

OBJETIVOS

La necesidad de demostrar la producción de  $\beta$ -lactamasas por un microorganismo aislado en el laboratorio clínico, ha llegado a ser de crucial importancia en los últimos años, debido a la emergencia de cepas productoras de nuevos tipos de  $\beta$ -lactamasas y su diversificación. En muchos casos son difíciles de diferenciar entre ellas.

Es necesario entonces, poder caracterizarlas y clasificarlas:

- según sus características fenotípicas: perfil de actividad, punto isoeléctrico y actividad hidrolítica,
- según características genotípicas: PCR con iniciadores específicos para el gen que codifica la  $\beta$ -lactamasa, clonación y secuenciación.

Por lo expuesto, los objetivos del presente trabajo son:

- Evaluar la incidencia de cepas de enterobacterias, productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas, con sensibilidad disminuida a cefalosporinas de tercera generación.
- Definir cualitativa y cuantitativamente el fenotipo de resistencia de estas cepas.
- Caracterizar e identificar las  $\beta$ -lactamasas implicadas en la resistencia.

MATERIALES Y METODOS

## 1) Cepas estudiadas

---

Se han estudiado la sensibilidad de un total de 13,800 cepas de la familia *Enterobacteriaceae* aisladas de muestras clínicas entre los años 1997 y 1999 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. De estas 10,057 pertenecieron a las especies de *Escherichia coli* (7705), *Klebsiella pneumoniae* (491), *Salmonella enterica* (913) y *Proteus mirabilis* (948). A través de la técnica de difusión en agar (siguiendo las recomendaciones de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1995, 1998 y 1999) se seleccionan 53 cepas por presentar sensibilidad disminuida a cefalosporinas de tercera generación y/o aztreonam: 41 cepas de *E. coli*, 9 cepas de *K. pneumoniae*, 2 cepa de *S. enterica* y 1 cepa de *P. mirabilis*. El origen clínico de la mayoría de muestras era de orina 35 (67,3%), seguido de sangre 5 (9,6%) (Tabla 3, 6 y 9). Fueron obtenidas por los procedimientos microbiológicos habituales y se identificaron mediante las pruebas bioquímicas convencionales para enterobacterias.

## 2) Determinación de la sensibilidad a los antibióticos

---

### 2.1 Técnica de difusión

Se trata de ensayar la sensibilidad de las cepas bacterianas haciéndolas crecer en placas de agar donde se depositan discos de papel impregnados con los antibióticos a estudiar.

Si sembramos en una placa con un medio de cultivo de forma homogénea una bacteria y colocamos unos discos de papel cargados con concentraciones determinadas de cada antibiótico, éste al ser depositado sobre el agar, difunde casi instantáneamente a través del agar, formándose un gradiente radial de concentración del antibiótico alrededor del disco.

Se incuba la placa a 35°C-37°C durante 18 horas y cuando el microorganismo empieza a crecer, este gradiente ya está formado: el microorganismo crecerá dando lugar a un halo de inhibición o zona sin crecimiento, alrededor del disco. En la zona radial del agar en la que empiezan a desarrollarse colonias, estará la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antibiótico con el que el disco estaba cargado. Mediremos el diámetro del halo y lo expresaremos en milímetros. Mediante líneas de regresión CIM/halos de inhibición, podremos correlacionar ámbos parámetros.

Se utiliza el medio Mueller Hinton (Oxoid, Unipath Limited, Basingstoke, United Kingdom) y los discos (Oxoid) estudiados son: ampicilina (30 µg), piperacilina (100 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (30/10 µg), cefazolina (30 µg), cefuroxima (30 µg), cefoxitin (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), imipenem (10 µg), aztreonam (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), estreptomina (10 µg), kanamicina (30 µg), neomicina (30 µg), gentamicina (30 µg), tobramicina (30 µg), amikacina (30 µg), sulfamidias (300 µg), trimetoprim (30 µg), cotrimoxazol (110 µg), colistina (30 µg), y fosfomicina (50 µg).

El tamaño del inóculo, las condiciones de incubación así como los criterios de lectura e interpretación de los resultados fueron los establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>107</sup>.

## **2.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)**

El estudio de la sensibilidad bacteriana *in vitro* se efectúa determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la mínima concentración de antibiótico expresado en µg/mL que inhibe el crecimiento del microorganismo.

El estudio de éste parámetro, que cuantifica la sensibilidad, se lleva a cabo mediante técnicas de dilución en medio líquido (o caldo) o en medio sólido.

### 2.2.1 Técnica de dilución en medio sólido

Se prepara una serie de tubos con cantidades decrecientes de un antibiótico, para conseguir una serie doble progresiva de concentraciones. Se incorporan las diluciones al agar fundido, a temperatura alrededor de 50°C y se vierten posteriormente en placas de Petri que se dejaron solidificar. Esta técnica permite estudiar simultáneamente la CIM de un gran número de cepas a un antimicrobiano.

Se inoculan las placas con una cantidad conocida de los microorganismos a estudiar, con la ayuda de un replicador de Steers (Multipoint inoculator), para obtener una concentración de microorganismo en el agar de  $10^4$  UFC. Tras la incubación a 35-37°C durante 18 horas se determina el valor de la CIM del antibiótico para cada microorganismo, que corresponde a la placa con la menor concentración de antibiótico en la que el crecimiento bacteriano está inhibido.

