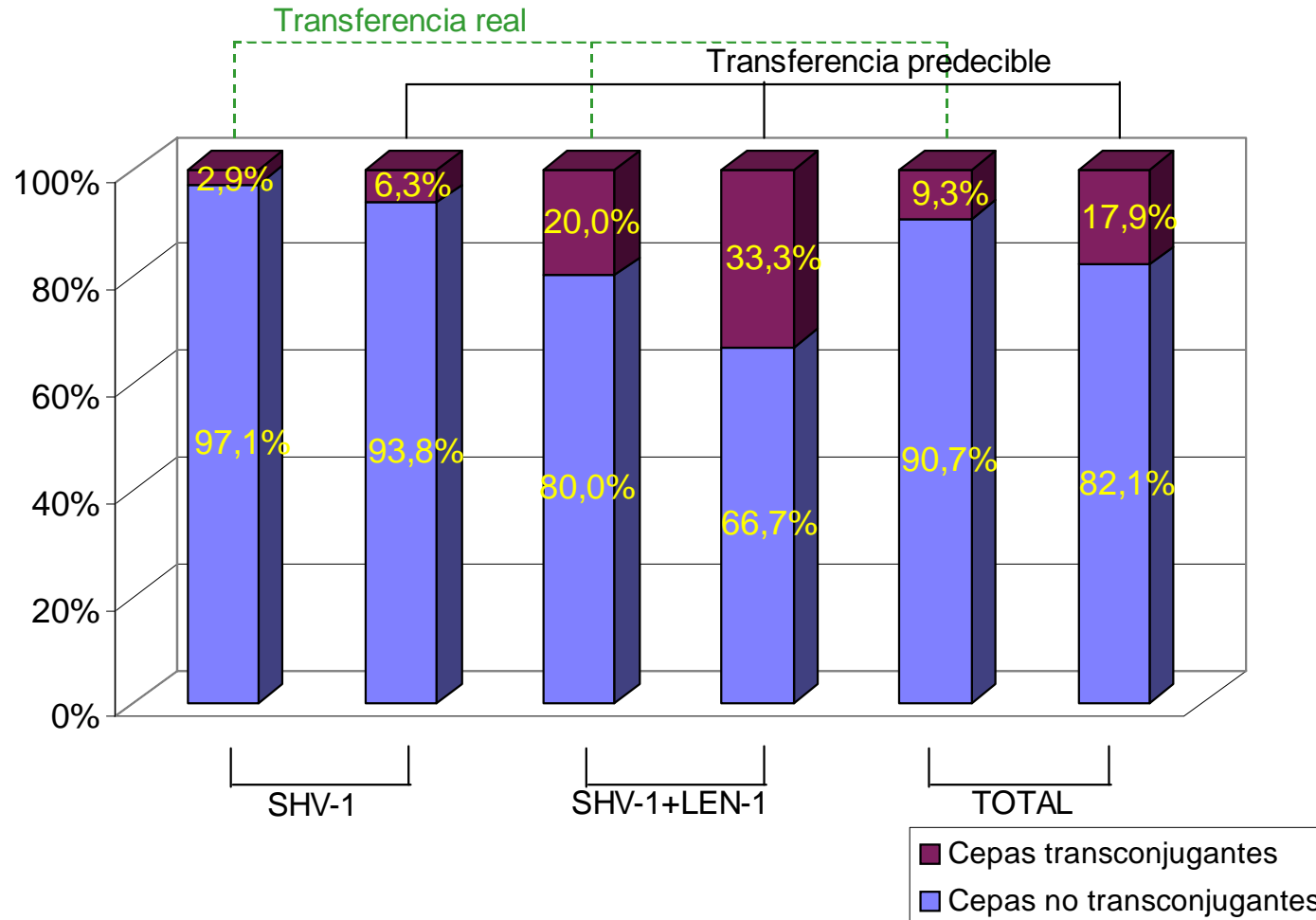


Figura 26. Resultados comparativos de la detección directa de la β -lactamasa SHV-1 por IEEA y la detección indirecta mediante la PCR del gen *bla-SHV-1*.

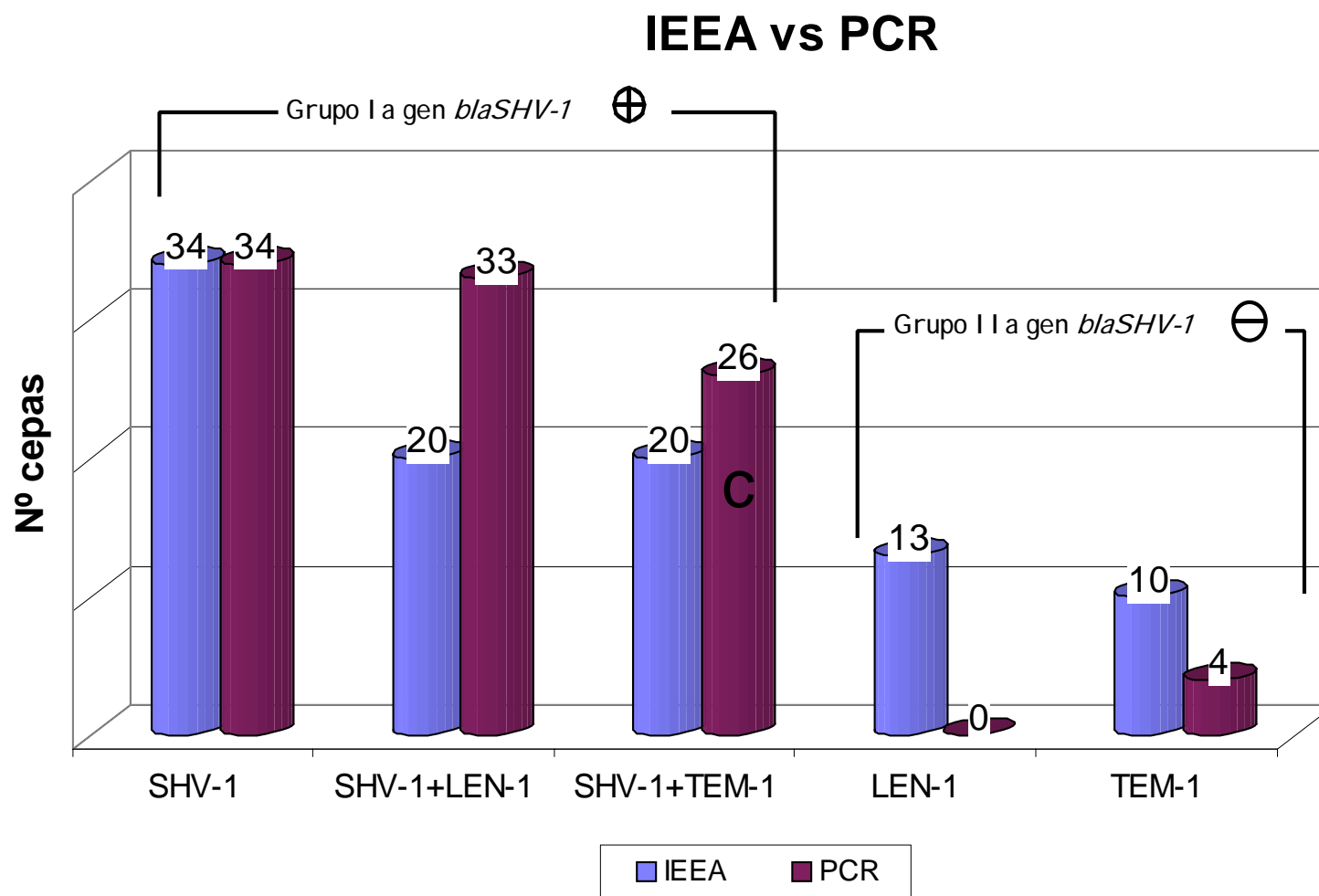


Figura 27. Detección del gen *bla-SHV-1* por PCR específica (178 pb). Carriles 1-18: muestras positivas; carril 19: control negativo; carril 20: control positivo; carril 21: marcador de DNA pGEM (Promega).

