

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA, INMUNOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA

Estudio de las bases bioquímicas y moleculares de la actividad hidrolítica de variantes salvajes y mutacionales de β -lactamasas CTX-M sobre oximino-cefalosporinas. Papel de mutaciones puntuales en la expansión del espectro de hidrólisis

Tesis para optar al Título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Autora: Bioq. Barbara Ghiglione
Director: Dr. Gabriel O. Gutkind
Director Adjunto: Dr. Pablo Power

Año 2015

A Mateo, a quien amaré más y más cada día
A Guido, a quien amo profundamente
A Papá, Mamá y Brenda, a quienes he amado toda mi vida

Índice

<i>Agradecimientos</i>	8
<i>Resumen</i>	11
<i>Abreviaturas utilizadas</i>	13
<i>Capítulo 1 – Introducción</i>	15
<i>1 Situación actual de la resistencia antibiótica</i>	15
<i>1.1 Resistencia antibiótica en bacilos gram negativos</i>	19
<i>1.2 Resistencia a los antibióticos β-lactámicos en Enterobacteriaceae</i>	20
<i>2 Los antibióticos β-lactámicos</i>	22
<i>2.1 Mecanismo de acción de los antibióticos β-lactámicos</i>	23
<i>2.2 Clasificación de los antibióticos β-lactámicos</i>	28
<i>2.3 Mecanismos generales de resistencia a los antibióticos β-lactámicos en bacterias gram negativas</i>	35
<i>2.3.1 Impermeabilidad</i>	36
<i>2.3.2 Sistemas de eflujo</i>	39
<i>2.3.3 Alteración de los blancos moleculares</i>	41
<i>2.3.4 Inactivación enzimática</i>	42
<i>3 Las β-lactamasas</i>	42
<i>3.1 Clasificación de las β-lactamasas</i>	44
<i>3.2 Las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE)</i>	50
<i>3.3 La familia CTX-M</i>	53
<i>3.3.1 Elementos móviles: Origen y movilización de la familia CTX-M</i>	58
<i>3.3.2 Emergencia y diseminación</i>	69
<i>3.3.3 Fenotipo de Resistencia</i>	71
<i>3.3.4 Mecanismo de acción de las β-lactamasas de clase A y estructura molecular de la familia CTX-M</i>	72
<i>3.3.5 Evolución y especialización de la familia CTX-M</i>	75
<i>Capítulo 2 - Hipótesis y objetivos de la investigación</i>	78
<i>Resumen esquemático de la metodología</i>	82

Capítulo 3 - Materiales y Métodos	83
1 Aislamientos bacterianos empleados	83
1.1 Cepas bacterianas de origen clínico	83
1.2 Cepas bacterianas comerciales y de referencia	84
2 Metodologías empleadas para la manipulación de ADN.....	85
2.1 Extracción de ADN.....	85
2.1.1 Extracción de ADN total mediante lisis de colonias de las cepas bacterianas de origen clínico.....	85
2.1.2 Extracción de ADN plasmídico recombinante	86
2.1.3 Extracción de ADN plasmídico de alto peso molecular	86
2.2 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	88
2.2.1 Amplificación por PCR de genes <i>bla</i> _{CTX-M} salvajes	89
2.2.2 Generación de mutantes puntuales Asp240Gly de <i>bla</i> _{CTX-M} por PCR.....	90
2.2.3 Amplificación por PCR de genes <i>bla</i> _{CTX-M} salvajes y mutados para subclonado en pET28a(+)......	92
2.2.4 Mapeo por PCR del entorno genético de <i>bla</i> _{CTX-M-12} y <i>bla</i> _{CTX-M-96}	93
2.3 Electroforesis en geles de agarosa	94
2.4 Purificación de ADN.....	95
2.5 Técnicas de clonado	95
2.5.1 Clonado de <i>bla</i> _{CTX-M} en pK19.....	95
2.5.2 Clonado de <i>bla</i> _{CTX-M} en pET28a(+) con cola de histidinas.....	98
2.5.3 Clonado de <i>bla</i> _{CTX-M-96} en pET28a(+) sin modificaciones adicionales	101
2.6 Obtención de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	102
2.6.1 Introducción de plásmidos recombinantes por transformación en células competentes con CaCl ₂	102
2.6.2 Introducción de plásmidos de alto peso molecular por transformación en células competentes con RbCl	103
2.7 Análisis de los transformantes obtenidos.....	105
2.8 Secuenciación automatizada de ADN.....	106
2.9 Análisis de las secuencias	106
2.10 Conjugación	107

2.10.1	Conjugación en medio sólido	107
2.10.2	Conjugación en medio líquido.....	107
2.11	Determinación del tamaño molecular de los plásmidos portadores de <i>bla</i> _{CTX-M-12} y <i>bla</i> _{CTX-M-96}	108
2.12	Tipificación molecular de los microorganismos productores de <i>bla</i> _{CTX-M-12} y <i>bla</i> _{CTX-M-96} por ERIC-PCR.....	108
2.13	Tipificación molecular de los plásmidos portadores de <i>bla</i> _{CTX-M}	109
3	Ensayos microbiológicos.....	109
	Ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos y detección de BLEE	109
4	Metodologías empleadas para el estudio de proteínas	111
4.1	Cálculo de actividad específica (AE) de los clones de <i>E. coli</i> DH5 α productores de CTX-M obtenidos en 2.5.1	111
4.1.1	Preparación de extractos proteicos crudos.....	111
4.1.2	Detección de actividad de β -lactamasa	112
4.1.3	Cuantificación de proteínas	112
4.1.4	Cálculo de Actividad Específica (AE).....	112
4.2	Análisis bioquímico y estructural de β -lactamasas CTX-M comparadas con sus respectivas variantes Asp240Gly.....	113
4.2.1	Producción de CTX-M	113
4.2.2	Purificación.....	114
4.2.3	Digestión con proteasa	114
4.2.4	Determinación de la masa molecular por SDS PAGE.....	115
4.2.5	Determinación de los principales parámetros cinéticos.....	115
4.2.6	Caracterización cinética de CTX-M-96 y CTX-M-131	116
4.2.7	Ensayo de preincubación	118
4.2.8	Dicroísmo circular [159]	119
4.2.9	Fluorescencia intrínseca [159].....	120
4.3	Análisis estructural de CTX-M-96.....	121
4.3.1	Producción de CTX-M-96 sin modificaciones.....	121
4.3.2	Purificación de CTX-M-96 sin modificaciones	121
4.3.3	Determinación de la estructura cristalográfica de CTX-M-96 por difracción por rayos X	122

4.3.4	<i>Modelos de simulación de CTX-M-96 con oximino-cefalosporinas</i>	123
4.4	<i>Análisis bioinformático de proteínas</i>	123
Capítulo 4 - Resultados y Discusión		125
1	<i>Caracterización fenotípica y molecular de microorganismos productores de cefotaximasas</i>	125
1.1	<i>Análisis del efecto de la mutación Asp240Gly en el perfil de resistencia de clones recombinantes de Escherichia coli que expresan CTX-M</i>	125
1.2	<i>Análisis del efecto de la mutación Asp240Gly en clones recombinantes de Escherichia coli deficientes en porinas</i>	134
1.3	<i>Caracterización fenotípica y molecular de K. pneumoniae que expresan CTX-M-12 y CTX-M-96. Entornos, evolución molecular y diseminación de CTX-M's</i>	140
1.3.1	<i>Ensayos de susceptibilidad a los antimicrobianos y detección de BLEE</i>	140
1.3.2	<i>Análisis de la localización y capacidad de transferencia de los genes bla_{CTX-M}</i> ...	141
1.3.3	<i>Tipificación molecular de K. pneumoniae productora de CTX-M</i>	142
1.3.4	<i>Tipificación molecular y determinación del tamaño molecular de los plásmidos portadores de bla_{CTX-M}</i>	143
1.3.5	<i>Mapeo por PCR del entorno genético de bla_{CTX-M}</i>	144
2	<i>Caracterización bioquímica de cefotaximasas</i>	148
2.1	<i>Producción, purificación y caracterización cinética y bioquímica de β-lactamasas de tipo CTX-M portadoras de la mutación Asp240Gly</i>	148
2.2	<i>Caracterización cinética completa de dos nuevas variantes naturales Asp240Gly: CTX-M-96 y CTX-M-131</i>	156
2.3	<i>Ensayo de preincubación con ceftazidima</i>	160
3	<i>Análisis estructural de CTX-M-96</i>	166
3.1	<i>Obtención y análisis de la estructura cristalográfica de CTX-M-96</i>	166
3.2	<i>Modelos de simulación: Interacción entre CTX-M-96 y oximino-cefalosporinas</i>	174
Capítulo 5 - Conclusiones		178
Referencias		182
Anexo A: Medios de cultivo, soluciones stock y reactivos		194
A.1	<i>Medios de cultivo</i>	194
A.2	<i>Buffers y soluciones</i>	194
A.2.1	<i>Soluciones stock para detectar clones con α-complementación</i>	194

A.2.3 Buffers y soluciones varias	196
A.3 Otros Reactivos.....	197
Anexo B: Vectores utilizados.....	198
B.1 pK19.....	198
B.2 pJET1.2	199
B.3 pET28a(+).....	200
B.4 pTZ57R/T.....	201
Anexo C: Protocolos experimentales.....	202
C.1 Técnicas de clonado molecular	202
C.2 Determinación del tamaño molecular de los plásmidos portadores de <i>bla</i> _{CTX-M-12} y <i>bla</i> _{CTX-M-96}	207
C.3 Tipificación molecular de plásmidos según Carattoli y colaboradores	208
C.4 Cinética de β -lactamasas	209
Anexo D Entornos genéticos <i>bla</i> _{CTX-M-12} y <i>bla</i> _{CTX-M-96}	213
D.1 Entorno genético <i>bla</i> _{CTX-M-96}	213
D.2 Entorno genético <i>bla</i> _{CTX-M-12}	216
Anexo E: Aminoácidos	218
E.1 Código de 1 y 3 letras	218
E.2 Mutaciones	218
Anexo F: Publicaciones	219
F.1 Publicaciones	219
F.2 Presentaciones a Congreso	219

Agradecimientos

Me parece increíble estar aquí escribiendo las últimas palabras de esta tesis, que bien merecen estar al comienzo, ya que no hubiera sido capaz de llegar a esta instancia sin tener a mi lado desde un principio a todos aquellos a las que quiero decirles GRACIAS...