Se incluyen en todas las series dos cepas de control *E.coli* ATCC 29213 y *E.coli* ATCC 25922.

Los antimicrobianos estudiados son: ampicilina, amoxicilina, ácido clavulánico, ticarcilina (Smith Kline Beecham); piperacilina, cefoperazona (Sigma); tazobactam (Lederle Cyanamid); cefuroxima, ceftazidima (Glaxo S.A.); cefoxitina (Merck Sharp & Dohme); cefotaxima (Hoechst Marion Roussel); cefepime, aztreonam (Bristol Myers Squibb) y cefpodoxima (Sankyo Co). Los disolventes y diluyentes utilizados para cada antibiótico son los recomendados por el fabricante.

### 2.2.2 Técnica de microdilución

La técnica de microdilución es una técnica de dilución en caldo que utiliza placas de poliestireno con micropocillos en lugar de tubos de ensayo, utilizándose por tanto, volúmenes finales menores.

Se utilizan placas comercializadas (Sensititre<sup>®</sup> EMIZA 9EF) con 26 antibióticos desecados por placa. La metodología seguida fue la propuesta por el fabricante, siguiendo las normativas del NCCLS. Los antibióticos estudiados y sus concentraciones fueron: ampicilina (1-16 µg/mL), amoxicilina-ácido clavulánico (4/2-16/8 µg/mL), cefuroxima (4-16 µg/mL), cefoxitina (4-16 µg/mL), cefazolina (8 y 16 µg/mL), piperacilina (16-32 µg/mL), ticarcilina (16-64 µg/mL), cefixima (8 y 16 µg/mL), piperacilina/tazobactam (8/4-64/4 µg/mL), gentamicina (1-8 µg/mL), amikacina (4-32 µg/mL), tobramicina (2-8 µg/mL), fosfomicina+G6P (128 µg/mL), imipenem (0,25-8 µg/mL), ampicilina/sulbactam (8/4 y 16/8 µg/mL), meropenem (0,5-8 µg/mL), aztreonam (4-16 µg/mL), ciprofloxacino (0,25-2 µg/mL), norfloxacino (4 y 8 µg/mL), tetraciclina (4 y 8 µg/mL), levofloxacino (0,25-2 µg/mL), trimetropin/sulfametoxazol (0,5/9,5-2/38 µg/mL), cefepime (1-16 µg/mL), cloranfenicol (8 y 16 µg/mL), cefotaxima (0,25-32 µg/mL) y ceftazidima (0,25-16 µg/mL).

### 2.2.3 Método de E-test

E test (AB Biodisk, Solna, Sweden) es un método innovador para cuantificar la actividad antimicrobiana, al determinar la CIM por técnica de difusión.

Consiste en una tira de plástico no poroso de 5 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de un antimicrobiano equivalente a 15 concentraciones dobles progresivas. Siguiendo la metodología de difusión, una vez se ha inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre la superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte de plástico hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano.

Tras la incubación de las placas, a 35°C durante 18 horas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. El punto en que el extremo de la zona de inhibición intersecciona con la tira, es el valor de la CIM.

E-test es un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución.

En este estudio se utilizaron tiras de E-test de cefotaxima/cefotaxima-ácido clavulánico y ceftazidima/ceftazidima-ácido clavulánico, valorándose la reducción de la CIM de cefotaxima y ceftazidima en presencia de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico. Dicha reducción de CIM sugeriría la presencia de BLEAs en las cepas estudiadas.

### **2.3 Prueba de doble difusión con disco (placa de sinergia)**

Para la detección de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido se emplea la prueba de doble difusión con disco. La placa de agar Mueller Hinton se baña con la cepa a estudiar; en el centro de la placa se coloca un disco de amoxicilina-ácido clavulánico 2:1 (30  $\mu$ g), y radialmente se colocaron los siguientes discos: cefotaxima (30  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), aztreonam (30  $\mu$ g) y cefepime (30  $\mu$ g). Estos discos son puestos a 30mm del disco de amoxicilina-ácido clavulánico y cuando no se observa sinergia de esta forma se cambió a 25mm. Las placas se incuban a 37°C por 18 horas. Se considera la prueba positiva cuando se observa un aumento del halo de inhibición en cualquiera de los discos de cefalosporinas de tercera generación o el de aztreonam, en la zona próxima al disco que contiene el ácido clavulánico<sup>75</sup>.

### **3) Procedimientos para el análisis epidemiológico de las cepas**

---

Se denomina así, al proceso de analizar aislados múltiples de un especie dada, para determinar si ellos vienen de una sola cepa o de diferentes y múltiples cepas, que están causando alguna infección clínica. De esta forma se puede decir si la serie de aislados obtenidos durante un brote epidémico o durante el curso de una infección en un mismo paciente son clonales, es decir descienden de un precursor común.

### 3.1 Técnicas fenotípicas

Aquellas técnicas que detectan las características expresadas por los microorganismos. Están limitadas inherentemente por la capacidad del microorganismo para modificar la expresión de los genes subyacentes.