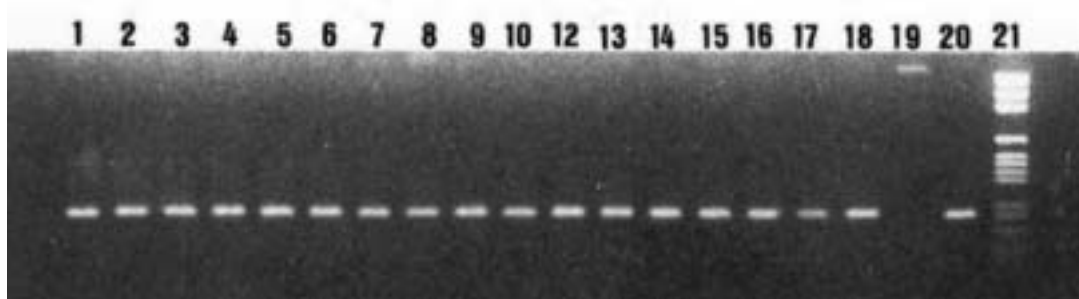


Figura 28. PCR-RFLP con la enzima de restricción NotI que corta específicamente el fragmento amplificado de 178 pb de SHV-1. Carriles 1-2: pMON38 no digerido y digerido con NotI; carril 8: muestra PCR positiva (178 pb) no digerida; carriles 3-7 y 9-13: fragmentos de PCR-RFLP con NotI; carril 14: marcador de DNA pGEM (Promega).

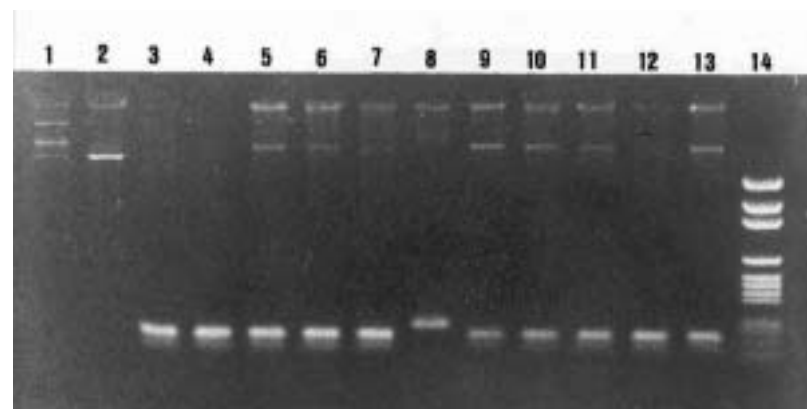


Figura 29. Southern-blot RFLP de diferentes muestras de DNA cromosómico. A) Electroforesis en gel de agarosa al 0,5%. Pocillos: 1. K251 \perp BamHI; 2. K273 \perp BamHI; 3. K534 \perp BamHI; 4. P111 \perp BamHI; 5. K51 \perp EcoRI; 6. K51 \perp BamHI; 7. K51 \perp PstI; 8. K51 \perp NotI; 10. K48 \perp EcoRI; 11. K48 \perp BamHI 12. K48 \perp PstI; 13. K48 \perp NotI; 14. K53 \perp EcoRI; 15. K53 \perp BamHI; 16. K53 \perp PstI; 17. K53 \perp NotI; 19. K75 \perp EcoRI; 20. K75 \perp BamHI; 21. K75 \perp PstI; 22. K75 \perp NotI. \perp : restricción con la enzima indicada; pocillos 9 y 18 marcador de peso molecular λ \perp HindIII; K seguida de un número indica cada cepa de *K. pneumoniae* ensayada; P111, cepa de *E. coli* productora de TEM-1, empleada como patrón control negativo. B) Correspondiente blot tras la hibridación con la sonda SHV-1 marcada con DIG-dUTP como se describió en material y métodos.

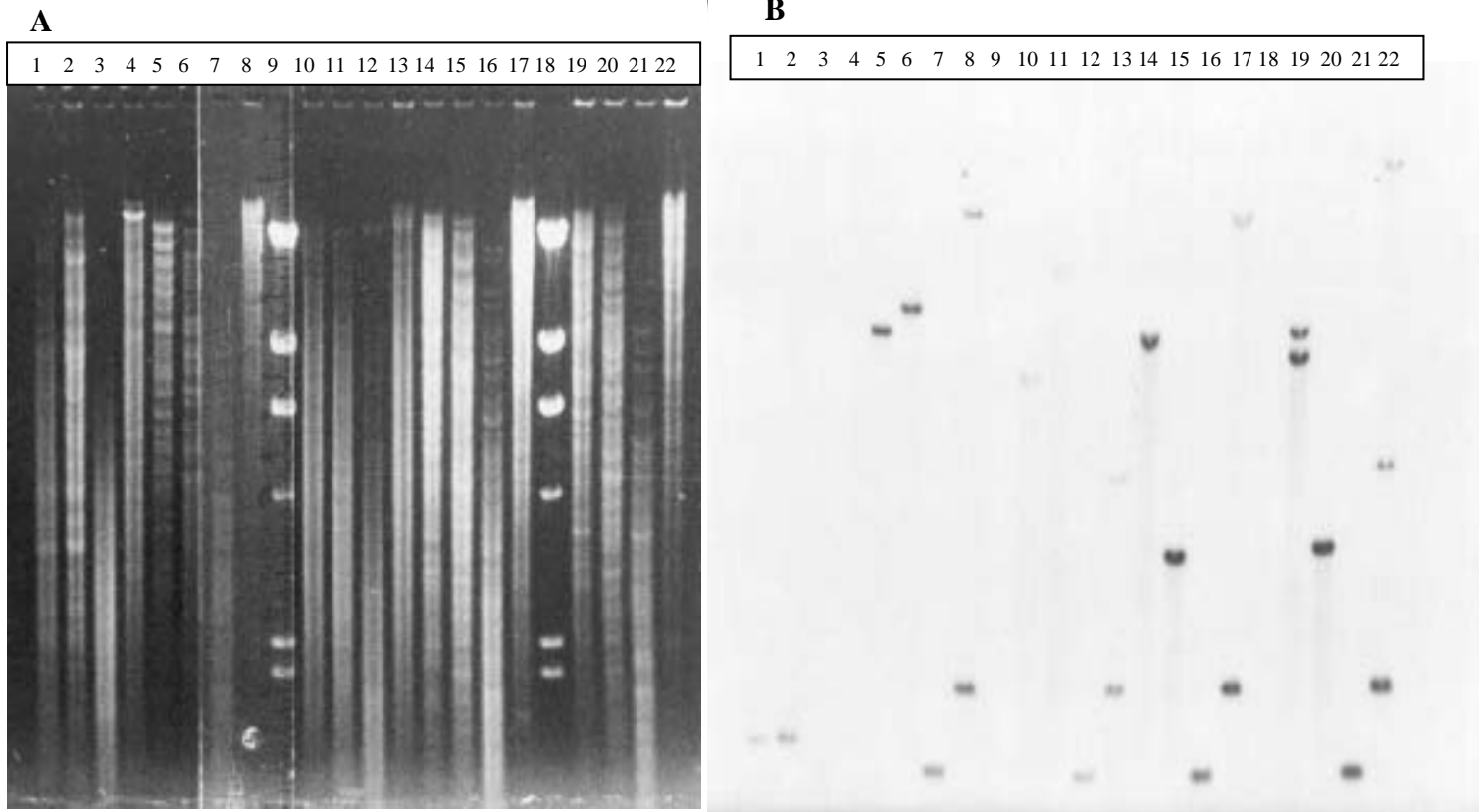


Figura 30. Análisis por Southern-blotting de los fragmentos de restricción EcoRI-EcoRI. Se especifican las β -lactamasas identificadas por isoelectroenfoque analítico (IEEA) en las cepas con ningún o con dos fragmentos.