Gabriel, por haber accedido a incorporarme a tu grupo de trabajo y por enseñarme que “para aprender, primero hay que hacer”. He podido asumir desafíos que no creía capaz de concretar... Gracias, porque la independencia que me diste me hizo ganar confianza en mí misma.

Pablo, qué alegría poder compartir esto con vos, esta tesis que ha sido fruto del trabajo en equipo... Hace años que nos conocemos y más importante que el trabajo que compartimos, para mí es la franqueza con que hemos sabido crecer y madurar juntos como jefe y becario, con errores que nos han encontrado siempre cara a cara dispuestos a salir adelante, y sobre todo con aciertos que hemos sabido capitalizar. Se nos mezcla la amistad...y no puedo dejar de pensar...qué suerte que así sea!!! Me hace muy feliz ver tus logros y el esfuerzo que le estás poniendo a tu carrera, gracias por dejarme ser parte.

Magui, vos me abriste las puertas de tu casa y de tu familia; sé que estos últimos años han sido difíciles y me complace que me permitas acompañarte mientras compartimos experiencias “laboratoriles”. Tenés una gran fortaleza y espero que el tiempo que tenemos por delante nos encuentre codo a codo, trabajando con energía y alegría renovadas.

Mile, vos ocupás un lugar muy especial... no sólo sos una colega a quien admiro profundamente, sino una amiga reciente que parece que conozco hace miles de años... Me siento muy afortunada de haber trabajado con vos y haberte conocido... te extraño mucho.

Vicky, vos también, mi amiga a la distancia, laboradora incansable, llena de energía y buena onda... Fue una suerte que Rafa te mandara para este lado del charco... a vos también te extraño.

Pam y Vero, las quiero y las admiro tanto!!! Creo que ni se imaginan lo mucho que me ayudaron con esta tesis. Me llena de alegría cada encuentro, cuando damos clases, cuando preparamos trabajos prácticos, cuando nos juntamos fuera de la facu...Ojalá algún día pueda tener por lo menos la mitad de la garra y el empuje que le ponen ustedes a todo lo que hacen.

“Las chicas del Fondo”: Dani, Gio, Marian, Meli, Marylú, Silvi y Sabri, con quienes he compartido tanto y me enseñan algo nuevo cada día; de todas y cada una de ustedes tengo un hermoso recuerdo que atesoro. Mi más profundo agradecimiento por estar ahí en persona, por mail, por mensajito... Ustedes son las que hacen que los engranajes del Cepario estén coordinados y en funcionamiento!

Jose, vos me acompañaste los primeros meses de la beca, cuando todo me costaba tanto! Gracias por acompañarme ahora con las charlas de la vida, las serias y las divertidas.

Lau B., gracias por los consejos más allá de la mesada y, sobre todo, por tus palabras en esta nueva etapa de mi vida que está comenzando y es tan hermosa. Me enorgullece saberme mujer, madre y trabajadora; ojalá pueda combinar esos roles con responsabilidad, inteligencia y disfrute, tal y como hacés vos.

Marta, me siento encantada de trabajar en el equipo que armaste de Microbiología de los Alimentos. Cada año que pasa siento que avanzamos a pasos agigantados; los martes y los jueves a la noche de la segunda mitad del año han sido de disfrute total y me han enseñado que en equipo se logran grandes cosas.

Marce, gracias por permitir que me integre al Cepario. Sos una excelente docente e investigadora de quien admiro la constancia, la responsabilidad y la pasión por el trabajo.

Gracias a los “visitantes”, que saben hacerse extrañar: Kat, Aleja, Mariela, Marisa, Lili y “la Litterio”. Ustedes supieron hacer de las horas compartidas en el labo momentos de diversión y aprendizaje. A cada una de ustedes le agradezco la confianza, la buena compañía y las enseñanzas impartidas.

A los que vienen o vinieron part time: Esteban, Andre, Verito (Vero Kovacec), Agus...los quiero mucho, siempre acompañándome con la mejor predisposición, sobre todo en esas noches largas de cinéticas y PCR. Se extrañan las meriendas de las 19 hs (las de Cindor y las de cerveza, cada uno sabrá hacerse cargo, jajaja).

Cande, mi compañera de andanzas docentes!! Me encanta tenerte de compinche, sos una gran compañera!

Carlos, Diego, Walter, Mary (María Saliba Pineda)... qué sería de mí si no los tuviera a ustedes. Me acompañaron en mis catarsis...y las hicieron tan divertidas!! Son unos genios, los adoro!!!

Rodri, gracias por tu generosidad. Aprecio enormemente tu ayuda desinteresada. Espero que pronto mi trabajo pueda tenerte también de colaborador, además de amigo.

Mary y Flor, gracias por los mimos y la enorme ayuda. Para mí, su tarea resultó imprescindible.

A los que ya no están en el labo: Ceci, Noe, Gise, Ara, Aye, con quienes no compartí mucho tiempo, pero me han dejado alguna enseñanza. Todo lo vivido en el Cepario me ha dejado crecer como profesional y como ser humano y ustedes han formado parte de ese desarrollo.

María del Carmen, Beatriz y Tulia: Venezuela fue una gran experiencia personal y laboral. Les agradezco haberme cuidado y contenido tanto, sin ustedes no hubiera sido tan enriquecedor. Admiro su fuerza de voluntad!

A mis amigos: Adri, Marthus, Malenchus, Fans, Majo, Silvi, Romi R., Romi C., Vivian, Felo, el dúo Vic/Mata, Ale... Gracias por estar, por hacerme divertir y principalmente porque siempre, cuando estamos juntos, llego a la conclusión de que lo más importante en la vida son las personas y el amor que nos une a ellas.

A mi familia, la extendida, la de hace casi 16 años, esa que me adoptó y me hizo partícipe de las fotos de disfraces de fin de año. Todas esas veces que me quedé estudiando, trabajando o escribiendo los extrañé inmensamente, porque cada momento vivido con ustedes es extraordinario. Los quiero mucho.

A papá, mamá y Brenda, a quienes amo con toda mi alma. Gracias papá por enseñarme que con esfuerzo y voluntad “se puede” (“I did it my way”), gracias mamá por enseñarme el valor de la franqueza, gracias Bre por enseñarme a ponerme en el lugar del otro. A los tres, gracias por cuidarme y quererme.

Finalmente, gracias a mi compañero, a mi amor, al papá de Mateo, a Guido... en cada desafío, cada sueño, cada deseo, has estado a mi lado, dándome aliento, amándome, acompañándome...con vos, lo difícil se vuelve fácil...TE AMO.

Buenos Aires, febrero 2015

Resumen

La familia de las β -lactamasas CTX-M está constituida por 163 miembros, entre variantes plasmídicas y cromosómicas, agrupadas en al menos 5 sub-familias. La mayoría de los microorganismos portadores de estas enzimas presenta valores de CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) mayores para cefotaxima o ceftriaxona que para ceftazidima, la otra oximino-cefalosporina más utilizada clínicamente. Por esta razón, estas enzimas también se conocen como “**cefotaximasas**”. Esta característica se atribuye a la existencia de un ambiente en el sitio activo más favorable para el reconocimiento e interacción con cefotaxima con respecto a ceftazidima, que posee un sustituyente más voluminoso y por lo tanto no podría introducirse tan profundamente en el bolsillo catalítico.

Sin embargo, existen variantes “emergentes” de CTX-M capaces de conferir resistencia a cefotaxima y ceftazidima simultáneamente.

Entre las modificaciones aminoacídicas que resultarían en la supuesta actividad de “**ceftazidimasa**”, la mutación Asp240Gly es la de mayor prevalencia.

Nosotros demostramos en este trabajo que los valores de CIM de ceftazidima elevados en microorganismos productores de estas variantes son producto de la sumatoria de varios factores:

1. Su modo de producción (que incluye la actividad relativa de los promotores y el número de copias de los plásmidos portadores).
2. La permeabilidad del microorganismo a los antibióticos.
3. Las propiedades estructurales y catalíticas de CTX-M.

La generación de mutantes *in vitro* de miembros de las cinco sub-familias de CTX-M nos permitió corroborar que la presencia de la mutación Asp240Gly no siempre se asocia a un fenotipo de resistencia a ceftazidima en cepas de *Escherichia coli* productoras de estas variantes enzimáticas, aún en condiciones en las que el nivel de expresión es lo suficientemente elevado como para otorgar un perfil clásico de “cefotaximasa”. El cambio Asp240Gly y su asociación a un fenotipo claro de resistencia

a ceftazidima se manifestó sólo cuando los clones hiperproductores carecían de porinas OmpF en la membrana externa.

Aunque las β -lactamasas CTX-M_{Asp240Gly} tienen eficiencias catalíticas frente a ceftazidima entre 5 y 15 veces mayores que las de sus respectivas variantes salvajes, éstas continúan siendo por lo menos 200 veces más bajas que las de cefotaxima. Es decir que la mutación Asp240Gly ejerce efectos sutiles en el comportamiento cinético de la enzima, pero puede sin embargo otorgar una gran ventaja selectiva a los microorganismos hiperproductores cuando se combina con impermeabilidad en el ambiente de selección adecuado.