#### 3.1.1 Biotipado

El biotipado se refiere al patrón metabólico expresado por un aislado. Para realizar el biotipado de las cepas de *E. coli* se utiliza una serie bioquímica<sup>141</sup> con doce test dividido en grupos de tres: un grupo de fermentación del dulcitol, sacarosa y rafinosa; otro grupo producción de lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa y detección de la  $\alpha$ -glucuronidasa; otro de fermentación de la ramnosa y el sorbitol y producción de gas en el tubo de glucosa; y fermentación de la lactosa, adonitol y sorbosa. Luego se va dando puntos por cada reacción positiva: 1 punto para el primer test de cada grupo, 2 puntos para el segundo test y 4 puntos para el tercer test. Los biotipos se expresan en un código de 4 dígitos. La lectura se realiza primero a las 24 horas luego a las 48 horas.

#### 3.1.2 Antibiotipado

El antibiotipado esta dado por el patrón de resistencia de los microorganismos a los diferentes antimicrobianos (ver apartado 2).

#### 3.1.3 Serotipado

El serotipado se basa en la observación de que microorganismos de la misma especie pueden diferir en los determinantes antigénicos expresados en la superficie celular. El serotipado, de las cepas de *Salmonella enterica* se realizó en el Servicio de Enterobacterias del Centro Nacional de Microbiología, Instituto Carlos III Majadahonda, Madrid.

La realización del serogrupo de las cepas de *E. coli*, se realizó con anticuerpos específicos de los siguientes antígenos O: O:1, O:2, O:4, O:6, O:8, O:9, O:15, O:18 y O:83 La prueba se considera positiva cuando se observa una aglutinación franca al enfrentar el anticuerpo con la cepa problema, negativa cuando no se observa aglutinación y rugoso cuando la cepa autoaglutina.

#### **4) Selección de las cepas estudiadas con cefotaxima**

Esta selección se realiza por el método de Szybalski<sup>35</sup> que consiste en la utilización de placas de Mueller Hinton con un gradiente determinado de un antibiótico de elección. Primero se debe conocer la CIM de la cepa a seleccionar ya que las placas de Mueller Hinton, en este caso con cefotaxima, se preparan a una concentración dos veces superior a la CIM de la cepa a estudiar. Las placas se preparan con 18 mL de agar Mueller Hinton a 50°C más 2 mL de cefotaxima a una concentración diez veces superior a la que se quiere obtener en el volumen final. Agregar la mezcla del agar en la placa petri inclinada (para esto se coloca un lapiz sobre la mesa de trabajo y sobre él se apoya la placa), hasta que el agar quede a 1 cm del borde de la placa que se apoya en el lapiz. Dejar secar, cuando se enfríe, colocar la placa en posición horizontal y agregar agar Mueller Hinton a 50°C hasta el borde más alto de agar solidificado previamente. Es importante señalar el lado donde hay más agar con antibiótico. Una vez solidificadas las placas, dejar secar en la estufa a 37°C durante más o menos 1 hora. Luego sembrar en el medio de la placa 100 µl de una suspensión de la cepa en suero fisiológico a 0,8 McFarland y extender uniformemente por toda la placa con asa de vidrio. Incubamos a 37°C durante 18 horas. El crecimiento que se observa es un gradiente desde el sitio de menor concentración del antibiótico (cefotaxima) al sitio de mayor concentración de antibiótico. A continuación, se seleccionan las colonias más próximas al sitio de mayor concentración del antibiótico. De estas colonias se debe realizar la CIM por el método de dilución en caldo Mueller Hinton ajustado con cationes. Se usa como control la cepa *E. coli* ATCC 25922. Aquellas cuya CIM haya incrementado, se volverán a seleccionar (se utiliza el tubo de mayor concentración de antibiótico donde se observa crecimiento), hasta obtener colonias cuya CIM no pueda subir más, o alcanzar la concentración de 1024 µg/mL.

De esta forma se seleccionaron 16 cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasa compatible con CTX-M-9 y TEM-1 y 5 cepas de *E. coli* con  $\beta$ -lactamasa compatible con SHV-2.

## 5) Determinación del punto isoelectrico

---

### 5.1 Extracción de $\beta$ -lactamasas

La extracción de las  $\beta$ -lactamasas se realiza por medio de la lisis celular llevada a cabo mediante sonicación. El contenido resultante corresponde a todo el contenido proteico celular (incluida la  $\beta$ -lactamasa) y se denomina extracto crudo.

#### Procedimiento:

Se siembra una o dos colonias de la cepa, se pone en crecimiento en 5 mL de caldo tripticasa soya (CT) durante 2 horas en agitación a 37°C; una vez se alcanza el cultivo exponencial (aproximadamente a las 3 horas) se coloca 2 mL de este cultivo en 200 mL de caldo Luria-Bertani, LB (método de Mathew y cols., 1975)<sup>94</sup>. Se agrega ampicilina (antibiotico necesario para la inducción de la  $\beta$ -lactamasa) en una concentración de 100  $\mu$ g/mL y se incuba en agitación durante 18 horas a 37°C. Se hace un antibiograma del cultivo para comprobar la pureza del mismo así como, la expresión de la  $\beta$ -lactamasa. Se centrifuga el cultivo a 4,000 rpm a 4°C durante 30 minutos, el sedimento se resuspende en 10 mL de agua bidestilada y la suspensión se centrifuga nuevamente durante 30 minutos a 10,000 rpm a 4°C. El sedimento se resuspende en 5 mL de agua bidestilada ultrapura (si es <5 mg en 5 mL y si >5 mg en una proporción 1:1) y la suspensión celular se somete a sonicación (Ultrasonicador: Labsonic 200, B. Braun Biotech International), 1 minuto en 15  $\mu$ M a 4°C por tres veces, con períodos de descansos intercalados de 30 segundos. Observar una disminución en la turbidez. Luego las células lisadas se centrifugan a 14,000 rpm a 4°C durante 30 minutos y el sobrenadante, que es el extracto crudo proteico se conserva a -20°C.

