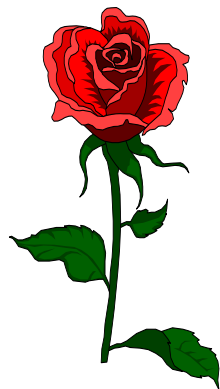


TESI DOCTORAL

**CARACTERITZACIÓ
DE L'ENTORN GENÈTIC DE LA
BETALACTAMASA CTX-M-9**

Aurora García Fernández

**Director:
Ferran Navarro Risueño**



*A mi madre, mi padre
y mi hermano Pedro
allá donde estén*

... El genoma es más bien un lugar extraño y absurdo en el que el cazador de genes ha de arreglárselas para ir tras el rastro de su presa. Intentar encontrar un gen es como ponerse en el papel de los héroes de El Corazón de las Tinieblas de Conrad o en el de los soldados de Apocalypse Now. Se parte muy contento de la desembocadura del río con una gran aventura por delante. Al internarse aguas arriba y complicarse las cosas con los nativos escabulléndose y poniendo trampas, uno empieza primero por no darse cuenta de nada y después acaba por corromperse. Al ponerse las cosas cada vez peor, uno se siente cansado e irascible y empieza a tomar represalias como los nativos y a multiplicar sus atrocidades. Al final se encuentra uno atascado en el infierno musitando "¡Qué horror!" y espera desesperadamente que alguien clone el gen y te saque fuera ...

"Cazadores de genes. La aventura del genoma"

Greg Germino

AGRAÏMENTS

Resumir en un par de pàgines los agradecimientos me resulta un poco frío, pero espero que mis palabras lleguen al corazón de las personas a las que me dirijo ya que gracias a ellas mi estancia en Sant Pau ha sido un periodo de mi vida que no olvidaré.

En primer lugar se encuentran Ferran i Eli, a los que podría llamar mis padres científicos, a ellos les debo toda mi formación en biología molecular, gracias a ellos he conseguido acabar este proyecto, gracias a su ayuda, consejos e indicaciones científicas, gracias por su paciencia, por haber leído y releído esta tesis, incluyendo los artículos que la componen. Pero ante todo y sobretodo os agradezco Ferran y Eli vuestra humanidad, ya que en estos cuatro años de doctorado he pasado por momentos realmente duros, momentos en los que se necesita que te echen una mano, en esos momentos me habéis dado vuestro apoyo e ayuda incondicional, vuestra amistad, e incluso a veces hasta vuestro hombro, esto es algo de lo que os estaré siempre agradecida. Gracias de corazón.

En segundo lugar se encuentra mi "segundo hogar", por llamarlo de alguna manera, la primera planta del pre-fabricado número 17, también llamada "Recerca de Microbiología", allí como una pequeña familia se encuentra un grupo de personas que siempre recordaré.

A Montse Rebollo, que aún y llegar posteriormente al laboratorio, ha resultado ser más que una compañera de trabajo, una verdadera amiga. A ti Montse, gracias por tu apoyo y ayuda, gracias por tu amistad, gracias por tu dulzura, por ser como eres, una gran investigadora y una bellísima persona.

A Laura y Montse Espanyol agradecerles sobretodo mi inserción en la vida cotidiana de un laboratorio, por ayudarme a entender todos aquellos aparatos que para mi eran completamente desconocidos, gracias por vuestra ayuda y por vuestra amistad. También agradecer a Raúl y Zoraida por la alegría que aportaron en el día a día del laboratorio y a Paquita por su ayuda científica y amistad. Mencionar también a las "vecinas" de la sección de serología, Sofia, Mercé, Julia y Glòria porque sin ellas la primera planta del prefabricado 17 no sería lo mismo.

Y saliendo del prefabricado número 17 y bajando la "montañita", a mano derecha, se encuentra la segunda planta del edificio número 7, también llamada Microbiología. Allí tengo que agradecer a cada una de las personas que integran cada sección por todo lo que aprendí de ellas nada más llegar a este Hospital para realizar la última asignatura de mi licenciatura. En aquel entonces el servicio de Microbiología estaba a cargo del Dr. Guillem Prats al cual agradezco su acogida y del que aprendí que es necesario tener siempre en mente el cómo y el porqué de cada prueba experimental que se realiza.

Y como no, la sección de Antibióticos, donde entonces se encontraba Carme Roig, gracias Carme por tu cariño y amistad, por tu preocupación y simpatía, por tu apoyo en los momentos difíciles, gracias por todo. También a ti Alba, por la alegría que te caracteriza y que contagias a la gente que te rodea, incluyéndome a mi. Gracias a ti Lina por tu ayuda en los últimos trámites burocráticos de la tesis. También agradecer a la Dra. Beatriz Mirelis por su ayuda y consejos científicos, pero también, gracias Bea, por tu cariño y dulzura. Y por último, agradecer al Dr. Pere Coll por la confianza depositada en mi en estos últimos años, por la paciencia en revisar esta tesis y sus artículos y por aconsejarme científicamente.

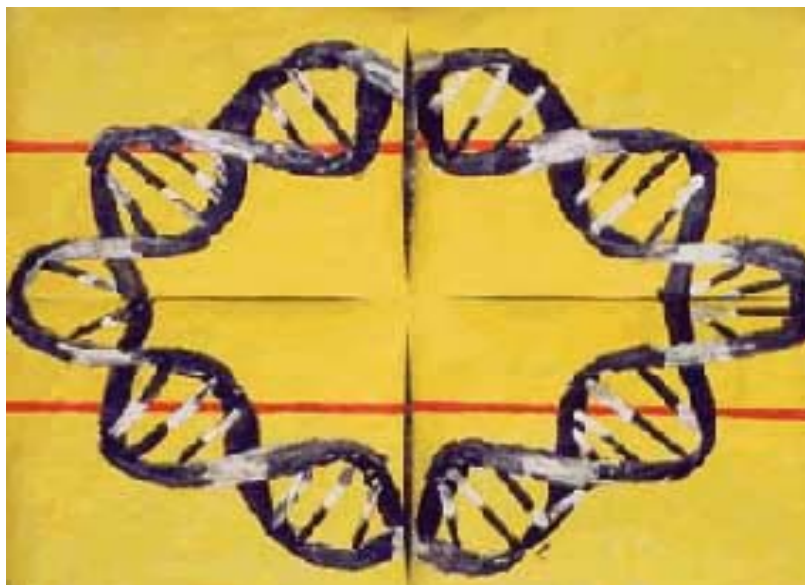
Y saliendo del edificio 7 del Hospital de la Santa Creu y Sant Pau, y cogiendo los ferrocarriles, en el Departamento de Genética y Microbiología de la UAB, tengo que agradecer a los grupos del Dr. Jordi Barbé y Dra. Montserrat Llagostera y especialmente a Vanesa Blanc, Pilar Cortés y Susana Campoy por toda la ayuda que me ofrecieron a la hora de entender un poco mejor el apasionante mundo de los plásmidos.

Y cogiendo el avión, hasta llegar a Roma, en la via Regina Elena 299 se encuentra el "Istituto Superiore di Sanità" y en el piano E, stanza 23, se encuentra la Dra. Alessandra Carattoli y la Dra. Ida Luzzi y todo su grupo, Alessia Bertini, Laura Villa, Ana Maria Dionisi, Ildo, Saverio, Claudia, Emma, Sergio, ... a todos ellos les agradezco su ayuda en el último período de realización de esta tesis sin la cual no hubiera podido acabarla, gracias por vuestra ayuda científica y humana, gracias por hacer que me sintiera integrada en el laboratorio desde el primer día en que llegué y especialmente a ti Ale, gracias por todo.

Y finalmente y fuera del ámbito científico-laboral, agradecer a mis amigas/os, Mun, Elena, Ana, Maite, Eva, Eri, Nuri, Ricard, Rafa, ... por estar ahí.

*Agradecer sobretodo a mi familia,
A los que están: a mi hermano Jerónimo y a mi cuñada preferida Tere por apoyarme en los momentos difíciles y animarme a seguir adelante con el doctorado. Y a mis sobrinos Lluís y Joan, por su alegría y frescura.
Y a los que no están: a ti mamá por haberme querido siempre tanto, a ti Pedro porque estuviste a mi lado en todo momento y a ti papá porque sé que hubieras estado orgulloso de mi al verme acabar esta tesis.*

E a la fine ti ringrazio a te, Antonio, per essere come sei, per essere vicino a me nei bruti momenti, per amarmi cosi, perché senza di te sarebbe stato tanto difficile... Ti amo.



"Drapeau génomique" Jaques Deshaies

ÍNDEX

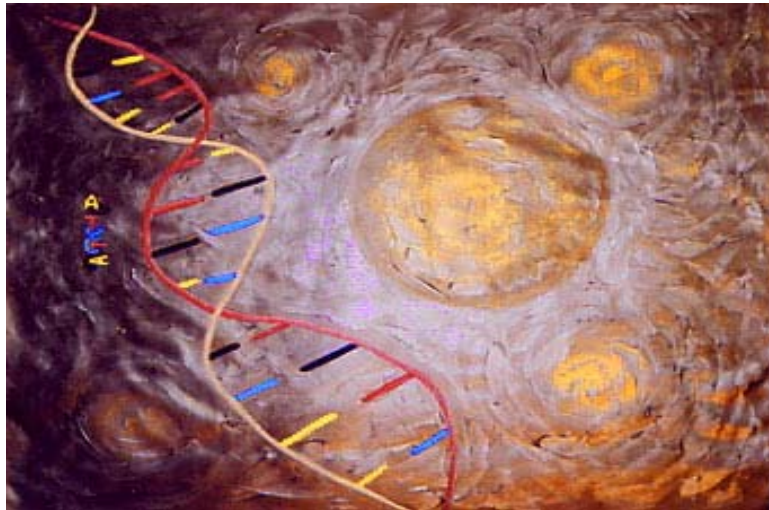
0. Resum / Resumen / Summary	1
1. Introducció	9
1.1. Els Enterobacteris	11
1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	12
1.2. Mecanismes de resistència	13
1.3. Adquisició de resistència	17
1.3.1. Transformació	18
1.3.2. Transducció	19
1.3.2.1. Bacteriòfags	19
1.3.2.2. Transducció generalitzada	20
1.3.2.3. Transducció especialitzada	21
1.3.3. Conjugació	23
1.4. Elements mòbils	26

1.4.1. Plasmidis	27
1.4.2. Seqüències d'inserció	31
1.4.3. Transposons	32
1.4.4. Illes genòmiques	33
1.5. Integrons	34
1.6. Antibiòtics betalactàmics	38
1.7. Betalactamases	42
1.8. Betalactamases de la família de les CTX-M	47
1.9. L'enzim CTX-M-9	51
1.10. Incidència de CTX-M-9 a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau	52
2. Objectius	55
3. Resultats i Discussió	59
3.1. Selecció de les soques a estudiar	61
3.2. Estudi de la clonalitat	62
3.3. Conjugacions	65
3.4. Estudi dels plasmidis portadors del gen <i>bla</i> _{CTX-M-9}	66
3.5. Estudi de l'entorn genètic del gen <i>bla</i> _{CTX-M-9}	72
3.6. Caracterització plasmídica	79
3.7. Rep <i>typing</i> PCR	80
3.8. Digestió del DNA total amb l'enzim <i>Bgl</i> I	81
3.9. Estudi dels plasmidis portadors del gen <i>bla</i> _{CTX-M-9}	82
3.10. Implicació dels bacteriòfags en la difusió dels gens que codifiquen betalactamases	86
3.10.1. Extracció DNA fàgic	86
3.10.2. Detecció de la presència de betalactamases mitjançant PCR	88
4. Conclusion s / Conclusiones / Conclusions	91

5. Annexes	99
5.1. Annex 1 “Characterisation of the highly variable region surrounding the <i>bla</i>_{CTX-M-9} gene in non-related <i>Escherichia coli</i> from Barcelona”	103
5.2. Annex 2 “Acquisition and diffusion of <i>bla</i>_{CTX-M-9} gene by an R478-IncHI2 derivative plasmid”	113
5.3. Annex 3 “Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes”	139
6. Bibliografia	145

◆ 2 ◆

◆ ◆



" Gene saga " Jaques Deshaies

0. RESUM

Les betalactamases CTX-M formen una família d'enzims d'espectre ampliat capaços d'hidrolitzar tots els betalactàmics amb l'excepció de l'associació amoxicilina-àcid clavulànic, les cefamicines i els carbapenems. Al 1996, fruit d'un estudi sobre la incidència de BLEAs al nostre entorn, va ser aïllada al nostre laboratori una soca portadora d'una nova betalactamasa, la CTX-M-9. Es va estudiar l'entorn genètic del gen *bla*_{CTX-M-9} i s'observà que es trobava formant part de l'integró complex de classe 1, In60. La incidència d'aquest enzim va augmentar durant el període 1996-1999 i ens vam plantejar esbrinar el per què d'aquest fet. A partir dels coneixements previs comentats, hipotetitzarem que el gen que codifica la betalactamasa CTX-M-9 es trobava en un plasmidi conjugatiu que possiblement hauria difós per diferents clons bacterians. A més, molt probablement aquest gen podria trobar-se en algun element mòbil, tipus transposó, que encara afavorís més aquesta difusió. Per altra banda i donat que els bacteriòfags són un dels vehicles més eficients a l'hora de transferir fragments de DNA entre les cèl·lules, volíem esbrinar també el seu paper en l'increment dels nivells de resistència, particularment en gramnegatius, durant els últims anys.

Donat que el coneixement precís del possible vector que porta el gen *bla*_{CTX-M-9} pot ajudar a entendre la ràpida difusió i prevalença d'aquesta betalactamasa al nostre país i preveure la seva futura difusió, es va realitzar un estudi exhaustiu en 33 *Escherichia coli* i 4 *Salmonella enterica* portadores d'aquest gen, aïllades en el període 1996-1999.

La relació clonal entre les soques es descartà mitjançant estudis de macrorestricció genòmica amb l'enzim de baixa freqüència de tall *Xba*I. Posteriorment, s'estudià l'estructura de

l'integró In60 en totes les soques de l'estudi, observant-se que existia una ampla variació de la mateixa. Un terç de les soques presentaven deleccions i/o insercions (*IS_{Ect8}*, *IS₂₆*, *aadA2* parcial) dintre de l'integró In60, per tant, aquest element genètic portador del gen *bla* semblava no ser una estructura estable sinó susceptible a patir variacions.

Posteriorment, es varen estudiar els perfils plasmídics i es va determinar el grup d'incompatibilitat d'aquests, mitjançant rep *typing* i mitjançant la digestió amb l'enzim *S1*, campulsat, *southern-blot* i hibridació amb sondes específiques pels diferents grups d'incompatibilitat. S'observà com el gen *bla_{CTX-M-9}* es trobava en un plasmidi del grup d'incompatibilitat HI2 derivat del plasmidi de referència R478, en totes les soques menys en dues. En aquestes dues soques, el gen *bla_{CTX-M-9}* es trobava en un plasmidi repFIB, i en un repFII. Una de les soques de l'estudi presentava el gen *bla* al cromosoma.

L'amplia difusió d'aquest gen en un curt període de temps, la no clonalitat de les soques portadores d'aquest, junt amb la seva localització en diferents estructures genètiques, tant plasmídiques com cromosòmiques, fa pensar que està situat en un element mòbil, en un transposó.

La gran majoria d'estudis relacionats amb la difusió de gens de resistència a antimicrobians es realitzen principalment en soques aïllades de mostres clíniques, on s'estudien els diferents elements mòbils com a vehiculadors dels gens de resistència. Els elements mòbils estudiats amb més freqüència han estat els plasmidis, juntament amb els transposons i els integrons. És per això que ens plantejarem determinar quin paper podien jugar els bacteriòfags en la difusió de les resistències als antimicrobians.

Aquest estudi es realitzà a partir de l'anàlisi de nou mostres d'aigües residuals, tant humanes (cinc mostres) com animals (tres mostres), amb el propòsit de determinar els bacteriòfags presents en elles com a possibles vehiculadors de gens de resistència a betalactàmics.

L'estudi es va dur a terme mitjançant l'amplificació per PCR d'un ampli ventall de betalactamases d'interès clínic, a partir del DNA aïllat de les partícules víriques purificades de les mencionades aigües residuals. Els resultats varen demostrar la presència de seqüències dels gens *bla_{OXA-2}*, *bla_{PSE-1/4}* i *bla_{PSE}*-relacionada, en l'interior de les partícules víriques.

Els bacteriòfags són, per tant, un vehicle transportador de gens bacterians que es troba al medi ambient que ens envolta i que no podem subestimar.

0. RESUMEN

Las betalactamasas CTX-M forman una familia de enzimas de amplio espectro capaces de hidrolizar todos los betalactámicos con la excepción de la asociación amoxicilina-ácido clavulánico, las cefamicinas y los carbapenemas. En el 1996, fruto de un estudio sobre la incidencia de BLEAs en nuestro entorno, se aisló en nuestro laboratorio una cepa portadora de una nueva betalactamasa, la CTX-M-9. Se estudió el entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-9} y se observó que se encontraba formando parte del integrón complejo de clase 1, In60. La incidencia de esta enzima aumentó durante el período 1996-1999 por lo que nos planteamos investigar el porqué de este suceso. A partir de los conocimientos previos comentados, hipotetizamos que el gen que codifica la betalactamasa CTX-M-9 se encontraba en un plásmido conjugativo que posiblemente habría difuso entre diferentes clones bacterianos. Además, probablemente este gen podría estar situado en algún elemento móvil, tipo transposón, que favoreciera aun más esta difusión. Asimismo y dado que los bacteriófagos son uno de los vehículos más eficientes a la hora de transferir fragmentos de DNA entre las células, nos propusimos investigar cuál era su papel en el incremento de los niveles de resistencia a antimicrobianos, particularmente en gramnegativos, durante los últimos años.

Dado que el conocimiento preciso del posible vector que transporta el gen *bla*_{CTX-M-9} puede ayudar a entender la rápida difusión y prevalencia de esta betalactamasa en nuestro país y prevenir su futura difusión, se realizó un estudio exhaustivo en 33 *Escherichia coli* y 4 *Salmonella enterica* portadoras de este gen, aisladas en el período 1996-1999.

La relación clonal entre las cepas se descartó mediante estudios de macrorestricción genómica con la enzima de baja frecuencia de corte *XbaI*. Posteriormente, se estudió la estructura del integrón In60 en todas las cepas del estudio, observándose que existía una amplia variación de la misma. Un tercio de las cepas presentaban deleciones y/o inserciones (*ISEc8*, *IS26*, *aadA2* parcial) dentro del integrón In60, por lo tanto, este elemento génico portador del gen *bla* parecía no ser una estructura estable sino susceptible a sufrir variaciones.

Posteriormente, se estudiaron los perfiles plamídicos y se determinó el grupo de incompatibilidad de estos, mediante rep *typing* y mediante digestión con la enzima *SI*, campo pulsate, *southern-blot* e hibridación con sondas específicas para los diferentes grupos de incompatibilidad. Se observó como el gen *bla*_{CTX-M-9} estaba situado en un plásmido del grupo de incompatibilidad HI2 derivado del plásmido de referencia R478, en todas las cepas menos en dos. En estas dos cepas, el gen *bla*_{CTX-M-9} se situaba en un plásmido repFIB y en un repFII. Una de las cepas del estudio presentaba el gen *bla* en el cromosoma.

La amplia difusión de este gen en un corto período de tiempo, la no clonalidad de las cepas portadoras de éste, junto con la localización en diferentes estructuras génicas, tanto plasmídicas como cromosómicas, hace pensar que está situado en un elemento móvil, en un transposón.

La gran mayoría de estudios relacionados con la difusión de genes de resistencia a antimicrobianos se realizan principalmente en cepas aisladas de muestras clínicas, en las que se estudian los diferentes elementos móviles como vehiculadores de los genes de resistencia. Los elementos móviles estudiados con más frecuencia han sido los plásmidos, juntamente con los transposones y los integrones. Por esta razón nos planteamos determinar cuál era el papel que jugaban los bacteriófagos en la difusión de las resistencias a los antimicrobianos.

Este estudio se realizó a partir del análisis de nueve muestras de aguas residuales, tanto humanas (cinco muestras) como animales (tres muestras), con el propósito de determinar los bacteriófagos presentes en ellas como posibles vehiculadores de genes de resistencia a betalactámicos.

El estudio se realizó mediante la amplificación por PCR de un amplio abanico de betalactamasas de interés clínico, a partir del DNA aislado de las partículas víricas purificadas de las aguas residuales mencionadas. Los resultados demostraron la presencia de secuencias de los genes *bla*_{OXA-2}, *bla*_{PSE-1/4} y *bla*_{PSE}-relacionada, en el interior de las partículas víricas.

Los bacteriófagos son, por lo tanto, un vehículo transportador de genes bacterianos que se encuentra en el medio ambiente que nos rodea y que no podemos subestimar.

0. SUMMARY

The CTX-M families are extended-spectrum beta-lactamase enzymes (ESBL) that hydrolyse all beta-lactams with the exception of the amoxicillin-clavulanic association, cephamycin and carbapenem. In 1996, in the context of a ESBLs study at our hospital, a strain carrying a new beta-lactamase, the CTX-M-9, was isolated. When the surrounding region of the *bla*_{CTX-M-9} gene was studied, it was observed that it was located in a novel-complex *sul1* integron, the In60. In the 1996-1999 period, the incidence of this enzyme was higher and we decided to investigate the reasons for this. We assumed that this *bla*_{CTX-M-9} gene was located in a conjugative plasmid and that the gene had probably spread between different strains. Moreover, this gene would be included within a mobile element such as transposons that could contribute to its diffusion. Finally, as the bacteriophages play an important role in the diffusion of DNA fragments between cells we decided to study whether they, are involved in the diffusion of beta-lactamases.

Knowledge of the possible vector that carries the *bla*_{CTX-M-9} gene could help to understand and prevent its rapid diffusion and high prevalence in Barcelona. An exhaustive study was performed with 33 *Escherichia coli* and 4 *Salmonella enterica* carrying this gene, isolated during 1996-1999.

The clonal relationship between the strains was disregarded by macrorestriction studies using the *XbaI* enzyme. The In60 structure was later studied in all strains, detecting a high variability. One third of the strains showed a deletion and/or insertion (*ISEc8*, *IS26*, *aadA2* partial) within the In60 integron. Accordingly, this genetic element that contains the *bla* gene seems to be an unstable structure.

We then studied the plasmid pattern using the ep typing method and southern-blot of PFGE digested with S1. The membranes obtained were hybridised with specific probes from the different incompatibility groups. In all but two strains the *bla*_{CTX-M-9} gene was found in a plasmid belonging to the HI2 incompatibility group, which derived from the R478 reference plasmid. In one of the two remaining strains, the *bla*_{CTX-M-9} gene was found in a plasmid belonging to the IncFIB and in the other it was found in the IncFII incompatibility group. In another strain, however, it was found in the chromosome.

The extended diffusion of this gene in a short period of time, the non-clonal relationship between the strains carrying this gene, and their presence in different genetic

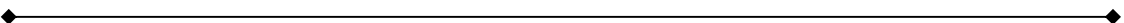
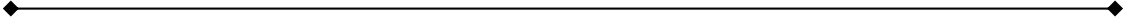
structures, plasmidical or chromosomal, reinforce the hypothesis that this gene was located in a mobile genetic element, such as a transposon.

Most studies based on antimicrobial resistance, particularly the mobility of the resistance genes, were made using clinical strains. The mobile genetic elements most studied to date are plasmids, transposons and integrons, but bacteriophages provide one of the most efficient vehicles for moving DNA sequences between bacterial cells.

We therefore evaluated the presence of various beta-lactamase genes within the bacteriophages in five residual humans sewage samples and in three residual animal sewage samples by PCR. Different primers were used in order to amplify the beta-lactamases of most interest in a clinical context. The results showed the occurrence of phage particles carrying sequences of *bla*_{OXA-2}, *bla*_{PSE-1/4} and *bla*_{PSE}-related genes. Phages may therefore contribute to the spread of some beta-lactamases genes.



1. INTRODUCCIÓ





Escherichia coli (<http://www.genomenetwork.org>)

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Els enterobacteris

La **família *Enterobacteriaceae*** està formada per diferents espècies de bacils gramnegatius, heterogenis pel que fa al seu hàbitat i a la seva capacitat patogènica, però que comparteixen semblances en els seus caràcters estructurals, fisiològics i en la seva homologia genètica.

En l'actualitat, la nomenclatura i classificació de la família *Enterobacteriaceae* està canviant, ja que amb la introducció de noves tècniques genètiques s'estan descrivint noves espècies i per tant es fa necessària una continua re-classificació dels microorganismes que la integren. Actualment (Octubre 2005) trobem 47 gèneres classificats (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy) :

<i>Alterococcus</i>	<i>Aquamonas</i>	<i>Aranicola</i>	<i>Arsenophonus</i>	<i>Brenneria</i>
<i>Buchnera</i>	<i>Budvicia</i>	<i>Buttiauxella</i>	<i>Candidatus Phlomobacter</i>	<i>Cedecea</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Dickeya</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Erwinia</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Ewingella</i>	<i>Grimontella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>Kluyvera</i>	<i>Leclercia</i>	<i>Leminorella</i>	<i>Moellerella</i>	<i>Morganella</i>
<i>Obesumbacterium</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Pectobacterium</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Plesiomonas</i>
<i>Pragia</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Rahnella</i>	<i>Raoultella</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Samsonia</i>	<i>Serratia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Sodalis</i>
<i>Tatumella</i>	<i>Tiedjeia</i>	<i>Trabulsilla</i>	<i>Wigglesworthia</i>	<i>Xenorhabdus</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Yokenella</i>	Altres enterobacteris no classificats		

Els gèneres d'enterobacteris que s'aïllen amb més freqüència en un laboratori de microbiologia clínica són *Escherichia* i *Klebsiella* seguides d'*Enterobacter*, *Citrobacter* i les diferents espècies del grup *Proteus-Morganella-Providencia*. Totes les espècies pertanyents a aquests gèneres són microorganismes que causen infecció oportunista en l'home (amb l'excepció d'alguns serotips d'*Escherichia coli* que són enteropatògens). Per altra banda, es troba tot un altre grup d'enterobacteris, patògens primaris per l'home, com les salmonel·les, les shigel·les i les yersínies que causen infecció gastrointestinal per diferents mecanismes (invasius, toxigènics) o infecció septicèmica com les febres tifoïdes o paratifoïdes (*Salmonella enterica* serovar Typhi i Paratyphi) o la pesta (*Yersinia pestis*) (99).

1.1.1 *Escherichia coli*

E. coli fou descoberta al 1885 per Theodor Escherich, qui l'anomenà inicialment *Bacterium coli*. Al 1947, Kauffmann proposà una forma de diferenciar les soques d'*E. coli* segons la determinació dels antigens superficials O (somàtics), K (capsulars) i H (flagel·lars). Aquesta forma de classificació serològica resultà molt útil als estudis epidemiològics i de patogènesi d'*E. coli*, facilitant la diferenciació entre soques virulentes i no virulentes.

E. coli és un bacil gramnegatiu, anaeròbic facultatiu, capaç de realitzar un metabolisme respiratori o fermentatiu. És l'espècie predominant de la flora normal aeròbia i anaeròbia facultativa del tub digestiu a la majoria dels mamífers, i s'elimina per la femta a l'exterior. Més de deu serotips diferents poden coexistir al mateix individu. Pot trobar-se al medi ambient ja que és capaç de sobreviure durant un cert temps a l'aigua i als aliments, de manera que el seu aïllament és un indicador de contaminació fecal recent.

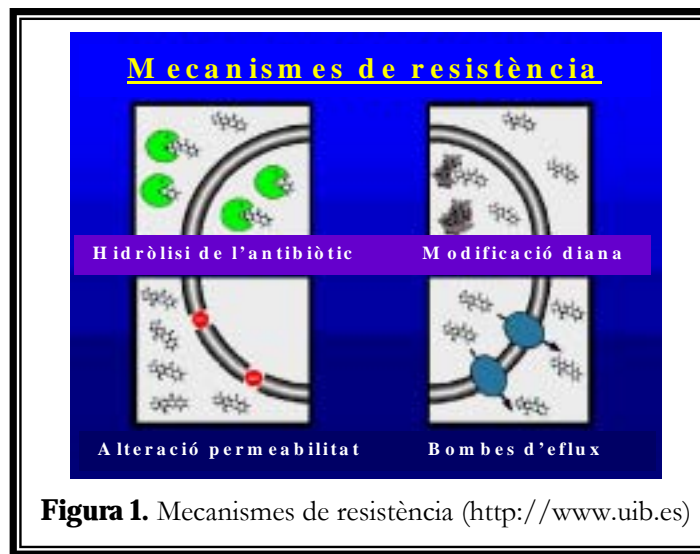
Si bé la majoria de soques d'*E. coli* no són patògenes per l'home poden trobar-se com a patògens oportunistes associats a infeccions extraintestinals, com són les infeccions urinàries, bacterièmies, meningitis, peritonitis, en infeccions pulmonars i de ferides. Però també s'han descrit una sèrie de soques de determinats serotips, com a patògens primaris. A l'actualitat es diferencien sis grans grups d'*E. coli* causants de patologia entèrica: *E. coli* enterotoxigènic (ECTE), *E. coli* enteroinvasiu (ECEI), *E. coli* enterohemorràgic (ECEH), *E. coli* enteroagregatiu (ECEA), *E. coli* enteropatògen (ECEP) i *E. coli* amb adherència difusa (ECAD). La virulència bacteriana és un fenomen multifactorial. Les soques patògenes d'*E. coli* posseeixen diferents tipus de factors de virulència que contribueixen conjuntament a potenciar la seva patogenicitat.

Tot i que les soques d'*E. coli* que causen infeccions en éssers humans i animals poden compartir factors de virulència, en general, presenten diferents serotips i adhesines específiques

que les fan responsables de la seva especificitat d'hoste. A conseqüència d'això, les soques patògenes per éssers humans no ho seran pels animals i viceversa. No obstant, s'ha comprovat que els animals són un reservori d'*E. coli* enteropatògenes per les persones.

Normalment les infeccions extraintestinals causades per *E. coli* requereixen un **tractament antibiòtic**, tractament que haurà de començar el més aviat possible en casos de bacterièmia o meningitis. El tractament de les enteritis amb antibiòtics està molt qüestionat i en alguns casos totalment contraindicat. Els antibiòtics a utilitzar han de ser actius *in vitro* i assolir quantitats suficients allà on està localitzada la infecció. És important escollir els menys tòxics i amb menys tendència en seleccionar resistències. Els antibiòtics més freqüentment utilitzats són l'amoxicil·lina, amoxicil·lina-àcid clavulànic, cefalosporines, carbapenems, aminoglicòsids, cotrimoxazol i quinolones.

1.2. Mecanismes de resistència



L'ús dels antimicrobians com a tractament de les infeccions va unit, pràcticament sempre, a l'aparició de soques resistents.

Els coneixements que disposem sobre els diferents mecanismes de resistència, tant fenotípics (resistències creuades i associades) com bioquímics i genètics, han permès establir unes bones bases per a la terapèutica així com per a la fabricació de nous antimicrobians. La importància de tots aquests coneixements es fa palesa quan en estudis rutinaris de sensibilitat *in vitro* no es detecten determinades resistències. En aquestes situacions, el coneixement dels

diferents mecanismes de resistència junt amb una bona elecció dels antimicrobians necessaris per detectar les resistències serà molt important alhora d'evitar fracassos terapèutics. La interpretació conjunta dels estudis de sensibilitat a diferents antimicrobians de la mateixa o diferent família (antibiograma) i la deducció del possible mecanisme de resistència, seria el que s'anomenaria **antibiograma interpretatiu** (27). Per a realitzar una lectura correcta d'un antibiograma s'han de tenir en compte diferents paràmetres (19): conèixer la identitat del microorganisme, tant a nivell d'espècie com de gènere; anàlisi del conjunt de resultats de sensibilitat, estudiant grups d'antibiòtics; ús d'antibiòtics indicadors de la presència de resistències; estudi de combinacions entre antibiòtics i inhibidors de mecanismes de resistència (entre ells destaquen els inhibidors de betalactamases, com l'àcid clavulànic que associat a la ceftazidima o cefotaxima permet deduir la presència de betalactamases d'espectre ampliat o BLEAs); estudi quantitatiu de la sensibilitat; estudi d'un ampli rang de concentracions d'antimicrobians; estudi de la sensibilitat utilitzant inòculs elevats; coneixement de l'epidemiologia local de la resistència als antimicrobians.

Per tant abans d'informar del resultat d'un antibiograma i abans de realitzar proves de sensibilitat *in vitro* s'han de tenir en compte tots els paràmetres anteriors ja que s'ha de tenir present tant la resistència natural com l'adquirida per a un microorganisme determinat.

No tots els microorganismes són inicialment sensibles a tots els antimicrobians, un determinat microorganisme pot ser resistent a un antimicrobià sense necessitat de cap adquisició del mecanisme de resistència. En aquests casos parlem de **resistència natural o intrínseca**. Propietat específica dels bacteris, la seva aparició és anterior a l'ús dels antibiòtics, com ho demostra l'aïllament de bacteris resistents als antimicrobians, amb una edat estimada de 2000 anys, trobats en les profunditats dels glacials de les regions àrtiques del Canadà (30). Els microorganismes que produeixen antibiòtics són, per definició, resistents a aquests que produeixen. En el cas de la resistència natural, totes les soques de la mateixa espècie són resistents a algunes famílies d'antibiòtics i això els hi permet tenir avantatges competitius respecte a altres espècies. L'estudi de les resistències naturals a les diferents espècies pot ser útil per fer una predicció de possibles problemes que podrien sorgir degut a pressions selectives. Saber el patró natural de resistència d'una espècie, i més concretament el seu mecanisme, ens pot ajudar en la seva identificació. Ja que en moltes ocasions, es pot utilitzar el patró de resistència-sensibilitat natural per confirmar o sospitar la identificació d'un microorganisme.