La sustitución de glicina en la posición 240 no afecta visiblemente la conformación ni la estabilidad de la enzima, lo que se traduce en eficiencias catalíticas conservadas frente a otros antibióticos β -lactámicos, como amino-penicilinas, cefalotina y cefotaxima. La molécula de ceftazidima, por otro lado, ingresaría lentamente al sitio activo (lo cual se ve reflejado en los altos valores de K_m de variantes salvajes y mutantes, del orden milimolar), y una vez allí acomodaría su sustituyente voluminoso debido al movimiento coordinado de Ser70, la cadena β_3 y el Ω -loop. La mayor flexibilidad conformacional de CTX-M_{Asp240Gly} facilitaría la hidrólisis enzimática, lo cual se vio reflejado en el mejoramiento de los valores de k_{cat} .

La evolución de la familia CTX-M también se asocia a la diversificación de los entornos genéticos responsables de la movilización de bla_{CTX-M} . En este trabajo describimos un entorno nuevo en el que *ISEcp1* se encontraba interrumpido por *IS903* y mantenía intacta su secuencia promotora. Los genes codificantes de variantes salvajes de CTX-M circularían entre plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad gracias al mecanismo de transposición provisto por *ISEcp1*, desde donde, una vez adquirida la mutación Asp240Gly, tendrían más posibilidades de ser seleccionadas y movilizadas.

Abreviaturas utilizadas

BLEA	β -Lactamasa de espectro ampliado
BLEE	β -Lactamasa de espectro extendido
ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
AE	Actividad específica
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Seroalbúmina bovina
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
dNTP	Desoxi-nucleótido(s) tri-fosfato(s)
EDTA	Ácido etilem-diamino-tetra-acético
IPTG	Isopropil-1-tio- β -D-galactósido
IS	Secuencia de inserción (Insertion sequence)
IR_R	Right Inverted Repeat (Repeticiones invertidas derechas)
IR_L	Left Inverted Repeat (Repeticiones invertidas izquierdas)
kb	Kilobase(s)
MM	Masa Molecular
MCS	Multiple Cloning Site
ORF	Open Reading Frame (marco de lectura abierto)
pb	Pares de bases
PBP	Penicillin Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Peptidoglicano
pI	Punto isoeléctrico
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SIR	Sistema de Relevamiento de la Resistencia
XGal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

Introducción

Capítulo 1 – Introducción

1 Situación actual de la resistencia antibiótica

El descubrimiento de sustancias producidas por bacterias u hongos capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos hace alrededor de ocho décadas revolucionó la práctica médica, transformando el manejo de las infecciones de origen bacteriano en una tarea enfocada principalmente en el **tratamiento**, además del diagnóstico. Desde entonces, estas sustancias llamadas “antibióticos”¹ [1], se han utilizado para el tratamiento de innumerables casos de infección, salvando millones de vidas. En comparación con la era pre-antibiótica, el tratamiento ha llevado a una notable reducción en la tasa de mortalidad producida por infecciones tales como endocarditis bacteriana (100% a 25%), meningitis bacteriana (80% a menos del 20%) y neumonía nosocomial (60% a 30%) [2].

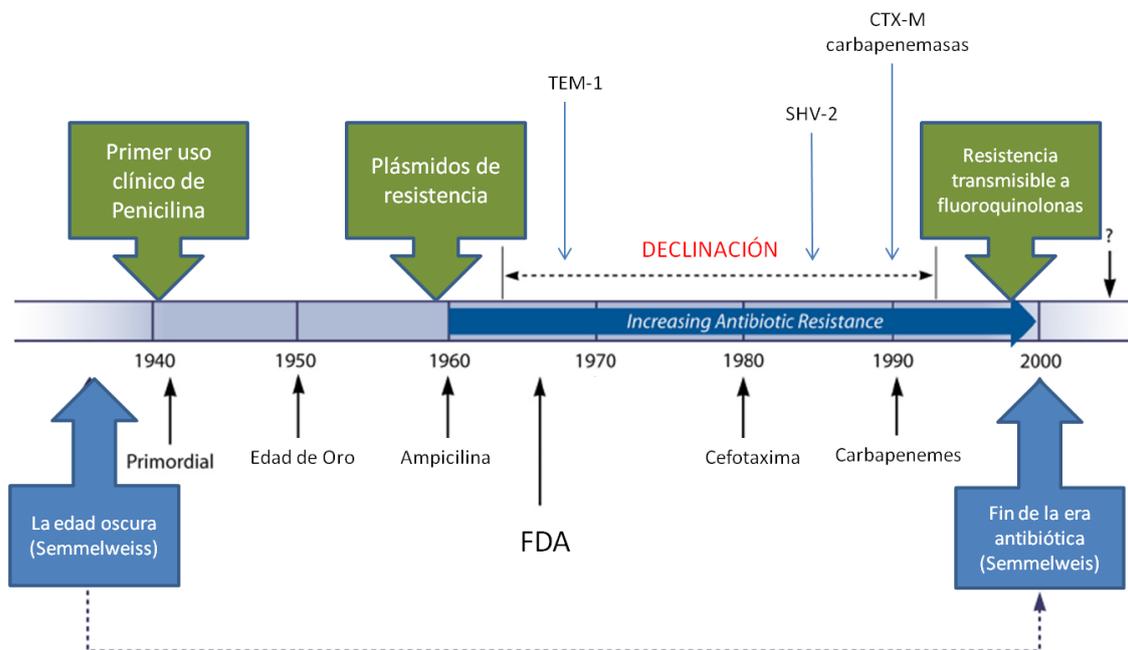
Ochenta años más tarde, sin embargo, nos encontramos ante una situación alarmante en la que la resistencia bacteriana amenaza la efectividad de todas las clases de antibióticos disponibles.

Ya en 1940, varios años antes de la introducción de la penicilina como opción terapéutica, Edward P. Abraham y Ernst B. Chain identificaron una penicilinasa bacteriana y publicaron el trabajo titulado “*An enzyme from bacteria able to destroy penicillin*” [3]. Una vez que esta familia de antibióticos empezó a ser usada ampliamente, emergieron microorganismos resistentes capaces de inactivarlos, lo que en unas décadas llevó a estudios de síntesis para modificarlas y prevenir la hidrólisis mediada por penicilinasas. Curiosamente, la identificación de una penicilinasa bacteriana antes del uso del antibiótico puede ahora ser apreciado a la luz de los hallazgos recientes que señalan que un gran número de genes de resistencia a antibióticos están presentes ubicuamente en las poblaciones microbianas [1]. En su discurso durante la ceremonia del Premio Nobel, Alexander Fleming advirtió que las

¹ El término genérico “antibiótico” se utiliza aquí para denotar cualquier clase de molécula orgánica que inhibe o mata microorganismos a través de interacciones específicas con blancos moleculares bacterianos, sin ninguna consideración sobre la fuente del compuesto.

bacterias podrían hacerse resistentes a estas drogas aparentemente milagrosas: **“Los microbios son educados para resistir la penicilina... la persona irreflexiva jugando con penicilina es responsable de la muerte del hombre que finalmente sucumbe a la infección con el organismo resistente a la penicilina... Espero que este mal se pueda evitar”**. De hecho, el desarrollo de cada nuevo fármaco antibacteriano ha sido seguido por la detección de algún mecanismo de resistencia, tal como lo predijera Fleming hace tantos años (**Figura 1.1**) [2, 4].

Figura 1.1: Línea de tiempo con la secuencia del descubrimiento y resistencia a las principales familias de antibióticos. **La edad oscura**, la era preantibiótica; **la edad primordial**, el comienzo de la quimioterapia, a través de las sulfonamidas; **la edad de oro**, cuando la mayoría de los antibióticos utilizados en la actualidad fueron descubiertos; **la edad de declinación**, los años en los que el desarrollo de nuevos antibióticos disminuyó notablemente. En esta última etapa se hicieron intentos para comprender y mejorar el uso de antibióticos por dosificación, administración, modificación química para evitar la resistencia y secuenciación del genoma para predecir nuevos blancos moleculares. La creación de la oficina de la FDA (*Federal Drug Administration*) llevó a requisitos más estrictos para la seguridad de los medicamentos, incluyendo el uso de antibióticos. Esto frenó el registro de nuevos compuestos. Antes de que fueran descubiertos los antibióticos, Semmelweis promovió el lavado de manos como una forma de evitar las infecciones; esta práctica continúa siendo fuertemente recomendada como un método para prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas. Adaptado de [1].



El desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo **normal y continuo** en los microorganismos [1]. Las tecnologías de secuenciación de última generación han permitido la detección inesperada de una reserva muy vasta de determinantes de

resistencia en el ambiente. Este hallazgo sugiere que los antibióticos y los genes de resistencia han co-evolucionado desde el inicio de los tiempos [5].

No cabe duda alguna de que la adopción de la terapia antibiótica a mediados del siglo XX para combatir las enfermedades infecciosas ha acelerado enormemente la evolución de la resistencia [6]. El principal factor influyente en esta carrera es el fenómeno de la **selección natural, que otorga ventaja a aquel organismo que pueda superar de manera más eficiente los efectos deletéreos de un antibiótico**. Los mecanismos involucrados en la evolución de la resistencia y por lo tanto en la relevancia de la selección natural, incluyen la transferencia horizontal de genes y la integración de genes de resistencia a antibióticos en plásmidos y otras plataformas genéticas, y eventos fortuitos tales como las mutaciones que pueden desempeñar un papel importante en las trayectorias evolutivas seguidas por cepas resistentes a los antibióticos [5].