## 5.2 Análisis por la técnica de isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida

El isoelectroenfoque (IEF) es un método de determinación del pI de una proteína mediante electroforesis, en un gel que contiene un gradiente de pH. Este gradiente de pH se establece con anfólitos. Estas son sustancias anfotéricas de bajo peso molecular que migran en un campo eléctrico hasta llegar a su pI donde su carga eléctrica es zero o neutra. Cuando se utiliza una mezcla de diferentes anfólitos es cuando se crea el gradiente de pH. Cuando se aplica una proteína al gel, esta puede estar cargada positiva o negativamente, dependiendo del pH local de aquel punto del gel. Después de la aplicación de la corriente, la proteína se moverá hacia el ánodo o al cátodo (dependiendo de su carga) hasta que encuentra la región en el gel donde la carga neta será 0 y por lo tanto parará de migrar, el pH de este punto se define como pI. Junto con la proteína problema corren proteínas de pI conocido, lo cual permite la estimación, mediante la correlación de éstas, del pI de nuestra proteína problema.

### Procedimiento:

El análisis por isoelectroenfoque<sup>8</sup> del extracto crudo, se realiza en gel de poliacrilamida con anfólitos de un rango de pH 3,5 a 11 (Pharmacia Biotech 3,5–9,5 y Serva 9-11). El volumen de extracto analizado varía, entre 20µl y 40µl. Las condiciones de la corrida del gel son de 1000V, 50 mA y 2W durante 18 horas. Cuando es necesario, porque no sé define bien alguna  $\beta$ -lactamasa con pI bajo (pI esperados fueron ácidos), sé realizan geles con anfólitos de un rango de pH 3,5 a 9,5 (Pharmacia Biotech 3,5–9,5 y Pharmacia Biotech 4 -6), en este caso las condiciones de corrida son las siguientes: voltaje máximo 1500 V, amperaje máximo de 50 mA y una potencia fija de 50W durante 4 horas. La focalización en ambos casos se realiza a 4°C.

La actividad enzimática se revela mediante el método iodométrico con geles de agar con una concentración final de 125 µg/mL de ceftriaxona, para poder observar si la  $\beta$ -lactamasas tiene actividad frente a las cefalosporinas de tercera generación, y luego una vez visualizada la actividad y quitando este gel, se revela con un segundo gel con una concentración final de 125 µg/mL de penicilina. El gel de revelado es superpuesto al gel

de IEF y en los puntos donde se hayan focalizado las  $\beta$ -lactamasas estas degradarán el anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico con la consecuente liberación de protones que reducirán el yoduro a yodo, este proceso conlleva un cambio de color del almidón que pasará de azul a blanco.

Como controles se colocan extractos crudos de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas SHV-1 (p453 pI 7,6), SHV-3 (pUD18 pI 7,1), SHV-5 (TR349 pI 8,2), TEM-1 (RL111 pI 5,4), TEM-2 (RL114 pI 5,6), TEM-3 (CF1304 pI 6,3), CTX-M-4 (R893 pI 8,4), CTX-M-9 (MSP492 pI 8,0) y CTX-M-9 y TEM-1 (785-D pI 8,0 y pI 5,4), los cuales se corren paralelamente a los extractos de las cepas problemas.

## 6) Conjugación

---

Es un método de apareamiento sexual donde el plásmido o el material genético se transmite desde una célula bacteriana donadora hasta otra célula bacteriana receptora, a través de un apéndice especial denominado pili sexual. La célula donadora posee un plásmido (factor F; fertilidad) que permite la síntesis del pilus sexual o pilus conjugativo. La célula receptora está relacionada estrechamente con la donadora y contiene en su superficie lugares de reconocimiento. El material genético pasa a través del punto formado por el pilus dejando en la bacteria donadora generalmente una copia del material genético transferido.

### Procedimiento:

Para la obtención de los transconjugantes se utiliza *E. coli* BM694 Cla, resistente al ácido nalidíxico, como cepa receptora, cuyo fenotipo se describe en la tabla 20, 21 y 22. Se siembran las cepas donadoras y la receptora en placas de agar sangre, incubar 18-20 h a 37°C. Inocular una colonia de cada una de estas placas, en 3 mL de CT durante 2-3 h a 37°C en agitación, es decir, hasta que esten en la fase de crecimiento exponencial. La conjugación se realiza en medio sólido, poniendo en contacto 50  $\mu$ L de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, tanto de la cepa donadora como de la cepa receptora, en el centro de una placa de agar sangre muy seca. Para evitar que la suspensión se

expanda en toda la placa se utiliza un disco de papel de filtro estéril (Millipore ), el que se coloca en el centro y sobre el cual se realiza la mezcla. Una vez seca la gota se incuba 18h a 37°C, evitando mover bruscamente la placa.