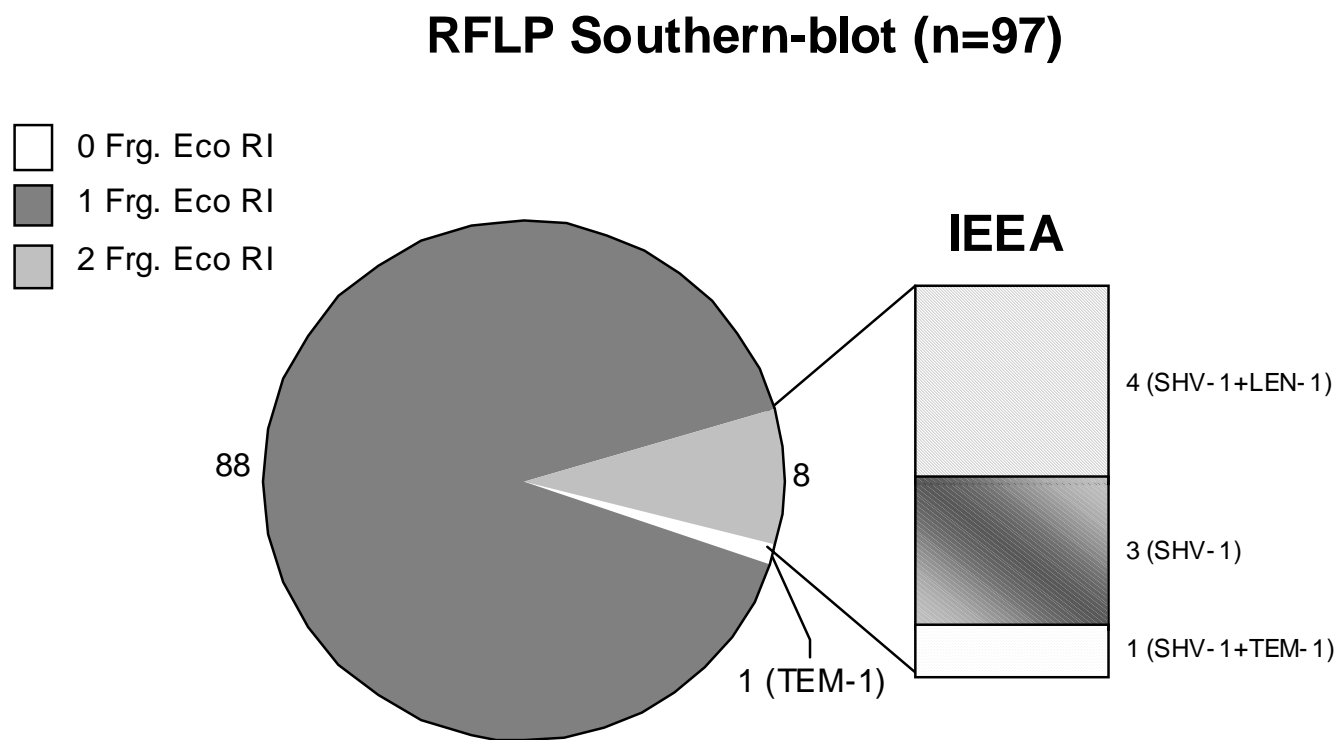


Figura 31. Análisis por RFLP-Southern-blot de los fragmentos EcoRI en las 97 cepas estudiadas y categorizadas según el resultado del IEEA.

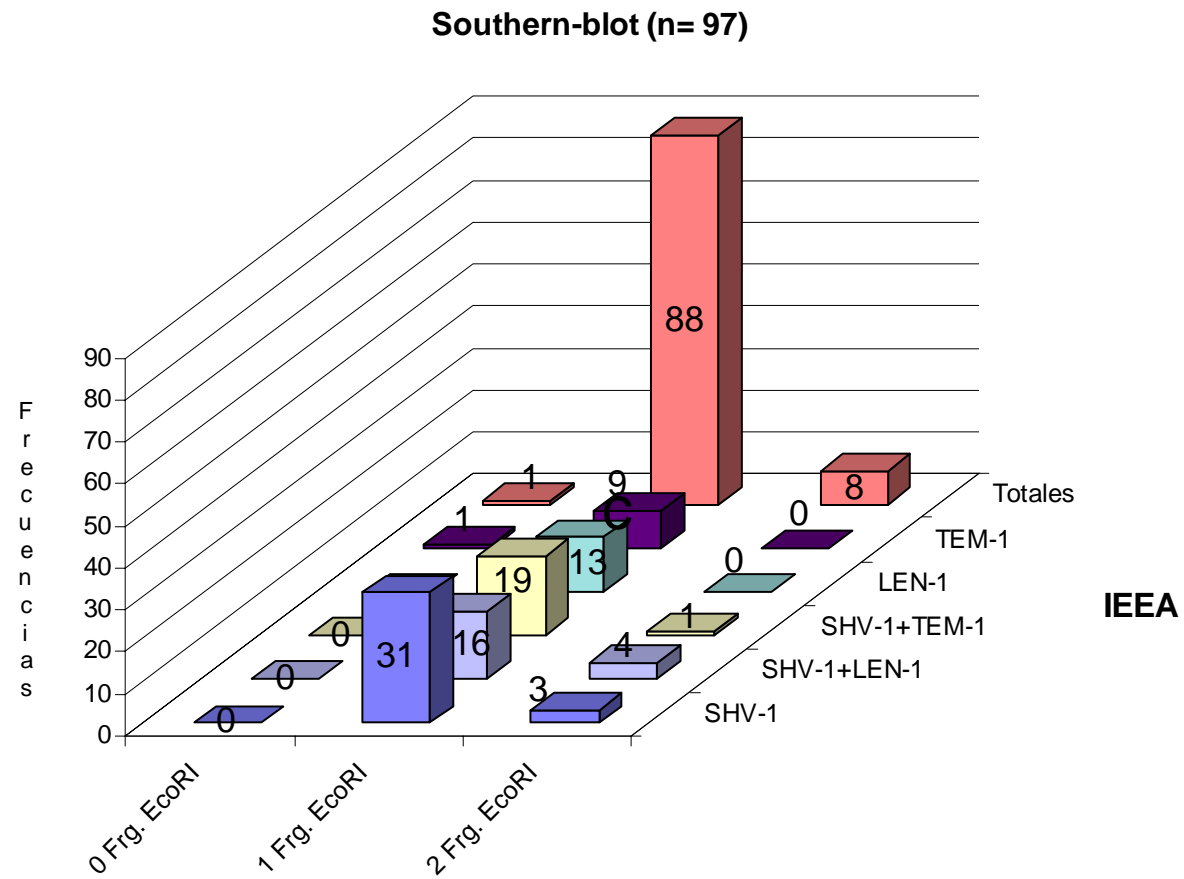


Figura 32. Análisis por RFLP-Southern-blot de los fragmentos EcoRI en las 97 cepas estudiadas y categorizadas según la información obtenida del resultado de la PCR para el gen *bla-SHV-1*.