Estas drogas se emplean tan extensivamente en humanos y animales destinados a la alimentación, que la selección y propagación de bacterias resistentes ha sido favorecida peligrosamente los últimos años. En consecuencia, la efectividad de los antibióticos se ha visto reducida e incluso anulada, lo que resulta en la **situación de emergencia sanitaria mundial declarada por la Organización Mundial de la Salud en el año 2014** [4].

Se estima que millones de toneladas de antibióticos han sido liberados a la biósfera durante el último siglo. Como mencionáramos antes, parte de los antibióticos presentes en el ambiente provienen de las cepas que los producen naturalmente en su hábitat. Sin embargo, debemos asumir que la producción comercial es responsable de la mayor proporción de los antibióticos que son volcados en la biósfera. Algunos usos de los antimicrobianos son los siguientes:

- Promoción del crecimiento / Profilaxis en animales de producción o consumo;
- Uso terapéutico / Profilaxis en seres humanos;
- Uso terapéutico / Profilaxis en animales domésticos;
- Control de plagas en agricultura / Clonación de plantas;
- Uso como biocidas en artículos de tocador y productos de limpieza del hogar;
- Clonado y selección en investigación e industria;

Cabe señalar que el uso terapéutico en seres humanos representa menos de la mitad de todas las aplicaciones que tienen los antibióticos producidos comercialmente [7].

La resistencia a los antibióticos ha pasado de ser un problema individual del paciente infectado a constituir un problema global de salud pública. Esta transición ocurrió cuando la resistencia a los antibióticos se propagó desde bacterias asociadas a pacientes o animales infectados hacia personas sanas, de madres hacia recién nacidos, desde sitios de infección hacia la microbiota normal, desde la microbiota humana hacia las instalaciones hospitalarias, alimentos, aguas residuales, ríos, suelos y todo el entorno [8].

Los microorganismos de mayor relevancia en el fenómeno de la resistencia global forman parte del grupo bautizado **ESKAPE**² [9], título que enfatiza su capacidad para “escapar” de la acción de los tratamientos antimicrobianos habituales [10]. Este grupo incluye cepas **MDR** (del inglés, *Multi-Drug Resistant*; son aquellas cepas resistentes a por lo menos tres clases de antimicrobianos), **XDR** (del inglés, *eXtensively Drug Resistant*; son aquellas cepas resistentes a todas menos dos de las opciones terapéuticas empleadas habitualmente en el tratamiento de la infección) y **PDR** (del inglés, *Pan-Drug Resistant*; son aquellas cepas resistentes a todas las opciones terapéuticas empleadas habitualmente para el tratamiento de la infección) de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias [11].

Si bien el problema de la resistencia involucra tanto a bacterias gram positivas como gram negativas, existen en nuestros días unas pocas drogas de introducción reciente que pueden ser opciones disponibles para el tratamiento de infecciones causadas por cocos gram positivos, tales como daptomicina y tigeciclina. Sin embargo, el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos gram negativos resistentes (incluidas las enterobacterias) se está quedando sin alternativas terapéuticas [12-14] ya que las potenciales nuevas drogas antimicrobianas en desarrollo son escasas, y aún se encuentran en las primeras fases de prueba [15].

La resistencia bacteriana es un problema de naturaleza multifactorial y multicompartimental, por lo que el diseño de estrategias terapéuticas y preventivas para

² Grupo de microorganismos integrado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y especies de *Enterobacter* de mayor prevalencia en infecciones nosocomiales. Representan ejemplos paradigmáticos de transmisión, patogénesis y resistencia a los antibacterianos.

combatirla deben considerar todos los factores intervinientes (pacientes, animales, aguas, suelos, etc.). El descubrimiento de nuevos antibióticos es una tarea que debe promoverse sin lugar a dudas, pero no debemos olvidar que éstos serán liberados en un ambiente preparado para la selección de nuevos mecanismos de resistencia, *como sucedió con la rápida diseminación de la resistencia a los carbapenemes, facilitada por la expansión de clones exitosos y plásmidos portadores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)* [8].

1.1 Resistencia antibiótica en bacilos gram negativos

El papel de las bacterias gram negativas multirresistentes como agentes etiológicos de infecciones nosocomiales se ha agravado y, con frecuencia creciente, algunos de estos agentes están causando infecciones en pacientes no hospitalizados. De los 6 patógenos incluidos en el grupo ESKAPE, 4 son bacilos gram negativos: *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, y las enterobacterias en general.

Los microorganismos gram negativos provocan alrededor de la mitad de todas las bacteriemias. Tanto las enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp.) como los no fermentadores (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*) son importantes patógenos oportunistas [16].

Particular interés revisten para la salud pública [13]:

- Las enterobacterias productoras de β -lactamasas (BLEE, cefamicinasas plasmídicas y carbapenemasas; ver clasificación más adelante), en especial cuando presentan resistencia combinada a quinolonas y reducción de la permeabilidad.
- Cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, productoras de β -lactamasas y con permeabilidad reducida.

Los **antibióticos β -lactámicos** son los más empleados para el tratamiento de infecciones producidas por estos microorganismos debido a sus propiedades bactericidas, índice terapéutico elevado y excelente eficacia clínica. Representan el componente principal de todo el arsenal de antimicrobianos disponible para el tratamiento de muchas de las infecciones nosocomiales más serias, por lo que la amenaza a su utilidad es una de las realidades que más preocupa a la comunidad científica en la actualidad [14].

El principal mecanismo de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos en bacterias gram negativas involucra a las **β -lactamasas, enzimas hidrolíticas que los inactivan.**

Las enterobacterias representan la causa más prevalente de infecciones bacterianas en humanos en todo el mundo. Particularmente alarmante es la expansión de cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* que producen β -lactamasas, sobre todo de la familia CTX-M, y carbapenemasas [4]. Además de la diseminación de clones epidémicos resistentes [17], se observa un incremento notable en la dispersión horizontal de plataformas genéticas móviles portadoras de genes codificantes de β -lactamasas, tales como plásmidos y transposones. Por tal motivo, resulta cada vez más frecuente que distintos tipos de β -lactamasas coexistan en una misma enterobacteria junto a otros mecanismos de resistencia, dando origen a la **multirresistencia** [13].

1.2 Resistencia a los antibióticos β -lactámicos en Enterobacteriaceae

La resistencia a los antibióticos β -lactámicos en esta familia de microorganismos puede ocurrir por impermeabilidad, alteración del blanco molecular, eflujo y producción de β -lactamasas (ver en detalle más adelante). No hay duda de que este último mecanismo es el de mayor importancia clínica [13, 18-20]:

Resistencia mediada por cefamicinas:

Cromosómicas: Muchas enterobacterias presentan resistencia natural a algunos β -lactámicos debido a la producción de una β -lactamasa cromosómica denominada AmpC (β -lactamasa de clase C). *Escherichia coli* la produce en baja cantidad, por lo que no compromete la actividad de la mayoría de los β -lactámicos. Sólo cuando la enzima se hiperproduce puede llegar a otorgar niveles de resistencia a diversas penicilinas, combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas y cefalosporinas (incluidas las de tercera generación si la cantidad de enzima es suficientemente elevada). Varias enterobacterias (*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Providencia* spp, etc.) expresan AmpC de forma basal en cantidades relevantes. Además, en estos casos la expresión es inducible (se produce mayor cantidad de AmpC en presencia de β -lactámicos) y se puede hiperexpresar por mutaciones en genes reguladores. Esta última situación llega a ampliar el espectro de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y

ceftazidima) y, cuando se asocia a trastornos de la permeabilidad, incluso a resistencia a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenemes.

Plasmídicas: Las cefamicinasas plasmídicas, constitutivas o inducibles, causan habitualmente resistencia a penicilinas, combinaciones de β -lactámicos más inhibidores de β -lactamasa, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación. Las cefalosporinas de cuarta generación, como el cefepime y cefpirome, y los carbapenemes son malos sustratos para este tipo de enzimas dado que las tasas de hidrólisis son bajas y los valores estimados de K_m son altos, reflejando la baja afinidad por ellos [21].

Resistencia mediada por BLEE: Las BLEE son enzimas que hidrolizan todos los β -lactámicos a excepción de cefamicinas y carbapenemes.

Resistencia mediada por serino-carbapenemasas: En los últimos años han adquirido importancia las enzimas codificadas por genes plasmídicos, especialmente las de la familia KPC y, en menor medida, las GES. Confieren resistencia a todos los β -lactámicos. La especie en la que se observan con mayor frecuencia es *K. pneumoniae*.

De todos los mecanismos enzimáticos mencionados, **la presencia de BLEE es el que representa el principal problema por su asociación a la multirresistencia en las enterobacterias**. Las cepas con BLEE tienen distribución mundial, al igual que las productoras de cefamicinasas plasmídicas, pero aquéllas se aíslan más frecuentemente. Se conocen múltiples familias, entre las que destacan, por su importancia y frecuencia, TEM, SHV y CTX-M [13].

E. coli y *K. pneumoniae* son las dos enterobacterias que encabezan la lista de los 9 microorganismos declarados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como aquellos de interés internacional debido a su preocupante prevalencia en las infecciones más frecuentes [4].

La primera BLEE en ser reportada pertenecía a cepas de *K. pneumoniae* aisladas de un brote hospitalario en Alemania en 1983 [22], y unos años más tarde, en 1986, se detectaron por primera vez β -lactamasas de espectro extendido en cepas de *E. coli* en Francia [23]. Desde entonces, más de 200 variantes de estas enzimas han sido identificadas, algunas de las cuales se han extendido rápidamente en todo el mundo. Por

otra parte, muchas variantes de BLEE inicialmente identificadas en *K. pneumoniae* se han transferido posteriormente a *E. coli*.