Pasado ese tiempo de incubación, recoger el crecimiento mediante una asa de siembra y colocar el contenido en un tubo que contiene 2 mL de suero fisiológico. Hacer diluciones de éste, obteniendo unas concentraciones finales en placa de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Sembrar en placas de Mueller Hinton suplementado con ampicilina 100 µg/mL, cefotaxima 2 µg/mL y ácido nalidíxico 50 µg/mL, lo que permite la selección de las cepas transconjugantes, lo que será diferente para cada conjugación. Incubar 18-20 h a 37°C. Hacer un antibiograma y biotipado, para excluir las mutantes naturales, de la cepa transconjugante y además comprobar el punto isoeléctrico (pI).

#### **7) Detección y caracterización de las β-lactamasas por amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza para amplificar de forma exponencial un segmento de ADN existente entre dos regiones de secuencia conocida. Se utilizan dos oligonucleótidos como iniciadores para una serie de reacciones en cadena que constan de ciclos de desnaturalización, renaturalización y extensión. Debido a que los productos de un ciclo completo sirven como moldes para el segundo, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad del producto del ADN, obteniendo al final del proceso un número de moléculas de ADN de  $2^X$ , siendo X el número de ciclos realizados. En nuestro caso se va a realizar la técnica de la PCR para la amplificación de los genes codificantes de las β-lactamasas y posteriormente, en algunos casos, para la secuenciación. El procedimiento seguido se realiza a partir de muestras que contienen el ADN molde procedente de una extracción de ADN a partir de una colonia.

#### **Procedimiento:**

Los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>AMPC</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>, *ampR* y la región variable de los integrones son amplificados utilizando los iniciadores que se detallan en la tabla 2.

Las condiciones de amplificación para *bla*<sub>TEM</sub> son: desnaturalización durante 4 min a 94°C, 35 ciclos (desnaturalización 1 min a 94°C, renaturalización 2 min a 48°C, extensión 2 min a 72°C), extensión 10 min a 72°C y parada de la reacción a 4°C. El fragmento amplificado a obtener es de 938 pb. Las condiciones de amplificación para *bla*<sub>SHV</sub> son: desnaturalización durante 5 min a 95°C, 30 ciclos (desnaturalización 30 segundos a 94°C, renaturalización 30 segundos a 68°C, extensión 50 segundos a 72°C), extensión 3 min a 72°C y parada de la reacción a 4°C. Los iniciadores son los descritos por Nüesch-Inderbinnen y cols. en 1996<sup>116</sup>. El fragmento amplificado a obtener es de 1017 pb. Se utiliza como cepa control *E. coli* SHV-1 (J53 R1010) y *E. coli* SHV-2 (DH5x, MPB-2). Para la amplificación del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> se utilizan los iniciadores CTX-M-9<sub>IATG</sub> y CTX-M-9<sub>ISTOP</sub> descritos por Sabaté y cols. (2000)<sup>145</sup>, y las condiciones son: desnaturalización durante 5 min a 94°C, 30 ciclos (desnaturalización 1 min a 95°C, renaturalización 1 min a 55°C, extensión 1 min a 72°C), extensión 7 min a 72°C y parada de la reacción a 4°C. El tamaño del fragmento amplificado a obtener es de 850 pb. Cuando se utilizaron los iniciadores CTX-M-9<sub>EATG</sub> y CTX-M-9<sub>ESTOP</sub>, descritos por Sabaté<sup>145</sup>, las condiciones de amplificación son: desnaturalización durante 5 min a 94°C, 30 ciclos (desnaturalización 1 min a 95°C, renaturalización 1 min a 57°C, extensión 2 min a 72°C), extensión 7 min a 72°C y parada de la reacción a 4°C. El tamaño del fragmento amplificado a obtener es de 1.5 Kb. Se utiliza como cepa control la cepa de *E. coli* MSP492. Las condiciones de amplificación para *bla*<sub>AMPC</sub>, que utiliza los iniciadores degenerados *ampC* A1 y *ampC* A2, son los descritos por Marchese y cols en 1998<sup>93</sup> que permiten la amplificación del gen *ampC* de *E. coli*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii* así como de otros genes que codifican para -lactamasas plasmídicas CMY-2, LAT-21, LAT-2 y BIL-1 entre otras. Las condiciones de amplificación son: desnaturalización durante 5 min a 94°C, 35 ciclos (desnaturalización 30 segundos a 94°C, renaturalización 30 segundos a 48°C, extensión 1 min a 72°C), extensión 10 min a 72°C y parada de la reacción a 4°C. El tamaño del fragmento amplificado a obtener es de 561 pb. Como cepa control se utiliza *E. coli* MI 1443 (cepa sin el gen *ampC* cromosómico y con el gen *ampC* de *Enterobacter* clonado en el plásmido p18Ec). Para la amplificación del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> se diseñan los iniciadores CMY-2<sub>ATG</sub> y CMY-2<sub>STOP</sub> y las condiciones de amplificación son: desnaturalización durante 5 min a 94°C, 30 ciclos (desnaturalización 30 segundos a 94°C, renaturalización