Es creu que els gens de resistència ja estaven presents a la natura abans que s'utilitzessin els antibiòtics en la pràctica clínica, ja que una gran part dels antibiòtics que s'utilitzen actualment són d'origen microbià. No és d'estranyar, doncs, que aquests gens de resistència ja

estiguessin presents en les mateixes bacteries que produeixen els antibiòtics (bacteries del sòl, aigua, etc.). El problema ha sorgit quan, degut a la difusió de l'ús dels antimicrobians, s'ha sotmès a moltes comunitats microbianes, com per exemple la microbiota intestinal, a una forta pressió selectiva.

En contrapartida, es parla de **resistència adquirida** quan en una espècie que és naturalment sensible a un antimicrobià apareixen soques de la mateixa espècie amb resistència a aquest. Com ja s'ha vist, aquest tipus de resistència és deguda a la modificació de la càrrega genètica del bacteri que pot aparèixer per mutació cromosòmica o per mecanismes de transferència genètica horitzontal. La primera pot anar seguida de la selecció dels mutants resistents i la seva posterior extensió clonal, però la transmissió horitzontal de la resistència és la més freqüent, essent mitjançada per diferents elements mòbils que poden passar d'un bacteri a un altre, ja siguin de la mateixa espècie o no. En aquests darrers casos, cada nova soca resistent podrà donar lloc o no a una posterior expansió clonal.

Un altre concepte important a destacar, és el de resistència microbiana i terapèutica. Considerem la **resistència microbiana** com la pèrdua de la sensibilitat d'un microorganisme a un antimicrobià al que originalment era sensible; mentre que la **resistència terapèutica**, està influenciada per molts factors, com l'hoste (malaltia de base, alteracions immunitàries, etc.); els factors relacionats amb l'antimicrobià (dosí, farmacocinètica i farmacodinàmica, etc.); pel tipus de pacient (amb cossos estranys com catèters i pròtesis, lloc d'infecció, etc.) o per altres factors relacionats, com el microorganisme (factors de virulència, d'adhesivitat, etc.). Una sensibilitat determinada, *in vitro*, a un antimicrobià, no necessàriament implica efectivitat clínica.

En general, el fracàs terapèutic d'un tractament pot deure's a la resistència microbiològica, ja sigui natural o adquirida o a la resistència terapèutica.

Podríem dir que els mecanismes de resistència dels bacteris s'agrupen, des del punt de vista molecular i bioquímic, en tres grans grups (Figura 1):

- 1) **Producció d'enzims** que inactiven o modifiquen l'antimicrobià. El bacteri produeix determinats enzims que inactiven l'antibiòtic, com, per exemple, les betalactamases. En grampositius, les betalactamases solen ser d'origen plasmídic, s'expressen de forma induïble i es localitzen extracel·lularment, mentre que en gramnegatius solen ser d'origen plasmídic o codificats en transposons, s'expressen de forma constitutiva i es localitzen a l'espai periplasmàtic. També trobem enzims modificants d'aminoglicòsids, del cloranfenicol, i,

encara que no és el seu principal mecanisme de resistència, també les tetraciclines i els macròlids poden ser inactivats per enzims.

- 2) Modificacions bacterianes que impedeixen l'arribada de l'antibiòtic a la seva diana (permeabilitat i bombes d'eflux). Mutacions en les porines de la paret impedeixen l'entrada de determinats antibiòtics (betalactàmics) o bé alteren els sistemes de transport (aminoglicòsids en els anaerobis); és a dir, té lloc una **alteració de la penetració de l'antimicrobià** a través de les envoltges bacterianes, de la permeabilitat, o es bloqueja el mecanisme d'entrada. En altres ocasions poden provocar la sortida de l'antibiòtic (com, per exemple, la tetraciclina) per un mecanisme d'expulsió activa, impedit que s'acumuli en quantitat suficient com per a que actuï eficaçment. Aquest mecanisme de bombeig de l'antimicrobià, es deu a la presència d'una sèrie de proteïnes de membrana especialitzades.
- 3) Alteració, per part del bacteri, del seu punt diana, impedit o dificultant l'acció de l'antibiòtic. Quan s'altera el substrat o blanc d'acció (diana) dels antimicrobians, aquests no reconeixen el seu substrat, no es fixen i, per tant, no poden exercir la seva acció. Alguns exemples d'aquest tipus de resistència són les alteracions a nivell de les PBP's (*Penicillin Binding Proteins* o proteïnes fixadores de penicil·lina) necessàries per a la formació de la paret cel·lular, donant lloc a resistència a betalactàmics.

Altres mecanismes de resistència serien, per exemple, les **vies metabòliques alternatives**, com en el cas de la resistència a les sulfamides i al trimetoprim. Consisteix en l'adquisició, per part del microorganisme resistent, d'un nou enzim sense afinitat per l'antibiòtic i que realitza les funcions de l'enzim natural present en la cèl·lula. En un últim grup s'englobarien altres mecanismes, com són les resistències degudes a la **hiperproducció** d'un enzim determinat que, encara que és present en totes les soques d'una determinada espècie, només algunes d'elles poden adquirir la capacitat d'hiperproduir-lo; o la **inducció**, per part d'un antimicrobià o, fins i tot, d'altres substàncies sense activitat antimicrobiana, de l'expressió d'un o diversos gens que comportarien la resistència a un o diversos antimicrobians. També estan els efectes poblacionals, com poden ser la producció de **biofilms**, per part del microorganisme, que dificultarien la difusió de l'antimicrobià, o una elevada concentració de microorganismes productors d'un enzim inactivant que comporta un increment de la concentració de l'enzim al voltant de les cèl·lules i, per consegüent, resistència. Finalment, s'ha de considerar la possibilitat de sinèrgia entre dos o més mecanismes de resistència diferents.

Un mateix bacteri pot desenvolupar diversos mecanismes de resistència a un o més antibiòtics (cal destacar que aquests mecanismes de resistència poden ocórrer simultàniament) i, de la mateixa manera, un antibiòtic pot ser inactivat per diferents mecanismes, el que complica en gran mesura l'estudi de les resistències dels microorganismes als diferents antimicrobians.

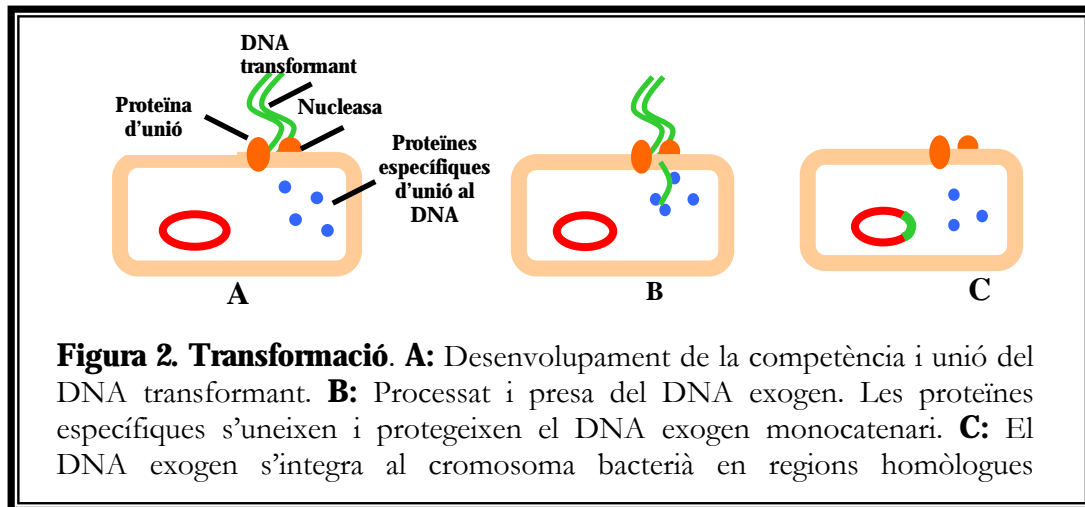
1.3. Adquisició de resistència

L'adquisició dels diferents mecanismes de resistència pot tenir lloc en el mateix microorganisme, fruit d'errors en la seva replicació o bé per adquisició de material genètic que codifiqui gens de resistència. El primer cas faria referència a les **mutacions**, les quals poden aparèixer només en una o varies generacions, difonent de manera vertical. La freqüència amb la que un microorganisme és capaç de mutar i expressar resistència a un antimicrobià pot ser molt variable. Totes aquestes mutacions i alteracions del genoma que afecten a una cèl·lula poden difondre verticalment, de cèl·lula mare a cèl·lula filla, però si no li confereixen un avantatge selectiu, aquesta nova cèl·lula podrà ser seleccionada negativament. La mutació d'un simple nucleòtid pot comportar un canvi aminoacídic, i per tant un canvi a la proteïna. Aquests canvis poden comportar o no un benefici a la bactèria. Pot ser que la mutació no comporti un canvi funcional de la proteïna i per tant el microorganisme no es veuria afectat, però també pot donar-se que aquesta nova proteïna li confereixi un avantatge, com per exemple la modificació de la diana on actuava un determinat antibiòtic, en aquest cas, el més probable és que la mutació, positiva per a la cèl·lula, quedi fixada per l'acció de la selecció natural positiva i per tant difondre's verticalment de mare a filla, tot i que també podria arribar a perdre's degut a l'efecte de l'atzar o deriva gènica.

També existeixen una sèrie de mecanismes d'adquisició de material genètic mitjançant els quals la cèl·lula pot adquirir gens de resistència d'una cèl·lula veïna, essent aquesta de la mateixa espècie o no. Aquest mecanisme s'anomena transmissió o **difusió horitzontal** de la resistència i es poden diferenciar tres tipus:

- Transformació
- Transducció
- Conjugació

1.3.1. Transformació



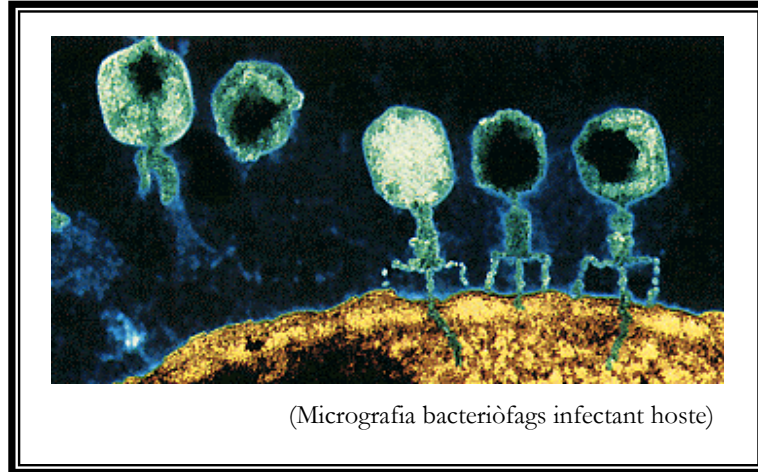
Potser el més simple d'aquests mecanismes de transferència de gens és la **transformació natural**, que es definí originàriament com l'habilitat d'algunes espècies bacterianes d'absorbir, sota determinades circumstàncies, molècules de DNA nu lliure en l'ambient, DNA provinent d'un bacteri donant que serà adquirit per un bacteri receptor, que rep el nom de transformant. Aquest DNA serà incorporat a la cèl·lula i, a l'expressar-se, comportarà un canvi fenotípic. Per a que el material genètic s'incorpori al genoma bacterià, després de travessar la membrana citoplasmàtica, i pugui per tant comportar un canvi fenotípic, és necessari que existeixin regions de certa homologia entre el nou DNA incorporat per la cèl·lula i el del bacteri en qüestió (Figura 2). Si no existeix aquesta homologia, el DNA incorporat bàsicament serà degradat; mentre que si existeix homologia, el nou DNA podrà ser incorporat mitjançant recombinació. De totes maneres, encara que el DNA exogen internalitzat ha d'integrar-se mitjançant recombinació al cromosoma o a un plasmidi, també podria circularitzar-se i establir-se com un replicó autònom si conté un origen de replicació.

Com a resultat dels fenòmens de recombinació es poden obtenir gens, la seqüència dels quals està formada per múltiples fragments de diferents orígens, formant el que es denomina un **mosaic**. Un exemple de gen mosaic és el que confereix resistència a penicil·lina i a cefalosporines en *Streptococcus pneumoniae*. S'ha descrit, en soques resistents, una gran varietat de gens mosaic codificants de la *penicillin binding protein (pbp)*, amb el nivell i grau de resistència determinats pel nombre i naturalesa de recombinacions gèniques (57).

Els mecanismes pels quals tenen lloc els fenòmens de transformació són variats i encara no molt ben coneguts. Per a que la cèl·lula pugui captar el DNA nu ha de trobar-se en un estat de "**competència**". Aquest estat de competència pot ocórrer naturalment (competència

fisiològica) en alguns microorganismes o bé pot ser induït artificialment en altres (competència artificial) per mecanismes artificials (CaCl₂, polsos elèctrics, etc.).

1.3.2. Transducció



(Micrografia bacteriòfags infectant hoste)

1.3.2.1. Bacteriòfags

Els **bacteriòfags** o fags són virus que infecten els bacteris. Els fags que infecten *E. coli* varien en forma, tamany i estil de vida. Són fags amb petits genomes de cadena simple (DNA o RNA) o fags amb una complexa doble cadena de DNA, com el fag T4, amb més de 200 gens. Alguns poden ser virulents, matant i lisant la cèl·lula infectada, o d'altres, com el fag λ , atemperat, són capaços d'insertar-se al genoma cel·lular i establir-se en forma de profags.

El paper dels bacteriòfags a la natura encara no està gaire clar però sembla ser que tenen un gran impacte en el creixement i evolució dels bacteris al seu hàbitat natural. Es creu que els enzims bacterians van aparèixer en els bacteris per defensar-se de la infecció fàgica. Els fags atemperats afecten l'antigenicitat i patogenicitat de l'hoste. A través de la transducció afavoreixen la **transferència de gens** en la població bacteriana. Igualment que els virus, els bacteriòfags serien uns vehicles de DNA empaquetat, DNA que seria transportat d'una cèl·lula a una altra (85).

El DNA captat per la nova cèl·lula hoste prové d'una cèl·lula prèviament infectada. Els fags implicats en un procés de transducció reben el nom de **fags transductors** o partícules transductores. La soca bacteriana original en la que aquests fags s'han multiplicat s'anomena cèl·lula donant, mentre que la soca bacteriana infectada per aquestes partícules rep el nom de

cèl·lula receptora. Finalment, les cèl·lules que han rebut DNA d'un altre bacteri per transducció es denominen transductants.

Existeixen dos tipus de **transducció**:

1.3.2.2. Transducció generalitzada

Comença en el moment en que té lloc l'empaquetament accidental d'una porció de DNA bacterià en una partícula vírica. Quan s'indueix la lisi cel·lular, s'allibera aquesta partícula transductora que, tot i que la totalitat del seu DNA és bacterià, és capaç d'adherir-se a una nova cèl·lula i injectar aquest DNA. Si existeixen regions homòlogues aquest material genètic transductor pot ser incorporat en el genoma de la cèl·lula receptora. Tot i que s'ha descrit que l'empaquetament del DNA víric comença per llocs específics del concatàmer víric, llocs *pac*, i aquests no es troben en el genoma bacterià, el fag pot, aparentment, reconèixer seqüències semblants produint-se així l'**encapsidació errònia de DNA bacterià** (aquests llocs *pac* del genoma víric no són tant específics com per a que no es puguin trobar seqüències semblants al DNA de l'hoste). S'han trobat llocs semblants a aquests llocs *pac* tant en *E. coli* com en *S. enterica* serovar Typhimurium (115).

La quantitat de partícules de transducció generalitzada que es poden produir a les cèl·lules infectades és molt variable. Mentre que algunes cèl·lules no en produeixen cap, altres poden arribar a encapsidar el 20% del genoma bacterià. Si bé, en aquest tipus de transducció, totes les regions del DNA bacterià poden ser encapsidades, alguns *loci* són transduïts amb major freqüència. La freqüència amb que es produeixen cèl·lules transductants no és massa elevada. Això s'explica per diferents raons. En primer lloc, l'error en l'empaquetament que dona lloc a l'empaquetament de DNA de l'hoste és, per sí mateix, poc probable. No tots els fags són capaços d'iniciar un procés de transducció, ja que els fags no han de degradar completament el DNA de l'hoste després de la multiplicació i, a més a més, pot ser que el DNA de l'hoste no sigui capaç de ser empaquetat dins les càpsides víriques. En segon lloc, el DNA introduït en la cèl·lula receptora ha de "sobreviure" en aquesta per tal de formar un transductant estable. Es calcula que aproximadament el 90% del DNA bacterià injectat per partícules de transducció generalitzada a cèl·lules receptores no és viable. Això significa que la informació genètica introduïda no es replica conjuntament amb el genoma de la cèl·lula hoste i, per tant, es perd per segregació. El fet que cadascun d'aquests casos tingui una limitada probabilitat de succeir fa que s'hagin d'utilitzar poderoses tècniques de selecció *in vitro* per a poder detectar els transductants.

1.3.2.3. Transducció especialitzada

Es diferencia de la generalitzada en que només un grup limitat de gens pot ser transferit. Aquests gens són els que es troben flanquejant la regió on el fag atemperat o lisogènic s'integra al cromosoma bacterià. Aquesta regió d'integració sovint es troba en punts concrets del genoma i, per tant, els gens transduïts solen ser uns determinats. Els fags atemperats com el λ o el $\phi 80$ integren el seu material genètic en llocs específics del genoma bacterià. Per exemple, el lloc d'inserció del fag λ es troba, en *E. coli*, entre els gens *gal* i *bio* (el producte del gen *gal* degrada la galactosa per ser utilitzada com a font de carboni, mentre que el producte del gen *bio* sintetitza la vitamina biotina). No obstant, la integració d'aquest fag en altres llocs secundaris pot comportar la transducció d'altres marcadors bacterians. Aquest tipus de fags sintetitzen enzims d'integració i escissió que catalitzen, respectivament, la integració del fag en el lloc d'absorció i la seva correcta escissió posterior. Aquesta escissió, però, no sempre és "perfecta". En alguns casos pot tenir lloc una **escissió anormal** que provoca que el genoma del fag λ arrossegui gens bacterians propers al punt on estava. Com a conseqüència d'aquest fet, es formen fags defectius anomenats **fags o partícules de transducció especialitzada** que contindran tant DNA víric com bacterià. Aquestes, s'obtenen amb una freqüència molt baixa, degut a que els errors en l'escissió del fag són extremadament infreqüents, sent un milió de vegades més freqüent l'escissió normal (115). Els lisats cel·lulars que contenen els fags transductors reben el nom de lisats LFT (*Low Frequency Transduction* o Transducció de Baixa Freqüència) o lisats HFT (*High Frequency Transduction* o Transducció d'Alta Freqüència). Una vegada el fag injecta el DNA transductant poden donar-se diferents situacions. En tots els casos, però, després de la injecció, es produeix la circularització i superenrotllament del DNA transductor. Després, el DNA víric pot produir la replicació vírica mitjançant un cicle lític, pot mantenir-se inactiu i eliminar-se per segregació, o bé pot recombinar-se, per diferents vies, amb el material genètic bacterià.

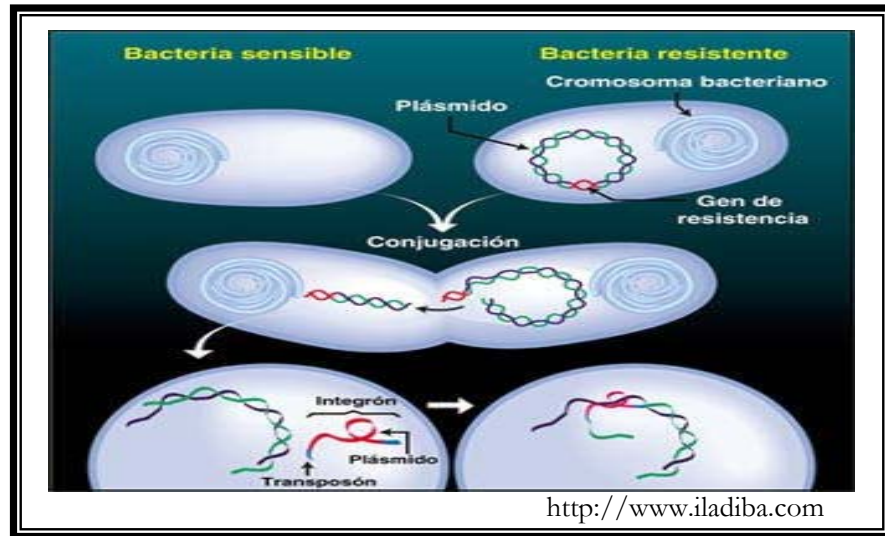
Un dels primers exemples de transducció detectat en clínica va ser el de la transferència de gens de resistència a penicil·lina en *S. aureus*. En aquest cas, però, el bacteriòfag contribueix a la difusió de plasmidis de petit tamany, que són encapsidats i transferits a altres bacteris. Els plasmidis seran autoreplicats i mantinguts sense necessitat de recombinació. El fet que el responsable d'aquesta resistència sigui un gen que codifica una betalactamasa i que aquest s'ha identificat freqüentment en plasmidis no conjugatius, d'aproximadament 35-40 Kb de grandària, i el fet que durant molt de temps s'hagin descrit amb detall diversos bacteriòfags en aquest grup de microorganismes, ha permès especular que l'elevada prevalença de producció de betalactamases en estafilococs prové de la transferència d'aquests plasmidis a través de bacteriòfags.

Un altre cas seria la detecció de gens que confereixen **resistència a betalactàmics**, com són els gens *bla_{OXa}* i *bla_{PSE}*, en DNA fàgic obtingut a partir d'aigües residuals tant humanes com animals, a la província de Barcelona (81).

Els bacteriòfags s'han implicat també en la transferència de **determinants de virulència**. Un exemple és el de la difusió de gens de patogenicitat com les toxines Stx1 i Stx2 en *E. coli* enterohemorràgic (O157:H7), causant de l'enteritis hemorràgica i, en alguns casos, de la síndrome hemolítica-urèmica. També en l'escarlatina, malaltia causada per l'estreptococ del grup A, el bacteri ha adquirit la exotoxina que actua com a superantigen activant el sistema immunitari mitjançant un bacteriòfag. Altres exemples són la neurotoxina de *Clostridium botulinum*, les exotoxines responsables del síndrome de la pell escaldada en *Staphylococcus aureus*, l'exotoxina colèrica de *Vibrio cholerae* i la de la diftèria.

Per tant, els fags juguen un important paper en l'evolució, promovent la transferència horitzontal de gens entre membres individuals de la mateixa espècie, així com entre bacteris força distanciat entre ells. El DNA dins les càpsides víriques és, normalment, més estable que el DNA nu lliure en el medi, pel que pot persistir més temps en l'ambient. A més a més, molts fags són capaços d'infectar un ampli rang d'hostes. Encara que el DNA d'una determinada espècie no sigui capaç de recombinar amb el cromosoma d'una espècie diferent si no presenten seqüències homòlogues, la transducció estable de gens entre bacteris poc relacionats és possible quan el DNA transduït és un plasmidi amb un ampli rang d'hostes, capaç d'autoreplicar-se en la cèl·lula receptora, o bé conté un transposó que pot saltar dins el DNA d'aquesta cèl·lula receptora.

1.3.3. Conjugació



El darrer mecanisme de difusió horitzontal de la resistència és la **conjugació**, procés de transferència de gens entre dues cèl·lules que estan en contacte. Aquest tipus de transferència de gens és possible gràcies a que els bacteris poden ser portadors d'estructures genètiques, denominades **plasmidis**. Els plasmidis i el cromosoma bacterià constitueixen el que es coneix amb el nom de genoma bacterià.

Els plasmidis són molècules circulars de DNA de doble cadena, superenrotllades negativament (tot i que també se'n troben de lineals en *Borrelia* i alguns actinomicets) (115). Normalment existeixen com a molècules circulars de DNA de doble cadena (dsDNA) tancades covalentment (conegudes com a formes CCC, *Covalently Closed Circular*). Les alteracions per trencament del dsDNA donaran configuracions plasmídiques obertes circular (formes OC, *Open Circular*) o lineals (formes L) segons s'afecti una o dues cadenes. Aquestes tres configuracions migren amb una velocitat diferent en els gels d'agarosa: la forma CCC més ràpidament que la L i aquesta més ràpid que la OC. Aquestes tres conformacions es troben en la mateixa cèl·lula per tant en un gel d'agarosa podrien arribar a observar-se tres bandes per plasmidi. Amb freqüència també es detecten dímers i multímers de les formes CCC i OC.

Els plasmidis representen entre un 1% i més d'un 10% del genoma. Són literalment material genètic accessori. No codifiquen funcions essencials per a la cèl·lula i el seu tamany pot variar entre poques i centenars de kilobases, podent transportar des d'únicament els gens necessaris per la seva replicació a centenars de gens addicionals, considerant-se llavors com a "mini-cromosomes" (26). En alguns casos la dispensabilitat d'aquests és dubtosa, com en el cas de *Borrelia burgdorferi*, on diferents plasmidis contenen gens que codifiquen lipoproteïnes i altres

funcions metabòliques, que en el cas de perdre's seria molt perjudicial per a la cèl·lula (47). Els plasmidis es repliquen autònomament (replicons), independentment del cromosoma de la cèl·lula (53). Estan formats doncs, d'una regió constant que inclou determinants genètics necessaris per a les seves funcions essencials (replicació, manteniment i transferència) i una regió variable de DNA heteròleg (gens de resistència,...).

La filogènia dels diferents plasmidis es realitza en funció de la seva regió constant, ja que la caracterització del seu DNA heteròleg ens serviria només per a determinar l'ecologia i epidemiologia d'aquests davant diferents pressions selectives, etc. Presenten un origen de replicació (*oriV*) i algunes de les proteïnes necessàries per iniciar la replicació, tot i que dependran de la cèl·lula hoste per a replicar-se ja que necessitaran l'aport extern de DNA polimerases, lligases, helicases, etc. S'han observat dos tipus de replicació plasmídica: la replicació en *theta*, freqüent en bacteris gramnegatius, i la replicació en *sigma* o cercle rodant, freqüent en bacteris grampositius. Els plasmidis es poden classificar en diferents grups depenent de diferents factors, com poden ser el grup d'incompatibilitat, el fenotip que codifiquen, etc. (veure apartat 1.4.1). Alguns d'ells presenten un rang d'hostes força estret, mentre que d'altres són capaços de transferir-se i replicar-se dins una gran varietat d'espècies bacterianes diferents (102). També poden integrar-se dins el cromosoma de la soca receptora (cèl·lules *Hfr*), incrementant així l'estabilitat de la informació genètica que transporten (101), replicant-se com qualsevol altre caràcter cromosòmic. Aquests plasmidis integrats s'anomenen episomes.

Els **plasmidis conjugatius** són potser més freqüents o, com a mínim, més estudiats, en bacteris gramnegatius (gèneres *Escherichia* i *Pseudomonas*) (115). Els plasmidis conjugatius són capaços d'iniciar la transferència de DNA en minuts (3 o 4 per formar el porus i 2 o 3 per transferir el DNA) un cop es troben les dues cèl·lules en contacte i en uns 30 minuts el 100% de les cèl·lules receptores han rebut el DNA de la donadora (1). El procés de la conjugació s'inicia quan el **pil-li sexual** de la cèl·lula donant, format per les proteïnes sintetitzades pels gens *traA* i *traQ*, entra en contacte amb l'envolta d'una cèl·lula receptora. El contacte cèl·lula-cèl·lula s'aconsegueix, presumiblement, o bé per la contracció o bé pel desensamblatge del pil·li sexual. L'aparellament entre les dues cèl·lules és, en un principi, inestable però després s'estabilitza específicament mitjançant les proteïnes TraG i TraN. Posteriorment, altres gens *tra* s'encarregaran de la transferència del plasmidi a través de les membranes, mitjançant la formació d'un relaxosoma (complex format per DNA i proteïnes) al voltant de l'origen de transferència (*oriT*) del plasmidi. Aquest complex realitzarà un tall i és la cadena simple de DNA, creada pel tall, la que es transferirà. Un altre complex de proteïnes, connectarà i estabilitzarà la cèl·lula receptora amb la donant, el pil·li col·laborarà en el manteniment de l'aparellament (115, 131). En bacteris grampositius (*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* i *Streptomyces*), l'agregació

de cèl·lules donants i receptores no està mitjançada pel pil·li sinó per mitjà d'una sèrie de **substàncies d'agregació i feromones**, ja que aquests microorganismes no tenen l'elaborada membrana externa dels bacteris gramnegatius (115). Es desconeix com es desestabilitza l'aparellament i com es separen les cèl·lules.

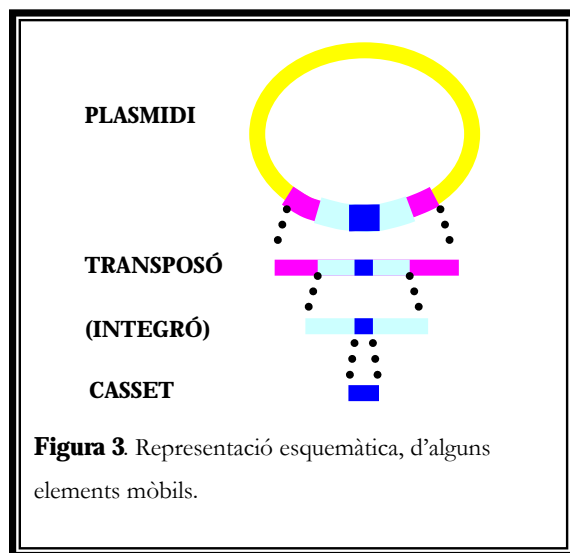
Diferents paràmetres fisiològics poden afectar a la conjugació, com són la densitat cel·lular, la temperatura, els nivells d'oxigen i la fase de creixement estacionària. Una proporció de 1:10 entre cèl·lules donadores i receptores amb una densitat d'aproximadament 10^8 cèl·lules per mil·lilitre seria una proporció bona per aconseguir una bona eficiència de conjugació tan en medi sòlid com en líquid. Els nivells d'oxigen poden tenir un paper molt important depenent del medi i del tipus de cèl·lules. La temperatura també és un factor important ja que determinats plasmidis com poden ser els pertanyents al grup d'incompatibilitat H, tenen un sistema d'aparellament extremadament termosensible amb una temperatura òptima de 25°C, la qual es co-relaciona amb la producció de pil·li H (76), però també trobem d'altres com els plasmidis F-like amb una temperatura òptima de 37°C i pH de 7.5, on el pil·li F desapareixeria a temperatures per sota dels 25°C i per sobre dels 55°C (86).

La conjugació s'ha estudiat amb més detall en *E. coli* per mitjà del **Factor F**, plasmidi conjugatiu i mobilitzable de 94,5 kb i que presenta la capacitat d'integrar-se al cromosoma bacterià. Aquest factor codifica la síntesi i l'ensamblatge del pil·li sexual, així com les diferents funcions que porten a la transferència d'una còpia del Factor F a la cèl·lula receptora (70). Els diferents gens que codifiquen les funcions de conjugació i transferència estan agrupats en una regió de 35 Kb que rep el nom de **reguló tra**. Aquesta regió conté l'*oriT* (diferent de l'origen de replicació *oriV*, on s'inicia la replicació normal del plasmidi)(115) que és el lloc on s'inicia la transferència del DNA i està contingut en el *locus bom* (*Basis of Mobility*), conjuntament amb més de 28 gens anomenats *tra* i *trb*.

El Factor F es transfereix des de la cèl·lula donant a la receptora en forma de DNA de cadena senzilla, passant en primer lloc l'extrem 5'. Es creu que en la síntesi del DNA donant conjugatiu estan involucrats els productes de quatre o cinc gens *tra* i que, abans que comenci la síntesi d'aquest DNA, tenen lloc diferents esdeveniments. Un d'ells és el trencament d'una de les dues cadenes del Factor F en l'*oriT* per mitjà del producte del gen *traI*, que es manté unit a l'extrem 5' de la cadena tallada. La proteïna TraI posseeix també activitat helicasa i ATPasa, amb el que separa la cadena de DNA conjugatiu durant la translocació utilitzant ATP. Fins al moment, encara no es coneix del tot el paper que tenen determinades proteïnes en l'anclatge i protecció del DNA, i en la formació de porus en les membranes, si bé sí que es coneix el sentit en que és transferit el DNA durant la conjugació. Una de les propostes sobre això és que el

DNA de cadena senzilla és protegit durant la transferència per les proteïnes SSB, tant en la cèl·lula donant com en la receptora. La transferència de l'extrem 5' s'acompanya de la síntesi contínua de la cadena de DNA complementària en la cèl·lula donant, mentre que en la receptora el DNA de cadena senzilla transferit serveix com a motlle per a la síntesi discontinua de la cadena complementària. Per tant, les dues cadenes senzilles serveixen com a motlle per a la replicació de molècules completes de DNA de doble cadena tant en la cèl·lula donant com en la receptora; després de la transferència, ambdues cèl·lules contenen una còpia del plasmidi. La cèl·lula receptora que ha rebut DNA com a resultat d'una conjugació rep el nom de **transconjugant** (115).