Debido a que las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE son generalmente también resistentes a otros familias de antibacterianos, los carbapenemes representan la **única y última opción de tratamiento de primera elección** para los casos de infecciones graves. La reciente expansión pandémica de CTX-M y otras BLEE ha llevado al incremento en el uso de los carbapenemes, con la consecuente expansión de infecciones producidas por cepas productoras de carbapenemasas [24-27], **para las que no existen tratamientos comparativamente tan eficaces.**

2 Los antibióticos β -lactámicos

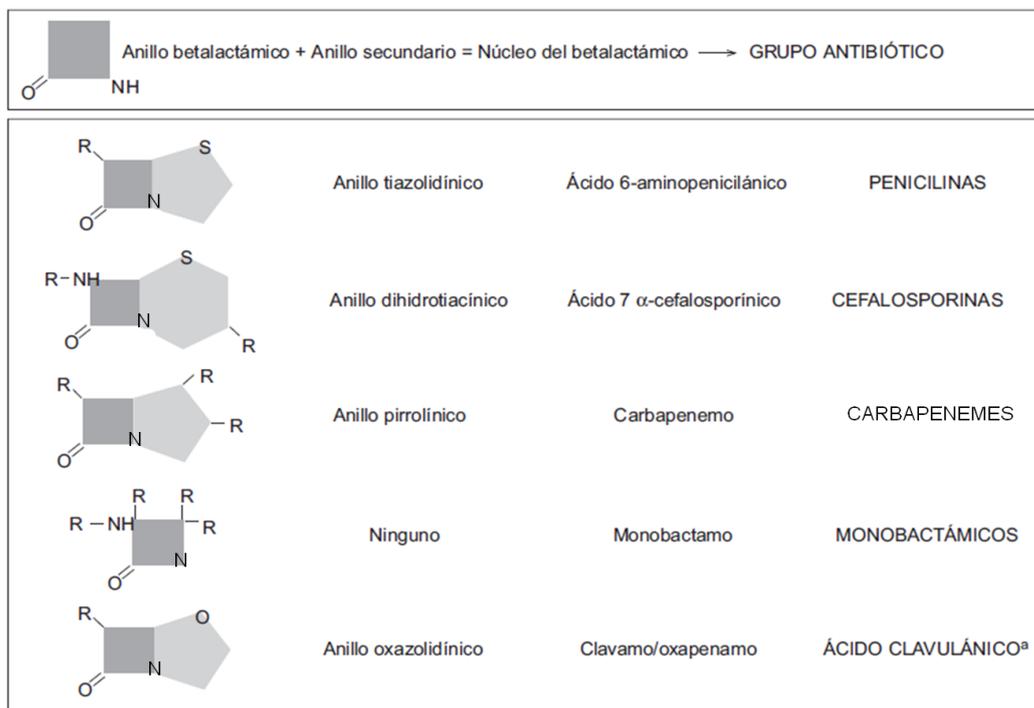
Alexander Fleming fue quien observó que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en algunas de las placas de Petri utilizadas para el cultivo se inhibía ante la presencia de un hongo contaminante: *Penicillium notatum* (hoy reclasificado). Este hongo producía una sustancia a la que llamó penicilina, capaz de impedir el crecimiento no sólo de diferentes tipos de estafilococos, sino también de muchos estreptococos [28]. En 1943, Chain y Abraham fueron capaces de deducir que la penicilina consistía en una molécula pequeña formada por un anillo β -lactámico fusionado a un anillo *tiazolidina*. El descubrimiento de la penicilina por Fleming y la demostración de su actividad antibacteriana por Florey y Chain alrededor de mediados del siglo XX, marcaron el comienzo de una nueva etapa en el tratamiento de las infecciones bacterianas que podríamos llamar “la era de los β -lactámicos” [29, 30].

Estos compuestos químicos deben su nombre a la presencia de un anillo de cuatro átomos, denominado anillo β -lactámico, que puede tener acoplado un segundo anillo. Según la presencia o ausencia del segundo anillo y de sus características químicas, se definen distintas clases de antibióticos β -lactámicos que incluyen a **penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemes, monobactámicos e inhibidores de β -lactamasas**. Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química son capaces de modificar características del antibiótico como el espectro, la afinidad por determinados blancos moleculares o la resistencia a las β -lactamasas. En la **Figura 1.2** se muestran sus estructuras generales [28, 31].

2.1 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto principalmente a través de 2 mecanismos: La inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y la inducción de la autólisis celular. Su blanco molecular son algunas de las enzimas participantes de la síntesis del peptidoglicano, denominadas *penicillin-binding-proteins* o PBPs.

Figura 1.2: Moléculas básicas de las que derivan los antibióticos β -lactámicos utilizados en la actualidad [28]



^aTodos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

El peptidoglicano es una macromolécula que envuelve por completo a la célula bacteriana y constituye uno de los principales componentes de su pared, permitiéndole soportar la presión de turgencia que ejerce el citoplasma sobre la membrana plasmática. Se trata de una estructura de presencia bacteriana exclusivamente, lo que la transforma en un blanco celular de elección a la hora de diseñar antimicrobianos con toxicidad selectiva elevada. La estructura básica del peptidoglicano de *E. coli* consiste de cadenas de azúcares largas unidas entre sí por puentes transversales de aminoácidos. Las cadenas polisacarídicas están compuestas por monómeros de los aminoazúcares *N*-acetil-glucosamina y ácido *N*-acetil-murámico, unidos en secuencia alternante por enlaces glucosídicos β -1,4. A su vez, el ácido *N*-acetil-murámico está sustituido por

una cadena lateral tetrapeptídica compuesta (en muchas bacterias de interés clínico) por los aminoácidos *L-alanina* (L-Ala), *ácido D-glutámico* (D-Glu), *L,D-diaminopimélico* (m-DAP) y *D-alanina* (D-Ala) (**Figura 1.3**) [32]. Este tetrapéptido es poco habitual, puesto que contiene aminoácidos tanto en forma D como en forma L (en la naturaleza normalmente no se utilizan D-aminoácidos para construir péptidos) y, además, se incorpora mediante la acción de enzimas solubles en lugar de por intervención del ribosoma. Los dos primeros aminoácidos unidos al ácido *N-acetilmurámico* pueden variar en distintos microorganismos. Los diaminoácidos que figuran en tercera posición son esenciales para el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano. El peptidoglicano naciente posee una *D-alanina* adicional que se libera durante la formación del entrecruzamiento [33].

La síntesis del peptidoglicano puede dividirse en tres fases (**Figura 1.4**) [32-34]:

La **primera fase** ocurre en el interior de la célula bacteriana, donde se produce la síntesis enzimática de los precursores activos del disacárido básico del peptidoglicano: UDP-*N*-acetil-muramilpentapéptido (UDP-MurNAc) y UDP-*N*-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc). UDP-GlcNAc se sintetiza a partir de fructosa-6-fosfato, mientras que la formación de UDP-MurNAc se produce usando UDP-GlcNAc como precursor [35]. Después, el pentapéptido UDP-MurNAc se ensambla a través de una serie de pasos enzimáticos. La **segunda fase** se lleva a cabo en la membrana citoplasmática. El pentapéptido UDP-MurNAc se une mediante un enlace pirofosfato al bactoprenol de la membrana y se libera monofosfato de uridina (UMP). Se añade entonces *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) desde el precursor UDP-GlcNAc para dar lugar al disacárido que formará el peptidoglicano. El uso de una molécula lipofílica como el bactoprenol permite el transporte de precursores hidrofílicos desde el entorno acuoso del citoplasma, a través de la membrana hidrofóbica, hacia los sitios de incorporación del peptidoglicano naciente. La **tercera y última etapa** de la biosíntesis de peptidoglicano, que tiene lugar en el lado exterior de la membrana citoplasmática, implica la polimerización de las unidades de disacárido-pentapéptido recién sintetizadas y su incorporación a la cadena creciente de peptidoglicano. Esto se logra a través de la acción de las PBPs, que catalizan las reacciones de transglicosilación y transpeptidación responsables de la formación de los enlaces glicosídicos y peptídicos.

Las unidades disacáridicas pentapéptido son polimerizadas como peptidoglicano naciente por la actividad **transglicosilasa de algunas PBPs**, que utilizan como fuente de energía para la reacción un enlace pirofosfato formado entre el disacárido y el bactoprenol. Posteriormente, el pirofosfato de bactoprenol se transforma de nuevo en fosfato de bactoprenol y se recicla. Finalmente, los péptidos procedentes de cadenas adyacentes de peptidoglicano naciente y la pared preformada se entrecruzan entre sí mediante la **transpeptidación** entre la amina libre del aminoácido situado en la tercera posición del pentapéptido (*D,L*-diaminopimélico), por un lado, y la D-alanina que está en la cuarta posición de la otra cadena peptídica, por otro, con lo que se libera la D-alanina terminal del precursor (**Figura 1.5**) [36]. La reacción de entrecruzamiento es catalizada por la actividad **transpeptidasa de algunas PBPs** ligadas a la membrana. Una actividad relacionada, **D,D-carboxipeptidasa, asociada a otras PBPs**, se encarga de eliminar las D-alaninas terminales extra con el objeto de limitar el grado de entrecruzamiento.

Figura 1.3: Unidad básica precursora del peptidoglicano de *E. coli*. Se observan D- y L-aminoácidos alternados unidos al ácido N-acetil-murámico. Nótese que la unidad básica **madura** carece del aminoácido D-alanina terminal (Adaptado de [32]).