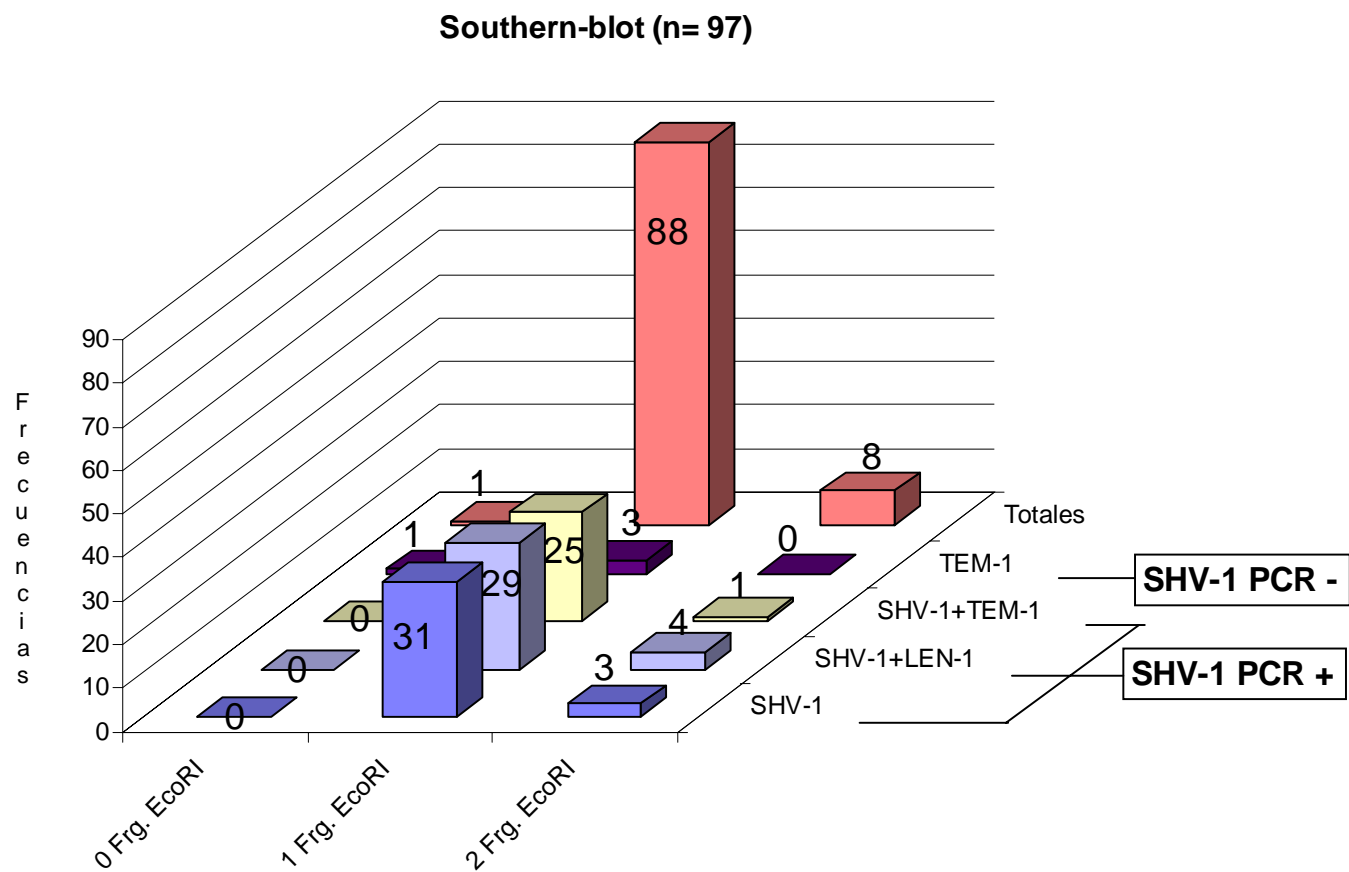


Figura 33. Tamaños de los fragmentos EcoRI identificados tras la hibridación con la sonda SHV-1₁₇₈ para detectar el gen *bla-SHV-1*.

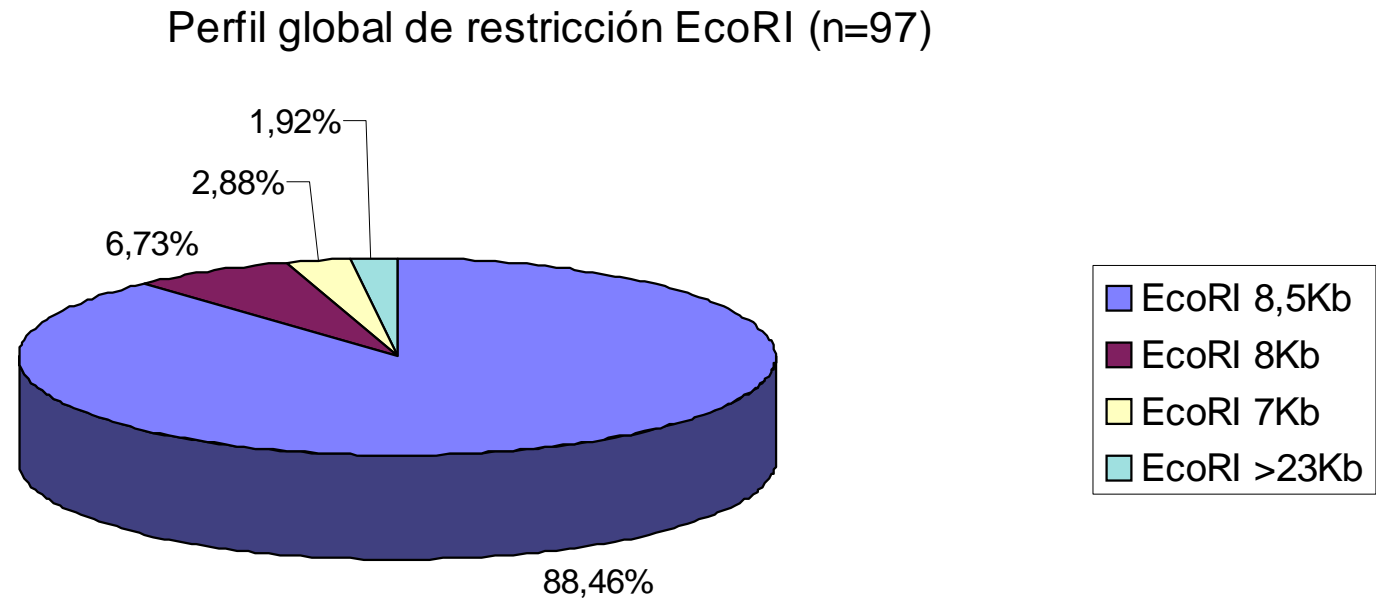


Figura 34. Número de cepas con fragmentos EcoRI identificados tras la hibridación con la sonda SHV-1₁₇₈ para detectar el gen *bla-SHV-1*.

Nº de cepas y fragmentos Eco RI (n=97)

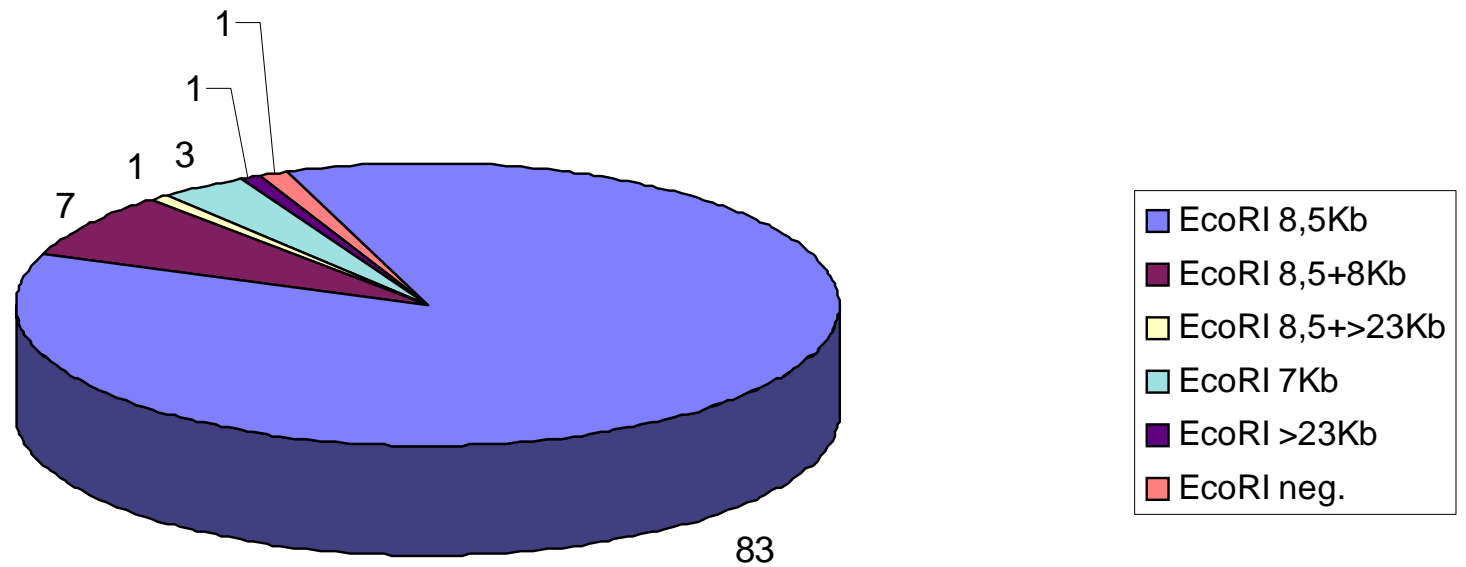


Figura 35. Distribución de los patrones de restricción en las 97 cepas estudiadas según el resultado del IEEA.