1.4. Elements mòbils



En la difusió de les resistències participen també elements mòbils o **elements genètics mòbils** (“Mobile Genetic Elements” MGEs), seqüències de DNA amb capacitat de moure’s entre cèl·lules o entre molècules de DNA. Poden ser petits (≈ 1 kb) o grans (centenars de kb) (Figura 3). Tradicionalment, els elements genètics mòbils es classificaven en **bacteriòfags, plasmidis, transposons** o **seqüències d’inserció**.

Aquesta classificació ha esdevingut obsoleta degut a la identificació d’uns elements quimèrics anomenats **illes genòmiques**.

Fer una classificació sistemàtica dels elements mòbils resulta difícil, ja que molts cops és difícil trobar una relació fil·logenètica entre ells. Són elements àmpliament distribuïts, extremadament diversos i en continua evolució. Un cromosoma bacterià ja sigui lineal o circular normalment tindrà a la seva estructura un elevat número de elements mòbils extracromosòmics inserits (87).

La transferència de material genètic entre microorganismes, prèviament comentada a l’apartat 1.3., juntament amb el moviment genètic intracel·lular, són factors molt importants a

tenir en compte quan estudiem l'adaptabilitat dels microorganismes enfront els canvis ambientals. Els elements genètics mòbils li confereixen a la cèl·lula **variabilitat genètica** i **flexibilitat** enfront l'estrès ambiental. Aquesta mobilitat genètica horitzontal podria considerar-se com un fenomen natural d'adaptació dels microorganismes a diferents nínxols ecològics.

1.4.1. Plasmidis

Tal i com s'ha comentat a l'apartat 1.3, la gran difusió geogràfica i el gran nombre d'espècies portadores d'un determinat gen de resistència antimicrobiana, com pot ser la resistència a cefotaxima, ve donat perquè el gen que codifica aquest enzim es troba localitzat en un element mòbil. Trobem diferents tipus d'elements mòbils capaços de vehicular gens d'una cèl·lula a una altra. En primer lloc, trobem els **plasmidis** com a principal vehicle de transferència genètica horitzontal. Els plasmidis són elements genètics extra-cromosòmics amb capacitat de replicació autònoma, és a dir, formen replicons propis. Són molècules circulars de doble cadena de DNA, la seva llargada va des de 2Kb a 500Kb i fins i tot es troben "megaplasmidis" que poden arribar a 1600Kb. La majoria són circulars, tancats covalentment i superenrotllats. Alguns plasmidis posseeixen, a més a més, la capacitat d'integrar-se reversiblement al cromosoma bacterià. Aquests s'anomenen episomes, molts d'ells transporten gens de resistència enfront antibiòtics (plasmidis R), de resistència a metalls pesats, factors de virulència, utilització de determinats sucres, etc.

Troblem una àmplia varietat plasmídica. Els plasmidis bacterians poden classificar-se segons diferents caràcters (61):

1) Segons siguin **autotransferibles per conjugació o no**:

- Plasmidis auto-transferibles (**tra+**, **mob +**). Són plasmidis capaços per ells mateixos de conjuguar. Trobem un tipus especial de plasmidi conjugatiu, el plasmidi promiscu, que té la capacitat de transferir-se a sí mateix i transferir cromosoma entre una àmplia varietat de bacteris gramnegatius, inclús entre gèneres molt diferents.
- Plasmidis conjugatius però no mobilitzables (**tra +**, **mob -**). Són aquells que els hi manquen les proteïnes Mob, proteïnes que tallen el DNA a l'origen de transferència (*oriT*) i inicien la transferència d'una de les cadenes cap a la cèl·lula hoste.

- Plasmidis no conjugatius, dintre dels quals trobem, el plasmidis no mobilitzables (**tra** -, **mob** -) i els plasmidis mobilitzables (**tra** -, **mob** +). Aquests últims no tenen la regió **tra** però sí la regió **mob** que pot ser reconeguda per proteïnes Tra de conjugació d'altres plasmidis que sí són conjugatius.
- 2) Segons el **control de la replicació** vegetativa (on el “número de còpies” és el número de còpies del plasmidi en una nova cèl·lula immediatament després de la divisió cel·lular). Aquesta regulació pot estar mitjançada o per RNA *antisense* o mitjançant una regulació en *cis* a través d'iterons.
- Plasmidis que mantenen un **control estricte** del seu número de còpies: tenint un baix número de còpies per cromosoma en la mateixa cèl·lula. Normalment són plasmidis de tamany mitjà (unes 30 kb) i gran (centenars de kb). Com a exemple tenim el factor F que té una o dues còpies per cromosoma (33).
 - Plasmidis de **control relaxat**: alt número de còpies per cromosoma (més de 10). Són plasmidis petits (menys de 10 kb). Alguns tenen un sistema de replicació especial, modulats per la presència de cloramfenicol. Aquests plasmidis presenten un mecanisme que inhibeix l'inici de la replicació quan el número de còpies ha arribat a un cert nivell.
- 3) Segons el tipus de **fenotip** que codifiquen:
- **Plasmidis R**, que codifiquen una o més resistències enfront antibiòtics i/o metalls pesats. Els plasmidis R, o plasmidis de resistència enfront antibiòtics foren descoberts als anys 50 al Japó quan s'investigaven soques de *Shigella* multiresistents, que havien començat a proliferar però que en poc temps van disseminar-se arreu del món. Aquests plasmidis són molt lleugers i evolucionen ràpidament enfront la pressió selectiva. Gràcies a la enginyeria genètica i la seqüenciació s'ha vist com aquests gens han difós entre espècies i gèneres molt diferents mitjançant una difusió horitzontal. El mateix gen, pot estar situat en espècies molt llunyanes, en plasmidis de diferent tipus i grups d'incompatibilitat diferents (veure més endavant). Tot i que a la natura i independentment de l'acció humana ja existien plasmidis R, l'ús massiu dels antibiòtics ha provocat un augment espectacular de les soques portadores d'aquests plasmidis i potser ha afavorit el fet de que cada cop es trobin situats més gens de resistència en un mateix element mòbil.
 - Plasmidis **bacteriocinogènics**, que codifiquen una bacteriocina i immunitat enfront aquesta. Com a exemple tenim els plasmidis Col.

- Plasmidis de **virulència**, que codifiquen funcions relacionades amb la virulència. Un exemple d'aquests seria els que codifiquen per la toxina tetànica en *Clostridium tetani* o la toxina de l'àntrax de *Bacillus anthracis*.
 - Plasmidis que codifiquen **factors de colonització**.
 - Plasmidis que confereixen la capacitat d'utilitzar rutes metabòliques alternatives, com la degradació de l'octà (plasmidis OCT), degradació del tolué i xilè (plasmidis TOL/XYL) o la degradació del naftalè (plasmidis NAF).
 - Plasmidis responsables de la **fixació de nitrogen** en els nòduls radicals de les lleguminoses en les soques de *Rhizobium*.
 - Plasmidis Ti i Ri de *Agrobacterium*, responsables de la **producció de tumors** en moltes plantes dicotiledònies.
- 4) Plasmidis segons el **grup d'incompatibilitat (Inc)**. Classificació creada als anys setanta principalment per Datta i Hedges (63). Molts bacteris contenen més d'un tipus de plasmidi, però no tots els plasmidis poden coexistir en un microorganisme durant varies generacions. Aquest fenomen s'anomena incompatibilitat plasmídica, dos plasmidis són incompatibles quan no poden coexistir establement en la mateixa cèl·lula perquè comparteixen el mateix sistema de replicació i/o segregació de les còpies i/o control del número de còpies. Els gens necessaris per a una replicació autònoma són els replicons bàsics dels plasmidis, generalment estan formats per l'origen de replicació i els gens relacionats amb el control de l'inici de la replicació, a la majoria de casos, trobem els gens *rep*, gens que codifiquen per proteïnes necessàries en el control de la replicació. En molts casos sembla que els sistemes de conjugació han evolucionat amb els seus replicons, un mateix grup d'incompatibilitat pot no tenir el mateix sistema de transferència. Mentre que la replicació vegetativa i conjugativa sembla estar emparellada en plasmidis com el RP4 (IncP α) (9) o el R1162 (IncQ) (64), d'altres no tenen cap tipus de relació, com en el plasmidi F, tot i que sembla raonable assumir que aquest segon cas és característic dels plasmidis auto-transferibles. Molts sistemes de conjugació tenen l'habilitat de transferir el material genètic entre diferents gèneres i regnes, independentment del sistema de replicació. Els plasmidis F-like aparentment estan limitats a la família *Enterobacteriaceae* mentre que plasmidis com els IncP poden transferir-se en un ampli rang de bacteris gramnegatius (54).

S'han identificat més de 26 grups d'incompatibilitat en enterobacteris (Taula 1) 14 en *P. aeruginosa* i 15 en *S. aureus*. El procediment per classificar els plasmidis segons el grup d'incompatibilitat es basà en la introducció per conjugació o transformació del plasmidi

Taula 1. Grups d'incompatibilitat en <i>Enterobacteriaceae</i> .(96)				
Grup	Subgrup	Plasmidi	Soca original	Tamany
B		R724	<i>Shigella flexneri</i>	89
C		RA1	<i>Aeromonas liquefaciens</i>	133
D		R7116	<i>Providencia spp.</i>	51
FI		R455	<i>Proteus morgani</i>	97
FII		R1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphi B	96
FIII		ColB-K98	<i>Escherichia coli</i>	108
FIV		R124	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	126
FV		pED208	<i>Escherichia coli</i>	9
FVI		pSU1	<i>Escherichia coli</i>	ND
FVII		pSU233	<i>Escherichia coli</i>	ND
HI	1	R27	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	180
	2	R478	<i>Serratia marcescens</i>	275
	3	MIP233	<i>Salmonella enterica</i> serovar Ohio	231
HII		pHH1508a	<i>Klebsiella aerogenes</i>	208
I1		R46	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	51
I2		TP114	<i>Escherichia coli</i>	63
I γ		R621a	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	100
J		R391	<i>Proteus rettgeri</i>	89
K		R387	<i>Shigella flexneri</i>	82
M		R446b	<i>Proteus morgani</i>	72
N		N3	<i>Shigella spp.</i>	51
P	α	RP1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
	β	R751	<i>Klebsiella aerogenes</i>	46
Q		R300b	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	9
T		Rts1	<i>Proteus vulgaris</i>	217
U		RA3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	46
W		S-a	<i>Shigella flexneri</i>	35
X		R6K	<i>Escherichia coli</i>	40
Y		P1Cm	<i>Escherichia coli</i>	93
Com9		R71	<i>Escherichia coli</i>	79

problema dins d'una soca amb un grup de incompatibilitat determinat, si el plasmidi resident és eliminat en les generacions futures vol dir que el plasmidi que s'ha introduït pertany al mateix grup d'incompatibilitat (31). Pel que fa a el grup d'incompatibilitat i la conjugació, s'ha vist com existeix una relació entre el grup d'incompatibilitat i el tipus de pil·li i aparellament entre les cèl·lules, de tal manera que plasmidis pertanyents al grup d'incompatibilitat FI, FII, FV, HI1, HI2, T, J o X presenten un aparellament mitjançant un pil·li flexible i amb una eficiència màxima d'aparellament tant en medi sòlid com en líquid i en canvi existeixen uns altres plasmidis pertanyents als grups d'incompatibilitat M, N, P o W que presenten un pil·li rígid i amb una eficiència màxima de conjugació en medi sòlid.

Molts dels grups d'incompatibilitat de la família *Enterobacteriaceae* han sigut reorganitzats i reassignats en altres grups. Un exemple d'aquesta reorganització ha sigut la del grup d'incompatibilitat S descrit per Hedges et al. (63) i identificat a *S. marcescens* el qual fou posteriorment determinat com a H2. Avui en dia aquests plasmidis, els qual inclouen el plasmidi de referència R478, s'han situat dins el grup d'incompatibilitat HI, subgrup 2. La taula 1 mostra els grups Inc reconeguts per *Plasmid Section of the National Collection of Type Cultures, United Kingdom*. Aquesta col·lecció ha sigut creada per Naomi Data i els seus col·laboradors al Hospital Hammersmith entre el 1960 i 1982. La determinació del grup d'incompatibilitat s'ha utilitzat freqüentment per a classificar els plasmidis a la vegada que ha sigut una bona eina per a estudiar la difusió plasmídica de determinats factors. S'ha creat una col·lecció de 19 sondes específiques que detecten 17 grups d'incompatibilitat, basades en la tipificació dels replicons o rep *typing* (29), és a dir, la identificació dels diferents plasmidis mitjançant hibridació amb diferents sondes que contenen els gens responsables de la replicació plasmídica. Però recentment han estat dissenyats iniciadors específics (52, 92), capaços de determinar fins a 18 grups d'incompatibilitat mitjançant PCR.

1.4.2. Seqüències d'inserció

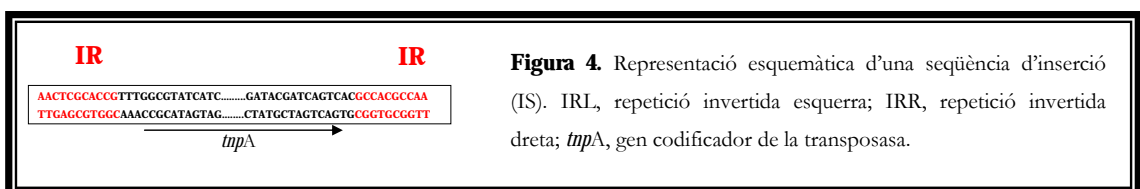


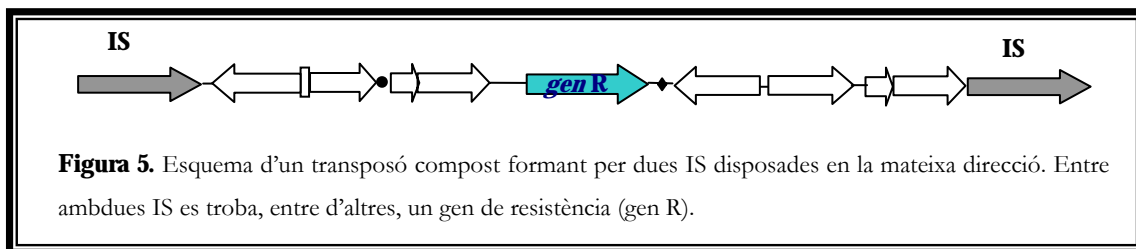
Figura 4. Representació esquemàtica d'una seqüència d'inserció (IS). IRL, repetició invertida esquerra; IRR, repetició invertida dreta; *tnpA*, gen codificador de la transposasa.

Les **seqüències d'inserció** són els elements transposables més petits, tenen entre 700 i 2.500 pb. S'han trobat a tots els genomes, tant d'eubacteris (grampositius i gramnegatius) com d'arqueobacteris. També són freqüents als genomes de bacteriòfags i encara més als plasmidis.

No confereixen caràcters fenotípics al bacteri. Entre les IS hi ha moltes variacions d'estructura, però normalment es caracteritzen per tenir en els extrems repeticions invertides (IR) d'entre 10 i 40 pb (77), tot i que s'han trobat IS com la *IS200*, que no en tenen. Moltes IS tenen un marc obert de lectura (*orf*) o diversos de superposats que codifiquen una transposasa i la seva regulació o proteïnes reguladores de funció desconeguda (22) (Figura 4). La transposició està estretament regulada per un o diversos mecanismes que operen en sèrie, els quals normalment mantenen les freqüències de transposició a nivells molt baixos (22).

1.4.3. Transposons

Els **transposons** són elements mòbils que, a diferència de les IS, porten gens addicionals, a més dels necessaris per a la seva mobilització. En la família dels enterobacteris trobem dues classes de transposons: els **transposons compostos o de classe I** i els **transposons no compostos** o de la família del *Tn3* o també anomenats de **classe II**. Els transposons compostos estan formats per dues IS que tenen diferents gens entremig. En la majoria dels casos una de les dues IS és inactiva (Figura 5). Generalment, totes dues IS es disposen en forma invertida una respecte de l'altra, però també hi ha transposons on les dues IS es troben disposades en la mateixa direcció. Per exemple, el *Tn5* està format per dues seqüències *IS50* invertides i una regió central que conté gens de resistència a la kanamicina, l'estreptomicina i la bleomicina; en canvi, el *Tn9* té una regió central que conté gens de resistència a cloramfenicol i està flanquejada per repeticions directes d'*IS1* (22). Els transposons compostos més coneguts són els que contenen gens de resistència a agents antimicrobians.



Els **transposons no compostos o de la família de *Tn3*** els trobem molt freqüentment en bacteris gramnegatius resistents a antibiòtics. Aquests no presenten dues IS però tenen repeticions terminals. A més de la transposasa, codifiquen una resolvasa, que és l'enzim encarregat de solventar les estructures formades durant el procés de transposició (o **cointegrats**) actuant sobre seqüències adjacents, anomenades *res*. La majoria dels transposons de la família *Tn3* porten gens addicionals de resistència a antibiòtics (7). El *Tn21* i el *Tn1696*

pertanyen a la família Tn3; són transposons grans que confereixen resistència al mercuri i a diversos antibiòtics. Concretament, el Tn21 té una regió central que conté un gen que confereix resistència a sulfamides (*sulI*) i un gen que confereix resistència a l'estreptomicina i l'espectinomicina (*aadA1*). El Tn1696 conté gens de resistència a l'estreptomicina i l'espectinomicina (*aadA1*) i al cloranfenicol (*cmIA1*).

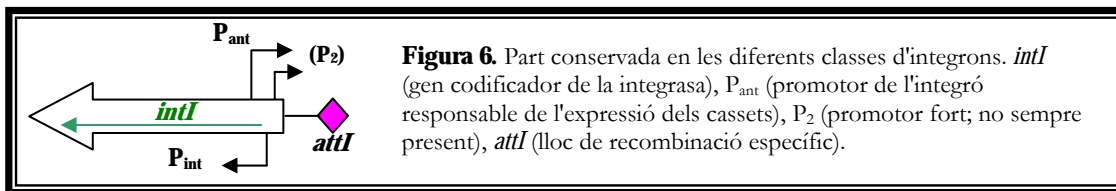
Hi ha un tipus de transposons que, a diferència dels descrits anteriorment, posseeixen no sols la capacitat de mobilitzar-se, sinó que també poden autotransferir-se, són els **transposons conjugatius**. Són elements genètics no replicatius que, a més a més, tenen la capacitat de transferir-se no tant sols en l'àmbit intracel·lular sinó també intercel·lular. En el procés de transferència requereixen, igual que en la conjugació, el contacte entre dues cèl·lules, però a diferència dels plasmidis, aquests no es poden replicar independentment i s'han de mantenir en l'hoste integrats en el DNA genòmic o plasmídic. Així doncs, els transposons conjugatius posseeixen totes les característiques pròpies dels transposons citades anteriorment i, a més a més, requereixen de sistemes genètics complexos per dur a terme tot el procés bioquímic de la transferència entre cèl·lules. Per transferir-se d'una cèl·lula a una altra primer s'escindeixen i circularitzen, una de les cadenes és transferida a l'altra cèl·lula i un cop allà es forma la cadena complementària formant de nou una estructura circular capaç d'integrar-se al genoma del nou hoste. Un exemple de transposons conjugatius molt ben estudiats són el Tn916 (41) i el Tn1545 (28). Es troben més freqüentment en bacteris grampositius com els estreptococs i els enterococs. La majoria dels transposons conjugatius descrits porten gens de resistència a la tetraciclina, la kanamicina, el cloranfenicol o l'eritromicina (110).

1.4.4. Illes genòmiques

Troben uns altres elements que juguen un paper molt important en el moviment del material genètic, són les **illetes genòmiques** (<10Kb) o **illes genòmiques** (>10Kb). Tots aquests elements formen part d'un *pool* flexible de gens que es caracteritzen per codificar funcions no essencials per a la cèl·lula però que li confereixen avantatges enfront condicions particulars (canvis en el medi, patogenicitat enfront un nou hoste, ...) i per tenir, normalment, un contingut de G+C i una pauta de lectura diferents respecte al cromosoma bacterià. Les illes genòmiques poden subdividir-se en diferents grups segons els avantatges que li confereixen al nou hoste, **illes ecològiques** en els microorganismes ambientals, **illes saprofitiques**, **illes de simbiosi** o **illes de patogenicitat** (PAIs) en microorganismes que interaccionen amb el seu hoste.

Les illes genòmiques oscil·len entre 10 i 500 kb de llargada (90), freqüentment transporten bacteriòfags i/o restes de seqüències plasmídiques, com són gens de transferència, integrases o seqüències d'inserció. Aquests blocs de DNA tan particulars es troben molt sovint insertats dintre de gens tRNA o tmRNA (56) del cromosoma de l'hoste, per tant serà molt freqüent trobar a banda i banda de les illes de patogenicitat els dos fragments de tRNA, fet que autors com Mantri *et al.* han utilitzat per detectar aquests tipus d'elements mòbils dintre del genoma bacterià (79). Les illes genòmiques transporten *clusters* de gens amb funcions específiques que són incorporats al nou DNA en bloc. Transporten gens que els hi confereixen activitats de transferència, recombinació i restricció i gens que confereixen avantatges adaptatius o de patogenicitat a la cèl·lula on s'inserten, com poden ser la producció de toxines, factors d'adherència, la degradació de fenols, la resistència enfront antibiòtics, la fixació de nitrogen, etc. S'ha vist però que en algunes illes genòmiques el gen de la transposasa pot estar deleccionat o no funcional, essent per tan illes genòmiques no mòbils (90).

1.5 Integrons



Uns altres elements que juguen un paper important en la difusió de les resistències són els **integrons**. Són unes estructures genètiques descrites a principis dels anys 80 quan la seqüenciació de diferents gens de resistència va revelar una seqüència comuna en la regió 5' que contenia un promotor i un gen codificador d'una integrasa, similar a les descrites en els bacteriòfags. Els integrons es caracteritzen per ser estructures genètiques capaces d'**integrar o mobilitzar gens casset** que poden codificar determinants de resistència als antibiòtics i determinants amb altres funcions. Els integrons s'han disseminat àmpliament entre les espècies d'*Enterobacteriaceae* i alguns s'han descrit com a part de transposons (133).

Els integrons estan formats per tres elements necessaris per a la captura i expressió de gens exògens (continguts en els gens casset): un gen que codifica una integrasa (*intI*), un lloc de recombinació específic (*attI*) i un promotor (P_{ant}) per a l'expressió dels gens casset adjacents. A vegades contenen un segon promotor més fort, P_2 , localitzat adjacentment al primer (Figura 6).

Com ja s'ha parlat anteriorment, els gens exògens que són incorporats als integrons tenen una estructura particular i se'ls ha denominat **gens casset**. La integració es produeix per un mecanisme de recombinació de lloc específic.

Els integrons contenen un lloc de recombinació anomenat ***attI*** (format per 65 pb que inclou el lloc de recombinació i dues regions corresponents als lloc d'unió fort i dèbil de la integrasa) en el qual els gens capturats són integrats gràcies a l'acció de la integrasa **IntI**. Aquesta integrasa sembla que pertany a la família de les recombinases ja que presenta les dues regions ***consensus*** trobades a la integrasa (***intI***) del fag λ i a altres recombinases (116).

Els gens casset o gens exògens capturats pels integrons són molècules de DNA no replicatives que es troben com DNA circular lliure, però també es poden trobar formant part d'una molècula de DNA (plasmidi o cromosoma) com a seqüències lineals. En aquest darrer cas, majoritàriament estan inclosos en integrons. Aquests gens casset, generalment, inclouen un únic gen i en posició posterior presenten una seqüència de recombinació específica, coneguda com a ***attC*** o element de 59 bases (59-be), la qual permet el reconeixement i la mobilització dels cassets (117). La mida dels cassets varia considerablement entre 250 i 1.600 pb aproximadament (100).

Els gens casset normalment no contenen promotors i s'expressen utilitzant el promotor de l'integró. La transcripció dels gens casset inserits en l'integró s'inicia a partir d'un mateix promotor i tots ells són transcrits en un mateix mRNA, la qual cosa dona lloc, per tant, a una relativa disminució de la transcripció en els gens més distals.

Els gens casset no es poden moure independentment, però els mobilitza la integrasa codificada en l'integró, que reconeix l'***attC*** del gen casset i el lloc receptor ***attI*** de l'integró. Això permet tant la integració com l'escissió d'aquests cassets a l'integró. La integrasa de la classe 1 (IntI1), a més a més de catalitzar la reacció d'integració o escissió entre ***attI*** i ***attC***, pot catalitzar ocasionalment processos de **recombinació**, tant d'integració com d'escissió, entre dos ***attC***. També ha estat documentada la recombinació integrativa entre dos ***attI*** i, fins i tot, entre llocs secundaris i l'***attC*** o l'***attI*** (60), encara que aquests dos darrers casos tenen lloc amb una freqüència baixa. La inserció i/o escissió dels cassets dintre de l'integró juga un paper important en la disseminació i la formació de noves combinacions de gens de resistència als antibiòtics. El fet que molts integrons posseïxin més d'un gen casset de resistència, juntament amb el fet que molts estan localitzats en elements genètics com per exemple transposons o plasmidis, que porten determinants de resistència, fa que la selecció a través d'un d'aquests determinants de resistència antimicrobiana seleccioni els altres (selecció en ***autostop***) (40).

La classificació dels **integrons** es basa en la seqüència codificadora de la integrasa. Actualment se'n coneixen nou classes. Per exemple els membres de les classes 1, 2, 3 contenen gens casset de resistència als antibiòtics (100), en canvi l'integró de la classe 8 no presenta cap gen casset i el de la classe 9 conté un gen casset de resistència a antibiòtics i altres gens casset de funció desconeguda.

Els **integrons de la classe 1** són els que es troben amb major freqüència en soques aïllades de malalts. Es caracteritzen per tenir una seqüència 5' conservada (**5'-CS**) que conté el gen codificador de la integrasa. La majoria conté també una seqüència 3' conservada (**3'-CS**) que inclou el gen que dóna resistència a components d'amoni quaternari (***qacEΔ1***) i el gen de resistència a sulfamida (***sul1***); aquests dos gens de resistència no són cassets, sinó que es troben fixos en l'integró (Figura 7). La longitud d'aquesta regió anomenada 3'-CS és variable en el seu extrem 3', com s'ha descrit en In1 a In5 i In10 (59). També s'han caracteritzat integrons de la classe 1 que presenten delecions en aquesta regió 3'-CS, com per exemple els integrons localitzats en el Tn5086 i en el Tn5090. Així doncs, el contingut i l'extensió del segment 3'-CS difereix en cada integró (59). Tot i això, Stokes i col. (116) descriuen que aquest fragment conté tres pautes obertes de lectura: l'*orf4* (***qacEΔ1***), que confereix resistència a components d'amoni quaternari i presenta una pauta oberta de lectura a l'extrem 3' que se solapa amb els primers dos codons de *sul1*, encara que amb una pauta de lectura diferent; *sul1*, un determinant de la resistència a les sulfamides; i l'*orf5* el producte del qual presenta similitud amb la puromicina-acetiltransferasa (inhibeix la puromicina, proteïna que inhibeix la síntesi proteica).

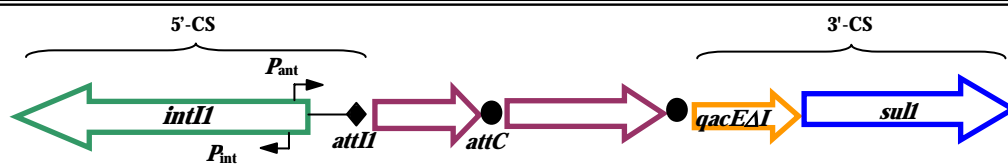


Figura 7. Integró de classe 1. 5'-CS i 3'-CS, segments conservats; *intII*, gen codificador de la integrasa; *attII*, lloc de recombinació específic; *qacEΔ1*, gen que codifica resistència a compostos d'amoni quaternari; *sul1*, gen que dóna resistència a sulfamides; *attC* (●), punt de recombinació dels gens casset.

Molts dels integrons que pertanyen a aquesta classe han estat identificats en elements transposables com l'In2 al Tn21 (116) o l'In4 al Tn1696 (93) (ambdós classificats com a membres de la família del Tn3) o en transposons defectius com és el cas d'In0, In2 i In5 (100).

Mentre que la majoria dels integrons de la classe 1 tenen l'estructura descrita anteriorment, també s'han descrit integrons inusuals pertanyents a aquesta classe: In6, In7 (118),

un integró descrit en el plasmidi pSAL-1 de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis que conté el gen *bla*_{DHA-1} i el seu regulador *ampR* (125), diferents variants d'integrans complexos portadors del gen *bla*_{DHA-1} trobats en *Klebsiella pneumoniae* i *Klebsiella oxytoca* recentment (126), l'In60 portador del gen *bla*_{CTX-M-9} (106), l'In35, l'In36 i l'In116 portadors tots tres del gen *bla*_{CTX-M-2} (4, 98), etc. Aquests integrans són inusuals perquè contenen una segona còpia del segment 3'-CS. Tots aquests integrans tenen un segment comú de 2,1 kb localitzat entre les dues repeticions 3'-CS, que conté l'*orf513* (Figura 8). Aquest segment a l'integró de pSAL-1 s'anomena *orf341*, producte de la delecció d'una base que crea un codó *stop*, obtenint-se una proteïna de 341 aminoàcids.

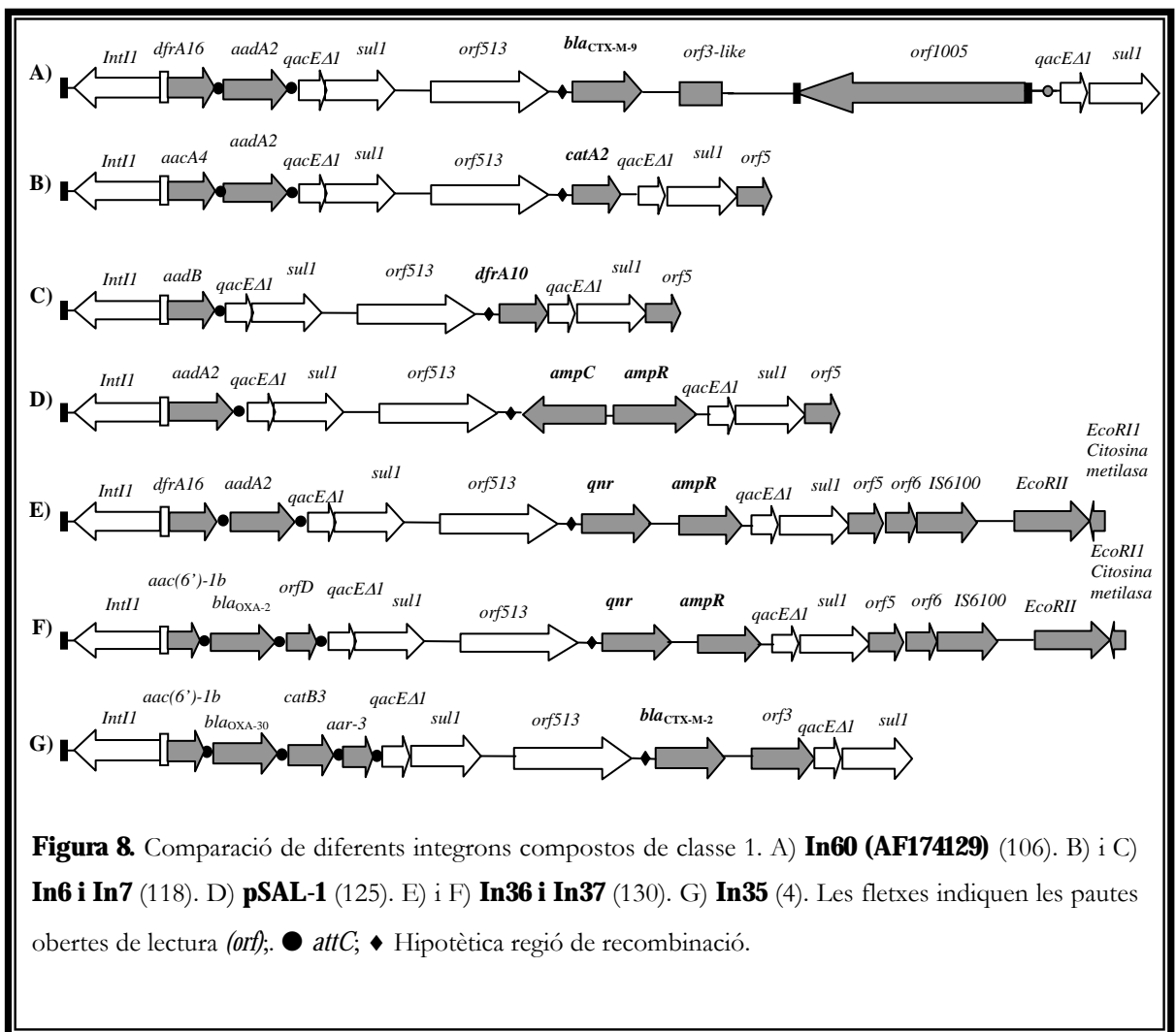


Figura 8. Comparació de diferents integrans compostos de classe 1. A) **In60 (AF174129)** (106). B) i C) **In6 i In7** (118). D) **pSAL-1** (125). E) i F) **In36 i In37** (130). G) **In35** (4). Les fletxes indiquen les pautes obertes de lectura (*orf*); ● *attC*; ◆ Hipotètica regió de recombinació.