30 segundos a 50°C, extensión 1 min a 72°C), extensión 10 min a 72°C y parada de la reacción a 4°C. El tamaño del fragmento amplificado a obtener es de 1017 pb. Como cepa control se utiliza *Citrobacter freundii* 70HB (aislada del LCR de un paciente de HSP). Para la amplificación del gen *ampR* se realiza dos PCRs en una se utiliza los iniciadores *ampRd* y *ampRMr* y en la otra *ampRd* y *ampRFr*; las condiciones en ambos casos son: desnaturalización durante 5 min a 94°C, 35 ciclos (desnaturalización 30 segundos a 94°C, renaturalización 30 segundos a 52°C, extensión 1 min a 72°C), extensión 10 min a 72°C y parada de la reacción a 4°C. El tamaño del fragmento amplificado a obtener es de 550 y 1100 pb, respectivamente. Como cepa control se coloca la misma cepa anterior de *C. freundii*. Y finalmente para la amplificación de fragmentos internos de las zonas 5'-CS y 3'-CS de los integrones de la clase I se utilizan los iniciadores descritos por Lévesque y cols. en 1995<sup>83</sup> y las condiciones de amplificación son: desnaturalización durante 5 min a 94°C, 35 ciclos (desnaturalización 1 min a 94°C, renaturalización 1 min a 55°C, extensión 5 min a 72°C con un aumento de 1 seg en cada ciclo), extensión 10 min a 72°C y parada de la reacción a 4°C. El tamaño del fragmento amplificado depende en cada caso del número de genes cassettes insertados en el integrón. Como cepa control se utiliza *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 44S (que contenía dos integrones de 1000 pb y 1200 pb).

Las concentraciones finales de la mezcla para la reacción de amplificación son: tampón de reacción 1X (2 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), *Taq* ADN polimerasa 0.03 U (Expand<sup>TM</sup> *High Fidelity*, Roche) y 400 mM dinucleótidos trifosfatos (dNTPs). El ADN que se utiliza como cebador para la amplificación es obtenido a partir de una colonia resuspendida en 100 µl de agua estéril miliQ y dicha suspensión es hervida durante 10 min a 95°C. La cantidad de ADN de la que se parte para cada reacción de amplificación depende del gen en cuestión, siendo de 2 µl para *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub>, 50 µl para *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (tanto cuando se utilizan los iniciadores internos CTX-M-9<sub>IATG</sub> y CTX-M-9<sub>ISTOP</sub> como los externos CTX-M-9<sub>EATG</sub> y CTX-M-9<sub>ESTOP</sub>), 15 µl para la amplificación de *bla*<sub>AMPC</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> y *ampR* y finalmente para la amplificación de la región interna de los integrones se utiliza 10 µl de ADN. Como cepas controles se utilizan las mismas que las utilizadas en la técnica de isoelectroenfoque, excepto en aquellos casos donde se detalla la cepa control utilizada.

Los fragmentos amplificados por PCR son separados mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, teñidos en bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y visualizados con luz ultravioleta (ver apartado 8.2).

Todas las reacciones de amplificación se realizan en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Roche Diagnostic Systems).

**Tabla 2:** Secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR y la secuencia del ADN

Iniciadores	Secuencia Nucleotídica 5' a 3'
Iniciadores usados para la amplificación por PCR	
TEM – 3 <sup>1</sup> TEM – 4 <sup>1</sup>	AGT GTC GAC TTA CCA ATG CTT AAT CAG T AAA GAA TTC TAA ATA CAT TCA AAT ATG
SHV A SHV B	CGC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA
CTX-M-9 <sub>IATG</sub> CTX-M-9 <sub>ISTOP</sub> CTX-M-9 <sub>EATG</sub> CTX-M-9 <sub>ESTOP</sub>	GTG ACA AAG AGA GTG CAA CGG ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC CGT CTC TTT GAC TGA CGA CCC TGG AAG AAT AAC TTC CGG CGG
<i>ampC</i> A1 <i>ampC</i> A2	GGA ATT CCT (AT)TG CTG CGC (GCT)CT GCT CGG GAT CCC TGC CAG TTT TGA TAA AA
CMY-2 <sub>ATG</sub> <sup>1</sup> CMY-2 <sub>STOP</sub> <sup>1</sup>	ATG ATG AAA AAA TCG TTA TGC TTG CAG CTT TTC AAG AAT GCG C
5'-CS 3'-CS	GGC ATC CAA GCA GCA AGC AAG CAG ACT TGA CCT GAT
<i>ampRd</i> <i>ampRMr</i> <i>ampRfr</i>	GA(CT) AAA C(GT)G TTA AAT TTA TAA TCC AGC CCT TCG GCG GC TTT ATT TGT GCA GCA CCC CG
Iniciadores usados en la secuenciación <sup>1</sup>	
CMY-2 <sub>MIG</sub>	GAC GTT AGG GAT AAA GCC GC
P5M P6M P7M P8M	TAG TTT GCG CAA CGT TGT TG CTA TTC TCA GAA TGA CTT GG GCC ACA TAG CAG AAC TTT AA TAA AGT TGC AGG ACC ACT TC

<sup>1</sup>Estos iniciadores también son utilizados en la secuenciación

---

## 8) Técnicas de análisis del ADN

---

La mayoría de las técnicas aplicadas en este trabajo están basadas en los protocolos descritos en los libros “Molecular cloning: a laboratory manual”<sup>147</sup>, y “Current protocols in molecular biology”<sup>5</sup>, introduciendo pequeñas modificaciones.

### 8.1 Endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas, purificadas a partir de hongos o bacterias que presentan una marcada especificidad respecto a secuencias cortas de ADN y que actúan sobre ellas rompiendo los enlaces fosfodiéster y por tanto cortando la cadena del ADN. Cada enzima de restricción presenta requerimientos de fuerza iónica y condiciones específicas de reacción, así que en cada caso se tiene que utilizar el tampón de restricción pertinente. Como norma general se digiere el ADN con aproximadamente 5 unidades de enzima por  $\mu\text{g}$  de ADN, a una concentración de glicerol del 5% y a la temperatura recomendada, durante un mínimo de 4 horas. Los productos de restricción son analizados en geles de agarosa.