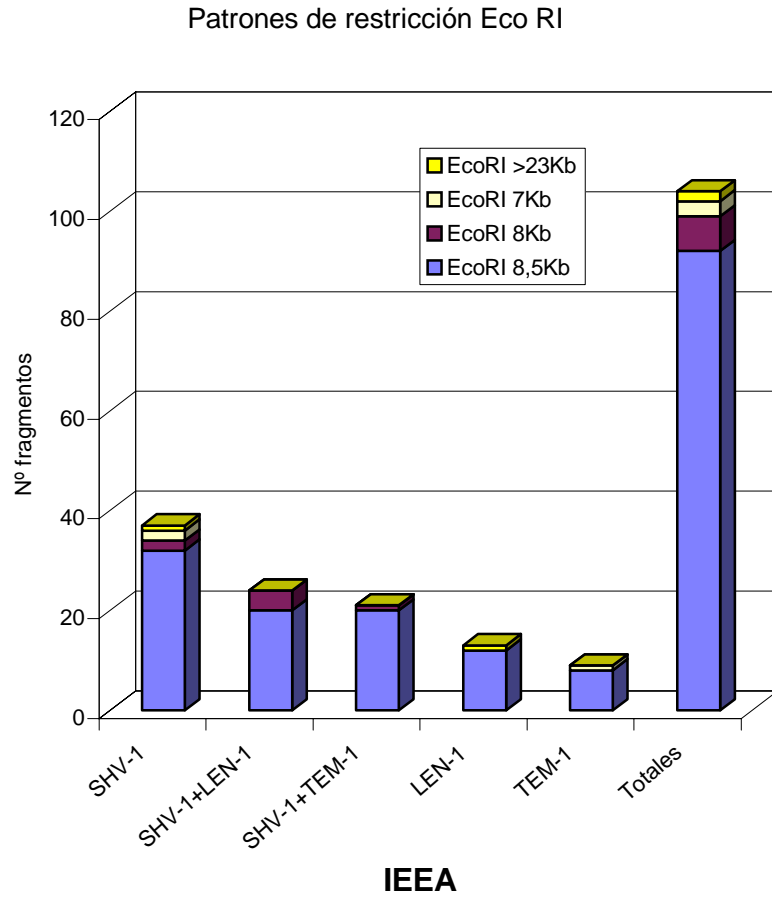


Figura 36. Distribución de los patrones de restricción en las 97 cepas estudiadas según el resultado de la PCR para SHV-1.

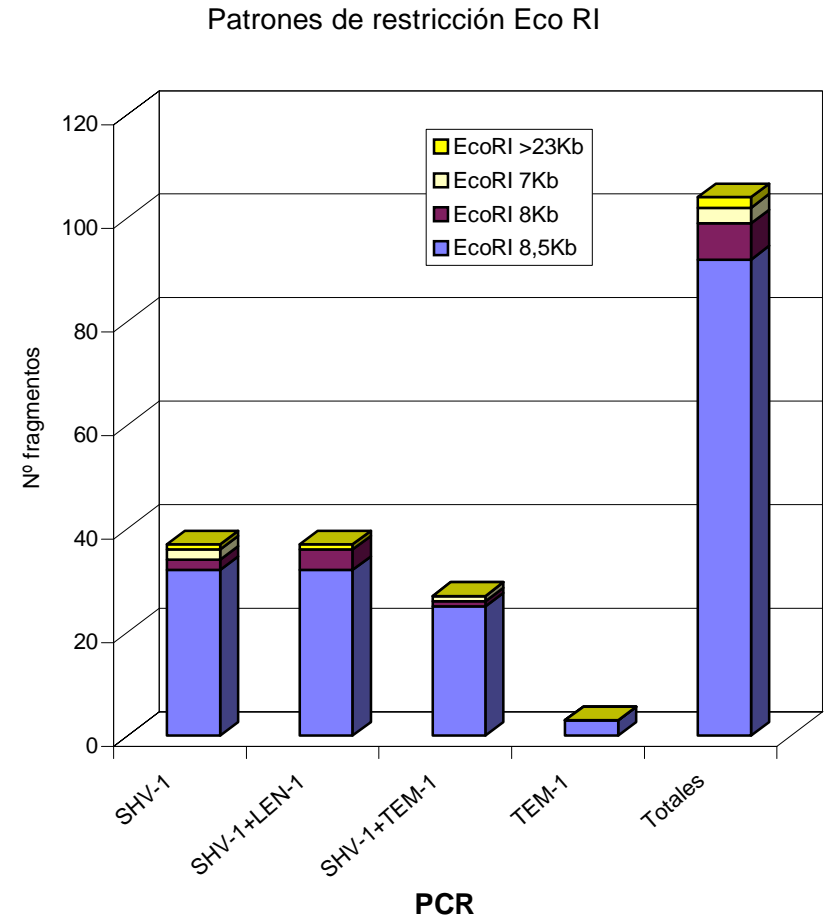
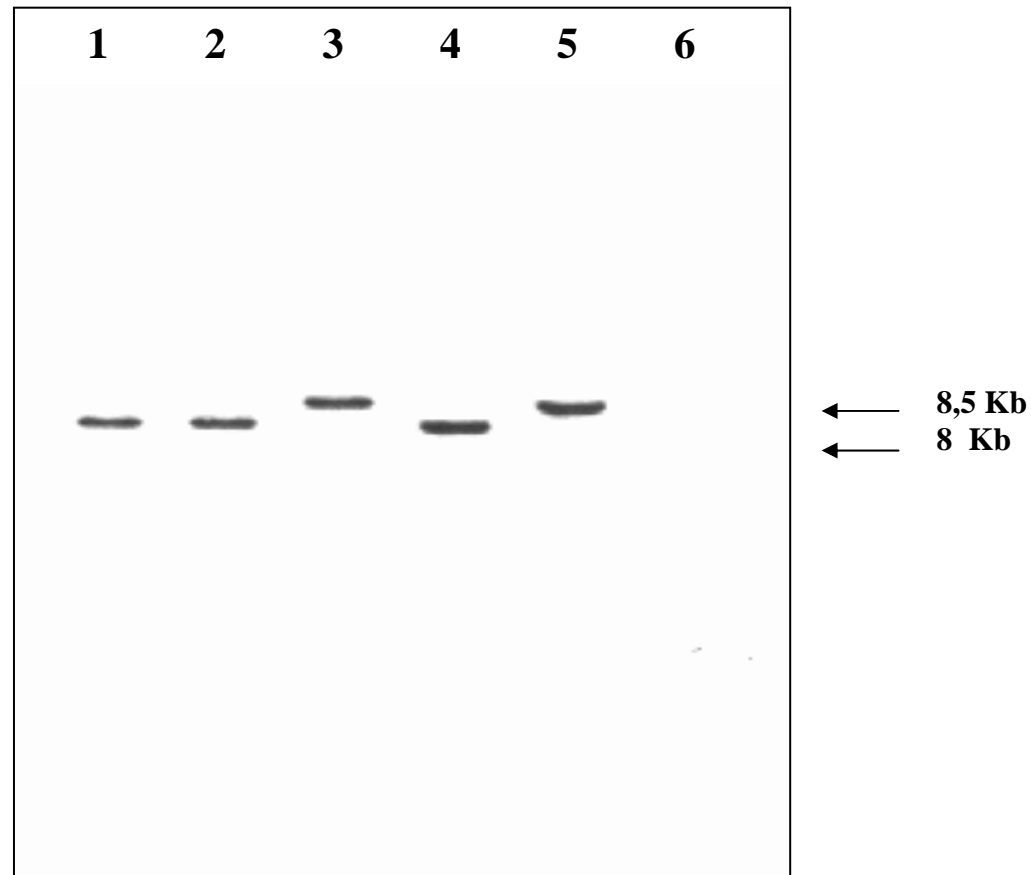
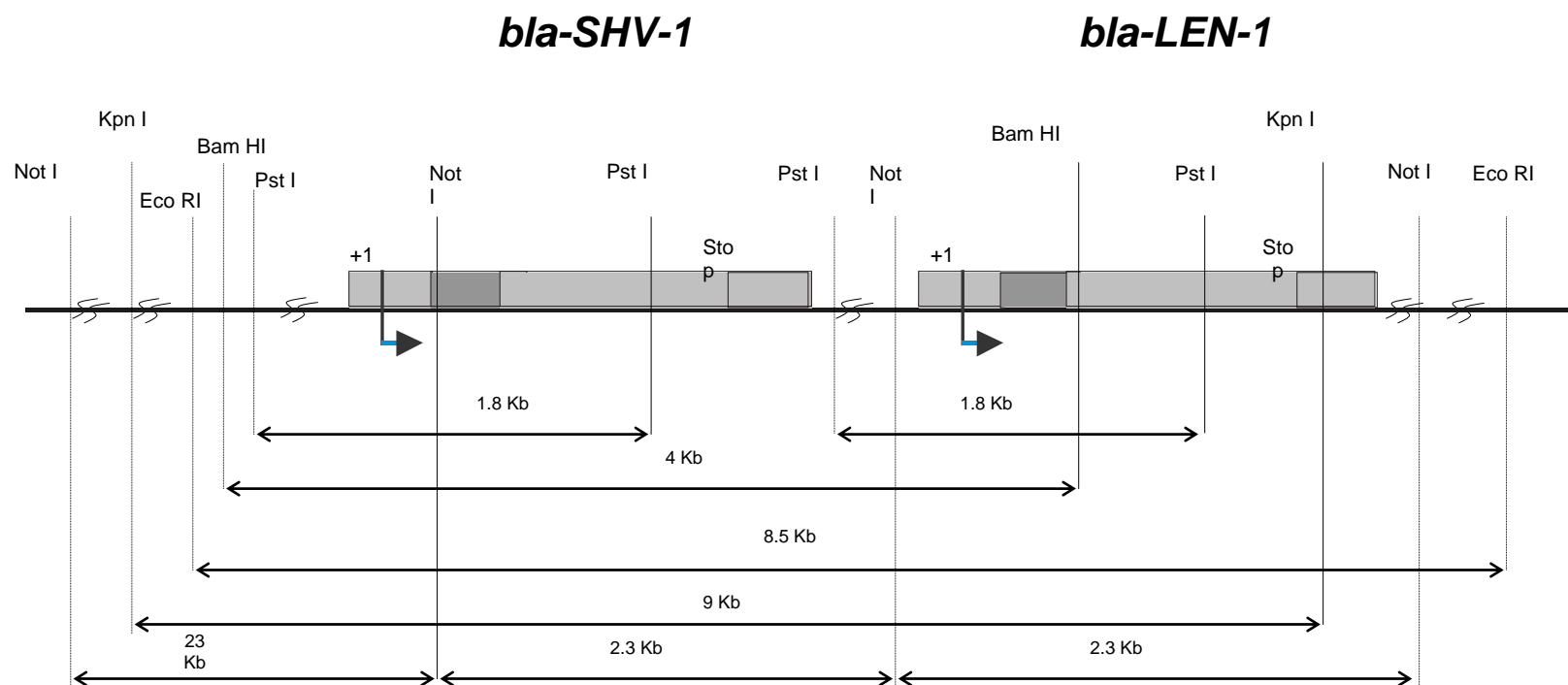