Les diverses classes d'integrans són capaces d'adquirir els mateixos gens casset, la qual cosa indica que el *pool* de gens casset és compartit. Clark i col. (25), van descriure un superintegró en el cromosoma de *Vibrio cholerae* que contenia més de cent gens casset.

Fins a l'actualitat s'han descrit més de 60 gens casset dins la família *Enterobacteriaceae* i el gènere *Pseudomonas* (133). S'han trobat diferents gens de resistència per a la majoria dels

antibiòtics; en alguns casos el mecanisme pel qual confereixen la resistència és diferent. Les betalactamases codificades en els cassets coneguts fins ara pertanyen a tres classes: classe A (gens *bla_P*), metal·lo-betalactamases de la classe B (*bla_{IMP-1}*) i la classe D (gens *bla_{OXA}*).

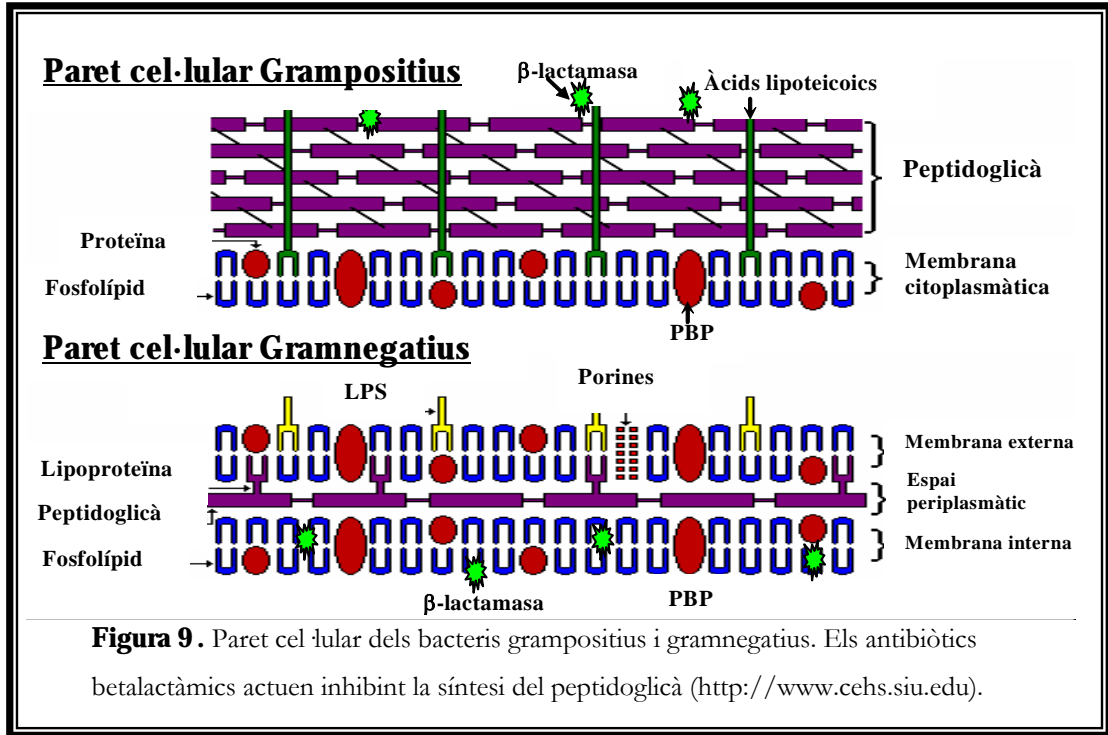
La potència dels integrons rau en la seva versatilitat, és a dir, en l'habilitat de reconèixer una alta varietat de seqüències de recombinació i en la seva aparent il·limitada capacitat d'intercanvi de gens casset. Aquesta flexibilitat permet una ràpida adaptació al flux impredecible dels nínxols ecològics. S'ha observat que els cassets examinats sembla que codifiquen funcions adaptatives més que no pas funcions indispensables. Tot i que l'origen dels integrons i dels gens casset no està clar, hi ha evidències que mostren que els integrons continuen evolucionant. Molts integrons porten gens casset de resistència a antics antibiòtics, no obstant, s'han descrit gens casset que codifiquen resistència enfront dels nous antibiòtics (*bla_{IMP}*, *bla_{VEB-1}*, *bla_{oxa35}*).

1.6. Antibiòtics betalactàmics

El tractament d'elecció en un gran nombre d'infeccions produïdes per bacteris de la família *Enterobacteriaceae* són els betalactàmics. Els antibiòtics betalactàmics es caracteritzen per presentar l' **anell betalactàmic** que defineix químicament aquesta família, essencial per la seva acció antimicrobiana. Es divideixen en penicil·lins, cefalosporines, carbapenems, monobactams i inhibidors de les betalactamases. S'uneixen a les proteïnes fixadores de penicil·lina o **PBPs**, enzims amb activitat transglucosidasa, transpeptidasa i, alguns endopeptidasa, implicades en les últimes fases de síntesi del peptidoglicà (Figura 9). La unió betalactàmic-PBP inhibeix o disminueix la formació d'enllaços entre les cadenes de peptidoglicà, que juntament amb l'alliberació d'autolisines fa que el bacteri acabi lisant-se (74, 122). Els bacteris grampositius tenen una paret cel·lular on el component principal és el peptidoglicà o mureïna (fins el 90% de la paret), en canvi els bacteris gramnegatius tenen una paret més complexa que consta d'una membrana externa formada per lípids i proteïnes i d'una capa interna prima de peptidoglicà (un 10% de la paret).

El **peptidoglicà** està format per llargues cadenes de glúcids formades per la repetició de molècules d'àcid N-acetilmuràmic (NAM) i N-acetilglucosamina (NAG) units per enllaços β -1,4. Els àcids muràmics es troben units directament per cadenes de pentapèptids en els cas dels gramnegatius i gràcies a un pont pèptidic en grampositius. Entre els aminoàcids típics d'aquestes cadenes es troben la L-alanina, el D-glutàmic, l'àcid diaminopimèlic (DAP) o la L-lisina o la D-alanina, aquests varien depenen si es tracta de gramnegatius o grampositius. Els betalactàmics inhibeixen precisament aquesta unió o transpeptidació realitzada per les PBPs a l'última etapa de

la síntesi del peptidoglicà. Aquesta inhibició és possible gràcies a la similitud estructural entre els compostos betalactàmics i la D-alanil-D-alanina terminal.



Els antibiòtics betalactàmics són habitualment **bactericides**, destruint els bacteris que estan en creixement actiu però no als que romanen en repòs. La seva eficàcia terapèutica es relaciona especialment amb el temps que romanen en quantitats suficients per sobre del nivell terapèutic (àrea bactericida sota la corba). L'efecte post-antibiòtic, que és la persistència de la supressió del creixement bacterià després de l'exposició del microorganisme a l'agent antimicrobià, és de poques hores enfront els cocs grampositius i menor pels bacils gramnegatius (excepte els carbapenems). La brevetat de l'efecte post-antibiòtic i la curta vida d'alguns d'aquests compostos, fa que gran part dels betalactàmics s'hagin d'administrar en infusions contínues o intervals breus.

Els antibiòtics betalactàmics es classifiquen en funció de l'anell betalactàmic que contenen (Taula 2):

1) Les **penicil·lines** són un grup d'antibiòtics que contenen un anell betalactàmic i un anell de tiazolidina, format per l'àcid 6-aminopenicil·lànic, estructura derivada de la condensació d'una molècula de valina i una de cisteïna per donar lloc al doble anell característic. També tenen una cadena lateral variable en la posició 6 de l'anell betalactàmic, cadena que defineix les

propietats de la molècula. Tal i com observem a la taula, hi ha diferents tipus de penicil·lines, com són la penicil·lina G o benzilpenicil·lina i els seus derivats, les penicil·lines resistents a la

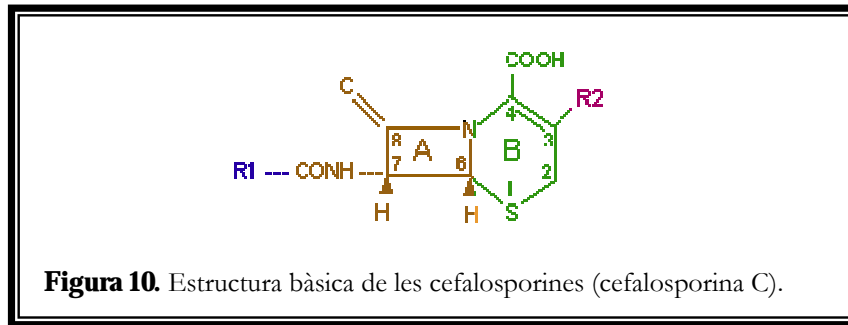
Taula 2. Principals antibiòtics betalactàmics (*Cefamicines)(46).

GRUP	BETALACTÀMICS
PENICIL·LINES	Penicil·lina G, Aminopenicil·lines (Ampicil·lina, Amoxicil·lina), Carboxipenicil·lines (Ticarcil·lina), Ureido 3^a Generació: Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima, Cefpodoxima penicil·lines (Piperacil·lina).
INHIBIDORS BETALACTÀMICS	Àcid clavulanic, Sulbactam, Tazobactam.
CEFALOSPORINES	1^a Generació: Cefalotina, Cefazolina, Cefradina, Cefalexina, Cefadroxil, Cefaloglicina, Cefaloridina, Cefapirina, Cefatricina, Cefacetil, Ceforànid, Ceforaxidina, Cefazaflur. 2^a Generació: Cefamandol, Cefuroxima, Cefonicid, Cefoxitina*, Cefaclor, Cefmetazol*, Cefotetán*, Cefotiam, Cefprozil, Cefbuperazona*, Cefminox*, Cefixima, Cefibutén, Cefmenoxima, Cefodoxima, Cefoperazona, Cefsulodina, Ceftizoxima, Cefterama, Cefdinir, Cefetamet. 4^a Generació: Cefepime, Cefpiroma, Cefclidina, Cefozopran, Cefluprenam, Cefoselis.
MONOBACTAMS	Aztreonam.
CARBAPENEMS	Imipenem, Meropenem, Ertapenem.

penicil·linasa com la cloxacil·lina, les aminopenicil·lines, com l'ampicil·lina i els seus ésters o l'amoxicilina, i per últim, les carboxi- i ureidopenicil·lines com la ticarcil·lina i la piperacil·lina respectivament.

2) Les **cefalosporines** són estructuralment similars a les penicil·lines, presenten també un anell betalactàmic però en comptes de tenir un anell tiazolidínic presenten un anell de dihidrotiazina. Són antibiòtics semisintètics derivats de la cefalosporina C (Figura 10), un antibiòtic natural produït pel fong *Cephalosporium acremonium* (actualment *Acremonium chrysogenum*). L'estructura base és un nucli cefem format a partir de la fusió d'un anell dihidrotiacínic i un anell betalactàmic. Les modificacions en les cadenes laterals origina les diferents cefalosporines. Les cefalosporines més modernes han anat incrementant la seva activitat bactericida enfront els

bacteris gramnegatius. Es distribueixen àmpliament en la majoria de líquids i teixits corporals i les concentracions a les que s'arriba són suficients per al tractament d'infeccions. La penetració al humor vitri o al líquid cefaloraquidi (LCR) és relativament baixa, tot i que la tercera generació de cefalosporines pot assolir nivells bastant alts en aquest últim, pel tractament de les meningitis.



Les **cefalosporines de primera generació** tenen totes el mateix espectre però es diferencien farmacològicament. Tenen una important activitat enfront cocs grampositius (excepte enterococs i estafilococs resistents a la meticil·lina) així com per a la majoria de soques de *E. coli*, *P. mirabilis* i *K. pneumoniae*.

Les **cefalosporines de segona generació** tenen un espectre més ampli enfront bacils gramnegatius tot i que difereixen en el seu espectre antibacterià.

Les **cefalosporines de tercera generació** tenen una acció encara més ampla i són més estables a la hidròlisi de les betalactamases. Tenen una major activitat enfront els bacteris gramnegatius, incloent els *Enterobacteriaceae* més importants des del punt de vista clínic (*E. coli*, *K. pneumoniae*, ...). La seva activitat enfront estafilococs grampositius és menor que les cefalosporines de primera generació, però són més actives enfront els estreptococs. La **cefotaxima**, va ser la primera obtinguda d'aquest grup, té una modesta activitat enfront *P. aeruginosa* però és molt eficaç enfront cocs grampositius. Per altre banda la ceftazidima presenta una gran activitat enfront de *P. aeruginosa*.

Per últim trobem les **cefalosporines de quarta generació**, aquestes tenen una bona penetració a través de la membrana cel·lular externa dels bacteris i les betalactamases presenten una baixa activitat enfront elles. *In vitro* tenen un espectre d'activitat més ampli i una bona activitat enfront els grampositius.

3) Els **inhibidors betalactàmics** tenen una estructura química betalactàmica. L'àcid clavulànic té un nucli similar a l'àcid penicil·lànic de les penicil·lines amb la substitució de l'àtom

de sofre en posició 3 per un àtom d'oxigen i no té cadena lateral en posició 6. El sulbactam és una sulfona semisintètica de l'àcid penicil·lànic. El tazobactam es diferencia del sulbactam per la presència d'un grup triazol en posició 3. No s'utilitzen com a antibiòtics en si, ja que tots tenen una baixa activitat antibacteriana, sinó com associats. Els inhibidors betalactàmics s'uneixen a les betalactamases formant enllaços covalents amb aminoàcids residuals al centre actiu de les betalactamases, inactivant-les de forma irreversible, aconseguint un augment de l'activitat dels antibiòtics betalactàmics sensibles a betalactamases. Actualment les associacions d'aquests inhibidors són àcid clavulànic amb amoxicil·lina, sulbactam amb ampil·lina, àcid clavulànic amb ticarcil·lina i piperacil·lina amb tazobactam, aquestes combinacions augmenten l'activitat antibacteriana dels betalactàmics de 4 a 32 cops més.

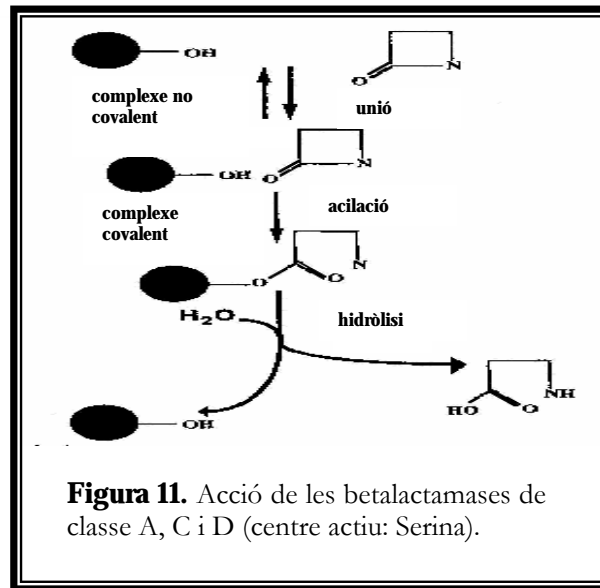
4) Els **carbapenems** tenen com a base un anell betalactàmic fusionat a un pirrolidínic compartint un nitrogen. Aquestes modificacions i les cadenes laterals condicionen una major afinitat per les PBP, un augment de la potència, de l'espectre antibacterià i de la resistència enfront les betalactamases, essent els betalactàmics de més ampli espectre i activitat.

5) Els **monobactams** són derivats de l'àcid 3-aminomonobactàmic. Tenen una estructura betalactàmica simple amb una estructura monocíclica on l'anell betalactàmic no està unit a cap altre.

1.7. Betalactamases

El mecanisme majoritari de resistència a betalactàmics en bacils gramnegatius causants d'infecció és l'expressió de betalactamases. Les **betalactamases** són enzims que hidrolitzen penicil·lines, cefalosporines, monobactams i/o carbapenems, per trencament de l'anell betalactàmic. Aquests enzims es troben codificats per gens (**bla**) de localització molt variable, podent-se trobar tant en DNA cromosòmic com en plasmídic. Molt sovint s'han trobat formant part d'integrans, ja sigui com a gens casset o localitzats a la part variable d'integrans compostos. Però també s'han localitzat formant part d'estructures que presenten mobilitat pròpia com és el cas dels transposons.

Les betalactamases s'uneixen als betalactàmics mitjançant un enllaç no covalent reversible; posteriorment té lloc una acilació entre el grup éster de l'anell betalactàmic i el grup hidroxil lliure del residu de **serina** (en el cas de les betalactamases de classe A, C i D) del centre actiu de l'enzim. Finalment l'enzim, que resta actiu, és hidrolitzat i alliberat, i l'antibiòtic, inactivat (129)(Figura 11).



Alguns enzims en comptes de serina al centre actiu requereixen de **zinc** com a molècula activa, són els metal·loenzims o les betalactamases de classe B d'Ambller (16).

L'existència d'una pressió selectiva per l'abús de betalactàmics està conduint a una selecció de gens que codifiquen betalactamases que han ampliat el seu perfil d'hidròlisi. La introducció de la penicil·lina G i la posterior introducció de les diferents generacions de cefalosporines ha donat lloc paral·lelament a l'aparició de penicil·linases, cefalosporinases d'ampli espectre i penicil·linases-cefalosporinases d'espectre ampliat (betalactamases d'espectre ampliat o BLEAs). En l'actualitat, les betalactamases són capaces d'hidrolitzar la totalitat dels betalactàmics.

Aquesta diversitat d'enzims descrits, fa que la **classificació de les betalactamases** sigui complexa (Taula 3). Al llarg dels anys s'han proposat diferents tipus de classificacions segons criteris de perfil del substrat d'hidròlisi (103), de classe molecular (2), o segons les característiques funcionals (15, 18). La classificació de Bush, Jacoby i Medeiros (18) divideix les betalactamases en quatre grans grups segons el perfil del substrat d'hidròlisi i el perfil d'inhibició pels antibiòtics inhibidors de les betalactamases, com és l'àcid clavulànic.

Tots els enterobacteris (a excepció de les salmonel·les i possiblement *P. mirabilis*) presenten en el seu cromosoma un gen que codifica una betalactamasa, essent aquesta específica d'espècie (73). Poden expressar-se constitutivament, a nivells basals en els quals no mostren cap patró de resistència o poden ser induïdes per algun betalactàmic. En ambdós casos, mutacions

puntuals poder comportar la hiperproducció de l'enzim, en aquest darrer cas la resistència afecta a la major part de betalactàmics.

Les betalactamases plasmídiques generalment s'expressen constitutivament tot i que de manera variable. És probable que tinguin el seu origen en les betalactamases cromosòmiques, com és el cas de la SHV-1 i la betalactamasa plasmídica de *K. pneumoniae* que presenta un 100% d'homologia o la CTX-M-5 amb la betalactamasa cromosòmica KLUA-1 de *Kluyvera ascorbata* (66); tot i que en molts casos l'organisme del qual provenen es desconeix. L'amplia distribució de les betalactamases es deu al fet que molts dels gens que les codifiquen es troben formant part d'integrans o d'elements mòbils com els gens casset o els transposons i aquests a la vegada poden estar formant part d'un plasmidi, fet que els hi confereix una gran difusibilitat, fent que betalactamases que estaven confinades a un grup bacterià puguin observar-se, tard o d'hora, en altres espècies, fins i tot taxonòmicament allunyades.

Podem agrupar les **betalactamases plasmídiques** en quatre grans grups en funció del seu fenotip de resistència:

- 1) Betalactamases d'ampli espectre (grups 2b, 2ci 2d): TEM, SHV, OXA i CARB (PSE).
- 2) Betalactamases d'espectre ampliat o BLEAs (grups 2be i 2d): TEM, SHV, OXA i CTX-M.
- 3) Betalactamases resistents a inhibidors (grup 2br): TEM, SHV i OXY-2.
- 4) AmpC plasmídiques (grup1): LAT, FOX, MIR, CMY-2 a 7, etc.
- 5) Carbapenemases plasmídiques: grup 3a: VIM, IMP, KPC-1, etc.
grup 2d: OXA-10/-23/-27 i -40.

Taula 3. Classificació de les betalactamases (18).

Classe Ambler ^b	Grup funcional Bush, acoby, Medeiros	Centre actiu	Perfil de substrats preferents	Inhibició		Enzims representatius
				AC ^c	EDTA	
A	2 ^a	Serina	Penicil·lines	+	-	Penicil·linases de bacteris grampositius, que podent ser cromosòmiques o plasmídiques .
A	2b	Serina	Penicil·lines i cefalosporines	+	-	Penicil·linases-cefalosporinases. Plasmídiques: TEM-1/2, SHV-1, OHIO-1 i ROB-1. Cromosòmica: SHV-1 de <i>K. pneumoniae</i> .
A	2be	Serina	Penicil·lines, cefalosporines i monobactams	+	-	Penicil·linases-cefalosporinases d' espectre ampliat Plasmídiques: TEM-2/3, TEM-42, TEM-43, TEM-46 a 50, TEM-52 a 58, TEM-60 a 64, TEM-66 a 72, TEM-75, TEM-79 a 102, TEM-104 a 139; SHV-2 a 63 (excepte SHV-10); CTX-M-1 a 40; TOHO-1/2, UOE-1/2, SFO-1, FEC-1, VEB-1 a 3, PER-1/2, GES-1 a 4, IBC-1/2 i TLA-1. Cromosòmica: K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i> , KLUA-1 a KLUA-12 de <i>Kluyvera ascorbata</i> , KLUC-1 de <i>Kluyvera cryocrescens</i> i KLUG-1 de <i>K. georgiana</i> .
A	2br	Serina	Penicil·lines	-	-	Penicil·linases resistents als inhibidors derivades de TEM (IRT). Plasmídiques: TEM-30 a 41, TEM-44 a 45, TEM-51, TEM-54, TEM-59, TEM-65, TEM-67, TEM-73, TEM-74, TEM-76 a 78, TEM-81 a 84, TEM-103 i SHV-10.

A	2c	Serina	Penicil·lins carbencil·lins	+	-	<u>Penicil·lins-carbencil·lins</u> plasmídiques: PSE-1 (CARB-2), PSE-3, PSE-4 (CARB-1), PSE-5 (CARB-7), CARB-3 a CARB-9.
A	2e	Serina	Penicil·lins, cefalosporines i cefuroxima	+	-	<u>Cefalosporinasa cromosòmica</u> <u>induïble:</u> Sed-1 de <i>Citrobacter koseri</i> i <i>Citrobacter sedlakii</i> . L-2 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .
A	2f	Serina	Penicil·lins, cefalosporines i carbapenems	+	-	<u>Carbapenemes:</u> NMC-A i IMI-1 d' <i>Enterobacter cloacae</i> , SME-1 a SME-3 de <i>Serratia marcescens</i> , GES-2 a 4, KPC-1 a 4, en <i>Bacillus cereus</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> i <i>K. pneumoniae</i> .
B1	3 ^a	Zinc	Penicil·lins, cefalosporines i	-	+	<u>Carbapenemes plasmídiques:</u> IMP-1 a 17, VIM-1 a 11, MET-1.
B2	3b	Zinc	carbapenems excepte els	-	+	<u>Carbapenemes cromosòmiques:</u> CphA i Sfh-1 d' <i>Aeromonas hydrophila</i> .
B3	3 ^a	Zinc	monobactams	-	+	<u>Carbapenemasa cromosòmica</u> <u>induïble:</u> L1 i THIN-B de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> i <i>Janthinobacterium lividum</i> .
B3	3c	Zinc		-	+	<u>Carbapenemasa cromosòmica:</u> FEZ-1 de <i>Legionella gormanii</i> .
C	1	Serina	Penicil·lins, cefalosporines i monobactams	-	-	Enterobacteris i <i>Pseudomonas</i> , tant cromosòmiques com plasmídiques: FOX-1 a 6, MIR-1 A 3, MOX-1/2, LAT-1 a 4, CMY-1 a CMY-19, BUT-1, BIL-1, ABA-1, ACT-1, ACC-1/2, DHA-1, DHA-2, ...
D	2d	Serina	Penicil·lins isoxazòliques	+/-	-	<u>Penicil·lins-oxacil·lins</u> plasmídiques: OXA-1 a OXA-80 (OXA-10, OXA-23 a OXA-27 i OXA-40 amb activitat carbapenemàsica).

? ^d	4	Serina	Penicil·lins	-	-	Penicil·lina cromosòmica plasmídica de <i>Burkholderia cepacia</i> .	o
----------------	---	--------	--------------	---	---	---	---

- a) classificació basada en el grup funcional (18).
- b) classificació basada en les característiques moleculars (2), ambdues actualitzades (17).
- c) àcid clavulànic.
- d) desconegut.

1.8. Betalactamases de la família de les CTX-M

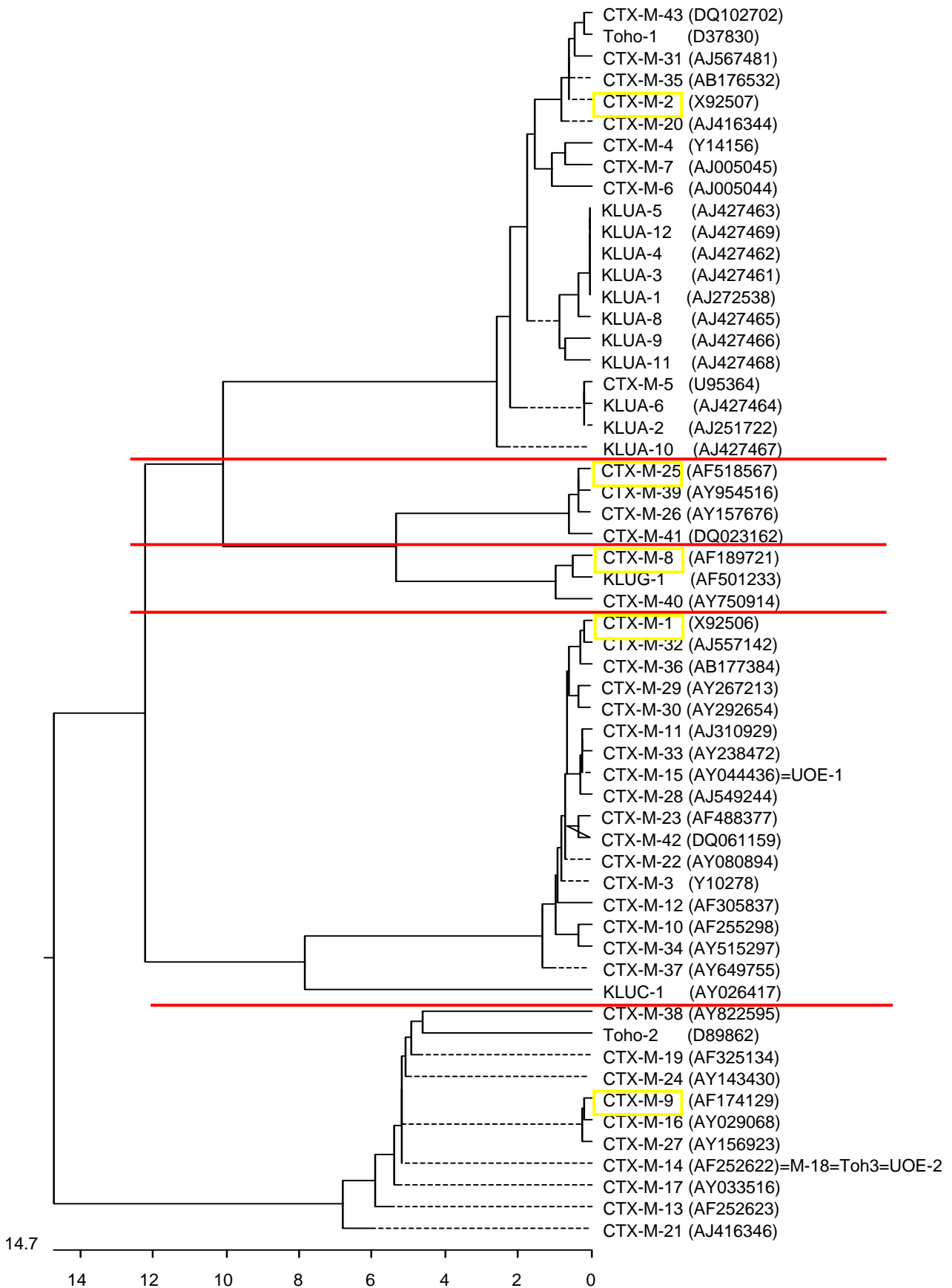
Un grup de gran interès clínic i epidemiològic són les **BLEAs del grup CTX-M**, les quals presenten una major afinitat per a la cefotaxima. Les CTX-M es van descriure com a una nova família d'enzims d'espectre ampliat fa setze anys. Al 1989 i 1990 aparegueren les betalactamases CTX-M-1 i MEN-1 a Alemanya i Itàlia respectivament, en soques d' *E. coli* (6, 8). Al mateix temps que començaven a aparèixer a Sud Amèrica (6). Al seqüenciar la betalactamasa MEN-1 s'observà que tenia només un 39% d'homologia amb betalactamases TEM i SHV descrites fins aleshores. Per tant era la primera betalactamasa plasmídica de classe A no-TEM i no-SHV BLEA descrita. Anys més tard es descrigué la betalactamasa d'espectre ampliat Toho-1, la qual mantenia un 83% d'homologia amb la MEN-1. Posteriorment s'observà com la betalactamasa MEN-1 i CTX-M-1 eren la mateixa i que la Toho-1 era una variant d'aquesta, la qual es designà CTX-M-2. Aquestes noves betalactamases es caracteritzaven per tenir punts isoelèctrics alcalins i que presentaven més resistència enfront la cefotaxima que enfront la ceftazidima a la vegada que eren sensibles als inhibidors. Des de llavors aquesta família d'enzims ha anat creixent i disseminant-se arreu del món i en diferents espècies bacterianes, però sobretot en enterobacteris (*Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter aerogenes*, etc.).

Actualment (octubre 2005) s'han descrit 49 enzims diferents, anomenats CTX-M, UOE o Toho, els quals es classifiquen segons la seva seqüència aminoacídica. L'estudi filogenètic revela la presència de cinc grans grups, els membres de cada grup mantenen una homologia superior al 94%, mentre que membre de diferents grups mantenen una homologia inferior al 90% (Figura 12) (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>):

- ◆ El primer grup (**grup CTX-M-1**) el formen els enzims CTX-M-1 (MEN-1), -3, -10, -11, -12, -15 (UOE-1), -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -34, -36, -37, -42.
- ◆ El segon grup (**grup CTX-M-2**) inclou la CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, -31, -35, -43 i la Toho-1.
- ◆ El tercer grup (**grup CTX-M-8**) està format per la CTX-M-8 i la CTX-M-40.
- ◆ El quart grup (**grup CTX-M-9**) està format per la CTX-M-9, -13, -14 (CTX-M-18), -16, -17, -19, -21, -24, -27, -38, -46, -47, -48, -49, -50, -51 i la Toho-2.
- ◆ I per últim, el cinquè grup (**grup CTX-M-25**) està format per la CTX-M-25, -26, -39 i la -41.

Entre tots cinc grups existeix una baixa homologia (entre un 68.7 i un 88.2%) fet que fa pensar que cada grup prové d'origens diferents. Fins ara s'ha pogut observar que els enzims del grup CTX-M-1 presenten una baixa homologia (78.4 i 86%) amb la betalactamasa cromosòmica **KLUC-1 de *K. cryocrescens*** (32). Però per exemple, enzims del grup CTX-M-2 comparteixen una homologia de entre un 96.6 % i un 100% (CTX-M-5) amb la betalactamasa cromosòmica de ***K. ascorbata*, KLUA-1** (100% homòloga amb KLUA-2) (84). Així com també la betalactamasa CTX-M-8 presenta una homologia d'un 99% amb la betalactamasa cromosòmica de ***K. georgiana*, KLUG-1**, havent-hi a més a més entre aquestes dues últimes una homologia entre el 83-88% dels seus entorns genètics (97). Estudis molt recents de l'entorn genètic de la betalactamasa cromosòmica de *K. georgiana* han detectat una elevada homologia (99%) amb 2.7 kb de l'entorn genètic de la betalactamasa CTX-M-9 localitzada a l'integró In60 i d'un 100% amb la betalactamasa CTX-M-14 (89). Aquesta alta homologia entre els enzims naturals de *Kluyvera* i els enzims adquirits CTX-M suggereix que les betalactamases naturals de *K. ascorbata* i *K. georgiana* puguin ser progenitors de les betalactamases dels grups CTX-M-2 i CTX-M-8 respectivament. D'aquesta manera els progenitors dels grups CTX-M-1 i CTX-M-25 serien encara desconeguts.

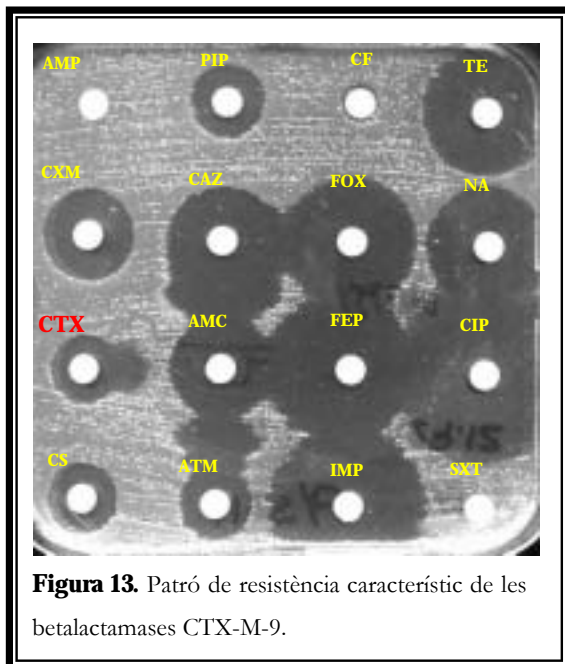
Figura 12. Arbre filogenètic realitzat a través de la comparació de seqüències aminoacídiques seguint el mètode Clustal i el programa DNASTar. Actualitzat a l'octubre 2005.