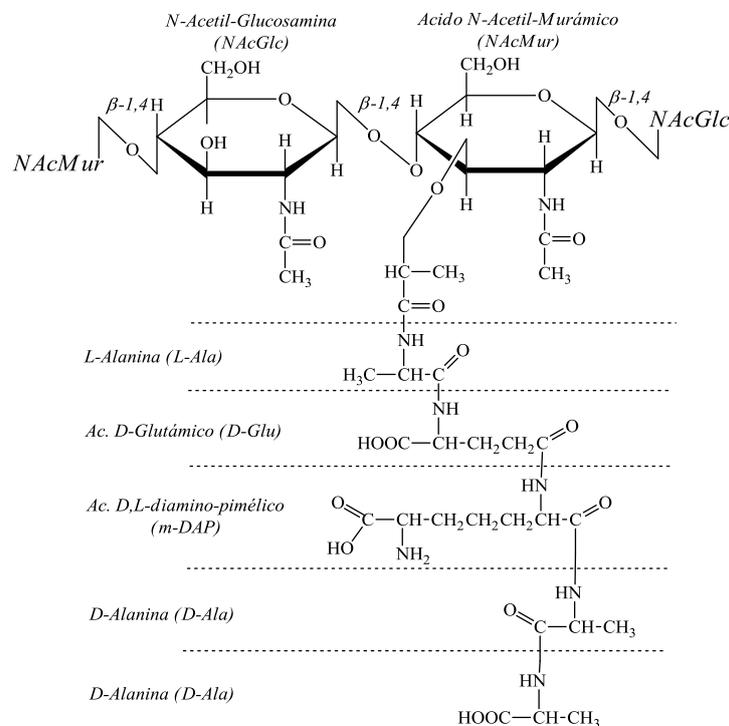


Figura 1.4: Síntesis del peptidoglicano. UDP-MurNAc, cuadrado naranja. UDP-GlcNAc, cuadrado azul. Ver explicación en el texto. (Adaptado de [37]).

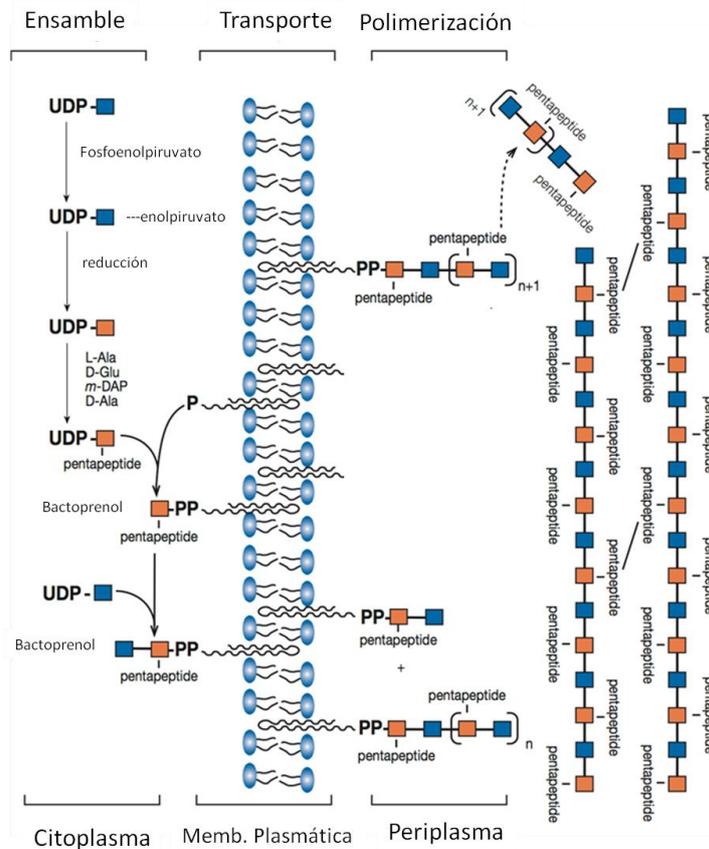
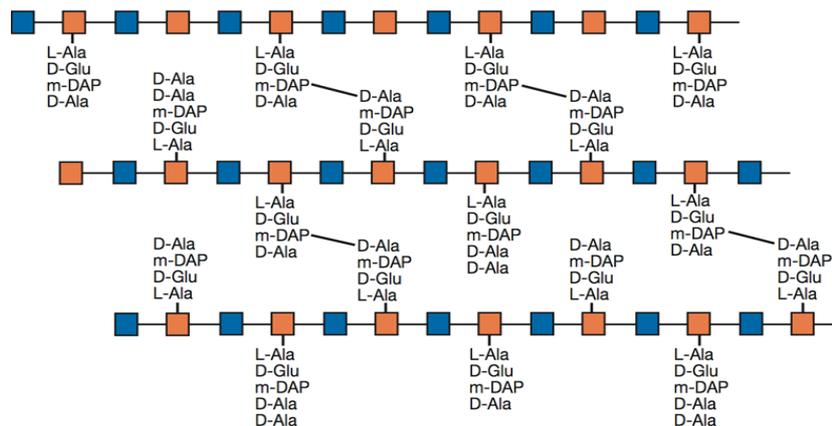


Figura 1.5: Estructura global del peptidoglicano de *E. coli*. En el esquema, las cadenas de peptidoglicano están compuestas por residuos de ácido N-acilmurámico (naranja) y N-acetilglucosamina (azul) mostrando el entrecruzamiento periódico entre los tetrapéptidos de L-Ala, D-Glu, m-DAP y D-Ala (Adaptado de [37]).

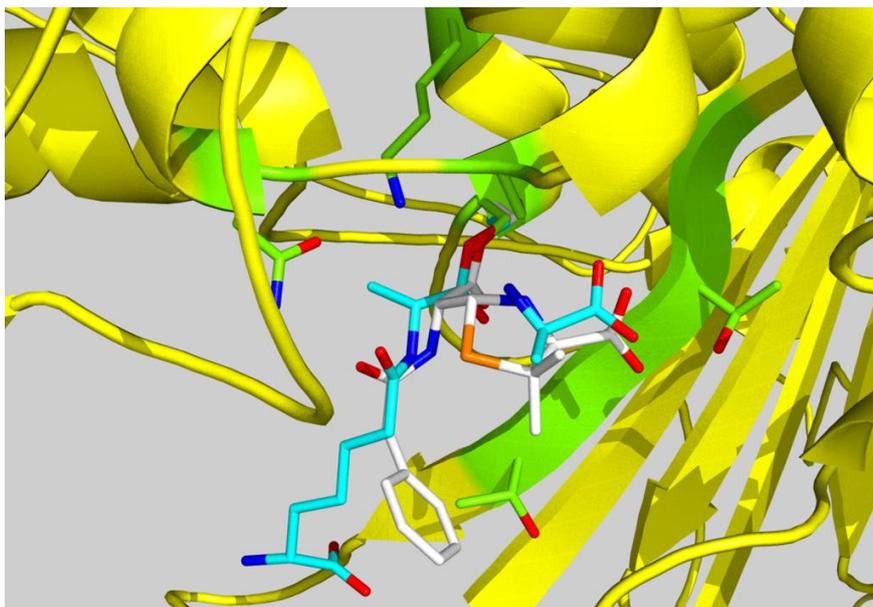


El peptidoglicano está sometido además a procesos de degradación por parte de las **autolisinas**, importantes en el crecimiento, la división celular y la determinación de la

forma bacteriana. La inhibición de la síntesis o el entrecruzamiento del peptidoglicano no detiene a las autolisinas, de manera que en estas circunstancias, su acción debilita la malla y la estructura bacteriana hasta ocasionar, junto a otros procesos indirectos, la muerte y posteriormente la lisis celular [34].

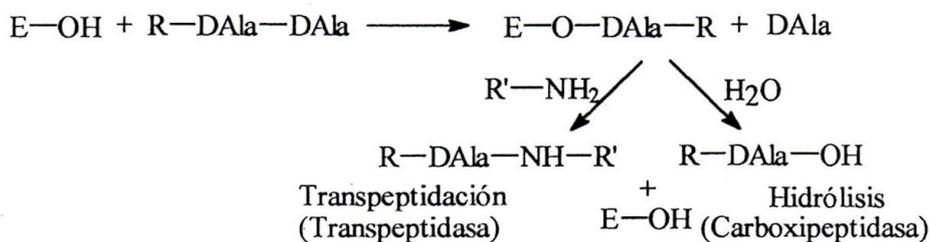
Las **proteínas de unión a la penicilina (PBPs, *Penicillin-binding proteins*) son aciladas por los** β -lactámicos y constituyen los blancos moleculares de la penicilina y otros antibióticos β -lactámicos. Los antibióticos β -lactámicos inhiben a las PBPs como análogos de sustrato, inhibiendo así la síntesis del peptidoglicano y produciendo habitualmente la muerte celular [38]. Esto se debe a que algunas de las posibles estructuras conformacionales del extremo *D-alanil-D-alanina* terminal de las hebras de peptidoglicano naciente tienen analogía estructural con la molécula del anillo β -lactámico (**Figura 1.6**) [39]. Como señaláramos anteriormente, el procesamiento del peptidoglicano naciente implica la formación de un complejo molecular entre una *D,D-transpeptidasa* (E-OH) y una molécula peptídica dadora de grupos carbonilo (R-D-Ala-D-Ala) (**Figura 1.7**). El péptido dador es la molécula precursora de peptidoglicano con su *D-alanil-D-alanina* terminal mientras que el residuo del sitio activo de la enzima que se une a la molécula precursora del peptidoglicano es una serina [40].

Figura 1.6: *Mimetismo molecular, el fundamento del mecanismo de acción de los β -lactámicos.* En la figura se observa el terminal D-Ala-D-Ala representado por el péptido mimético D-amino-pimelil- ϵ -D-alanina (celeste) y bencil-penicilina (blanco) unidos a la serina activa del bolsillo catalítico de PBP4a de *Bacillus subtilis* (amarillo).