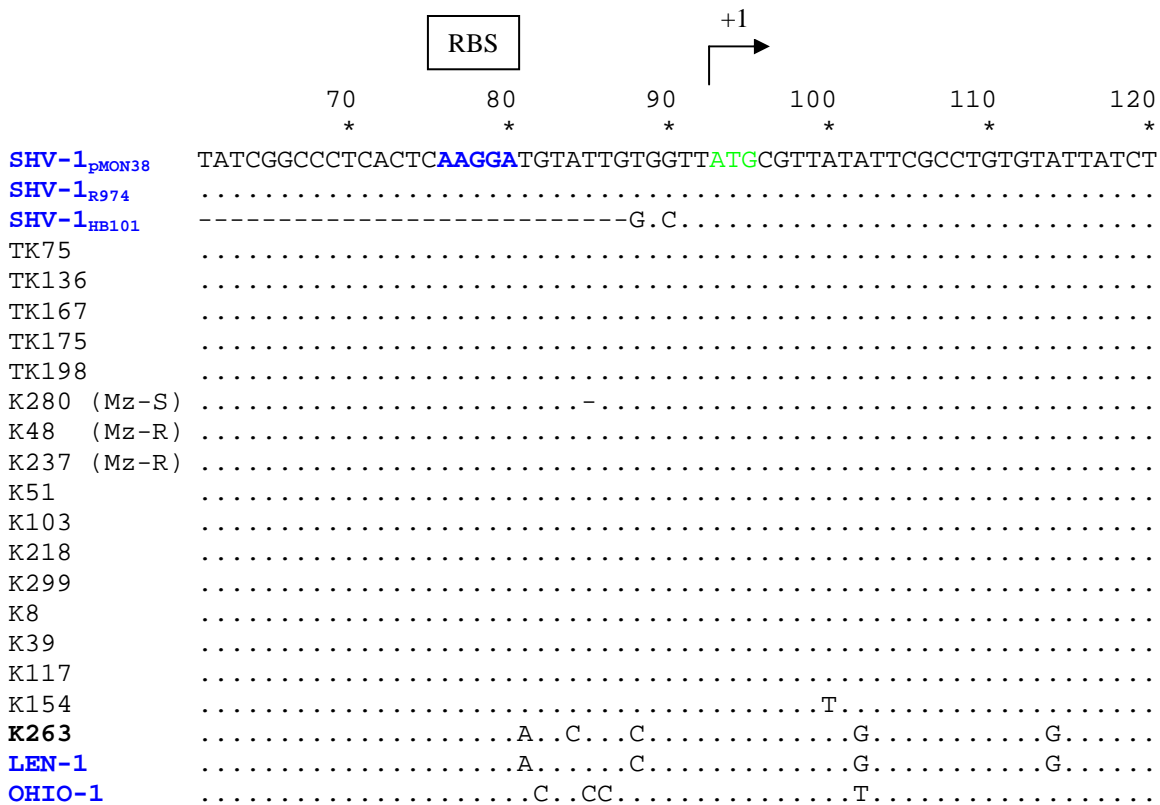
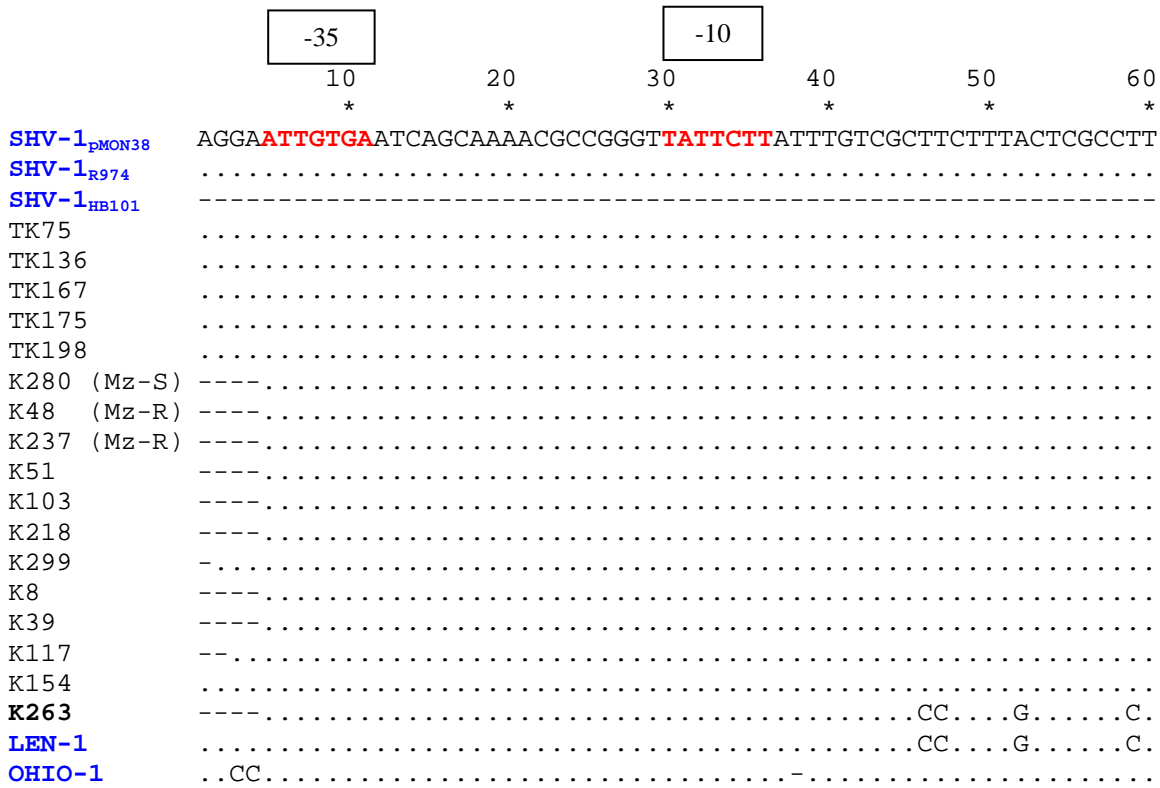
Figura 37. RFLP (EcoRI) Southern-blot del DNA plasmídico aislado de las cinco cepas transconjugantes e hibridado con la sonda SHV-1 marcada. Pocillos: 1. TK75 \perp EcoRI; 2. TK75 \perp EcoRI; 3. TK167 \perp EcoRI; 3. TK198 \perp EcoRI; 4. TK136 \perp EcoRI; 5. TK175 \perp EcoRI; 6. P72 (*E. coli* K12) empleado como control negativo. Las flechas horizontales indican los tamaños de los fragmentos de 8 y 8,5 Kb, respectivamente.