Els gens *bla*_{KLUA}, *bla*_{KLUC} i *bla*_{KLUG} s'han descrit localitzats al cromosoma on les seqüències que es troben als seus voltants tenen una certa homologia entre elles (32, 66, 97). Els gens *bla*_{CTX-M} s'han localitzat en plasmidis que varien molt en el seu tamany, coexistint molt freqüentment amb el gen *bla*_{TEM-1}. Els plasmidis portadors del gen *bla*_{CTX-M} normalment són conjugables *in vitro*. Però també s'han localitzat aquests gens al cromosoma (134). Aquest fet suggereix una possible mobilitat d'aquests gens que permetria una àmplia i ràpida difusió.

Totes les betalactamases de la família de les CTX-M, a excepció de la Toho-2 que té dos residus menys, contenen 291 residus d'aminoàcids, que donen a la proteïna una massa molecular de 28kDa. Els punts isoelèctrics d'aquestes varien en el rang de 7.4 a 9. Aquestes betalactamases són menys eficients que les TEM i les SHV enfront les penicil·lines.

Les BLEAs tenen un espectre d'hidròlisi estès enfront les oxymino-cefalosporines i monobactams, mantenint-se sensibles a la cefoxitina, a inhibidors de betalactamases i als carbapenems. Les **CTX-M** es caracteritzen per ser més actives enfront la cefotaxima que enfront l'aztreonam o la ceftazidima (Figura 13). Tot i que han aparegut variants amb mutacions al centre actiu *omega-loop*, com la CTX-M-15, -16, -27 i -32, més actives enfront aquesta última gràcies a una substitució Asp240Gly o la CTX-M-19 amb una substitució a Pro167Ser conferint-li també més resistència enfront la ceftazidima que a la cefotaxima (11, 21). O la betalactamasa CTX-M-23 amb una substitució de Pro167Thr que també li confereix un augment de la hidròli-



si de la ceftazidima. Els residus de **Ser-237** i **Arg-276** semblen ser els responsables de l'activitat **cefotaximasa** però el perfil d'espectre ampliat és una característica intrínseca i no producte de mutacions puntuals (48, 49).

L'antibiograma interpretatiu per a les betalactamases de tipus CTX-M serà de resistència enfront totes les cefalosporines d'espectre ampliat i l'aztreonam.

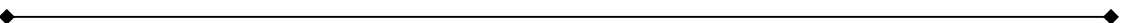
1.9. L'enzim CTX-M-9

Fruit d'un estudi realitzat al nostre Hospital, basat en la detecció i caracterització de BLEAs en enterobacteris durant el període 1996-1999 (105), es trobaren soques que presentaven sensibilitat reduïda o resistència enfront les penicil·lines, cefalosporines (excepte la cefoxitina i la ceftazidima) i a l'aztreonam, mostrant un fenotip de sinèrgia entre l'àcid clavulànic i la cefotaxima, característic de BLEA. Es seleccionà una d'aquestes soques (**785-D**) i es realitzà l'estudi per caracteritzar la betalactamasa. L'estudi del pI mostrà un punt al voltant de 8, el qual presentava activitat al ésser revelat amb ceftriaxona. A l'hora de caracteritzar el **pI de \cong 8** amb les PCR compatibles amb aquest punt (*bla_{SHV}* i *bla_{OXA}*) foren totes negatives indicant que podria tractar-se d'una nova betalactamasa d'espectre ampliat. Aquesta soca es conjugà (MSP492) per realitzar estudis de clonació, subclonació i seqüenciació. A partir dels resultats obtinguts, tant fenotípics com genotípics, es descrigué una nova betalactamasa de la família de les CTX-M, la **CTX-M-9** (107).

L'estudi de l'entorn genètic del gen *bla_{CTX-M-9}* va demostrar la presència a l'extrem 5' de l'**orf513**, el qual s'havia descrit formant part dels integrons compostos In6, In7 i l'integró present en el plasmidi pSAL-1. Aquest fet va fer pensar que pogués estar dins d'un integró, i a partir de diferents clonacions i posteriors seqüenciacions es va confirmar aquesta hipòtesi i es va anomenar **In60**, essent aquest un nou integró compost de classe 1 (GenBank AF1741299 (106)). Aquest integró es caracteritza per presentar les seqüències conservades dels integrons de classe 1 (5'CS i 3'CS), entre les quals hi ha dos gens casset: **dfiA16** (dihidrofolat-reductasa) i **aadA2** (aminoglicòsid-adeniltransferasa), a continuació trobem l'**orf513** i a continuació una regió descrita per Valentine i col. (124) com a punt calent de recombinació. Seguidament es troba el gen *bla_{CTX-M-9}* que junt amb una regió de 394 pb del seu extrem 3', presenten una homologia del 81 i 78% amb els gens cromosòmics *bla_{KLU-1}* i l'**orf β** de *K. ascorbata* (nombre d'accés AF272538). Posteriorment es troba una nova seqüència d'inserció, la **IS3000**, caracteritzada per contenir a cada extrem unes repeticions invertides (IR) imperfectes i el gen codificador d'una possible transposasa, degut a una elevada homologia amb la transposasa del Tn5501 descrit a *Pseudomonas putida*. Posteriorment a la IS es troba una regió *attC* que conté 48 nucleòtids idèntics als descrits en el gen casset **aadA2** i seguidament hi ha la segona repetició de l'extrem 3'CS conservat dels integrons de la classe 1, que conté els gens *qacEA1* i *sul1* (Figura 8). Tal i com s'ha descrit a la bibliografia alguns integrons de classe 1 i 2 presenten als seus extrems IR que li confereixen propietats de transposició (58). Es confirmà una IR a 1193 pb respecte al segment 5'CS a l'extrem 5', però no s'aconseguí trobar a l'altre extrem.

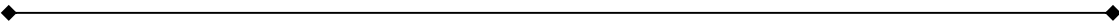
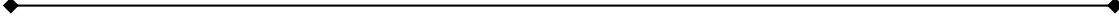
Pel que fa al període comprés entre 1996 i 1999, la incidència de CTX-M-9 era elevada en proporció a les altres BLEAs, ja que per exemple, no va ser fins al 1999 que no es detectà la primera CTX-M-14 i la primera CTX-M-3. La incidència de SHV-2 i SHV-12 era molt baixa, es mantenia entre 1 i 4 soques per any durant aquest període. Tot i aquest increment, la incidència de CTX-M-9 era baixa. Cal destacar que un 39.4% d'aquestes soques provenien de pacients extra-hospitalaris i un 60.6% d'intra-hospitalaris però que en cap cas corresponien a soques relacionades amb brots epidèmics.

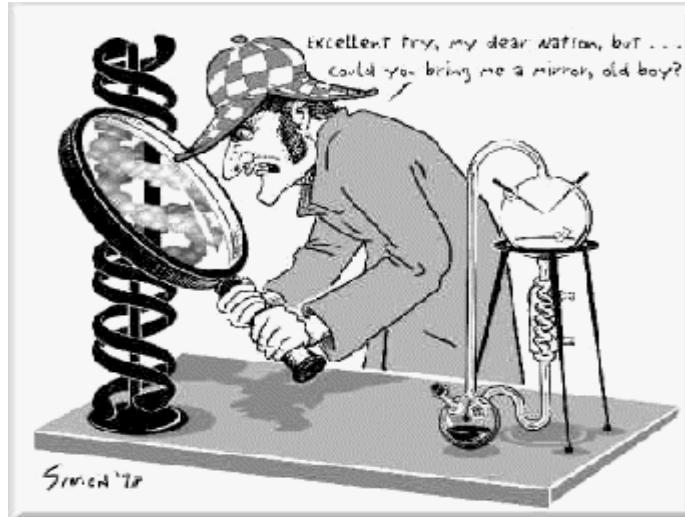
El fet que la incidència d'aquests enzims tingués un pic i un augment tant pronunciat i que cada cop es trobin en més d'espècies bacterianes i en àrees geogràfiques distants, fa pensar que si l'origen d'aquests enzims està en les betalactamases cromosòmiques de diferents espècies algun element mòbil deu haver intervingut en la seva posterior difusió.





2. OBJECTIUS



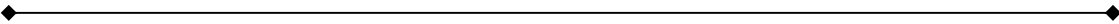
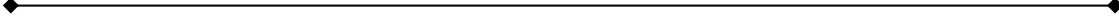


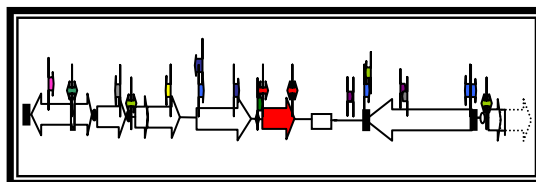
2. OBJECTIUS

Al final de la dècada dels 90, donada la creixent incidència de BLEAs al nostre hospital i en concret de la CTX-M-9, ens vam plantejar esbrinar el per què d'aquest fet. A partir dels coneixements previs comentats, hipotetitzarem que el gen que codifica la betalactamasa CTX-M-9 es trobava en un plasmidi conjugatiu que possiblement hauria difós per diferents clons bacterians. A més, molt probablement aquest gen podria trobar-se en algun element mòbil que encara afavorís més aquesta difusió. Per altra banda i donat que els bacteriòfags són un dels vehicles més eficients alhora de transferir fragments de DNA entre les cèl·lules, volíem esbrinar també el seu paper en l'increment dels nivells de resistència, particularment en gramnegatius, durant els últims anys.

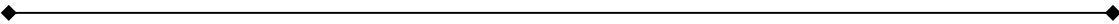
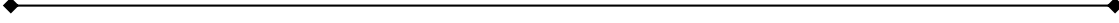
Així doncs, els objectius d'aquesta tesi han estat:

- 1) Descartar cap relació clonal entre les soques productores de la betalactamasa CTX-M-9 recollides en un període de quatre anys (1996 a 1999).
- 2) Determinar si els entorns del gen *bla*_{CTX-M-9}, l'In60, és una estructura conservada en totes les soques per, d'aquesta manera, obtenir informació sobre l'origen, formació i evolució d'aquest integró.
- 3) Caracteritzar els plasmidis portadors del gen *bla*_{CTX-M-9}.
- 4) Determinar el paper que poden jugar en la difusió de betalactamases els bacteriòfags aïllats en aigües residuals tant humanes com animals.

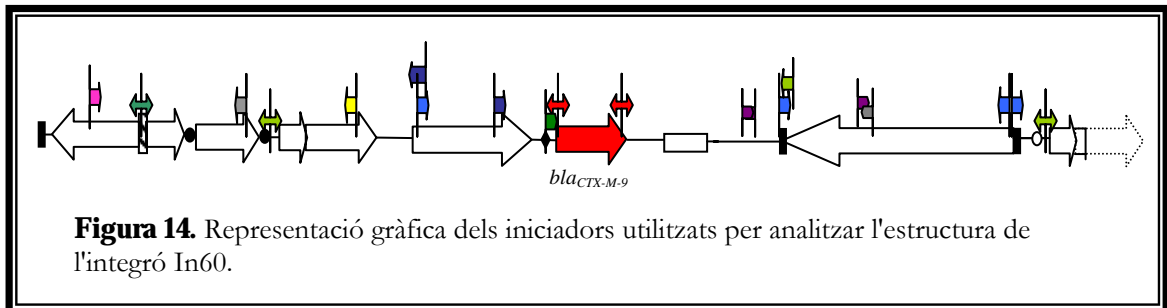




3. RESULTATS I DISCUSSIÓ



5) RESULTATS I DISCUSSIÓ



3.1. Selecció de les soques a estudiar

Des de l'any 1996 al 1999 han estat aïllades 37 soques (33 *E. coli* i 4 *S. enterica*) portadores de la BLEA CTX-M-9 (caracteritzada pel fenotip i la amplificació positiva amb iniciadors específics del grup de la betalactamasa CTX-M-9). L'any 2000 s'observà com aquesta betalactamasa es trobava situada dins d'un integró complex de classe 1, l'In60 (106).

El nostre treball (44) no contempla ni les 4 salmonel·les ni 3 de les 33 *E. coli*. La soca 1381-D perquè provenia del mateix pacient que la soca 1382-D, la soca 1387-D perquè resultà no ser una CTX-M-9 sinó una CTX-M-14 flanquejada per la IS*Ecp1* i la IS*903*, i la soca 743-D perquè no es pogué recuperar de l'arxiu. Tot i això, les soques 1381-D i 1387-D sí que foren incloses a l'estudi de macrorestricció genòmica amb alternança de camps.

Donat que s'han descrit soques portadores de CTX-M-9 conjuntament amb d'altres betalactamases d'espectre ampliat com la SHV-12 (80), on la presència d'aquesta associació pot passar desapercibuda a l'observar el patró de resistència de la soca, es descartà aquesta possibilitat tant per la determinació del punt isoelèctric de les betalactamases presents en aquestes soques com per PCR dels gens *bla*_{SHV}. Totes les soques resultaren negatives per aquest gen.

Les 30 soques d'*E. coli* de l'estudi foren aïllades en 10 homes d'edat compresa entre 5 i 95 anys i de 20 dones d'edat compresa entre 25 i 92 anys. Les soques provenien de mostres d'orina, sang, catèters i altres, de pacients de diferents serveis (Taula 5 i 6).

Les 4 salmonel·les no contemplades en aquest estudi (a les quals tan sols se'ls hi va fer l'estudi plasmídic, Taula 7) foren aïllades de pacients amb gastroenteritis, tres dels quals

provenien de l'Hospital "Virgen de Arreixaca" (Múrcia) (113). Dos d'aquests pacients eren nens d'entre 1 i 3 anys i els altres dos eren adults. Cap dels 4 pacients tenien cap relació, vivien en zones diferents i foren atesos en dies diferents.

Taula 5. Mostres de les quals s'han aïllat les diferents soques d'*E. coli* amb CTX-M-9 a l'Hospital de Sant Pau.

	1996	1997	1998	1999	Total
Sang	6 ^b	2	10	7	25
Catèters	0	2	0	0	2
Altres ^a	0	0	1	0	1
	0	0	2	3 ^c	5

^{a)} 3 exudats externals, 1 drenatge i 1 femta (portador sà).

^{b)} D'una d'aquestes orines s'aïllà la soca 743-D (no inclosa a l'estudi).

^{c)} Pacient que també té una mostra d'orina el mateix any.

Taula 6. Serveis de l'Hospital de Sant Pau en els qual s'han aïllat les diferents soques amb CTX-M-9.

	1996	1997	1998	1999	Total
Endocrinologia	1	0	0	0	1
Hematologia	0	1	0	0	1 (1)
Patologia digestiva	1	0	0	0	1 (1)
Oncologia	3 ^b	1	1	1	6 (4)
UCI	0	1	1	0	2 (2)
Medicina interna	1	1	1	2	5 (5)
Cirurgia general	0	0	3	2	5 (4)
Cardiologia	0	0	0	1	1 (1)
Cirurgia cardíaca	0	0	0	2 ^a	2 (2)
Urgències generals	0	0	4	1	5
Urgències pediatria	0	0	1	0	1
Urgències ginecologia	0	0	1	0	1
Ambulatori	0	0	1	0	1

^{a)} Les dues mostres (exudat i orina) aïllades en aquest servei provenen del mateix pacient.

^{b)} D'un d'aquests pacients s'aïllà la soca 743-D (no inclosa a l'estudi).

() Pacients ingressats.

3.2. Estudi de la clonalitat

El primer objectiu fou estudiar si existia una relació epidemiològica entre les soques d'*E. coli* de l'estudi. La tècnica utilitzada fou la macrorestricció de DNA genòmic i electroforesi en camp pulsat o PFGE (OFAGE, *Orthogonal Field Agarose Gel Eletrophoresi*, Amersham Biosciences), utilitzant *XbaI* com enzim de restricció. S'analitzà el patró de camp pulsat

mitjançant el sistema informàtic BioImage System (Millipore, USA). S'observà com la majoria de les soques tenien com a mínim 8 bandes de diferència i es van considerar no clonals (Figura 15 i 17).

Una de les soques, la 1226-D, no és tipable ja que es va repetir dos cops el camp pulsat i sempre s'autolisava (75). Només trobem dues soques amb igual patró de restricció, la soca 1381-D i la 1382-D provenien del mateix pacient, per tant, una d'elles fou retirada de l'estudi. S'observen també dos grups, un format per les soques 759-D i 876-D, i l'altre format per les soques 1266-D i la 1249-D (Figura 15), on les soques que els integren es diferencien entre elles en 6 bandes i per tant podrien estar possiblement relacionades. Però, si ens adrecem a l'epidemiologia clínica, les dues primeres foren aïllades en el servei de patologia digestiva i a la unitat de cures intensives, respectivament, i les altres dues foren aïllades a urgències generals i a urgències pediàtriques amb un interval de sis mesos de diferència, descartant així una possible relació epidemiològica entre elles.

La diversitat clonal observada en el conjunt de soques portadores de la betalactamasa CTX-M-9, ha estat descrita per altres autors com Bou et al. (13), el qual observà com en un període de temps més curt, entre gener i octubre del 2001, a l'Hospital Juan Canalejo de la Coruña, es detectaren 17 soques portadores de la betalactamasa CTX-M-14, on les soques no estaven relacionades entre elles. Així, la diversitat clonal trobada en *E. coli* portador de la betalactamasa CTX-M-9 en l'àmbit hospitalari podria ser un reflex de la existència d'aquesta diversitat en la població sana, talment com s'ha descrit en altres microorganismes amb altres resistències, incloent *E. coli* resistent a fluoroquinolones (43), neumococs resistents a la penicil·lina (122) o fins i tot *Staphylococcus aureus* resistent a la meticil·lina (23) els quals han esdevingut un important problema no tant sols en l'àmbit hospitalari sinó també en la comunitat. El fet que no existeixi un clon predominant portador de la betalactamasa CTX-M-9 fa pensar que la difusió de la resistència es deu a la presència d'un element mòbil, com podria ser un plasmidi o un transposó.

3.3. Conjugacions

Es realitzaren conjugacions biparentals a 37°C de totes les soques de l'estudi. La transferibilitat de la resistència es comprovà en totes les soques mitjançant la conjugació amb la soca receptora HB101 kanamicina-azida resistent (111). De les 30 soques s'obtingueren només 13 transconjugants amb diferents freqüències de conjugació:

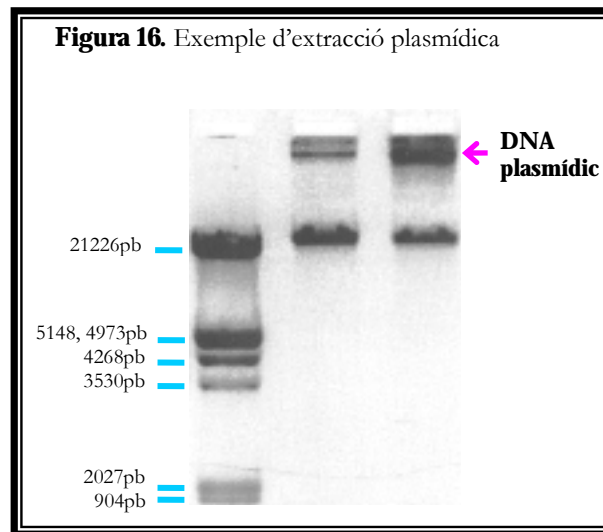
Donadora/ transconjugant (plasmidi): freqüència de conjugació

759-D / MSP510 (pMSP076):	1.1×10^{-4}
785-D / MSP492 (pMSP071):	2×10^{-7}
836-D / MSP511 (pMSP077):	1.3×10^{-6}
876-D / MSP512 (pMSP078):	8.3×10^{-7}
909-D / MSP513 (pMSP079):	3×10^{-4}
1104-D / MSP508 (pMSP074):	1.4×10^{-3}
1185-D / MSP514 (pMSP080):	5.6×10^{-6}
1249-D / MSP515 (pMSP081):	5.4×10^{-7}
1266-D / MSP516 (pMSP082):	3×10^{-8}
1290-D / MSP517 (pMSP083):	2.7×10^{-9}
1292-D / MSP518 (pMSP084):	1×10^{-9}
1383-D / MSP519 (pMSP085):	6×10^{-4}
1406-D / MSP509 (pMSP075):	5.6×10^{-5}

Els resultats positius en la conjugació confirmaven el fet observat en treballs previs (106, 107) de que el gen *bla*_{CTX-M-9} es troba localitzat en un plasmidi conjugatiu, fet que explica en part la gran difusió d'aquest enzim en aquest període de temps. Però, al mateix temps, s'observà com només un 43% de les soques conjugaren i algunes d'elles amb freqüències de conjugació molt baixes.

La conjugació pot donar-se per diferents mecanismes, ja sigui perquè el plasmidi és auto-transferible, perquè és mobilitzable i per tant necessita d'un altre per conjuguar, mitjançant la formació d'un cointegrat amb un plasmidi conjugatiu, etc. La baixa eficiència de conjugació obtinguda en la majoria de soques podria indicar algun dels dos últims casos o bé pot ser deguda al propi sistema de transferència del plasmidi o fins i tot a diferents factors fisiològics externs, com són la densitat cel·lular, temperatura, nivells d'oxigen, etc (96).

3.4 Estudi dels plasmidis portadors de *bla*_{CTX-M-9}



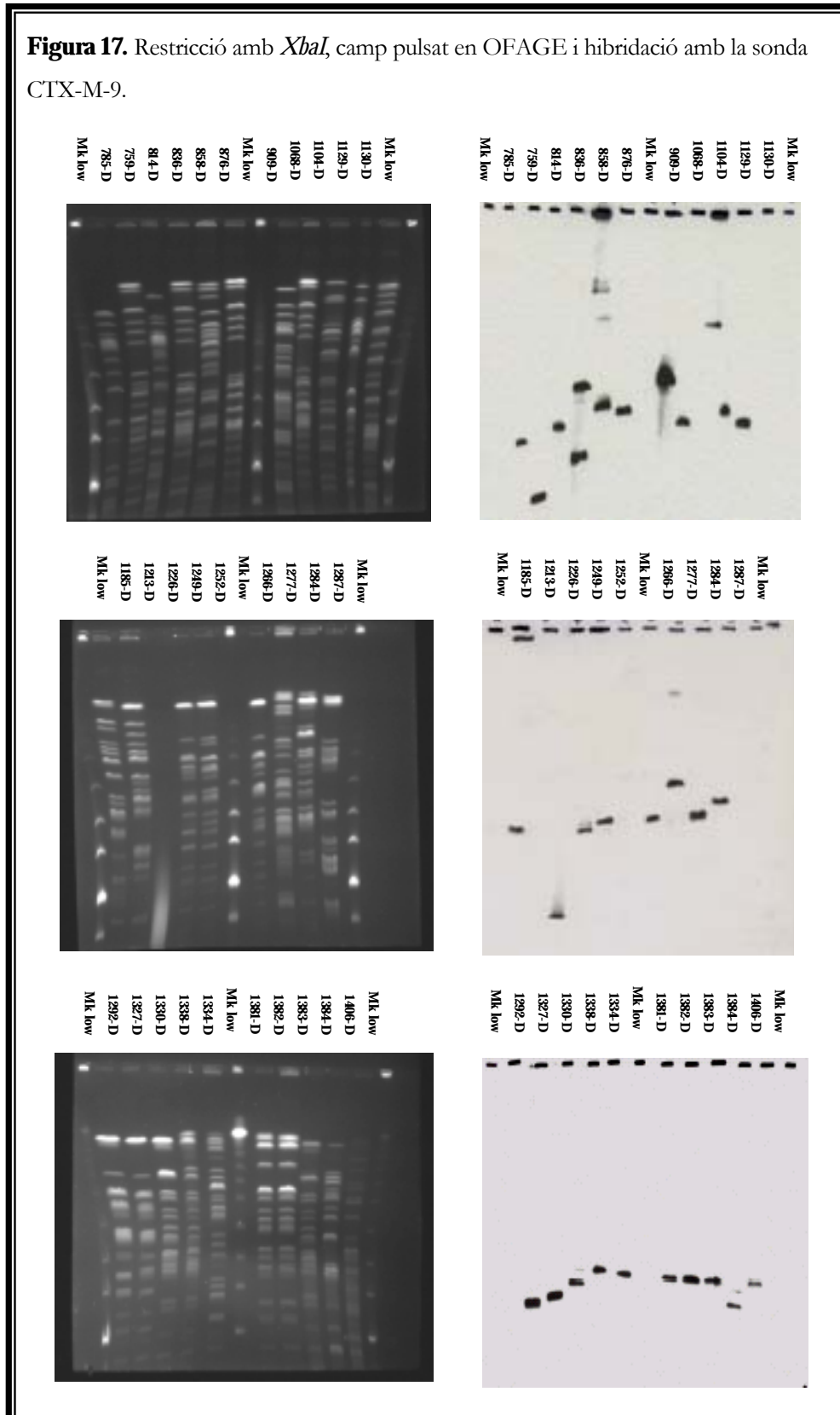
Per a realitzar l'estudi plasmídica, es varen fer diverses extraccions plasmídiques de diferents soques de l'estudi, observant-se la presència de plasmidis d'alt pes molecular, superior a 150 Kb (Figura 16). El fet de que els plasmidis fossin tan grans va fer impossible determinar el seu pes molecular mitjançant una simple extracció plasmídica i la seva posterior electroforesi en gels horitzontals d'agarosa

Un estudi preliminar dels plasmidis es va realitzar-se a partir del camp pulsat del DNA total digerit amb *Xba*I, transferint-lo a una membrana de nitrocel·lulosa i hibridant-lo amb la sonda CTX-M-9 (Figura 17). Les bandes d'hibridació obtingudes variaven entre les soques, obtenint-se bandes d'entre 60 a 310 Kb de pes molecular. Totes les soques presentaven una sola banda de hibridació, a excepció de la soca 836-D, que en presentava dues, una de 80 Kb i una de 180 Kb. Segons aquests resultats el gen *bla*_{CTX-M-9} es trobava o bé situat en diferents plasmidis o bé situat en diferents parts d'un mateix plasmidi. Altres CTX-M, com la CTX-M-3 s'ha trobat en diferents plasmidis (3 patrons plasmídics diferents en un conjunt de 23 soques) (51) o la CTX-M-14 (17 soques amb 9 patrons plasmídics diferents) (13), o la CTX-M-16 la qual es trobà en tres plasmidis diferents, un de 70 Kb, un altre de 98 Kb i un de 180 Kb (12).

El fet que en la soca 836-D trobem dues bandes d'hibridació de diferent pes molecular (80 i 180 Kb) pot indicar que hi ha dues còpies del gen *bla*_{CTX-M-9} en la mateixa soca. Bé en dos plasmidis diferents o en el mateix plasmidi o fins i tot al plasmidi i al cromosoma. Hi han estudis on s'han trobat betalactamases com la CTX-M-9, CTX-M-14 o la CTX-M-19, inserides al

cromosoma (24, 134, 135). Malgrat tot, a partir dels resultats obtinguts, no es pot diferenciar quines són bandes de DNA plasmídic o DNA cromosòmic.

Figura 17. Restricció amb *Xba*I, camp pulsat en OFAGE i hibridació amb la sonda CTX-M-9.



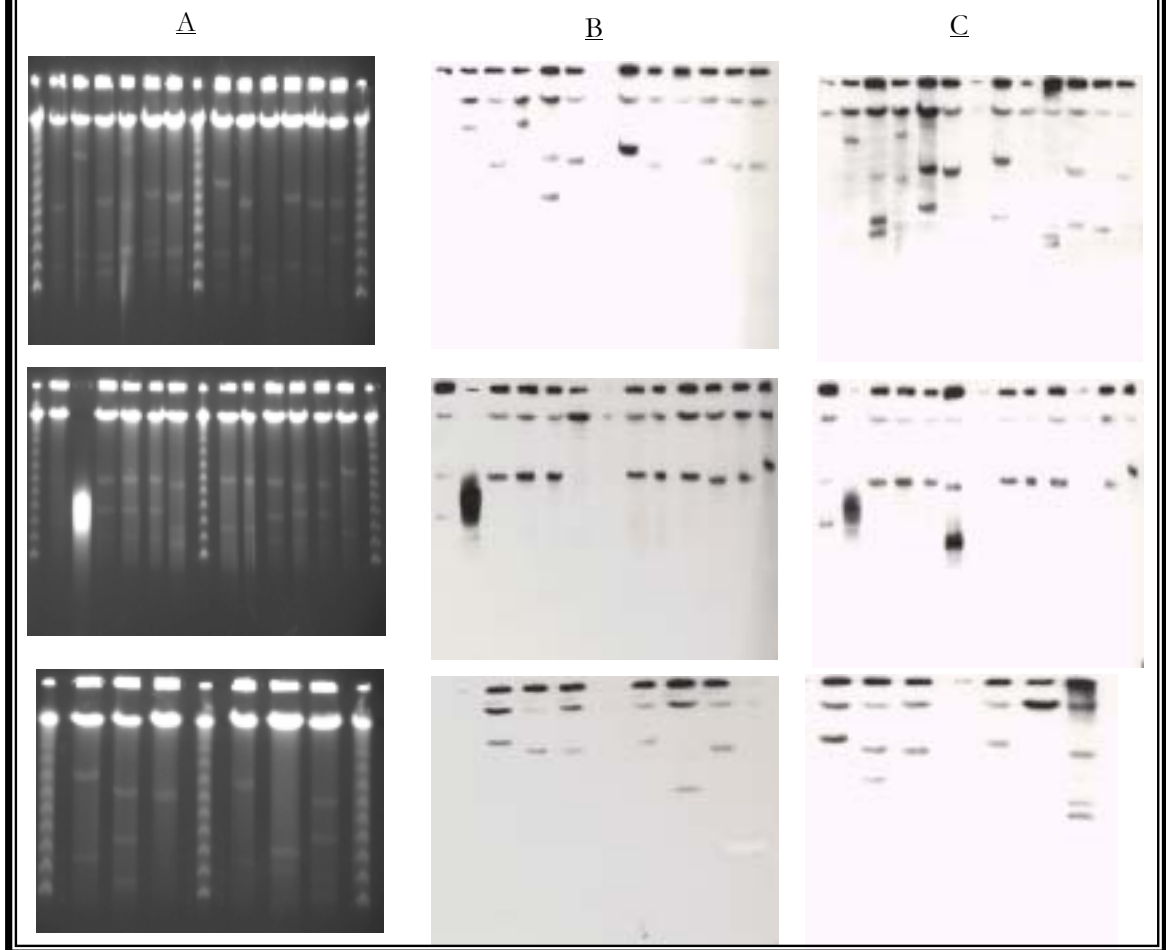
Donada la gran variabilitat que s'observà al digerir amb *XbaI*, es procedí a digerir el DNA total amb l'endonucleasa **SfI**, enzim que linealitzava el DNA plasmídic. Aquest DNA digerit va analitzar-se per PFGE (en aquest cas CHEF, *Contour-clamped Homogeneous Electric Field*, BioRad). S'obtingué una representació dels plasmidis presents a cada soca (Taula 7), observant-se la presència d'entre 1 i 4 plasmidis, d'entre 50 a 430 Kb de pes molecular (Figura 18, A). Per tant en aquestes soques estaven presents entre 1 i 4 plasmidis de grups d'incompatibilitat diferents. Els gels obtinguts foren transferits i hibridats amb la sonda CTX-M-9, i també, amb la sonda TEM.

Per conèixer el valor aproximat del pes molecular, el conjunt de bandes positives a la hibridació, enteses com a plasmidis portadors dels gens *bla*_{CTX-M-9} i *bla*_{TEM}, foren analitzades mitjançant el sistema informàtic BioImage System (Millipore, USA). En aquest anàlisi s'observà també l'existència d'una variabilitat plasmídica entre les soques.

La hibridació amb la **sonda CTX-M-9** (Figura 18, B) fou positiva en totes les soques menys en la soca 1277-D. El tamany dels plasmidis portadors del gen *bla*_{CTX-M-9} oscil·laven aproximadament entre 80 i 430 Kb, essent un plasmidi d'unes 280 Kb el predominant. Soques com la 858-D i la 1213-D presentaven dues bandes d'hibridació per tant aquestes soques presentaven dos plasmidis portadors del gen *bla*_{CTX-M-9}. Pel que fa a les tretze transconjugants, en set d'elles, la banda d'hibridació amb la sonda CTX-M-9 es corresponia amb la obtinguda a la seva donadora, però cinc transconjugants presentaven una banda d'un tamany superior a l'esperat, en la majoria de casos aproximadament d'unes 120 Kb de més (Figura 19). Per últim, en la soca 1277-D, no s'observà cap plasmidi que hibridés amb la sonda CTX-M-9.