La reacción de D,D-transpeptidación involucra primero la acilación de la enzima por transferencia del radical R-D-alanina al residuo de serina “activo”; en un segundo paso, la parte de la molécula dadora que estaba unida a la enzima es transferida al grupo amino de una molécula aceptora (otra cadena de peptidoglicano, R'-NH₂), regenerándose la enzima y liberándose como producto de la reacción la molécula de peptidoglicano entrecruzada (**Figura 1.7**) [41].

Figura 1.7: Reacción entre una D,D-peptidasa y un sustrato dador de grupos carbonilo. Si la molécula aceptora final es una segunda cadena de peptidoglicano, la peptidasa se comporta como D,D-transpeptidasa. Si la D,D-peptidasa es atacada por una molécula de agua, la enzima entonces se comporta como carboxipeptidasa.



Un complejo similar se forma cuando las PBPs reaccionan con antibióticos β -lactámicos, pero el intermediario que se forma es mucho más estable y los productos de reacción se liberan muy lentamente.

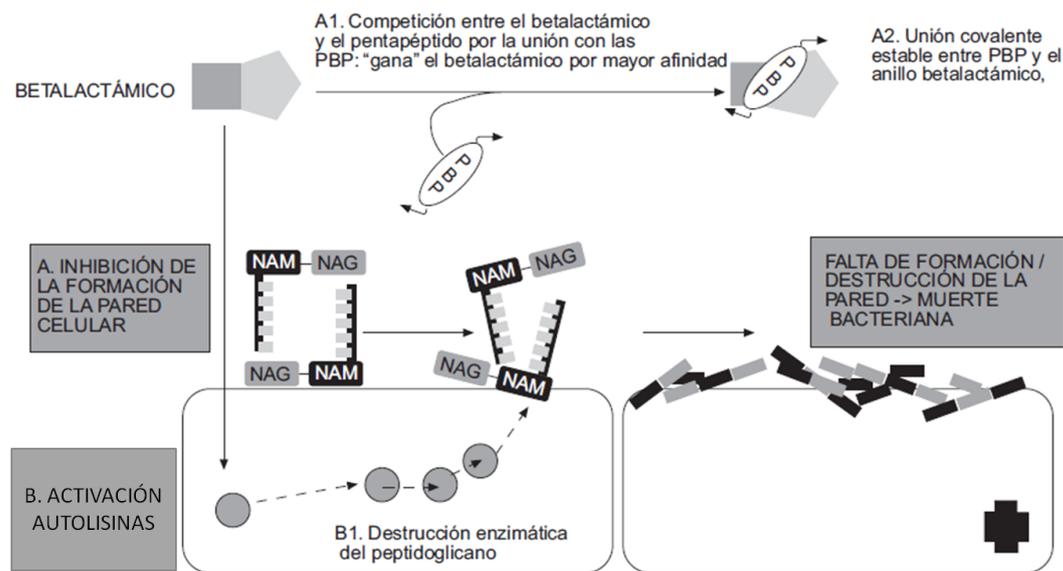
Los β -lactámicos se comportan como sustratos suicidas pues inmovilizan la serina esencial formando una enzima esterificada estable, y la molécula del antibiótico pierde su integridad por hidrólisis del enlace amida del anillo β -lactámico. Biológicamente, esto se traduce en la inactivación de la enzima, lo que lleva finalmente a la inhibición de la síntesis del peptidoglicano [41]. Por otro lado, los β -lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano [42]. El resultado es un desbalance a favor del debilitamiento y destrucción de la pared bacteriana (**Figura 1.8**).

2.2 Clasificación de los antibióticos β -lactámicos

Luego de las observaciones de Fleming, Florey y Chain sobre las propiedades antimicrobianas de la penicilina, se volvió necesario producirla en mayores cantidades,

especialmente para el tratamiento de los soldados aliados durante la Segunda Guerra Mundial. Esto llevó a Florey a colaborar con investigadores en Estados Unidos [43]. En 1943, Mary Hunt (también conocida como “*moldy Mary*”) del Northern Regional Research Laboratory de Peoria, Illinois, pudo aislar *Penicillium chrysogenum* a partir de melones enmohecidos. El crecimiento y producción de penicilina usando fruta como sustrato era muy eficiente. Así fue como hacia fines de ese año comenzó la producción masiva del antibiótico en países como Estados Unidos, Inglaterra y Australia [43]. La gran expansión de las penicilinas como familia de drogas fue posible gracias al trabajo del Dr. Rolison en los laboratorios de investigación de Beecham entre 1940 y 1960. La identificación y aislamiento del núcleo con actividad antibacteriana, el ácido 6-amino-penicilánico, hizo posible el desarrollo de las penicilinas semisintéticas y la introducción de la meticilina (1960) y la ampicilina (1961) [43].

Figura 1.8: Mecanismo de acción de los β -lactámicos. (Adaptado de [28]).



NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

El descubrimiento de las cefalosporinas siguió cronológicamente al de las penicilinas. En julio de 1945, Giuseppe Brotzu (1895-1955) detectó las propiedades antibacterianas sobre microorganismos gram negativos de filtrados de cultivos de un hongo identificado como *Cephalosporium acremonium*. El punto de partida de su investigación fue la observación de que la incidencia de fiebre tifoidea en la ciudad de Cagliari era curiosamente menor que en el resto de Italia o Europa, donde era habitual encontrar al

hongo en el agua de las cloacas. Años más tarde, Edward Abraham aisló cefalosporina C a partir de filtrados de aquel hongo. Cuando empezaron a realizarse modificaciones sobre el núcleo de la cefalosporina C, un gran número de derivados semisintéticos fueron desarrollados y comercializados [43].

En los años 70 se detectaron fuentes naturales de una variedad de nuevos β -lactámicos, estructuralmente diferentes a las penicilinas y cefalosporinas. Ellos fueron el *ácido clavulánico* (1976), los *carbapenemes* (como la tienamicina en 1977) y, más tarde, los monobactámicos (1981) [44].

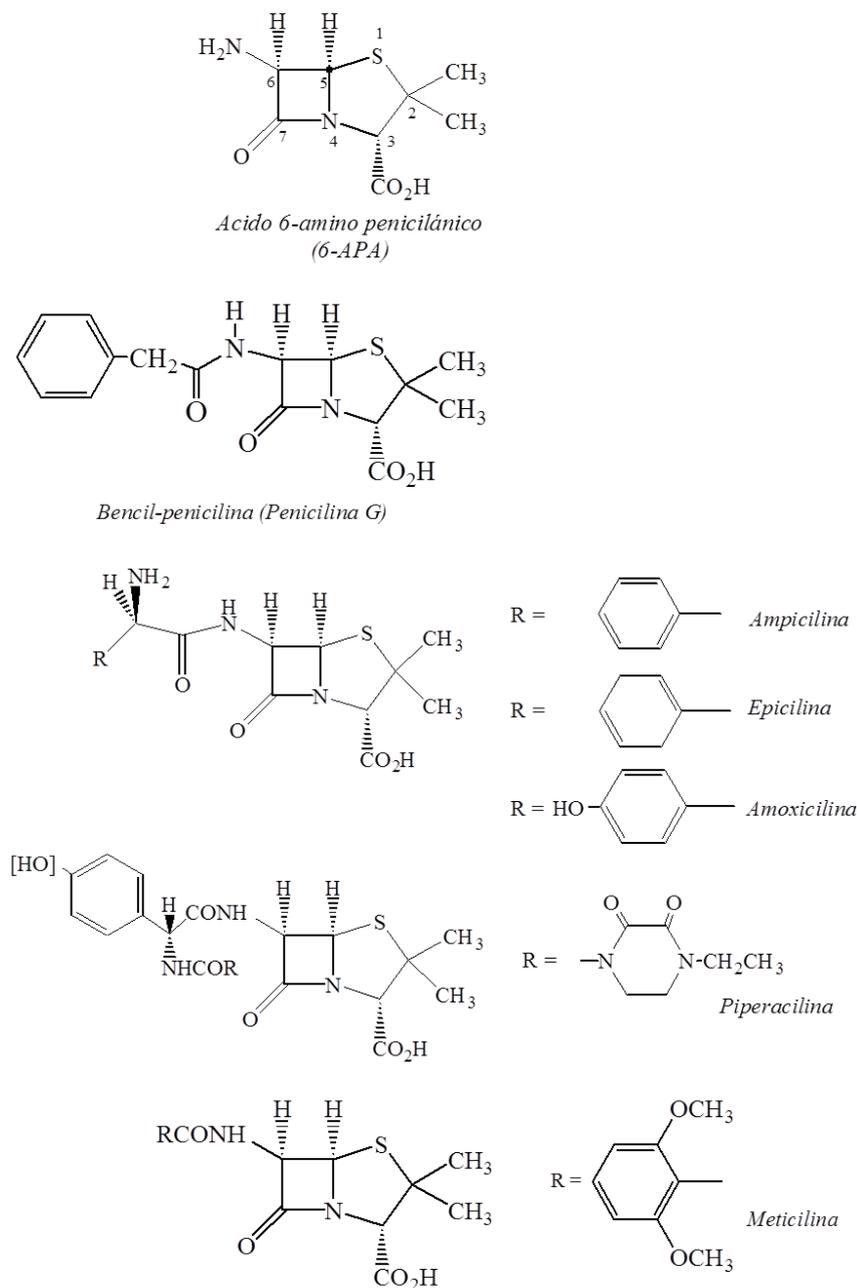
Los antibióticos β -lactámicos comprenden principalmente a *penicilinas*, *cefalosporinas*, *cefamicinas*, *carbapenemes*, *monobactámicos* e *inhibidores de β -lactamasas*, entre otros. A continuación se describen brevemente las características estructurales y biológicas de cada grupo [43].

Penicilinas (Figura 1.9): Las penicilinas son moléculas bicíclicas con un anillo β -lactámico fusionado a un anillo *tiazolidina*, dando como resultado el anillo básico de las penicilinas: el ácido 6-amino-penicilánico o 6-APA.