Esquema 1. Locus génico postulado de los genes codificantes para las β-lactamasas SHV-1 y LEN-1. En gris más oscuro se indica la posición dentro del gen donde hibridaría la sonda específica SHV₁₇₈. Las posiciones que ocupan las dianas para las enzimas de restricción se han señalado con línea continua (diana real) y discontinua (posición esperada); (+1) codón de inicio; Stop: codón de fin de transcripción.



ANEXO 1: LISTADO DE ALINEAMIENTOS COMPARATIVOS ENTRE LAS DIFERENTES SECUENCIAS DE DNA ESTUDIADAS.



	130	140	150	160	170	180
	*	*	*	*	*	*
SHV-1 _{pMON38}	CCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTA					
SHV-1 _{R974}					
SHV-1 _{HB101}					
TK75					
TK136					
TK167					
TK175					
TK198					
K280 (Mz-S)					
K48 (Mz-R)					
K237 (Mz-R)					
K51					
K103					
K218					
K299					
K8					
K39					
K117					
K154					
K263	A	G	G.T	A	G
LEN-1	A	T	T	G.T	A
OHIO-1		CG		G.A	

	Primer 3' de PCR				Not I	
	190	200	210	220	230	240
	*	*	*	*	*	*
SHV-1 _{pMON38}	AAC	TAAGCGAAAGCCAGCTGTCG	GGCCGCGTAGGCATGATAGAAATGGATCTGGCCA	GCG		
SHV-1 _{R974}					
SHV-1 _{HB101}					
TK75					
TK136					
TK167					
TK175					
TK198					
K280 (Mz-S)					
K48 (Mz-R)	A					
K237 (Mz-R)					
K51					
K103					
K218					
K299					
K8					
K39	A					
K117					
K154					
K263	A			G	G	G.G
LEN-1	A			G	G	G.G
OHIO-1		A			GC

VARI

Not I

Caja STFK

	250	260	270	280	290	300
	*	*	*	*	*	*
SHV-1_{PMON38}	GCCGCACGCTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCCCATGATGAGCACCTTTAAG					
SHV-1_{R974}					
SHV-1_{HB101}					
TK75					
TK136					
TK167					
TK175					
TK198					
K280 (Mz-S)					
K48 (Mz-R)					
K237 (Mz-R)					
K51					
K103					
K218					
K299					
K8					
K39					
K117					
K154					
K263G.....G.....					
LEN-1G.....G.....					
OHIO-1	C.G.....					

Primer 5' de PCR

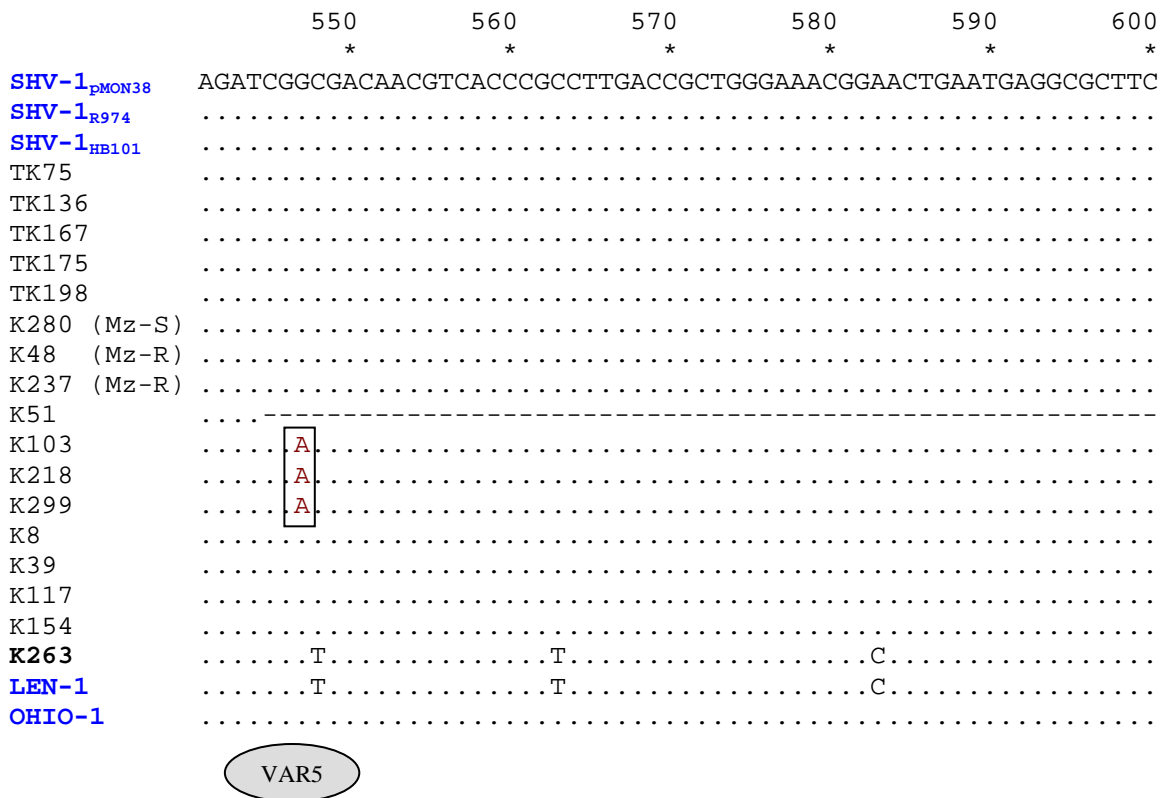
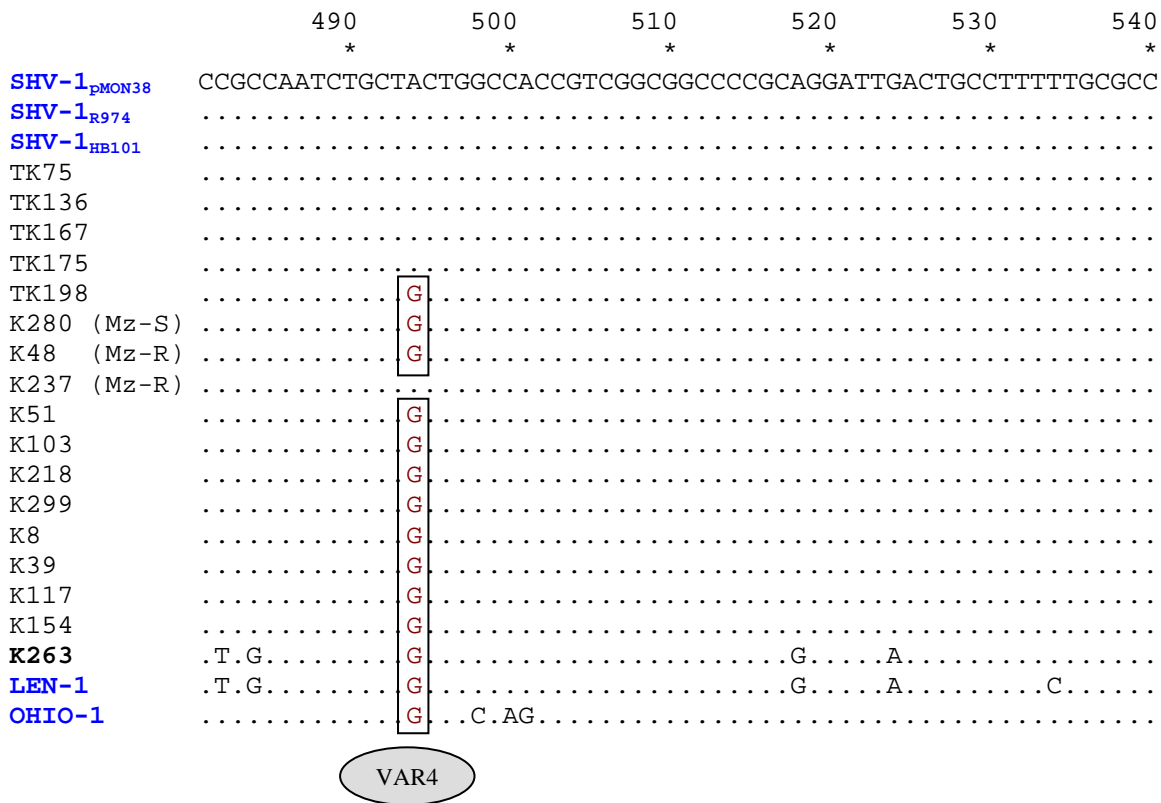
	310	320	330	340	350	360
	*	*	*	*	*	*
SHV-1_{PMON38}	TAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTGACGAACAGCTGGAGCGAA					
SHV-1_{R974}					
SHV-1_{HB101}					
TK75					
TK136					
TK167					
TK175					
TK198					
K280 (Mz-S)					
K48 (Mz-R)					
K237 (Mz-R)					
K51					
K103					
K218					
K299					
K8					
K39					
K117					
K154					
K263	.GC...G...G...A..G.T...A...T..GC					
LEN-1	.GC...G...G...GCT...A...T..GC					
OHIO-1GT.....					