La hibridació amb la **sonda TEM** (Figura 18, C) fou positiva en 26 de les 29 *E. coli* (una d'elles es lisava) tal i com era d'esperar pels resultats obtinguts per PCR i isoelectroenfoc (dades no mostrades), obtenint-se hibridacions positives per plasmidis que oscil·laven entre 60 i 430Kb. D'aquestes 26 soques 11 presentaven entre dues i tres bandes d'hibridació, en molts casos de baix pes molecular. També s'observà com en les 26 soques, almenys un dels plasmidis que hibridava amb TEM, hibridava també amb la sonda CTX-M-9. Les 4 salmonel·les no eren portadores de la betalactamasa TEM i per tant foren negatives per aquesta hibridació.

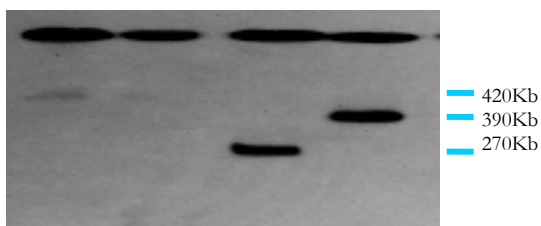
Figura 18. (A) DNA digerit amb *SI*, PFGE, (B) hibridació amb sonda CTX-M-9 i (C) hibridació amb sonda TEM. Les soques transconjugants no es troben presents en aquests gels.



En aquests casos on el transconjugant presentava un plasmidi de pes molecular superior s'observà que la suma dels pesos moleculars dels dos plasmidis presents a la soca donadora coincidia amb el pes molecular del plasmidi present a la seva transconjugant, per tant estàvem davant d'un cointegrat format en la conjugació i que es mantenia estable a la soca receptora. També s'observà com en 2 transconjugants, 1290-Dtc i 1292-Dtc, havien conjugat dos plasmidis, però en aquest cas no es troben formant un cointegrat a la soca receptora.

Figura 19. Exemple d'hibridació amb la sonda CTX-M-9 del DNA digerit amb l'endonucleasa *SI* de soques donadores i transconjugants.

759-D 759-Dtc 836-D 836-Dtc



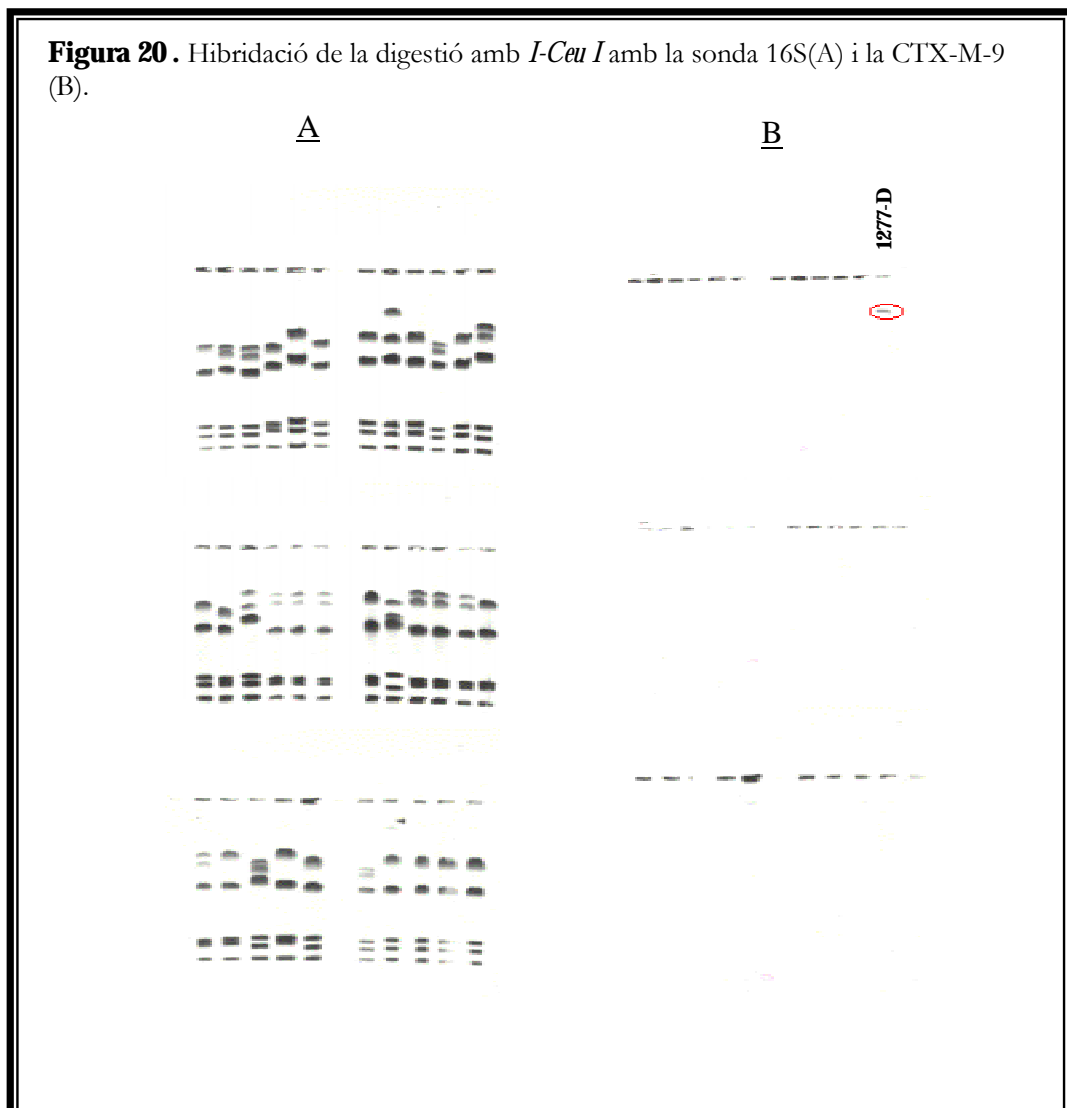
La presència d'aquests cointegrats s'ha observat prèviament en altres estudis similars (55). La soca 836-D que en el PFGE digerit amb *XbaI* i després hibridat amb la sonda CTX-M-9 només presentava dues bandes però només trobem un plasmidi portador del gen *bla*_{CTX-M-9} fet que fa pensar que hi havia 2 còpies en el mateix plasmidi.

Taula 7. Pesos moleculars aproximats dels plasmidis linearitzats obtinguts al digerir amb l'endonucleasa *SI* i la seva posterior hibridació amb les sondes CTX-M-9 i TEM.

Soca	PFGE <i>SI</i> (Kb)	Hibridació CTX-M-9 (Kb)	Hibridació TEM (Kb)
785-D	270, 110	270	NEG
785-D-Tc	370	370	NEG
759-D	420	420	420
814-D	280, 120, 80	280	280, 120, 80
836-D	430, 270, 140, 80	270	430, 270
858-D	290, 163, 123	290, 163	290, 163
876-D	290, 130, 80	290	290
909-D	340, 130, 100, 50	340	340, 130
1068-D	280, 140, 80	280	NEG
1104-D	110, 80	80	110, 80
1104-D-Tc	80	80	80
1129-D	300, 110	300	300, 110
1130-D	280, 100	280	280, 100
1185-D	290, 180	290	290
1213-D	280, 140	280, 140	280, 140
1226-D	LISIS	LISIS	LISIS
1249-D	280, 180, 90	280	280
1252-D	280, 180, 90	280	280
1266-D	280, 170	280	280
1277-D	260, 120, 80	NEG	260, 180, 80
1284-D	280, 120	280	280
1287-D	280, 120	280	280
1290-D	280, 160, 90	280	280
1292-D	260, 170, 90	260	NEG
1327-D	270, 170	270	270
1330-D	330, 110	330	330
1338-D	340, 110	340	340
1334-D	300, 170, 60	300	300, 170
1382-D	290	290	290
1383-D	330, 120	330	330
1384-D	150, 110	110	110
1406-D	290, 190, 90, 60	290	290, 90, 60
1406-D-Tc	300	300	300
110	330	330	NEG
112	330	330	NEG
114	340	340	NEG
116	340	340	NEG

Tal com s'ha comentat en la soca **1277-D**, no s'observà cap plasmidi que hibridés amb la sonda CTX-M-9, per tant s'estudià la possibilitat que el gen *bla*_{CTX-M-9} estigués situat al cromosoma. Es digerí el DNA total amb l'enzim de restricció ***I-Ceu I***, que només reconeix un lloc de restricció dins el gen que codifica per a l'RNA ribosomal 23S que només es troba present al DNA cromosòmic. S'analitzà en un camp pulsat, es transferí i s'hibridà amb la sonda específica del gen que codifica la subunitat 16S del RNA ribosomal i amb la sonda CTX-M-9, observant-se que només en aquesta soca, la mateixa banda positiva per la sonda CTX-M-9 també ho era per a la sonda 16S (Figura 20). Demostrant així la localització cromosòmica del gen *bla*_{CTX-M-9} en una de les soques de l'estudi.

Per tant, aquest fet, la presència de dos plasmidis de diferent tamany, tots dos portadors del gen *bla*_{CTX-M-9}, en la mateixa soca, i la presència de 2 còpies del gen en un mateix plasmidi, fa pensar en la vehiculació d'aquest gen mitjançant un transposó. Aquest fet podria explicar la gran difusió no clonal de la betalactamasa CTX-M-9.



S'ha observat, en certes ocasions, com alguns gens *bla*, com per exemple *bla*_{TEM-3} o *bla*_{PER-21} es troben localitzats en transposons (37, 78). Es varen realitzar estudis de **transponibilitat**, per veure si el gen *bla*_{CTX-M-9}, i a la vegada l'integró In60 que el conté, estaven situats dintre d'un transposó. Aquests estudis es realitzaren mitjançant vectors suïcides. El resultat d'aquest estudi fou ser negatiu mitjançant la tècnica de transponibilitat utilitzada. Així doncs, no es va poder confirmar la hipòtesi de la presència d'un transposó que mobilitzés el gen *bla*_{CTX-M-9}, i que expliqués la presència d'aquest al cromosoma de la soca 1277-D, ni tampoc de la presència de dos còpies en el mateix plasmidi. Val a dir que aquesta prova de transponibilitat es realitzà només amb una de les soques de l'estudi (785-D) i amb la seva transconjugant, les quals podrien haver patit alguna delecció o recombinació en l'estructura del transposó que els impedís la transposició.

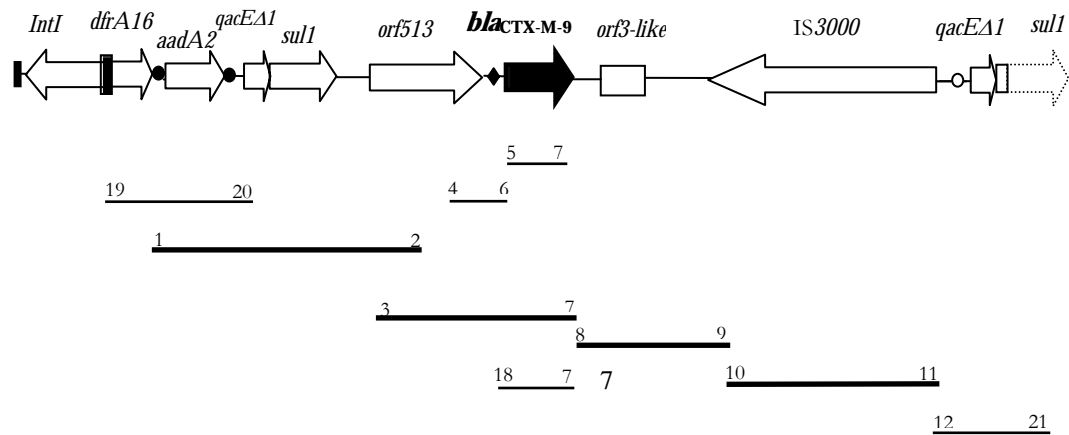
3.5. Estudi de l'entorn genètic de gen *bla*_{CTX-M-9}

Un cop vista la gran variabilitat obtinguda al realitzar la hibridació del DNA digerit amb els enzims *Xba*I i *S*I, es va estudiar l'entorn genètic del gen *bla*_{CTX-M-9} de les 30 soques d'*E. coli* i les 4 salmonel·les, per veure si també existien variacions en l'estructura de l'integró In60. Prèviament, s'amplificà i seqüencià el gen *bla*_{CTX-M-9} de totes les soques de l'estudi, obtenint-se una homologia del 100% amb el gen *bla*_{CTX-M-9} (AF174129). Es realitzà un mapeig des de la part conservada 5'CS fins al final de la seqüència d'inserció IS3000 de l'integró In60 mitjançant l'amplificació de tota la seva estructura a través de 4 PCRs solapades (Figura 21), amb els iniciadors: 5'CS-513IR (1 i 2), 513A-Istop (nº3 i 7), IstopR-orf3000stopR (nº8 i 9) i 785.S2-51.10A (nº10 i 11), amplificant en total unes 10.930 pb (Taula 8). Aquesta anàlisi determinà que un 64% de les soques presentaven els amplificats esperats però els 36% restant presentaven amplificats amb tamanys no esperats o simplement no amplificaven.

Les 11 soques que presentaren variacions foren: 1104-D, 1334-D, 1226-D, 1383-D, 1185-D, 1249-D, 1252-D, 1266-D, 1290-D, 1292-D i 1327-D. Aquestes soques que variaven en l'estructura de l'integró In60 s'estudiaren amb més detall per tal de veure que havia ocorregut, si es tractava de mutacions puntuals allà on hibridava l'iniciador o es tractava d'insercions o deleccions.

La soca **1104-D** presentava una PCR de la regió entre el gen *bla*_{CTX-M-9} i l'*orf1005* (de la IS3000) amb els iniciadors IstopR-orf3000stopR (nº8 i 9) positiva però d'un 3.5 Kb, 2 Kb més gran de l'esperat, aquest fet indicava una possible inserció (Figura 24). Per a completar la seqüenciació de tot el fragment s'utilitzaren nous iniciadors interns 1104-A i 1104-Arev (Taula 8)

Figura 21. Esquema representatiu de les PCRs realitzades per analitzar l'estructura de l'integró In60 (AF174129) en les soques de l'estudi (El número situat als fragments indica l'iniciador utilitzat (Taula 8)).



i s'observà que s'havia produït una inserció entre les bases número 8602 i 8603 respecte la seqüència del l'In60. Aquesta inserció de 2442 pb presentà una homologia del 99% amb la *ISEc8* (AY557606) (94) (Figura 2 de l'annex 1 (44)). Aquesta IS codifica per a tres pautes obertes de lectura situades en la mateixa direcció (*orf1*, *orf2* i *orf3*) flanquejades per dos repeticions invertides imperfectes de 18 i 21 pb. Pertany a la família de les *IS66* i fou descrita per primer cop adjacent a l'illa de patogenicitat (LEE) en *E. coli* EDL933 (AF071034)(94). Posteriorment, també fou descrita a *E. coli* O157:H7 Shakai on es trobaven 7 còpies completes i 4 parcials d'aquesta seqüència en tot el genoma (62).

En la soca **1334-D** (Figura 24), al realitzar la PCR amb els iniciadors 785.S2-51.10A (nº10 i 11)(Taula 8) s'obtingué un amplificat superior a l'esperat (Figura 24), quan es seqüencià s'observà que es tractava d'una inserció d'unes 820 pb localitzada dintre de la *IS3000*, entre les bases 10012 i 10013 de l'integró In60. Aquesta seqüència resultà idèntica, en un 100%, a la *IS26* (72) (AY557605) (Figura 2 de l'annex 1 (44)). La *IS26* pertany a la família de les *IS6*, molt estesa al món bacterià, relacionada molt estretament amb funcions de transposició, formant molts cops part de transposons com en el cas del *Tn2555* (36) o el *Tn2000* (83), acompanyant a betalactamases com la CTX-M-15 (39) o la SHV-12, precedint a integrons de classe 1 com l'In111 (portador de la betalactamasa d'ampli espectre IBC-1) (128) o fins i tot interrompent gens com la integrasa del integró de classe 1, In53 (83).

La soca **1226-D** també presentà una inserció ja que quan s'analitzà la segona còpia del segment conservat 3'CS mitjançant la PCR addicional 51.10C-sul1 (nº12 i 21)(Taula 8), l'amplificat obtingut era més gran a l'esperat (Figura 24). Aquest fragment fou seqüenciat i s'observà l'existència d'una segona còpia, però en aquest cas parcial, del gen casset *aadA2* i el seu punt de recombinació 59-be, a continuació de la *IS3000* (Figura 22). A més a més, aquesta és

l'única soca de l'estudi que a part de presentar la segona còpia 3'CS al complet, presenta l'*orf5* i l'*orf6* a continuació. Aquests dos ORFs o a vegades només l'*orf5*, s'han localitzat normalment darrera el segment conservat 3'CS d'integrans de classe 1 com poden ser l'In111 (128), l'In2 o fins i tot, com en el nostre cas, prosseguint la segona còpia 3'CS dels integrans compostos de classe 1 com són l'In36 i l'In37 (130).

Figura 22. Seqüència de la inserció parcial del gen casset *aadA2* just després de la seqüència d'inserció IS3000 (AY512972).

```
CGTTCCTCGAATGCCATGGATTTAGCCCAAAAAGACTAAATCTTACTCAAACAGAGCCCAAAATAGGG
ATCTCGAAAAAAGTAATACCCCTCTGGAGGCCACAGACGGCGGGGCTCCAGAGCACTTTGTCTGTT
TTTGGACGGAATAATCCCTAGAACCCCTATCCTGCTTACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCTTGG
TAGGTCGGGACGCGGAGGAATTCTTTGACCCGGTTCTTGAACAGGATCTATTTCGAGGCGCTGAGG
GAAACCTTGAAGCTATGGAACCTCGCAGCCGACTGGGCCGGCGATGAGCGAAATGTAAGTCTTAC
GTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAATAACCGGCAAAAATCGCGCCGAAGGATGTCTGCTGCCGACTG
GGCAATAAACCGCTACCTGCCAGTATCAGCCCGTCTTACTTGAAGCTAAGCAAGCTTATCTGGGA
CAAAAAGAAGATCACTTGGCCTCACGCGCAGATCACTTGAAGAATTTATTTCGCTTTGTGAAAGGC
GAGATCATCAAGTCAGTTGGTAAATGATGTCTAACAAATTCGTTCAAGCCGACCGCGCTACCGCGCG
CGGCTTAACCTCCGGCGTTAGATGCACTAAGCACATAATTGCTCACAGCCAAACTATCAGGTCAAAGTC
TGCTTTTATTATTTTAAAGCGTGCATAATAAGCCCTACACAAATTTGGGAGATATATCATGAAAGGCT
GGCTTTTTCTTGTATCGCAATAGTTGGCGAAGTAATCGCAACATCCGCATTAATAATCTAGCGAGGG
CTTACTAAGCTTGGCCCTTCCGCGGTTGTCATAATCGGTTATGGCATCGCATTTTATTTTCTTTCTCT
GGTTCTGAAATCCATCCCTGTCTGGTGTGCTTATGCAGTCTGGTCCGGACTCGGCGTCTGCATAAAT
ACAGCCAT
```

orf1005 parcialment seqüenciat
qacE1 parcialment seqüenciat

IR IS3000

inserció *aadA2* parcial

59-be

La soca **1383-D** presentava variacions a l'extrem 5' del gen *bla*_{CTX-M-9}, mantenint-se intacta la part posterior a aquest (Figura 24). No s'ha pogut detectar cap element dels que es troben presents a la part 5' de l'integró, les PCRs d'aquesta part són negatives, només s'obtenen PCRs positives quan s'amplifica a partir del punt calent de recombinació de l'*orf513*, amb l'iniciador Punt rec (nº18) situat abans del gen *bla*_{CTX-M-9}. Els gens presents davant aquest punt de recombinació resten pendents d'estudi.

Al fer la PCR de les 7 soques restants: **1185-D, 1249-D, 1252-D, 1266-D, 1290-D, 1292-D i 1327-D**, entre el fragment 5'CS i l'*orf513*, amb els iniciadors 5'CS-513IR (nº1 i 2) no s'obtingueren amplificats. La soca 1185-D, té present l'*orf513* però no la resta de l'estructura de l'extrem 5'. A les altres 6 soques l'integró In60 es troba truncat des d'un punt dintre de l'*orf513*, havent-se perdut la part 5' de l'integró (Figura 2 de l'annex 1 (44)). En aquestes 7 soques per tal de veure si estaven presents els dos gens casset (*drfA16* i *aadA2*) de l'In60, es va realitzar la PCR addicional corresponent, utilitzant els iniciadors, IntF1-aadA2R (nº19 i 20) (Taula 8) però resultaren totes negatives. Per confirmar que no tenien l'extrem 5', es va fer PCR de la part conservada de l'integró 5'CS-3'CS amb els iniciadors 5'CS-3'CS (nº1 i 1b) (Taula 8) i aquesta va resultar també negativa. Aquesta regió delecionada és una regió comú dins els integrans compostos de classe 1. Igual que en l'integró In60, l'*orf513* s'ha descrit en l'integró de pSAL-1 de *Salmonella enterica*

serovar Enteritidis (AJ237702)(125) portador del gen *bla*_{DHA-1}, en pIncF1/97 de *S. enterica* serovar Typhimurium (AJ310778)(127) portador del gen *dfxA18*, en pCMXR1 d' *E. coli* (AB061794)(35) portador del gen *bla*_{CMY-9}, en els integrons InS21 de pS1 de *S. enterica* serovar Infantis (AJ311891.2)(34) i In35 de pMAR-12 de *P. mirabilis* (AY079169)(4) portadors ambdós del gen *bla*_{CTX-M-2}, i per últim en pMG252 de *K. pneumoniae* (AY070235)(123) portador del gen *qnr*. Un cas similar a aquest és el descrit per Saladin *et al.* (109) qui detectà una soca portadora de la betalactamasa CTX-M-9 (AJ416345) que en comptes de tenir present l'*orf513* a 5', té la *ISEcp1* seguida del punt de recombinació de l'*orf513* (en aquesta soca no s'estudià si presentava la resta de l'estructura de l'integró In60). Malgrat aquestes deleccions, totes 7 soques, al igual que la soca 1383-D mencionada anteriorment, presenten el punt calent de recombinació descrit per Valentine *et al.* (124) a l'extrem 3' de l'*orf513* i a 5' del gen *bla*_{CTX-M-9}, però no presenten la *ISEcp1* davant d'aquest.

Malgrat la pèrdua d'aquest fragment, les soques 1249-D, 1252-D, 1266-D, 1290-D, 1292-D i 1327-D són resistents a les sulfamides. Es descartà la presència d'un altre integró de classe 1 mitjançant la PCR 5'CS-3'CS, la qual resultà negativa en totes elles. També s'observa resistència enfront l'estreptomicina en les soques 1249-D, 1252-D, 1266-D i 1290-D, però aquesta, tal i com s'ha comprovat, no és deguda a la presència del gen casset *aadA2* descrit a l'In60, ja que la PCR per aquest és negativa, sinó que deu ser deguda a altres gens que confereixen també aquest tipus de resistència.

Per tant, s'ha observat a grans trets, cinc tipus d'estructures (I, II, III, IV i V) de l'integró In60 o In60-like. L'estructura tipus I és aquella que conservava tota l'estructura de l'In60 descrita, la tipus II la presenten les soques amb delecció de la part 5' del l'integró In60 presentant part de l'*orf513*, la soca que representa el tipus III presenta aquesta delecció però l'*orf513* està al complet, la tipus IV presenta també aquesta delecció a la part 5' del gen *bla* però en aquest cas l'*orf513* no està present i, finalment, en el grup V s'agrupen les soques que presenten insercions a la part 3' del gen *bla*.

La segona còpia del segment conservat 3'CS fou analitzat per PCR mitjançant els iniciadors 51.10C-sul1 (nº12 i 21) (Taula 8), observant-se que només la soca transconjugant 785-D-Tc, presentava l'estructura que s'havia descrit a l'integró In60. En totes les altres soques, amb excepció de la soca 1226-D, l'amplificat obtingut era inferior a l'esperat. En algunes soques s'ha seqüenciat aquest amplicó i dona una homologia del 99% amb el gens *merR* i *merT*. Aquests gens són típics de transposons (50, 93), per tant la seva presència podria estar indicant-nos la localització de l'integró In60 en un transposó o a prop d'ell. Aquesta part de l'estudi resta pendent d'anàlisi.

En un intent d'estudiar l'entorn genètic de l'integró In60, es realitzaren les PCRs des de la IS3000 a gens descrits als extrems d'altres integrons de classe 1, com són l'*orf5*, *orf6* i la IS6100, utilitzant els iniciadors 51.10C-*orf5* (nº12 i 22), 51.10C-*orf6* (nº12 i 23) i 51.10C-IS6100 (nº12-24) (Taula 8). Només una soca, la 1226-D, donà amplificats positius quan es realitzà la PCR entre la IS3000 i l'*orf5* i l'*orf6*, no detectant-se però la IS6100.

Quan es va estudiar la part 5' més distal de l'integró en les soques d'aquest estudi, mitjançant PCR i seqüenciació amb els iniciadors IntIF i 34IR (nº19 i 2) (Taula 8), s'observà com en un terç de les soques la seqüència d'inserció **IS26** es trobava situada interrompent el gen de la integrasa en la base 131 tornant a iniciar-se en la base 396 respecte a la seqüència descrita a l'In60. Aquestes soques resten pendents d'estudi.

Figura 23. Inserció de la IS26 interrompent la integrasa de la soca 876-D entre les bases indicades respecte la seqüència de l'integró In60 (IS26 i In60).

131

CCGGCCGTTTCGATGCGGCACCGATGGCACTGTTGCAAATAGTCGGTGGTGATAAACTTATCATCCCCTTTTGCTGATGGA
 GCTGCACATGAACCCATTCAAAGGCCGGCATTTCAGCGTGACATCATTCTGTGGCCGTACGCTGGTACTGCAAATACG
 GCATCAGTTACCGTGAGCTGCAGGAGATGCTGGCTGAACGGGAGTGAATGTCGATCACTCCACGATTTACCGCTGGGT
 TCAGCGTTATGCGCCTGAAATGAAAAACGGCTGCGCTGGTACTGGCGTAAACCTCCGATCITTGCCCGTGGCACATGA
 TGAAACCTACGTGAAGGTCAATGCGCGCTGGGCGTATCTGTACCGGGCCGTCGACAGCCGGGGCCGCACTGTCGATTT
 TATCTCTCCCGTTCGTAACAGCAAAGCTGCATACCGGTTTCTGGGTAAAAATCCTCAACAACGTGAAGAAGTGGCAGAT
 CCCGCGATTTCATCAACACGGATAAAGCGCCCGCCTATGGTTCGCGCGCTTGCTCTGCTCAAACGCGAAGGCCGGTGGCCGT
 CTGACGTTGAACACCGACAGATTAAGTACCGGAACAACGTGATTGAATGCGATCATGGCAAACGAAACGGATAATCGG
 CGCCACGCTGGGATTTAAATCCATGAAGACGGCTTACGCCACCATCAAAGGTATTGAGGTGATGCGTGCCTACGCAA
 GGCCAGGCCTCAGCATTTTATTATGGTGTATCCCCTGGGCGAAATGCGCCTGGTAAGCAGAGTTTTTGAATGTAAGGCC
 TTTGAATAAGACAAAAGGCTGCCTCATCGCTAACTTTGCAACAGTGCCTTCTACGGCACGTTTGAAGGCCGGCTGAAAAGG

396

Recentment un estudi realitzat per Eckert *et al.* (38) descriu una estructura de l'In60 diferent a les trobades en aquest estudi. A la part variable, situada entre el segment conservat 5'-CS i 3'CS es troben una sèrie de gens cassetts diferents als descrits (*dhfA16* i *aadA2*) com son *dhfXII*, *orfF* i *aadA8*. I pel que fa a la part *downstream* del gen *bla*_{CTX-M-9} descriu la presència de l'*orf3* i part de l'*orf339*, descrits prèviament al cromosoma de *K. georgiana* (89).

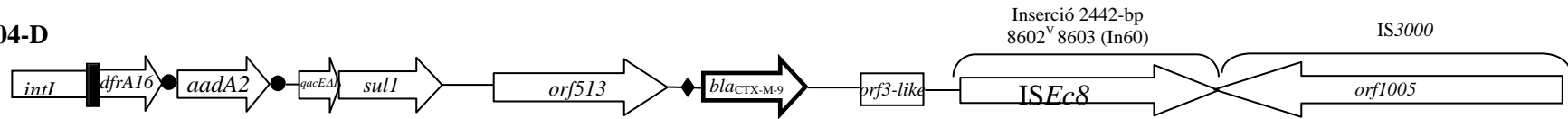
Per concloure doncs, assenyalarem que els resultats obtinguts al estudiar l'entorn genètic del gen *bla*_{CTX-M-9} ens fan pensar, que el mateix In60, com a estructura genètica capaç d'integrar i mobilitzar gens casset, és un element molt variable, ja que un terç de les soques de l'estudi no presenten l'estructura descrita. La seqüència d'inserció IS3000 amb elevada homologia amb la transposasa del transposó Tn5501, la trobem conservada en totes les soques, de la mateixa manera que també trobem el punt calent de recombinació present entre l'*orf513* i el gen *bla*_{CTX-M-9}, tots dos elements podrien jugar algun paper important en l'evolució d'aquests integrons compostos i en la difusió de la betalactamasa CTX-M-9.

Taula 8. Iniciadors utilitzats per estudiar l'estructura de l'integró In60.

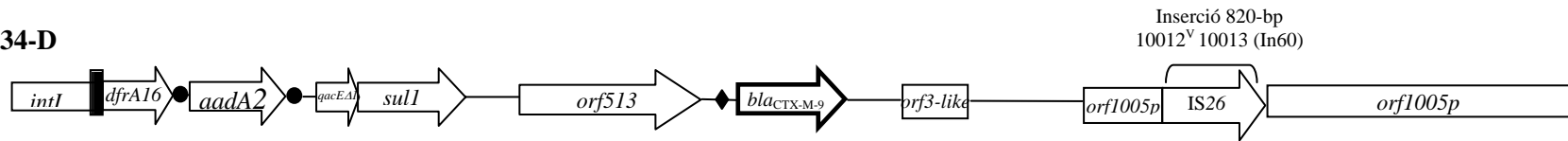
Nº	Iniciadors	Seqüència (5' a 3')	Ta ^a	Posició en la seqüència publicada (bp)	Nº accés ^b o referència
1	5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	53	1190-1206	M73819
1b	3'CS	GCA GAC TTG ACC TGA TAG TT	58	2828-2809	M73819
2	341IR	GTA ACC GTT TGT TTG AGT GGG	53	3627-3607	L06418
3	341A	CGC CCA CTC AAA CAA ACG	58	3605-3622	L06418
4	341STOP	ACA TTA GTC GGC CAG CGG	58	5452-5469	L06418
5	I_{ATG}	GTG ACA AAG AGA GTG CAA CGG	58	6337-6357	AF174129
6	I_{ATGR}	CCG TTG CAC TCT CTT TGT CAC	58	6357-6337	AF174129
7	I_{STOP}	ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC	58	7191-7171	AF174129
8	I_{STOPR}	GGC TTC AGC GGC GAG AAT CAT	58	7171-7191	AF174129
9	O3000_{SR}	GGA GCT TAT GCG CTC AAT CG	58	9319-9300	AF174129
10	785.S2	AAG CGG TCA TAA TCG GGG	58	9182-9199	AF174129
11	51.10A	CGA TCG CTA AAA GCC TCC	58	12166-12146	AF174129
12	51.10C	CAT CTT GTT CTG CCT CGG	55 / 59	12239-12256	AF174129
13	1104-A	TAA ACG GTA ACG GTC AGG AT	60	8481-8500	AF174129
14	1104-Arev	GAT GCG CAA CTC TTC AGC	60	8892-8875	AF174129
15	IS_{Ec8}	GTT GAT GCG TAG CGC CTT CC	60	7294-7313	AF071034
16	785.5	CAT AGC GTG GGG CAA ACT GG	60	9926-9945	AF174129
17	785.6	CCG GCG CGA GAC CTT CA	60	10178-10194	AF174129
18	Punt rec	AGG TGG TTT ATA CTT CC	50	6216-6232	AF174129
19	IntIF	TCT CGG GTA ACA TCA AGG	59	604-621	M73819
20	aadA2-R	GCT GCG AGT TCC ATA GCT TC	59	663-682	M73819
21	sulI	TGA AGG TTC GAC AGC AC	59	1463-1447	X68227
22	orf5	GAA GGT CTC CGC GAA TGT CC	55	9845-9864	X12869
23	orf6	CTC GCG CAA CCA AGA CAT	55	10286-10303	AY259085
24	IS6100	AAT GGC GCC ACT TGA AAT CC	55	10721-10740	AY259085
Sondes		Seqüència (5' a 3')	Ta	Nº accés o referència	
P5		TAG TTT GCG CAA CGT TGT TG	55	(108)06	
P6		CTA TTC TCA GAA TGA CTT GG	55	(108)06	
16S-27f		AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	53	(69)5}	
16S-907r		CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT	53	(69)5}	

^{a)} Temperatura d'hibridació. ^{b)} Número d'accés a la base de dades EMBL/*GeneBank*.