Para confirmar la existencia de una  $\beta$ -lactamasa de espectro ampliado derivada de SHV se va a realizar la digestión parcial de los productos de amplificación con los iniciadores específicos de SHV, con la enzima de restricción *NheI*<sup>116</sup>. Esta enzima de restricción reconoce 4 pb y corta en la diana GCT:AGC.

#### Procedimiento:

Para realizar la digestión se coloca en un ependorf 25,7  $\mu\text{l}$  de agua miliQ estéril, 4  $\mu\text{l}$  de tampón de restricción, 10  $\mu\text{l}$  del ADN amplificado con iniciadores SHV y 0,3  $\mu\text{l}$  de la enzima *NheI*. Se mezcla e incuba a baño maría a 37°C sin agitación durante 18 horas. Preparar un gel de agarosa de una concentración final al 1,5% para correr los productos de la digestión. Se utiliza como marcador de peso molecular el Marker VIII (Roche). Los fragmentos que se esperan encontrar cuando hay digestión es de 769 pb y 248 pb, lo

cual nos indica que no es una  $\beta$ -lactamasa SHV-1, y por lo tanto se puede tratar de una BLEA de la familia SHV, como por ejemplo SHV-2.

## **8.2 Separación de fragmentos de ADN en geles de agarosa**

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica útil para la separación analítica o preparativa de fragmentos de ADN de tamaño entre 0,1 y 25 Kb. Esta se basa en la migración unidireccional del ADN a través de una matriz porosa cuando se le aplica un campo eléctrico. La visualización de los fragmentos de ADN se consigue mediante la incorporación al gel de un colorante fluorescente que se intercala entre las dos cadenas de ADN. Este colorante (en nuestro caso el bromuro de etidio) revela la presencia de una banda de ADN o ARN al ser iluminada con luz ultravioleta, de longitud de onda corta (310nm). La técnica es muy sensible, permitiendo detectar en un gel bandas de hasta 5ng de ADN. Esta técnica también permite la cuantificación de bandas de ADN mediante comparación con patrones de concentración conocida. La resolución de los geles de agarosa se modula por la misma concentración de agarosa, permitiendo discriminar entre bandas de peso molecular próximos mediante la variación de concentraciones de agarosa. El peso molecular de las bandas resulta de la interpolación sobre una línea de regresión realizada mediante los datos obtenidos de la migración electroforética de bandas de peso molecular conocidos, donde la migración es proporcional al logaritmo del peso molecular.

Todos los productos de la amplificación se van a separar por electroforesis convencional en geles de agarosa. Para preparar un gel de agarosa se mezcla 150 mL de tampón TBE 0,5X (TBE 10X: 89mM Tris-HCl - 2,5 mM EDTA - 89 mM ácido bórico pH 8,3) y 1,2 gr de agarosa (Ultrapure ADN grade agarosa, Bio Rad), para conseguir una concentración final de 0,8%. Una vez calentada esta mezcla y completada su homogenización debe ser teñida con bromuro de etidio (100 mg/mL, esto es 8  $\mu$ L de bromuro de etidio en 150 mL del gel de agarosa). Esta mezcla se deja enfriar sobre la cubeta de electroforesis, que previamente se ha sellado, y a la que se ha colocado el peine respectivo. La muestra se cargará tras mezclar 18  $\mu$ L del ADN amplificado con 2  $\mu$ L de tampón de muestra 10X. Como marcador de peso molecular se utiliza el Marker

III (21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831 y 564 pares de bases) y VIII (1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67 y 37 pares de bases), ambos de Roche. Una vez cargados los pocillos en el gel de agarosa, se debe conectar la fuente de poder (Bio Rad) y aplicar un voltaje de 70V durante aproximadamente 2 horas. El bromuro de etidio intercalado entre las bases de ADN nos permitirá visualizar y fotografiar el gel mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

## 9) Secuenciación directa de los productos de la PCR

---

Para llevar a cabo las reacciones de secuenciación del ADN se va a utilizar el método basado en el marcaje con fluorocromos, en nuestro caso el marcaje está en los iniciadores. Este método fue descrito por Sanger y cols. en 1977<sup>151</sup>, y utiliza una mezcla de desoxinucleótidos y dideoxinucleótidos. De esta forma primero se van incorporando desoxinucleótidos, a la copia del ADN molde, pero cuando se incorpora un dideoxinucleótido, el fragmento de ADN que se estaba fabricando queda interrumpido. De esta manera, separando los fragmentos generados en la reacción de secuenciación a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida y determinando la fluorescencia, a través de un rayo láser, se podrá determinar la secuencia de nucleótidos.

La secuenciación de los productos resultantes de las PCR de CMY-2 y TEM, se realiza mediante el sistema automático *ALFexpress* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Los iniciadores que se utilizan están detallados en la tabla 2.