	370	380	390	400	410	420
	*	*	*	*	*	*
SHV-1_{pMON38}	A	GATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCAGCGAAAAACACCTTG				
SHV-1_{R974}
SHV-1_{HB101}
TK75
TK136
TK167
TK175
TK198
K280 (Mz-S)
K48 (Mz-R)
K237 (Mz-R)
K51	T
K103	T
K218	T
K299	T
K8
K39
K117
K154	T
K263	G	C	C
LEN-1	G	C	C
OHIO-1	GA

VAR2

	430	440	450	460	470	480
	*	*	*	*	*	*
SHV-1_{pMON38}	CCGACGGCATGACGGTCGGCGAACTCTGCGCCGCCGCCATTACCATGAGCGATAACAGCG					
SHV-1_{R974}	CA
SHV-1_{HB101}
TK75
TK136
TK167
TK175
TK198
K280 (Mz-S)
K48 (Mz-R)
K237 (Mz-R)
K51	T
K103	T
K218	T
K299	T	T
K8	T
K39
K117	T
K154
K263	T	G	A
LEN-1	T	G	A
OHIO-1

VAR3



	610	620	630	640	650
	*	*	*	*	*
SHV-1_{pMON38}	CCGGCGACGCCCGCGACACC	ACTACCCCGGCCAGCATGG	CCCGCGACCCTGCGCAAG	CTG-	
SHV-1_{R974}					CG.TG
SHV-1_{HB101}					
TK75					
TK136					
TK167					
TK175					
TK198					
K280 (Mz-S)					
K48 (Mz-R)		T			
K237 (Mz-R)					
K51	-----				
K103					
K218					
K299					
K8					
K39		T			
K117					
K154					
K263		G		C	
LEN-1		G		C	
OHIO-1				G	CCG

VAR6

	660	670	680	690	700	710
	*	*	*	*	*	*
SHV-1_{pMON38}	--CTGACCAGCCAGCGTCTG	GAGCGCCCGTTTCGCAAC	CGGCAGCTGCTGCAGTGG	TGGTGG		
SHV-1_{R974}	GC					
SHV-1_{HB101}	--					
TK75	--					
TK136	--					
TK167	--					
TK175	--					
TK198	--					
K280 (Mz-S)	--					
K48 (Mz-R)	--					
K237 (Mz-R)	--					
K51	-----					
K103	--					
K218	--					
K299	--					
K8	--					
K39	--					
K117	--				A	
K154	--					
K263	--	GCG	A		A	A
LEN-1	--	GCG	A		A	A
OHIO-1	--					

	720	730	740	750	760	770
	*	*	*	*	*	*
SHV-1 _{pMON38}	ACGATCGGGT	CGCCGGACCG	TTGATCCGCT	CCTGCTGCCG	GGCGGGCTGG	TTTATCGCCG
SHV-1 _{R974}
SHV-1 _{HB101}
TK75
TK136
TK167
TK175
TK198
K280 (Mz-S)
K48 (Mz-R)
K237 (Mz-R)
K51	-----	-----	-----	-----	-----	-----
K103
K218
K299
K8
K39
K117
K154	A.....
K263	T.....	C.....	C.....	G.....	C.....
LEN-1	T.....	C.....	C.....	G.....	C.....
OHIO-1	GT.....

Caja KTG

	780	790	800	810	820	830
	*	*	*	*	*	*
SHV-1 _{pMON38}	ATAAGACCGG	AGCTGGCG	AGCGGGGT	GCGCGCGG	GATTGTGCG	CCCTGCTTGG
SHV-1 _{R974}
SHV-1 _{HB101}
TK75
TK136
TK167
TK175
TK198
K280 (Mz-S)
K48 (Mz-R)
K237 (Mz-R)
K51	-----	-----	-----	-----	-----	-----
K103
K218
K299
K8
K39
K117
K154
K263	.C.A.....	G.....	C.....G.CG
LEN-1	.C.A.....	G.....	C.....G.CG
OHIO-1

A
C

A
A
A
A
A
C
C

VAR7
VAR8

	840	850	860	870	880	890
	*	*	*	*	*	*
SHV-1 _{pMON38}	ACAAAGCAGAGCGCATTGTGGTGATTTATCTGCGGGATACCCCGGCGAGCATGGCCGAGC					
SHV-1 _{R974}					
SHV-1 _{HB101}					
TK75					
TK136					
TK167					
TK175					
TK198					
K280 (Mz-S)				G	
K48 (Mz-R)					
K237 (Mz-R)					
K51	-----					
K103					
K218				G	
K299				G	
K8					
K39					
K117				G	
K154C.....					
K263	G...C.G.....C.....T					
LEN-1	G...C.G.....C.....T					
OHIO-1G.....				G	

VAR9

	900	910	920	930	940	950
	*	*	*	*	*	*
SHV-1 _{pMON38}	GAAATCAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCTGATCGAGCACTGGCAACGCTAACCCG					
SHV-1 _{R974}AA.....TA.....					
SHV-1 _{HB101}AAGC					
TK75					
TK136					
TK167					
TK175					
TK198					
K280 (Mz-S)					
K48 (Mz-R)					
K237 (Mz-R)					
K51	-----					
K103					
K218					
K299					
K8					
K39					
K117					
K154					
K263	.T...A.T.....A					
LEN-1	.T...A.T.....-A					
OHIO-1C.G.....					

	1080	1090
	*	*
SHV-1_{PMON38}	AGGTAACGCCATAAACG-TGGC--C	
SHV-1_{R974}-.....CA.	
SHV-1_{HB101}	-----	
TK75-.....--	
TK136-.....--	
TK167-.....--	
TK175-.....--	
TK198-.....--	
K280 (Mz-S)-.....--	
K48 (Mz-R)	-----	
K237 (Mz-R)-.....--	
K51	-----	
K103-.....--	
K218-.....--	
K299-.....--	
K8-.....--	
K39-.....--	
K117	-----	
K154-.....--	
K263	-----	
LEN-1	G.....G.-.C..C-T	
OHIO-1G....CA.	

Nota:

Además de las 12 Variables Alélicas Repetidas (VAR), se indican: El centro activo (STKF), la triada KTG, así como las regiones promotoras -35 y -10 de la secuencia del gen. El lugar de unión del ribosoma se indica como RBS; el codon de inicio como +1 y una flecha. Se han incluido en un recuadro las secuencias empleadas como cebadores de PCR 3' y 5', así como la diana interna (Not I) a la región amplificada de 178 pb.

ANEXO 2: ALINEAMIENTOS COMPARATIVOS ENTRE LAS DIFERENTES SECUENCIAS PROTEÍNICAS DEDUCIDAS A PARTIR DE LAS SECUENCIAS DEL GEN *BLA-SHV-1* ANALIZADAS.

El grado de homología está referido a SHV-1prot_{pMON38}

Secuencia	Apareamiento	Total	Porcentaje
SHV-1prot _{R974}	281	286	98.25
SHV-1prot _{HB101}	286	286	100.00
TK75prot	286	286	100.00
TK136prot	286	286	100.00
TK167prot	286	286	100.00
TK175prot	286	286	100.00
TK198prot	286	286	100.00
K280prot (M-S)	286	286	100.00
K48prot (M-R)	285	286	99.65
K237prot (M-R)	286	286	100.00
K51prot	150	150	100.00
K103prot	285	286	99.65
K218prot	285	286	99.65
K299prot	284	286	99.30
K8prot	285	286	99.65
K39prot	284	286	99.30
K117prot	286	286	100.00
K154prot	285	286	99.65
K263prot	260	286	90.91
LEN-1prot	251	286	87.76
OHIO-1prot	270	286	94.41