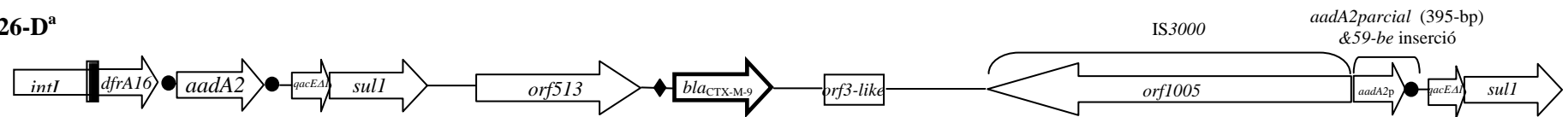
1104-D



1334-D



1226-D^a



1383-D



1185-D^b, 1249-D, 1252-D, 1266-D, 1290-D, 1292-D, 1327-D

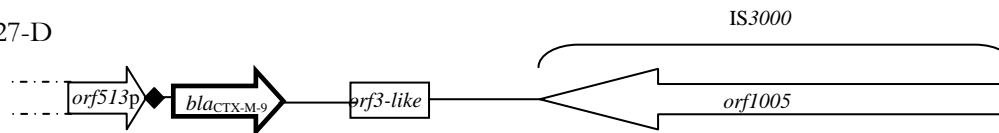
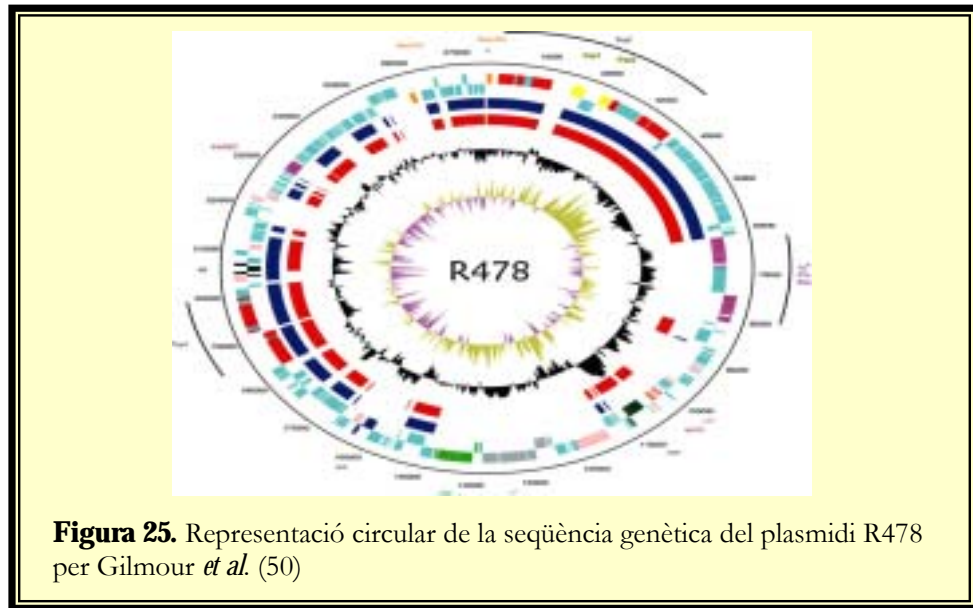


Figura 24. Representació esquemàtica de les soques que presenten variacions. • 59-be; **■** *attI1*; ◆ punt calent de recombinació.

^a Presenta l'*orf5* i l'*orf6* downstream el gen *sul1*.

^b Aquesta soca presenta l'*orf513* al complet.



3.6. Caracterització plasmídica

La gran variabilitat plasmídica observada i la presència del gen *bla*_{CTX-M-9} en plasmidis de diferent pes molecular va determinar l'inici de **l'estudi dels grups d'incompatibilitat** per tal de determinar si aquest gen es troba vehiculat pel mateix plasmidi que al llarg del temps ha anat evolucionant, adquirint o perdent part de la seva estructura gènica, o bé es tracta de plasmidis diferents que han adquirit aquest gen de resistència.

Es seleccionaren 12 soques d'*E. coli* i una *Salmonella enterica* serovar Virchow. La selecció d'aquestes soques s'efectuà en funció del pes molecular del plasmidi portador del gen *bla*_{CTX-M-9} i dels diferents tipus d'estructures In60-like observades.

Com ja s'ha citat anteriorment, la transferibilitat de la resistència es comprovà en totes les soques mitjançant la conjugació amb la soca receptora HB101 kanamicina-azida resistent (111) a 37°C en medi sòlid, obtenint-se només un terç de conjugacions positives i amb freqüències de conjugació molt baixes en algunes soques, al voltant de 10⁻⁸. Les transconjugants de les soques seleccionades foren incloses en aquest estudi (Taula 1 de l'annex 2 (44)). S'obtingueren transconjugants de totes les soques seleccionades a excepció de la soca 1384-D.

3.7. Rep *typing* PCR

La rep *typing* PCR consisteix en la detecció i amplificació de diferents gens de replicació o replicons. Mitjançant aquesta tècnica poden classificar-se els plasmidis segons el grup d'incompatibilitat. La tipificació dels replicons mitjançant PCR es basa en la detecció de **18 replicons, FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, II-I γ , L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, i diferents FII**. Aquests replicons representen tots els replicons coneguts que estan circulant actualment a la família *Enterobacteriaceae* (20).

Es realitzaren 5 PCR-múltiplex i 3 PCR-simples mitjançant les quals s'obtingueren diferents resultats (Taula 1 de l'annex 2 (44)). Els tres grups d'incompatibilitat predominants foren **repHI2, repFIB i repFII**. La PCR per repHI2 fou positiva en totes les soques menys en dos, la soca 1104-D (i la seva transconjugant, 1104-D-Tc) i la soca 1384-D. La soca 1104-D fou positiva només per repFII i per repA/C i la seva transconjugant només per repFII. En canvi la soca 1384-D, de la qual no s'obtingué transconjugant, fou positiva per repFII i per repFIB. La *Salmonella* fou positiva únicament per repHI2 al igual que la seva transconjugant. Algunes soques foren positives també per altres rep PCRs, com per exemple repY, repN o repA/C (Taula 1 de l'annex 2 (44)). La presència de diferents grups d'incompatibilitat ens indicava la presència de diferents plasmidis en una mateixa cèl·lula, però no era possible determinar quin era el plasmidi portador del gen *bla*_{CTX-M-9} mitjançant aquesta tècnica. Tanmateix analitzant els transconjugants, observarem que dels 5 transconjugants, quatre foren positius per repHI2 i un per repFII. Aquests resultats indicaven que el gen *bla*_{CTX-M-9} semblava estar situat en un plasmidi incHI2 o incFII.

Es realitzà la seqüenciació de les PCRs positives per HI2, essent totes d'una homologia del 100% amb el replicó HI2 del plasmidi de referència R478 (BX664015). La seqüenciació de les PCRs positives per FIB, donà un 98% d'homologia amb el plasmidi p1658/97 (AF550679), tot i que la seqüència del replicó FIB de la soca 1384-D tenia una homologia del 99% amb un altre plasmidi, anomenat plasmidi F (AP001918). La seqüenciació de les PCRs positives per a repF ens agrupà les soques en tres grups segons l'homologia amb els replicons FII presents al banc de dades del GeneBank (Figura 26). Les soques 759-D, 759-D-Tc, 836-D, 836-D-Tc, 785-D, 785-D-Tc, 1383-D i 1406-D-Tc presentaren una homologia del 100% amb el plasmidi **p1658/97 (AF550679)**, les soques 1185-D, 1290-D, 1290-D-Tc, 1384-D i 1406-D foren homologues un 100% amb **pTUC100 (AY091607)** i les soques 1104-D i 1104-D-Tc amb **pSFO157 (AF228759)**.

Figura 26. Seqüenciació de la PCR repFII. Homologia de la zona on el RNA antisentit (regulador de la replicació) fa el *loop* que es creu interacciona amb el DNA (91), amb altres plasmidis introduïts a la base de dades del GeneBank.

pTUC100 (AY091607)FII-like	CCCGGTAATCTTCT...AGTCGCCAAACTTGAAGAAGATTATCGGG	44
1185-D, ...	CCCGGTAATCTTCT...AGTCGCCAAACTTGAAGAAGATTATCGGG	44
p1658/97 (AF550679)FII	CCCGGTAATCTTCTTCGCAGTCGCCAAACTTGACGAAGATTATCGGG	47
759-D, ...	CCCGGTAATCTTCTTCGCAGTCGCCAAACTTGACGAAGATTATCGGG	47
pSFO157 (AF228759)FII-like	CCCGGTAATCTTCTTC...GTCGCCAAACATAGAAAGATTATCGGG	43
1104-D, ...	CCCGGTAATCTTCTTC...GTCGCCAAACATAGAAAGATTATCGGG	43

3.8. Digestió del DNA total amb l'enzim *BglI*

Per a realitzar un primer cribatge, dels plasmidis presents a les soques, utilitzant el DNA total, es realitzà una digestió amb l'enzim *BglI*, enzim talla a un punt intern del gen *bla*_{CTX-M-9} (nucleòtid número 6781 segons la seqüència publicada de l'In60, AF174129). Es realitzà una electroforesi en un gel d'agarosa a l'1% durant 3 hores a 80V, es transferí i s'hibridà amb les sondes CTX-M-9, HI2 i FIB. Amb la hibridació amb la sonda CTX-M-9, s'obtingueren els resultats esperats (Figura 27, A), tenint en compte les diferents estructures de l'integró In60 (anomenades tipus I, II, III, IV i V. Veure apartat 3.5.). S'observà com les soques que mantenen l'estructura de l'In60 (tipus I) presenten dues bandes d'hibridació, una de 4221 pb (extrem 5' del gen *bla*) i l'altra de 4048 pb (extrem 3' de gen *bla*). Les soques del tipus II (1290-D i 1290-D-Tc), les quals presentaven una delecció de la part 5' del l'integró In60 presentaren la banda esperada a 3' del gen *bla*_{CTX-M-9} de 4048 pb i una banda d'aproximadament 3500 pb. Les soques del tipus III (1185-D i 1185-D-Tc), que són equivalents a les de tipus III però amb l'*orf513* al complet, presentaren la banda de 4048 pb i una altra banda d'aproximadament 7100 pb. Les soques de tipus IV, (1383-D i 1383-D-Tc) que no presentaven l'*orf513*, també mantienien la banda de 4048 pb i una altra d'aproximadament 2000 pb. Les soques tipus V (1104-D i 1104-D-Tc) que presentaven la inserció de la *ISEc8* a 3' del gen *bla*_{CTX-M-9}, mostren la banda prevista a 5' del gen, de 4221 pb i una banda a 3' del gen *bla* d'aproximadament 2448 pb.

La hibridació amb la sonda HI2 confirmà els resultats obtinguts amb la PCR (Figura 27, B). En aquest gel s'inclougué el plasmidi de referència per al **grup d'incompatibilitat HI2, R478**. Segons la seqüència d'aquest plasmidi (BX664015) s'esperava una banda d'hibridació amb la sonda HI2 de 9715 pb. S'obtingué aquesta banda tant al plasmidi de referència com a les soques del nostre estudi positives per HI2. Aquest fet indicava que el plasmidi present a les soques de l'estudi podria tractar-se del plasmidi de referència R478 o d'un derivat seu.

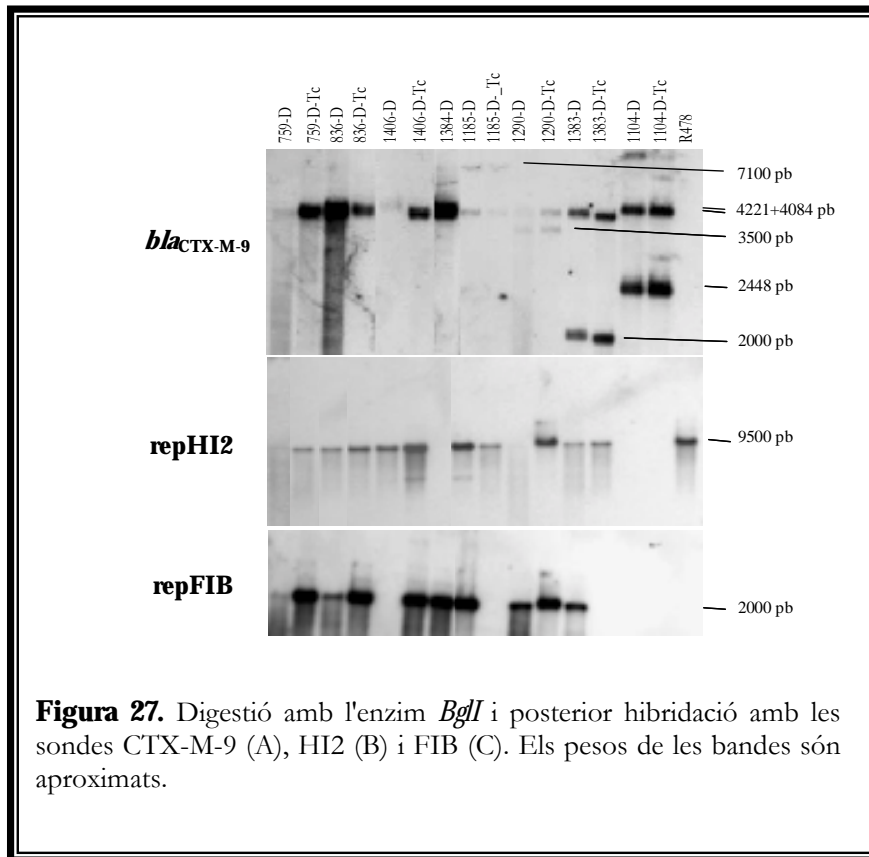


Figura 27. Digestió amb l'enzim *BglI* i posterior hibridació amb les sondes CTX-M-9 (A), HI2 (B) i FIB (C). Els pesos de les bandes són aproximats.

La hibridació d'aquesta digestió amb la sonda FIB (Figura 27, C), confirmava també els resultats obtinguts amb la PCR. En aquest cas no es va poder incloure cap plasmidi control per aquest grup d'incompatibilitat. S'obtingué un fragment d'aproximadament 2000 pb, el qual probablement podria estar ben conservat respecte al fragment que s'obtidria si digeríssim i hibridéssim amb la sonda FIB el **plasmidi p1658/97 (AF550679)**, amb el que prèviament ja s'havia observat una homologia del 98% al seqüenciar els amplificats obtinguts amb la repFIB PCR.

3.9. Estudi dels plasmidis portadors del gen *bla*_{CTX-M-9}

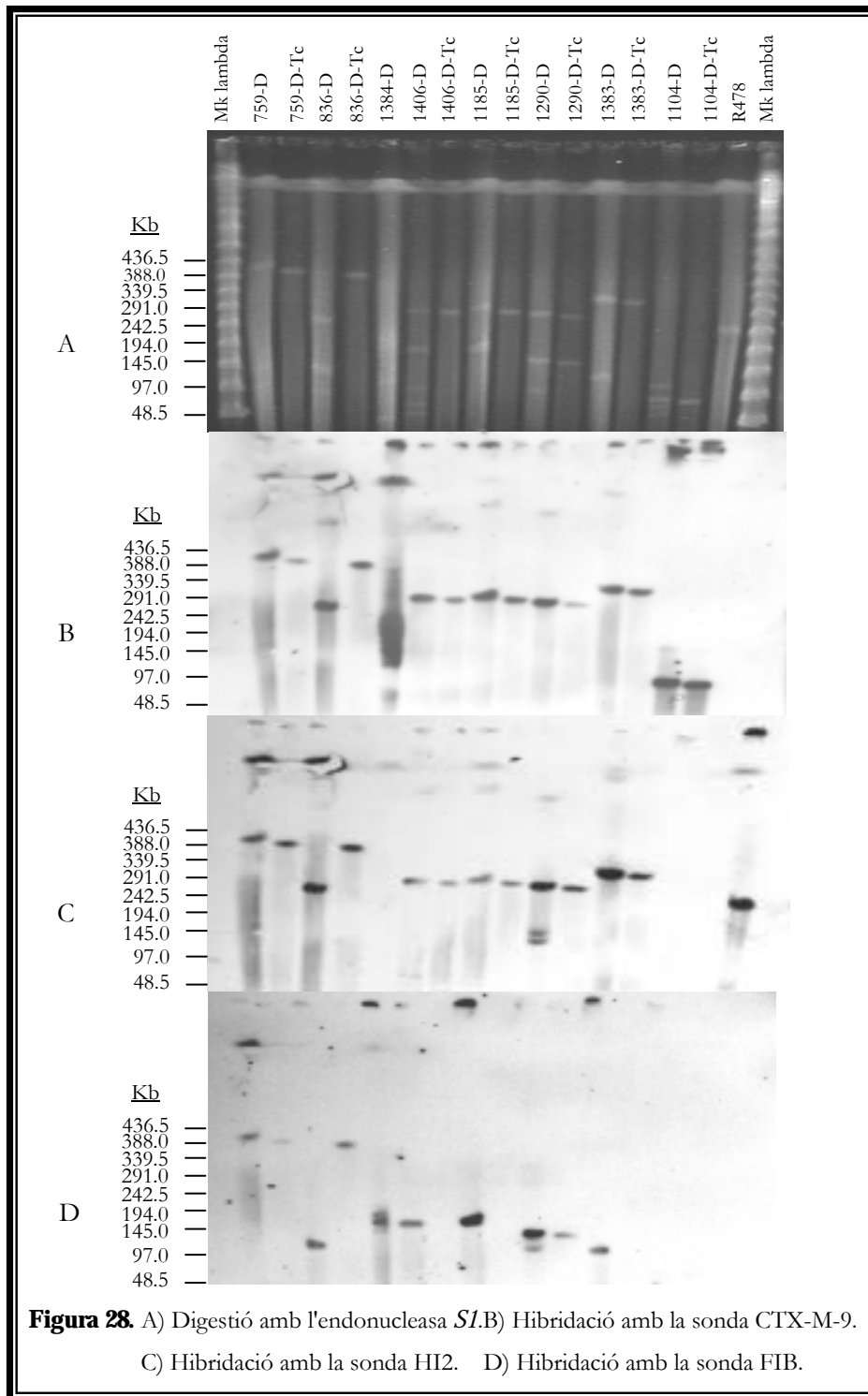
Per tal de determinar exactament de quin grup d'incompatibilitat era el plasmidi portador del gen *bla*_{CTX-M-9}, es realitzà la digestió del DNA total de les soques seleccionades amb l'enzim *S1*, i es realitzà el camp pulsat d'aquesta en un CHEF. En aquest gel s'observava la variabilitat plasmídica detectada prèviament (44), però en aquest cas s'havien inclòs les soques transconjugants. En quatre transconjugants 836-D-Tc, 876-D-Tc, 909-D-Tc i 1249-D-Tc (observar soca 836-D-Tc a la Figura 2 de l'annex

2 (45)) presentaven un plasmidi de tamany superior a les seves donadores a la vegada que s'observà com dues soques transconjugants com la 1290-D-Tc i la 1292-D-Tc (aquesta última no es mostra a la figura) havia conjugat més d'un plasmidi.

Quan aquest gel es transferí i s'hibridà amb la **sonda CTX-M-9** (Figura 28, B) els plasmidis portadors del gen *bla*_{CTX-M-9} (pl-M9) presentaven diferents tamanyos. La soca 1104-D i la seva transconjugant presentaven un pl-M9 d'aproximadament 80 Kb, essent el plasmidi més petit positiu per aquesta sonda. A la vegada que el plasmidi pl-M9 més gran fou de 420 Kb, present a la soca 759-D i a la seva transconjugant. El tamany de pl-M9 més freqüentment observat en les soques d'aquest estudi, tant donadores com transconjugants, oscil·lava entre 270 i 290 Kb.

La hibridació amb la **sonda HI2** (Taula 1 de l'annex 2 (45) i Figura 28, C) confirmà els indicis que en la majoria de soques el gen *bla*_{CTX-M-9} estava situat en un plasmidi del grup d'incompatibilitat HI2. Tots els pl-M9 hibridaren amb aquesta sonda a excepció de les soques que prèviament ja havien estat negatives per la PCR repHI2, com són les soques 1104-D i 1104-D-Tc i la soca 1384-D. Els pl-M9 positius per HI2 (pl-M9-HI2) presentaven una variabilitat de tamany, ja observada prèviament, al hibridar amb la sonda CTX-M-9. La *Salmonella* i la seva transconjugant presentaven tan sols un plasmidi d'aproximadament 320 Kb el qual fou positiu tant per la sonda CTX-M-9 i com per la sonda HI2. El plasmidi pl-M9-HI2 més freqüentment observat fou de 280 Kb aproximadament, pes que coincidia amb el pes molecular del plasmidi de referència R478, mencionat prèviament, el qual presenta una seqüència de 274'762 Kb (50).

El plasmidi R478 fou aïllat per primer cop al 1969 a Estats Units en *S. marcescens* (63). Al 1977 fou classificat dins del grup HI2 (120) i la seva seqüència completa no ha estat publicada fins l'abril del 2005 (50). Aquest plasmidi es caracteritza principalment per ser **termolàbil** alhora de transferir-se, la seva temperatura òptima de conjugació es troba entre 26°C i 30°C segons Taylor *et al.* (121) o entre els 22°C i 30°C, i inhibida a 37°C, segons Rodriguez-Lemoine *et al.* (104) o. Aquest factor, pot haver estat determinant als experiments de conjugació realitzats en aquest estudi, ja que s'efectuaren a una temperatura de 37°C, raó per la qual podria explicar-se la baixa freqüència de conjugació obtinguda en la majoria de les soques conjugades i el fet de que dos terços de les soques no s'aconguessin a conjuguar.



La hibridació amb la **sonda FIB** (Figura 28, D) mostrarà positivitat en la majoria de soques, a excepció de la *Salmonella* i la seva transconjugant, de la soca 1104-D i la seva transconjugant i de les soques, 1185-D-Tc, 1383-D-Tc i 1406-D-Tc. L'únic pl-M9 positiu per aquest grup fou el plasmidi de 260 pb present a la soca 1384-D, soca

negativa per HI2 i amb una seqüència de FIB lleugerament diferent a les altres. D'aquesta soca no s'obtení transconjugant.

Gràcies a aquesta hibridació s'observà com l'augment de tamany en els pl-M9-HI2 d'algunes transconjugants era degut a la fusió del pl-M9-HI2 amb el plasmidi FIB present a la soca donadora, pel que a la soca transconjugant observàvem un pl-M9-HI2-FIB. Aquest fet podria explicar, en part, la conjugació sota condicions no òptimes (37°C) dels plasmidis del grup HI2, on el pl-M9-HI2 podria haver estat ajudat en la conjugació, mitjançant cointegració, pel plasmidi FIB.

La presència d'aquest **cointegrat** també s'observà tant a la soca donadora 759-D com a la seva transconjugant, per tant podem afirmar que aquest és un fenomen que es dóna de manera natural dins la cèl·lula i no es tracta d'un procés que succeeix *in vitro* a l'hora de realitzar la conjugació davant d'una pressió negativa com podria ser la temperatura a 37°C. Aquesta soca però presenta un pl-M9-HI2-FIB d'un tamany superior als altres cointegrats observats, fet que podria ser degut a l'adquisició de material gènic ja sigui per la cointegració amb un altre plasmidi o per fenòmens de recombinació, transposició, etc.

També s'observà com en les dues soques transconjugants (1290-D-Tc i 1292-D-Tc) havien conjugat dos plasmidis, el pl-M9-HI2 i el plasmidi FIB, però en aquests cas el segon no el trobàvem formant un cointegrat amb el primer, ja sigui perquè havien conjugat per separat o perquè es va resoldre el cointegrat un cop dintre la cèl·lula receptora. Altres fenòmens de cointegració han estat observats en altres estudis (14), demostrant com els genomes bacterians són estructures dinàmiques on la recombinació entre seqüències homòlogues juga un paper molt important (3, 5, 55, 95).

Aquests resultats indiquen que en algun moment el plasmidi de referència, R478, del grup d'incompatibilitat HI2, ha anat evolucionant adquirint entre d'altres elements gènics, com per exemple el gen de resistència *bla*_{CTX-M-9}. Adquisició que pot haver-se produït mitjançant un transposó o seqüències d'inserció que li han permès mobilitzar-se a través de diferents estructures gèniques, ja siguin a altres plasmidis d'altres grups d'incompatibilitat, com observem a les soques 1104-D i 1384-D o dins el cromosoma bacterià, tal i com es va observar a la soca 1277-D (44).

3.10 Implicació dels bacteriòfags en la difusió dels gens que codifiquen betalactamases

La gran majoria d'estudis relacionats amb la difusió de gens de resistència a antimicrobians es realitzen principalment en soques aïllades de mostres clíniques, on s'estudien els diferents elements mòbils com a vehiculadors dels gens de resistència. Els elements mòbils estudiats amb més freqüència han estat els plasmidis, juntament amb els transposons i els integrans. Així doncs, ens vàrem proposar determinar els bacteriòfags presents en aigües residuals, tant humanes com residuals, com a possibles vehiculadors de gens de resistència, en concret, de gens que confereixen resistència a betalactàmics.

3.10.1. Extracció de DNA fàgic

Es recolliren **aigües residuals** durant un període de sis mesos (Novembre 2001 a Abril 2002). Recollint-se un litre d'aigua mensual que provenia de tres plantes de tractament residual amb una població de 50.000 habitants (on es va recollir aigua un cop), de 400.000 habitants (on es recollí en tres ocasions) i de 1.400.000 habitants (on es recollí en dos ocasions). També es recollí aigua residual d'origen animal, més concretament provinent de granges d'aus, porcs i boví.

Prèviament a l'obtenció dels bacteriòfags presents en les aigües es realitzà un estudi dels coliforms fecals i colifags somàtics presents (que són aquells que infecten *E. coli* WG5 i que comprenen un ampli rang dels fags presents en aigües. Es detecten mitjançant mètodes estandarditzats ISO10705-2) per tal de determinar el grau de **contaminació fecal** bacteriana i contaminació fecal vírica. En totes les mostres s'aïllaren diferents tipus d'enterobacteris i *Pseudomonas* resistent a betalactàmics, determinant una notable contaminació fecal.

La recuperació dels bacteriòfags es realitzà a partir de dos volums diferents d'aigua (100 mL i 10 mL) per veure si l'eficiència de recuperació d'aquests millorava però

Taula 9. Nivell de coliforms fecals, colifags somàtics i colifags somàtics a la mostra purificada.

Aigües residuals	Coliforms fecals (ufc/mL ⁻¹)	Colifags somàtics (ufc/mL ⁻¹)	Colifags somàtics a la purificació (ufc/mL ⁻¹)
Planta humana 1A (10mL)	9.7x10 ⁴ (2.2x10 ⁴)	5.1x10 ⁴ (3.6x10 ³)	2.0x10 ⁶
Planta humana 1A (10mL+CsCl)	9.7x10 ⁴ (2.2x10 ⁴)	5.1x10 ⁴ (3.6x10 ³)	7.5x10 ⁴
Planta humana 1A (100mL)	9.7x10 ⁴ (2.2x10 ⁴)	5.1x10 ⁴ (3.6x10 ³)	1.0x10 ⁷
Planta humana 2A (10mL)	9.2x10 ⁴ (7.2x10 ³)	5.1x10 ⁴ (4.4x10 ³)	1.3x10 ⁸
Planta humana 2A (10mL+CsCl)	9.2x10 ⁴ (7.2x10 ³)	5.1x10 ⁴ (4.4x10 ³)	8.5x10 ⁴
Planta humana 2A (100mL)	9.2x10 ⁴ (7.2x10 ³)	5.1x10 ⁴ (4.4x10 ³)	1.3x10 ⁶
Planta humana 2B (10mL)	2.0x10 ⁴ (9.6x10 ³)	9.2x10 ⁴ (4.6x10 ³)	2.5x10 ⁶
Planta humana 2C (10mL)	9.0x10 ⁴ (5.0x10 ⁴)	6.2x10 ⁴ (1.7x10 ³)	1.5x10 ⁶
Planta humana 3A (10mL)	2.5x10 ⁵ (6.0x10 ⁴)	8.9x10 ⁴ (3.0x10 ³)	3.0x10 ⁶
Planta humana 3B (10mL)	3.0x10 ⁵ (2.2x10 ⁴)	9.3x10 ⁴ (2.0x10 ³)	2.5x10 ⁶
Granja bovina (10mL)	1.8x10 ⁶ (7.2x10 ⁵)	7.9x10 ⁴ (1.5x10 ³)	1.0x10 ⁶
Granja porcina (10mL)	3.6x10 ⁵ (1.3x10 ⁵)	1.8x10 ⁵ (1.7x10 ⁴)	6.1x10 ⁶
Granja aviram (10mL)	2.3x10 ⁴ (7.2x10 ³)	8.5x10 ² (2.7x10 ²)	3.5x10 ⁴

s'observà que s'obtenia la mateixa en ambdós volums. Per tant es va procedir a analitzar només 10 mL de cada aigua residual recollida. Les aigües foren filtrades amb filtres PES (*Polyeter sulsonè*) de 0.22µm per tal d'eliminar la presència de bacteris i altres partícules presents de les mostres d'aigua residual.

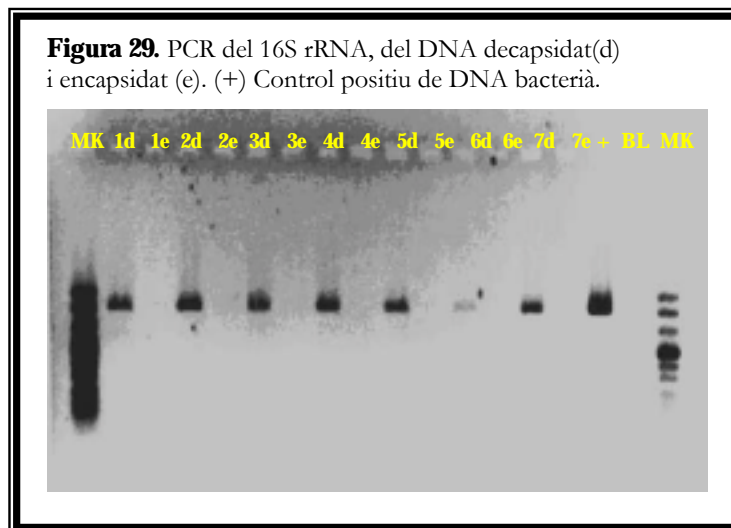
També es descartà la possible presència de DNA de nanobacteris (< 0'22µm) o de bacteris inferiors a aquest tamany, a través de l'obtenció de DNA víric pur mitjançant gradients amb clorur de cesi (CsCl). En dues de les mostres d'aigua residual humana els bacteriòfags obtinguts a partir de 10 mL foren purificats amb CsCl a 60000 x g per tal d'eliminar totes les partícules que no fossin bacteriòfags, observant-se com els valors de colifags somàtics presents en aquestes mostres disminuïren degut a la pèrdua d'aquests en els diferents gradients de CsCl però, mantenint-se la sensibilitat en les proves de PCR respecte les mostres no tractades amb CsCl (Taula 9).

Un cop purificades i concentrades les diferents mostres de bacteriòfags es realitzà un tractament amb DNAsa per a eliminar totes les restes de DNA bacterià tal i com s'havia realitzat en estudis previs (112). Amb l'eliminació d'aquestes possibles traces s'assegurava l'eliminació dels possibles falsos positius en la PCR degut a la presència de DNA bacterià. Posteriorment es realitzà la decapsidació dels bacteriòfags per d'aquesta manera obtenir el DNA fàgic, mitjançant el kit "QIAamp DNA Blood mini" i segons les instruccions del fabricant.

3.10.2. Detecció de la presència de betalactamases mitjançant PCR

S'utilitzaren 5µl de DNA fàgic (5 ng/µl), tant decapsidat com encapsidat (control negatiu), per a realitzar les PCRs per tal de detectar els **gens bla**. Paral·lelament també es realitzaren PCRs per a detectar la possible presència de **16S rRNA** i d'aquesta manera controlar que no existís contaminació de DNA bacterià a les mostres (132). En tots els casos es realitzà una Nested PCR.

Com s'observa a la Figura 29 quan es realitzà la PCR del 16S rRNA, amplificant un fragment de 909 pb, totes les mostres de DNA fàgic decapsidat foren positives indicant la presència de DNA bacterià al genoma víric degut al fenomen de transducció generalitzada descrit per altres autors (67). Les mateixes mostres no decapsidades foren negatives. Per tant la positivitat de la PCR no era deguda a traces de DNA bacterià que haguessin quedat a les mostres purificades.



Es realitzaren les PCRs de les betalactamases més freqüents al nostre ambient, com són:

***bla*_{TEM}**

***bla*_{SHV}**

***bla*_{CMY}**

***bla*_{LAT}**

***bla*_{MOX}**

***bla*_{OXA-2-tipus}**

***bla*_{OXA-1-tipus}**

***bla*_{VIM}**

***bla*_{FOX}**

***bla*_{PSE-1-tipus}**

***bla*_{CTX-M-9-tipus}**

i altres ***bla*_{CTX-M-tipus}**.