### **Procedimiento:**

Se purifica el fragmento de ADN amplificado para así eliminar los iniciadores y que estos no puedan interferir en la reacción de secuenciación. Para esto se utilizan dos enzimas hidrolíticas: la fosfatasa alcalina y la exonucleasa I (PCR Product Pre-Sequencing Kit, USB Corporation). La fosfatasa alcalina remueve los remanentes de los dNTPs y la exonucleasa I remueve los iniciadores residuales de cadena simple producida por la PCR. Por cada 5 µl de amplificado de la PCR colocar 1 µl de fosfatasa alcalina y 1 µl de exonucleasa I, mezclar e incubar a 37°C durante 15 minutos. Luego

inactivar las enzimas por calor a 80°C durante 15 minutos y guardar a 4°C. El ADN está ahora listo para ser secuenciado.

Las reacciones de secuencia se realizan con el kit *fmol* ADN Sequencing System (Promega, USA). 1) Rotular cuatro eppendorfs con las letras A, C, G y T, por muestra a secuenciar, y depositar en cada uno de ellos 2 µl de la mezcla de d/ddNTP respectivo (d/ddATP, d/ddCTP, d/ddGTP y d/ddTTP). 2) Por cada muestra a secuenciar se prepara en dos tubos eppendorf la siguiente mezcla: entre 4 y 40 fmols del ADN molde de la presecuencia (esta cantidad se determina con el GeneQuant de Amersham Pharmacia Biotech o utilizando geles de agarosa); 1,5 µl de iniciador marcado de una concentración de 1,5 pmols/µl (en uno el iniciador de la secuencia directa y en el otro de la secuencia inversa); 5 µl del tampón de la reacción; 1 µl de la Taq polimerasa; y agua miliQ hasta completar 16 µl. 3) En uno de los juegos de eppendorfs con los 2 µl de d/ddNTPs colocar 4 µl de la mezcla con el iniciador marcado para la secuencia directa y en el otro juego de cuatro eppendorfs colocar 4 µl de la mezcla con el iniciador marcado para la secuencia inversa. 4) Se coloca en el termociclador a 30 ciclos de: 95°C durante 30 segundos, luego, dependiendo de la temperatura de hibridación del iniciador que se utiliza, se coloca a dicha temperatura durante 30 segundos y finalmente a 70°C durante un minuto. Al final del programa colocar a 4°C. 5) Parar la reacción de secuenciación añadiendo 3 µl de la solución stop (formamida 100% desionizada y dextran blue 2000). Se guarda a -20°C hasta su utilización.

Para realizar el gel de secuenciación primero debe prepararse los vidrios lavándolos con un detergente catiónico (para evitar la mínima interacción con el rayo láser). Enjuagar abundantemente con agua destilada, secar y repasar con papel de celulosa impregnado con etanol al 70%. Se debe hacer lo mismo con los separadores y el peine de los pocillos. Preparar la solución fijadora con 1 mL de etanol al 100%, 250 µl ácido acético al 10%, 3 µl de bind-silane (Amersham Pharmacia Biotech). Esto se realiza para fijar la acrilamida a los vidrios y permitir así que los pocitos mantengan su forma. Con la solución fijadora, se unta 5 cm del vidrio exterior y 3 cm del vidrio interior mediante un papel de celulosa. Montar los vidrios y limpiar las superficies exteriores con alcohol. Utilizar el ReproGel High Resolution (Amersham Pharmacia Biotech), cuando la

secuencia que se quiere obtener es de 450 pb aproximadamente o el ReproGel Long Read (Amersham Pharmacia Biotech) cuando lo que se va a obtener es una secuencia de aproximadamente 750 pb. En el primer caso, se utiliza espaciadores de 0,5 mm y en el segundo caso se utiliza los espaciadores de 0,3 mm. Volcar el contenido del gel entre los vidrios teniendo en cuenta que no se formen burbujas. Colocar el peine y aplicar luz ultravioleta durante 10 minutos.

Para realizar la secuenciación, iniciar el programa ALFwin. Se inicia el secuenciador ALFexpress (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Programar el secuenciador con las condiciones necesarias para la corrida de un gel High Resolution o Long Read, en función de la secuencia que se espera obtener. Las condiciones de corrida van a ser para High Resolution: 1500 V, 60 mA, 25 W, 55°C durant 450 min y para Long Read: 1500 V, 60 mA, 25 W, 55°C durant 700 min. Situar el gel de poliacrilamida en el ALFexpress y preparar 1 L de tampon de electroforesis TBE 0,5X por cubeta. Alinear la luz láser y una vez que el gel ha llegado a los 55°C, retirar el peine y limpiar los pocillos de los restos de acrilamida mediante una jeringa que inyecta tampón de cubeta a presión encima de cada pocillo. Inmediatamente desnaturalizar las muestras 3 minutos a 70°C y colocar a 4°C. Cargar el gel con todo el volumen de las muestras, colocar los electrodos y comenzar la corrida electroforética. La lectura de la secuencia se realiza a través del software ALFwin Analysis Sequence (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

#### **10) Análisis computacional del ADN y de las secuencias aminoácídicas deducidas**

---

Para analizar las diferentes secuencias de ADN, se va a utilizar el programa DNASTAR (1999) que va a permitir el alineamiento múltiple de todas las secuencias nucleotídicas obtenidas y las aminoácídicas deducidas. Se va a utilizar el programa BLAST utilizando el software disponible vía Internet en la red del "National Center for Biothechnology Information" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y en la red "The Pedro's Biomolecular Research Tools" (<http://www.fmi.ch/biology/researchtools.html>) para la investigación de secuencias de ADN y proteínas homólogas.