S'obtingueren resultats positius quan s'utilitzaren els iniciadors ***bla*_{OXA-2-tipus}** i ***bla*_{PSE-1-tipus}** en totes les aigües de l'estudi tant humanes com animals (Taula10), per tant semblava

detectar-se la presència d'aquests dos gens al DNA fàgic. Alguns d'aquests amplificats obtinguts foren seqüenciats obtenint-se homologia amb les betalactamasa OXA-2, PSE-1, PSE-4 i *bla*P (número d'accés JS0755). Tot i augmentar el volum d'aigua recollida en algunes mostres per augmentar la sensibilitat de la PCR, no es va aconseguir detectar la presència dels gens *bla*_{TEM} ni *bla*_{SHV}, les betalactamases més freqüents en la família *Enterobacteriaceae*. Els gens *bla*_{OXA-2} i *bla*_{PSE} predominen al gènere *Pseudomonas* però també s'han descrit en la família *Enterobacteriaceae* i *Vibrionaceae*, normalment s'han descrit associats a integrons en forma de gens casset. Els integrons s'han localitzat freqüentment a plasmidis amb un ampli rang d'hostes els quals poden haver-se transferit horitzontalment cap a altres gèneres com *Pseudomonas* o *Acinetobacter* i que podrien tenir associats un número més alt de bacteriòfags que no pas *E. coli*. Altres autors han descrit la presència de fags portadors gens de virulència en aigües, com és el cas del gen de la Shiga toxina 1 i 2 d'*E. coli* (82) o autors com Smith *et al.* (114) que han comprovat com altres gens de resistència a betalactàmics són adquirits per *E. coli* degut a la infecció de bacteriòfags o en altres casos s'ha vist com el gen de resistència a la cefotaxima, CTX-M-10, té al seu entorn gènic restes de genoma víric, essent per tant un bacteriòfag el possible mobilitzador d'aquesta betalactamasa (88).

Taula 10. Resultats de les Nested-PCR realitzades a les diferents mostres.

(nd) fag no decapsidat; (d) fag decapsidat.

Aigua	16S rRNA		TEM	SVH	CTX	CTX-M-9	PSE-1-típus	VIM 2	AmpC	OXA-1-típus	OXA-2-típus
	nd	d									
Hum1A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Hum2A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Hum2B	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Hum2C	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Hum3A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Hum3B	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Aviram	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Porcí	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Boví	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+

Els bacteriòfags tenen la capacitat d'incorporar al seu genoma, gens o grups de gens. Quan es dona una co-infecció per diferents tipus de fags, aquests són capaços molts cops d'intercanviar el material genètic mitjançant recombinació, aquest fet junt amb el fet que alguns bacteriòfags tenen un ampli rang d'hostes, que poden ser taxonòmicament molt distants com

Sphaerotilus natans, *E. coli* i *Pseudomonas* (65), fa que els gens de resistència a antimicrobians, incorporats al genoma víric, puguin transferir-se entre espècies taxonòmicament llunyanes (10).

El tractament d'aigües per transformar-les en potables es un procés crític per la salut i el benestar de la població. Diferents estudis s'estan efectuant a l'actualitat per tal d'eliminar al màxim la concentració de contaminants fecals i bacteriòfags presents a l'aigua potable, ja sigui mitjançant raigs UV (71) o amb generadors electroquímics d'ozó (119). Tenint en compte que els fags són més resistents que els bacteris als processos de depuració d'aigües residuals, sobretot als processos realitzats amb clor (68), i tenen fins i tot la capacitat de sobreviure més temps al sòl (42), la probabilitat de que aquests gens de resistència a betalactàmics arribin als éssers humans mitjançant l'aigua potable o mitjançant aliments contaminats amb l'aigua de rec és probablement alta. Els bacteriòfags són per tant un vehicle transportador de gens bacterians que es troben al medi ambient que ens envolta i que no podem subestimar.



4. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES / CONCLUSIONS



www.exilioweb.cjb.net



Despues de muchas pruebas llegamos a la conclusion de que la baja actividad de su pez se debe a falta de espacio en la pecera

4. CONCLUSIONS

- 1) La difusió de les 37 soques, 33 *Escherichia coli* i 4 *Salmonella enterica*, portadores de la betalactamasa CTX-M-9 no fou deguda a l'expansió clonal d'una o unes poques soques epidèmiques.
- 2) A l'estudi de l'entorn genètic del gen *bla*_{CTX-M-9} s'observà com un terç de les soques estudiades no presentaven l'entorn ja descrit (In60) degut a insercions i/o deleccions.
 - a) La delecció més freqüentment observada és la delecció de la part 5' de l'integró In60, conservant-se en totes les soques tot o part de l'*orf513* i el punt calent de recombinació adjacent al gen *bla*_{CTX-M-9}.
 - b) La seqüència d'inserció IS3000 de l'In60 es troba conservada en totes les soques, menys en una. Aquesta presentava la inserció de la IS26.
 - c) Una soca presentava la inserció de la ISEc8 davant la IS3000.
 - d) Una soca presentava la inserció de part del gen casset *aadA2* a la segona còpia del segment conservat 3'CS.

Tant el punt calent de recombinació present entre l'*orf513* i el gen *bla*_{CTX-M-9} com la seqüència d'inserció IS3000 poden jugar un paper important en l'evolució d'aquests integrons compostos i en la difusió del gen *bla*_{CTX-M-9}.

3) El perfil plasmídic de les 37 soques portadores de la betalactamasa CTX-M-9 va evidenciar una ampla variabilitat plasmídica.

4) En totes les soques excepte en dues, el plasmidi portador del gen *bla*_{CTX-M-9}, era del grup d'incompatibilitat HI2 derivat del plasmidi de referència R478. En una soca el plasmidi portador d'aquest gen era positiu per repFII i en una altra per repFIB.

5) Una soca era portadora del gen *bla*_{CTX-M-9} al cromosoma.

6) En cinc soques transconjugants es formà un cointegrat entre el plasmidi repHI2 (portador del gen *bla*_{CTX-M-9}) i el plasmidi repFIB.

7) L'estudi de la transponibilitat de l'hipotètic transposó que mobilitzaria l'integró In60 no va donar resultats positius en l'única soca testada, raó per la qual no podem afirmar que l'integró In60 o In60-like, estigui situat en un transposó o almenys en un transposó amb la capacitat de transposar-se.

8) La localització del gen *bla*_{CTX-M-9} al cromosoma en una de les soques, la seva localització en plasmidis de diferents grups d'incompatibilitat (essent el més freqüent el plasmidi repHI2 derivat de R478), la presència de dos còpies del gen en un mateix plasmidi o de dos plasmidis portadors del gen *bla*_{CTX-M-9} en la mateixa soca, indicarien una possible existència d'un transposó, capaç de mobilitzar aquest gen a través de diferents estructures gèniques.

4. CONCLUSIONES

1) La difusión de las 37 cepas, 33 *Escherichia coli* y 4 *Salmonella enterica*, portadoras de la betalactamasa CTX-M-9 no fue debida a la expansión clonal de una o unas pocas cepas epidémicas.

2) En el estudio del entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-9} se observó que un tercio de las cepas estudiadas no presentaban el entorno ya descrito (In60) debido a inserciones y/o deleciones.

- a) La deleción observada con más frecuencia es la deleción de la parte 5' del integrón In60, conservándose en todas las cepas todo o parte del *orf513* y el punto caliente de recombinación adyacente al gen *bla*_{CTX-M-9}.
- b) La secuencia de inserción IS3000 del In60 se encuentra conservada en todas las cepas, menos en una. Ésta presentaba la inserción de la IS26.
- c) Una cepa presentaba la inserción de la ISEc8 delante de la IS3000.
- d) Una cepa presentaba la inserción de parte del gen cassette *aadA2* en la segunda copia del segmento conservado 3'CS.

Tanto el punto caliente de recombinación presente entre el *orf513* y el gen *bla*_{CTX-M-9} como la secuencia de inserción IS3000 pueden jugar un papel importante en la evolución de estos integrones compuestos y en la difusión del gen *bla*_{CTX-M-9}.

3) El perfil plasmídico de las 37 cepas portadoras de la betalactamasa CTX-M-9 evidenció una amplia variabilidad plasmídica.

4) En todas las cepas excepto dos, el plásmido portador del gen *bla*_{CTX-M-9}, era del grupo de incompatibilidad HI2 derivado del plásmido de referencia R478. En una cepa el plásmido portador de este gen era un plásmido positivo para repFII y en otra para repFIB.

5) Una cepa era portadora del gen *bla*_{CTX-M-9} en el cromosoma.

6) En cinco cepas transconjugantes se ha formado un cointegrado entre el plásmido repHI2 (portador del gen *bla*_{CTX-M-9}) y el plásmido repFIB.

7) El estudio de la transponibilidad del hipotético transposón que movilizaría el integrón In60 no ha dado resultados positivos en la única cepa ensayada, por lo que no podemos afirmar, que el integrón In60 o In60-like, esté situado en un transposón o al menos en un transposón con la capacidad de transponerse.

8) La localización del gen *bla*_{CTX-M-9} en el cromosoma en una de las cepas, su localización en plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad (siendo el más frecuente el plásmido IncHI2 derivado de R478), la presencia de dos copias del gen en un mismo plásmido y la presencia de dos plásmidos portadores del gen *bla*_{CTX-M-9} en la misma cepa, indicarían la posible existencia de un transposón, capaz de movilizar este gen a través de diferentes estructuras génicas.

4. CONCLUSIONS

- 1) The diffusion of the 37 isolates, 33 *Escherichia coli* and 4 *Salmonella enterica*, carrying the CTX-M-9 beta-lactamase, was not due to clonal expansion of one or several epidemic strains.
- 2) Study of the regions surrounding the *bla*_{CTX-M-9} gene showed one third did not present the described structure (In60) due to insertions and/or deletions.
 - e) The deletion most frequently observed was that of the 5' site of the integron In60. The *orf513* and its hot spot adjacent to the *bla*_{CTX-M-9} gene were conserved in all strains but one.
 - f) The insertion sequence IS3000 of the In60 was well conserved in all the strains except in that which presented the IS26 insertion.
 - g) One strain showed the insertion of the IS*Ec8* upstream of the IS3000.
 - h) One strain showed the insertion of a partial *aadA2* gene cassette within the second copy of the conserved segment, 3'CS.

Both the hot spot of recombination (present between the *orf513* and the *bla*_{CTX-M-9} gene) and the insertion sequence IS3000 could play an important role in the evolution of this integron and in the diffusion of the *bla*_{CTX-M-9} gene.

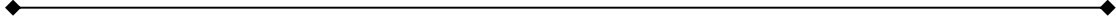
- 3) The plasmid profile of the 37 strains carrying the CTX-M-9 beta-lactamase showed a great variability.
- 4) In all but two strains, the plasmid carrying the *bla*_{CTX-M-9} gene belonged to the incompatibility group HI2, derived from the reference plasmid R478. In one strain, the carrying plasmid was positive for repFII and another for repFIB.
- 5) One strain contained the *bla*_{CTX-M-9} gene within the chromosome.
- 6) In five transconjugant strains, a cointegrate between plasmids repHI2 (carrier of the *bla*_{CTX-M-9} gene) and repFIB was observed.

7) The transposition studies in order to check the mobilization of the In60 integron were negative in the only strain studied. Accordingly, we could not confirm that the in60 was contained within a mobilizing transposon.

8) Location of the *bla*_{CTX-M-9} gene in the chromosome in one strain, its location in plasmids of different incompatibility groups (the most frequent being the repHI2 plasmid, a derivative of R478), the presence of two copies of the gene within the same plasmid, and the presence of two different plasmids carrying the *bla*_{CTX-M-9} gene in the same strain, suggest the existence of a transposon able to mobilize this gene.



5. ANNEXES





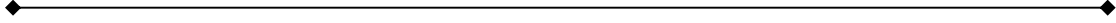
"Composition génomique" Jaques Deshaies

5. ANNEXES

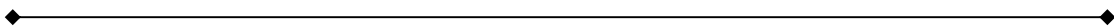
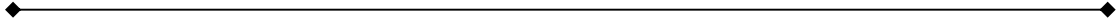
5.1. ANNEX 1 “Characterisation of the highly variable region surrounding the *bla*_{CTX-M-9} gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona” (44).

5.2. ANNEX 2 “Acquisition and diffusion of *bla*_{CTX-M-9} gene by an R478-IncHI2 derivative plasmid” (45).

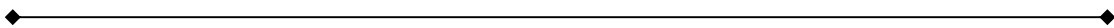
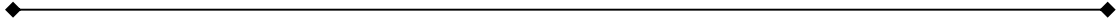
5.3. ANNEX 3 “Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes”(81).



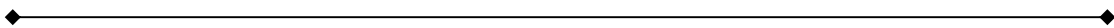
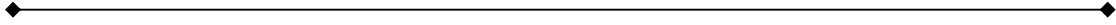
5.1. ANNEX 1



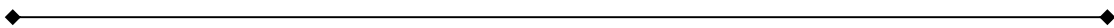
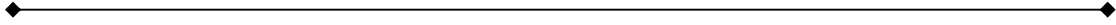
5.2. ANNEX 2



5.3. ANNEX 3



6. BIBLIOGRAFIA



1. **Althorpe, N. J., P. M. Chilley, A. T. Thomas, W. J. Brammar, and B. M. Wilkins.** 1999. Transient transcriptional activation of the Inc11 plasmid anti-restriction gene (*ardA*) and SOS inhibition gene (*psiB*) early in conjugating recipient bacteria. *Mol Microbiol* **31**:133-42.
2. **Ambler, R. P.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**:321-31.
3. **Anderson, R. P., and J. R. Roth.** 1977. Tandem genetic duplications in phage and bacteria. *Annu Rev Microbiol* **31**:473-505.
4. **Arduino, S. M., P. H. Roy, G. A. Jacoby, B. E. Orman, S. A. Pineiro, and D. Centron.** 2002. *bla*CTX-M-2 is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2303-6.
5. **Basta, T., A. Keck, J. Klein, and A. Stolz.** 2004. Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotic-degrading *Sphingomonas* strains. *J Bacteriol* **186**:3862-72.
6. **Bauernfeind, A., H. Grimm, and S. Schweighart.** 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* **18**:294-8.
7. **Bennett, P. M., and P. M. Hawkey.** 1991. The future contribution of transposition to antimicrobial resistance. *J Hosp Infect* **18 Suppl A**:211-21.
8. **Bernard, H., C. Tancrede, V. Livrelli, A. Morand, M. Barthelemy, and R. Labia.** 1992. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother* **29**:590-2.
9. **Bingle, L. E., and C. M. Thomas.** 2001. Regulatory circuits for plasmid survival. *Curr Opin Microbiol* **4**:194-200.
10. **Blaisdell, B. E., A. M. Campbell, and S. Karlin.** 1996. Similarities and dissimilarities of phage genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:5854-9.

-
11. **Bonnet, R.** 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1-14.
 12. **Bonnet, R., J. L. Sampaio, R. Labia, C. De Champs, D. Sirot, C. Chanal, and J. Sirot.** 2000. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1936-42.
 13. **Bou, G., M. Cartelle, M. Tomas, D. Canle, F. Molina, R. Moure, J. M. Eiros, and A. Guerrero.** 2002. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J Clin Microbiol* **40**:4030-6.
 14. **Bradley, D. E., D. E. Taylor, S. B. Levy, D. R. Cohen, E. C. Brose, and J. Whelan.** 1986. pIN32: a cointegrate plasmid with IncHI2 and IncFII components. *J Gen Microbiol* **132**:1339-46.
 15. **Bush, K.** 1989. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:259-63.
 16. **Bush, K.** 1998. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* **27 Suppl 1**:S48-53.
 17. **Bush, K.** 2001. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* **32**:1085-9.
 18. **Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1211-33.
 19. **Canton, R.** 2005. Role of the microbiology laboratory in infectious disease surveillance, alert and response. *Clin Microbiol Infect* **11 Suppl 1**:3-8.
 20. **Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins, and E. J. Threlfall.** 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**:219-28.
-

21. **Cartelle, M., M. del Mar Tomas, F. Molina, R. Moure, R. Villanueva, and G. Bou.** 2004. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2308-13.
22. **Casadesús, J.** 1992. Orígen i evolució del DNA mòbil, p. 35-50, Treballs de la SCB, vol. 43, Barcelona.
23. **Chambers, H. F.** 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* **7**:178-82.
24. **Chanawong, A., F. H. M'Zali, J. Heritage, J. H. Xiong, and P. M. Hawkey.** 2002. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:630-7.
25. **Clark, C. A., L. Purins, P. Kaewrakon, and P. A. Manning.** 1997. VCR repetitive sequence elements in the *Vibrio cholerae* chromosome constitute a mega-integron. *Mol Microbiol* **26**:1137-8.
26. **Cole, S., and I. Saint-Girons.** 1999. Bacterial genomes - all shapes and sizes, p. 35-62. *In* C. RL (ed.), *Organization of the Prokaryotic Genome*. ASM Press, Washington, D.C.
27. **Courvalin, P.** 1992. Interpretative reading of antimicrobial susceptibility tests. *ASM News* **58**:368-375.
28. **Courvalin, P., and C. Carlier.** 1987. Tn1545: a conjugative shuttle transposon. *Mol Gen Genet* **206**:259-64.
29. **Couturier, M., F. Bex, P. L. Bergquist, and W. K. Maas.** 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* **52**:375-95.
30. **Dancer, S. J., P. Shears, and D. J. Platt.** 1997. Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's High Arctic. *J Appl Microbiol* **82**:597-609.
31. **Datta, N., and R. W. Hedges.** 1971. Compatibility groups among fi - R factors. *Nature* **234**:222-3.

-
32. **Decousser, J. W., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2001. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:3595-8.
33. **del Solar, G., and M. Espinosa.** 2000. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol* **37**:492-500.
34. **Di Conza, J., J. A. Ayala, P. Power, M. Mollerach, and G. Gutkind.** 2002. Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*CTX-M-2 in *Salmonella enterica* serovar infantis. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2257-61.
35. **Doi, Y., N. Shibata, K. Shibayama, K. Kamachi, H. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Yagi, and Y. Arakawa.** 2002. Characterization of a novel plasmid-mediated cephalosporinase (CMY-9) and its genetic environment in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2427-34.
36. **Doroshenko, V. G., and V. A. Livshits.** 2004. Structure and mode of transposition of Tn2555 carrying sucrose utilization genes. *FEMS Microbiol Lett* **233**:353-9.
37. **Dubois, V., C. Arpin, P. Noury, and C. Quentin.** 2002. Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a *bla*(TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3624-6.
38. **Eckert, C., V. Gautier, and G. Arlet.** 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*CTX-M genes. *J Antimicrob Chemother* **57**:14-23.
39. **Eckert, C., V. Gautier, M. Saladin-Allard, N. Hidri, C. Verdet, Z. Ould-Hocine, G. Barnaud, F. Delisle, A. Rossier, T. Lambert, A. Philippon, and G. Arlet.** 2004. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1249-55.
40. **Eliasson, I., C. Kamme, and K. Prellner.** 1986. Beta-lactamase production in the upper respiratory tract flora. *Eur J Clin Microbiol* **5**:507-12.
41. **Franke, A. E., and D. B. Clewell.** 1981. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol* **145**:494-502.
-

42. **Gantzer, C., L. Gillerman, M. Kuznetsov, and G. Oron.** 2001. Adsorption and survival of faecal coliforms, somatic coliphages and F-specific RNA phages in soil irrigated with wastewater. *Water Sci Technol* **43**:117-24.
43. **Garau, J., M. Xercavins, M. Rodríguez-Carballeira, J. R. Gómez-Vera, I. Coll, D. Vidal, T. Llovet, and A. Ruiz-Bremón.** 1999. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:2736-41.
44. **García, A., F. Navarro, E. Miró, B. Mirelis, S. Campoy, and P. Coll.** 2005. Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*(CTX-M-9) gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J Antimicrob Chemother* **56**:819-26.
45. **García, A., F. Navarro, E. Miró, L. V., B. Mirelis, P. Coll, and A. Carattoli.** 2006. Acquisition and diffusion of *bla*_{CTX-M-9} gene by an R478-IncHI2 derivative plasmid. In press.
46. **García, J., and J. Muñoz.** 1999. Cefalosporinas. In J. Prieto (ed.), *Antimicrobianos en medicina*. Sociedad Española de Quimioterapia, Barcelona.
47. **García-de los Santos, A., S. Brom, and R. D.** 1996. Rhizobium plasmids in bacteria-legume interactions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**.
48. **Gazouli, M., N. J. Legakis, and L. S. Tzouvelekis.** 1998. Effect of substitution of Asn for Arg-276 in the cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase CTX-M-4. *FEMS Microbiol Lett* **169**:289-93.
49. **Gazouli, M., E. Tzelepi, S. V. Sidorenko, and L. S. Tzouvelekis.** 1998. 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* **42**:1259-62.
50. **Gilmour, M. W., N. R. Thomson, M. Sanders, J. Parkhill, and D. E. Taylor.** 2004. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid* **52**:182-202.

-
51. **Gniadkowski, M., I. Schneider, A. Palucha, R. Jungwirth, B. Mikiewicz, and A. Bauernfeind.** 1998. 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* **42**:827-32.
 52. **Gotz, A., R. Pukall, E. Smit, E. Tietze, R. Prager, H. Tschape, J. D. van Elsas, and K. Smalla.** 1996. Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**:2621-8.
 53. **Grinsted, J., and P. M. Bennet.** 1988. *Plasmid Technology*, Academic Press ed, London.
 54. **Guiney, D. G.** 1982. Host range of conjugation and replication functions of the *Escherichia coli* sex plasmid Flac. Comparison with the broad host-range plasmid RK2. *J Mol Biol* **162**:699-703.
 55. **Guo, X., M. Flores, P. Mavingui, S. I. Fuentes, G. Hernandez, G. Davila, and R. Palacios.** 2003. Natural genomic design in *Sinorhizobium meliloti*: novel genomic architectures. *Genome Res* **13**:1810-7.
 56. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**:1089-97.
 57. **Hakenbeck, R., and J. Coyette.** 1998. Resistant penicillin-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* **54**:332-40.
 58. **Hall, R. M.** 1998. Antibiotic resistance in gram negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug resistance UPDATES* **1**:109-119.
 59. **Hall, R. M., H. J. Brown, D. E. Brookes, and H. W. Stokes.** 1994. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J Bacteriol* **176**:6286-94.
 60. **Hansson, K., O. Skold, and L. Sundstrom.** 1997. Non-palindromic attL sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets. *Mol Microbiol* **26**:441-53.
-

61. **Hardy, K.** 1986. Bacterial plasmids, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
62. **Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M. Hattori, and H. Shinagawa.** 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**:11-22.
63. **Hedges, R. W., V. Rodriguez-Lemoine, and N. Datta.** 1975. R factors from *Serratia marcescens*. *J Gen Microbiol* **86**:88-92.
64. **Henderson, D., and R. Meyer.** 1999. The MobA-linked primase is the only replication protein of R1162 required for conjugal mobilization. *J Bacteriol* **181**:2973-8.
65. **Hendrix, R. W., M. C. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford, and G. F. Hatfull.** 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:2192-7.
66. **Humeniuk, C., G. Arlet, V. Gautier, P. Grimont, R. Labia, and A. Philippon.** 2002. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3045-9.
67. **International Organization** 2000, posting date. **International Organization. ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages-part 2: enumeration of somatic coliphages.** Geneva: The Organization. [Online.]
68. **Keswick, B. H., T. K. Satterwhite, P. C. Johnson, H. L. DuPont, S. L. Secor, J. A. Bitsura, G. W. Gary, and J. C. Hoff.** 1985. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol* **50**:261-4.
69. **Lane, D.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
70. **Lawley, T. D., W. A. Klimke, M. J. Gubbins, and L. S. Frost.** 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett* **224**:1-15.

-
71. **Lazarova, V., and P. Savoys.** 2004. Technical and sanitary aspects of wastewater disinfection by UV irradiation for landscape irrigation. *Water Sci Technol* **50**:203-9.
72. **Lee, K. Y., J. D. Hopkins, and M. Syvanen.** 1990. Direct involvement of IS26 in an antibiotic resistance operon. *J Bacteriol* **172**:3229-36.
73. **Livermore, D. M.** 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**:557-84.
74. **Livermore, D. M.** 1996. Mode of action and mechanisms of bacterial resistance, p. 5505-578. *In* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
75. **Llovet, T., P. Coll, F. March, I. Montserrat, I. Atela, B. Mirelis, and G. Prats.** 1995. Comparison of macrorestriction analysis of genomic DNA by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping with conventional methods for differentiation of *Escherichia coli* O124 isolates. *Clin Microbiol Infect* **1**:127-133.
76. **Maher, D., R. Sherburne, and D. E. Taylor.** 1993. H-pilus assembly kinetics determined by electron microscopy. *J Bacteriol* **175**:2175-83.
77. **Mahillon, J., and M. Chandler.** 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:725-74.
78. **Mantengoli, E., and G. M. Rossolini.** 2005. Tn5393d, a complex Tn5393 derivative carrying the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase gene and other resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3289-96.
79. **Mantri, Y., and K. P. Williams.** 2004. Islander: a database of integrative islands in prokaryotic genomes, the associated integrases and their DNA site specificities. *Nucleic Acids Res* **32 Database issue**:D55-8.
80. **Miró, E., B. Mirelis, F. Navarro, A. Rivera, R. J. Mesa, M. C. Roig, L. Gómez, and P. Coll.** 2005. Surveillance of extended-spectrum beta-lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* **56**:1152-5.
-

81. **Muniesa, M., A. García, E. Miró, B. Mirelis, G. Prats, J. Jofre, and F. Navarro.** 2004. Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerg Infect Dis* **10**:1134-7.
82. **Muniesa, M., J. Recktenwald, M. Bielaszewska, H. Karch, and H. Schmidt.** 2000. Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect Immun* **68**:4850-5.
83. **Naas, T., Y. Mikami, T. Imai, L. Poirel, and P. Nordmann.** 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol* **183**:235-49.
84. **Navarro, F.** 2002. Update on CTX-M-type b-lactamases. *Reviews in Medical Microbiology* **13**:63-73.
85. **Neidhardt, F. C.** 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology, 2nd ed, vol. 2. ASM Press, Washington D.C.
86. **Novotny, C. P., and P. Fives-Taylor.** 1974. Retraction of F pili. *J Bacteriol* **117**:1306-11.
87. **Ochman, H., J. G. Lawrence, and E. A. Groisman.** 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**:299-304.
88. **Oliver, A., T. M. Coque, D. Alonso, A. Valverde, F. Baquero, and R. Canton.** 2005. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among Enterobacteriaceae in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1567-71.
89. **Olson, A. B., M. Silverman, D. A. Boyd, A. McGeer, B. M. Willey, V. Pong-Porter, N. Daneman, and M. R. Mulvey.** 2005. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2112-5.
90. **Osborn, A. M., and D. Boltner.** 2002. When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid* **48**:202-12.

-
91. **Osborn, A. M., F. M. da Silva Tatley, L. M. Steyn, R. W. Pickup, and J. R. Saunders.** 2000. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiology* **146 (Pt 9)**:2267-75.
92. **Osborn, A. M., R. W. Pickup, and J. R. Saunders.** 2000. Development and application of molecular tools in the study of IncN-related plasmids from lakewater sediments. *FEMS Microbiol Lett* **186**:203-8.
93. **Partridge, S. R., H. J. Brown, H. W. Stokes, and R. M. Hall.** 2001. Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1263-70.
94. **Perna, N. T., G. F. Mayhew, G. Posfai, S. Elliott, M. S. Donnenberg, J. B. Kaper, and F. R. Blattner.** 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **66**:3810-7.
95. **Petes, T. D., and C. W. Hill.** 1988. Recombination between repeated genes in microorganisms. *Annu Rev Genet* **22**:147-68.
96. **Plasmid-Biology.** 2004. ASM Press, Portland,OR.
97. **Poirel, L., P. Kampfer, and P. Nordmann.** 2002. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:4038-40.
98. **Power, P., M. Galleni, J. Di Conza, J. A. Ayala, and G. Gutkind.** 2005. Description of In116, the first *bla*CTX-M-2-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. *J Antimicrob Chemother* **55**:461-5.
99. **Prats, G., T. Llovet, C. Munoz, R. Sole, B. Mirelis, C. Izquierdo, P. Rodríguez, M. E. Sabanes, N. Rabella, R. Pericas, F. Sanchez, N. Margall, F. Navarro, and P. Coll.** 1997. [Etiology of enteritis in a university general hospital in Barcelona (1992-1995)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **15**:349-56.
-

100. **Recchia, G. D., and R. M. Hall.** 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* **141 (Pt 12)**:3015-27.
101. **Rice, L. B., and L. L. Carias.** 1998. Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **180**:714-21.
102. **Rice, L. B., D. Sahn, and R. A. Bonomo.** 2003. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents, p. 1074-1101. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, J. A. Jorgensen, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
103. **Richmond, M. H., and R. B. Sykes.** 1973. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* **9**:31-88.
104. **Rodriguez Lemoine, V.** 1992. The incompatibility complex of H. plasmids. *Rev Latinoam Microbiol* **34**:115-27.
105. **Sabaté, M., E. Miró, F. Navarro, C. Vergés, R. Aliaga, B. Mirelis, and G. Prats.** 2002. Beta-lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother* **49**:989-97.
106. **Sabaté, M., F. Navarro, E. Miró, S. Campoy, B. Mirelis, J. Barbé, and G. Prats.** 2002. Novel complex sul1-type integron in *Escherichia coli* carrying bla(CTX-M-9). *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2656-61.
107. **Sabaté, M., R. Tarrago, F. Navarro, E. Miró, C. Vergés, J. Barbé, and G. Prats.** 2000. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1970-3.
108. **Sabaté, M., C. Vergés, E. Miró, B. Mirelis, F. Navarro, E. del Rio, and G. Prats.** 1999. [Incidence of extended spectrum beta lactamase in *Escherichia coli* in a university hospital from 1994-1996]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **17**:401-4.
109. **Saladin, M., V. T. Cao, T. Lambert, J. L. Donay, J. L. Herrmann, Z. Ould-Hocine, C. Verdet, F. Delisle, A. Philippon, and G. Arlet.** 2002. Diversity of CTX-

-
- M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. FEMS Microbiol Lett **209**:161-8.
110. **Salyers, A. A., and C. F. Amabile-Cuevas.** 1997. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? Antimicrob Agents Chemother **41**:2321-5.
111. **Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning:a laboratory manual, New York.
112. **Sander, M., and H. Schmieger.** 2001. Method for host-independent detection of generalized transducing bacteriophages in natural habitats. Appl Environ Microbiol **67**:1490-3.
113. **Simarro, E., F. Navarro, J. Ruiz, E. Miró, J. Gómez, and B. Mirelis.** 2000. *Salmonella enterica* serovar virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. J Clin Microbiol **38**:4676-8.
114. **Smith, H. W.** 1972. Ampicillin resistance in Escherichia coli by phage infection. Nat New Biol **238**:205-6.
115. **Snyder, L., and W. Champness.** 1997. Molecular Genetics of Bacteria, Washington, D.C.
116. **Stokes, H. W., and R. M. Hall.** 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol Microbiol **3**:1669-83.
117. **Stokes, H. W., D. B. O'Gorman, G. D. Recchia, M. Parsekhian, and R. M. Hall.** 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. Mol Microbiol **26**:731-45.
118. **Stokes, H. W., C. Tomaras, Y. Parsons, and R. M. Hall.** 1993. The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. Plasmid **30**:39-50.
-

119. **Tanner, B. D., S. Kuwahara, C. P. Gerba, and K. A. Reynolds.** 2004. Evaluation of electrochemically generated ozone for the disinfection of water and wastewater. *Water Sci Technol* **50**:19-25.
120. **Taylor, D. E., and R. B. Grant.** 1977. Incompatibility and surface exclusion properties of H1 and H2 plasmids. *J Bacteriol* **131**:174-8.
121. **Taylor, D. E., and J. G. Levine.** 1980. Studies of temperature-sensitive transfer and maintenance of H incompatibility group plasmids. *J Gen Microbiol* **116**:475-84.
122. **Tomasz, A.** 1979. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol* **33**:113-37.
123. **Tran, J. H., and G. A. Jacoby.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5638-42.
124. **Valentine, C. R., M. J. Heinrich, S. L. Chisoe, and B. A. Roe.** 1994. DNA sequence of direct repeats of the *sull* gene of plasmid pSa. *Plasmid* **32**:222-7.
125. **Verdet, C., G. Arlet, G. Barnaud, P. H. Lagrange, and A. Philippon.** 2000. A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*(DHA-1) gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:222-5.
126. **Verdet, C., Y. Benzerara, V. Gautier, O. Adam, Z. Ould-Hocine, and G. Arlet.** 2006. Emergence of DHA-1-Producing *Klebsiella* spp. in the Parisian Region: Genetic Organization of the *ampC* and *ampR* Genes Originating from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:607-17.
127. **Villa, L., P. Visca, F. Tosini, C. Pezzella, and A. Carattoli.** 2002. Composite integron array generated by insertion of an *ORF341*-type integron within a *Tn21*-like element. *Microb Drug Resist* **8**:1-8.
128. **Vourli, S., L. S. Tzouveleakis, E. Tzelepi, E. Lebessi, N. J. Legakis, and V. Miriagou.** 2003. Characterization of In111, a class 1 integron that carries the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla*IBC-1. *FEMS Microbiol Lett* **225**:149-53.

-
129. **Waley, S.** 1992. Beta-lactamase: mechanism of action. *In* M. Page (ed.), The chemistry of beta-lactams. A. and P. Blackie, London.
130. **Wang, M., J. H. Tran, G. A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang, and D. C. Hooper.** 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2242-8.
131. **Waters, V. L.** 1999. Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front Biosci* **4**:D433-56.
132. **Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**:697-703.
133. **White, P. A., C. J. McIver, and W. D. Rawlinson.** 2001. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2658-61.
134. **Yagi, T., H. Kurokawa, K. Senda, S. Ichiyama, H. Ito, S. Ohsuka, K. Shibayama, K. Shimokata, N. Kato, M. Ohta, and Y. Arakawa.** 1997. Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1-like beta-lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2606-11.
135. **Yagi, T., H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, and Y. Arakawa.** 2000. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett* **184**:53-6.
-