La disponibilidad de 6-APA permitió la síntesis de cientos de derivados sintéticos de la penicilina sustituidos en el grupo amino del C6, conduciendo al mejoramiento de propiedades biológicas como la estabilidad frente a las penicilinasas y la expansión del espectro de actividad antibacteriana.

Las penicilinas resistentes a las penicilinasas, como *meticilina*, poseen una cadena lateral adyacente al grupo amida que sería responsable del efecto protector del anillo β -lactámico frente a la hidrólisis enzimática. Fueron sintetizadas luego de que la penicilina G perdiera efectividad frente a cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de penicilinasas.

Las amino-penicilinas como *ampicilina* y *amoxicilina* fueron introducidas en la clínica entre 1961 y 1972, y se caracterizan por su amplio espectro antimicrobiano frente a bacterias gram positivas y gram negativas y buena absorción oral. Posteriormente fueron desarrolladas carboxi y *acil-ureído-penicilinas* con actividad anti-pseudomonas, siendo la de mayor importancia la *piperacilina*.

Figura 1.9: Estructura del 6-APA y derivados. (Adaptado de [44])

Cefalosporinas (Figura 1.10): En éstas el anillo β -lactámico está fusionado al anillo de seis miembros *dihidrotiazina*.

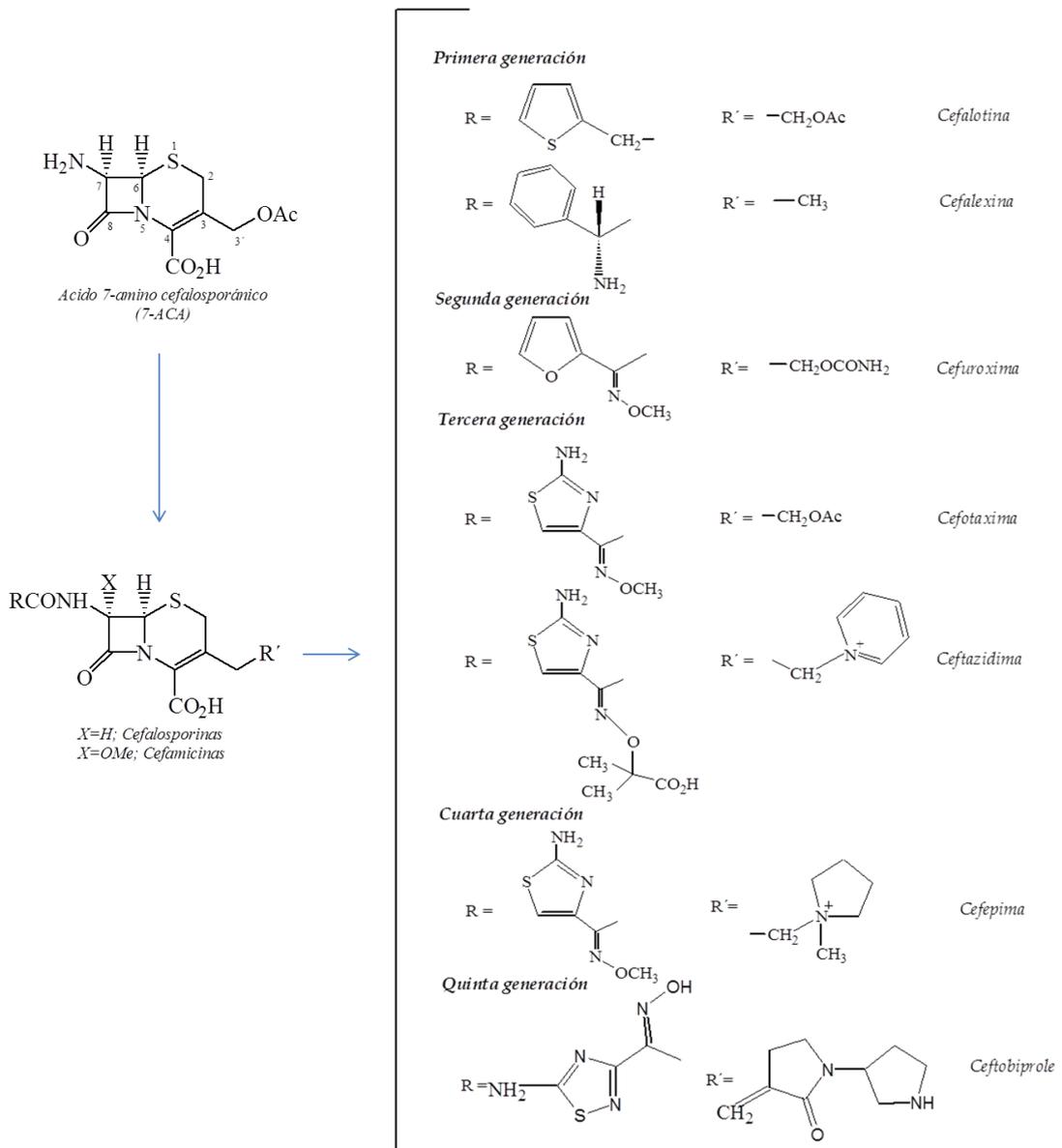
La remoción de la cadena lateral de la Cefalosporina C da como producto ácido 7-aminocefalosporánico o 7-ACA, que se utilizó como punto de partida sintético para la mayoría de las cefalosporinas disponibles en la actualidad. En general, se realizan modificaciones tanto en el grupo amino del C7 (favoreciendo cambios en el espectro de actividad, potencia y resistencia a β -lactamasas) como en el acetoximetilo del C3 (modificando las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas de las drogas).

Las cefalosporinas se clasifican en generaciones en función de su espectro antibacteriano y estructura química:

- Las **cefalosporinas de primera generación** incluyen *cefalotina*, *cefazolina* y *cefalexina*. Son muy efectivas sobre *Staphylococcus* spp. sensibles a la meticilina, pero son sólo moderadamente activos frente a bacterias gram negativas como *E. coli*, *Proteus* spp. y *Klebsiella* spp. debido a su susceptibilidad frente a las β -lactamasas producidas naturalmente por estas especies.
- Las **cefalosporinas de segunda generación** como *cefamandol*, *cefuroxima* y *cefactor* aumentaron su actividad contra *Haemophilus influenzae* y algunas especies de enterobacterias como *Klebsiella* spp. y *Proteus* spp. No son activas frente a *Pseudomonas* spp.
- Las **cefalosporinas de tercera generación** son activas frente a microorganismos gram negativos, (algunas incluso también lo son frente a *Pseudomonas aeruginosa*) y fueron diseñadas para ser resistentes a las β -lactamsas de amplio espectro (ver más abajo). Entre los antibióticos que se incluyen en este grupo están *cefotaxima*, *ceftriaxona* (con una muy buena vida media, permitiendo ser administrada de una o dos veces al día), *cefoperazona* y *ceftazidima* (con mejor actividad frente a *P. aeruginosa*). Una de las características más importantes de algunos de sus miembros es su capacidad de llegar al sistema nervioso central y alcanzar concentraciones suficientes en el fluido espinal para tratar las meningitis causadas por microorganismos gram negativos.
- Las **cefalosporinas de cuarta generación**, *cefepime* y *cefpirome*, permiten el control de microorganismos productores de cefamicinasas cromosómicas (o sus contrapartes plasmídicas). También tienen buena actividad frente a estreptococos y estafilococos sensibles a meticilina.
- Ceftobiprole, una **cefalosporina de quinta generación**, fue desarrollada específicamente para combatir *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (MRSA) ya que puede unirse a la PBP de baja afinidad presente en estos microorganismos. Ceftarolina es otra nueva oximino-cefalosporina que también es efectiva contra MRSA pero inactiva contra productores de BLEE y cefamicinasas.
- Las **cefamicinas**, *cefoxitina* y *cefotetan*, se caracterizan por poseer mayor resistencia intrínseca frente a β -lactamasas y actividad sobre algunos anaerobios, como

Bacteroides fragilis, por eso se emplean para el tratamiento de peritonitis y enfermedad inflamatoria pélvica. Se suelen incluir, incorrectamente, dentro de las cefalosporinas de segunda generación.

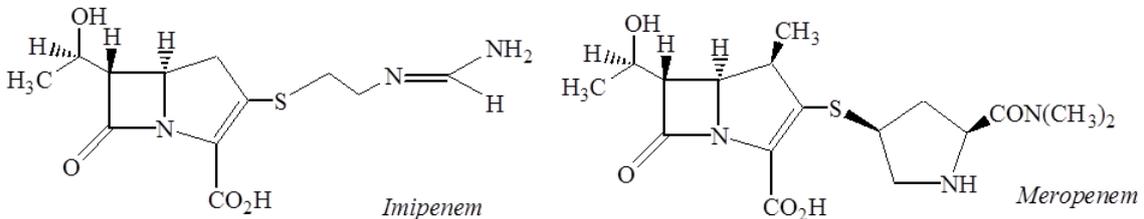
Figura 1.10: Estructura del 7-ACA y derivados. (Adaptado de [44])



Carbapenemes (Figura 1.11): La tienamicina, aislada a mediados de 1970 a partir de un aislamiento de *Streptomyces catleya*, es un carbapenem de origen natural con actividad contra un amplio rango de bacterias gram positivas y gram negativas, incluyendo *P. aeruginosa*. Sin embargo, es químicamente inestable. Imipenem y

meropenem son derivados estables con actividad contra bacterias gram positivas y gram negativas aerobias y anaerobias. Son los dos β -lactámicos más potentes utilizados en la clínica por su espectro de actividad y excelente estabilidad frente a las β -lactamasas.

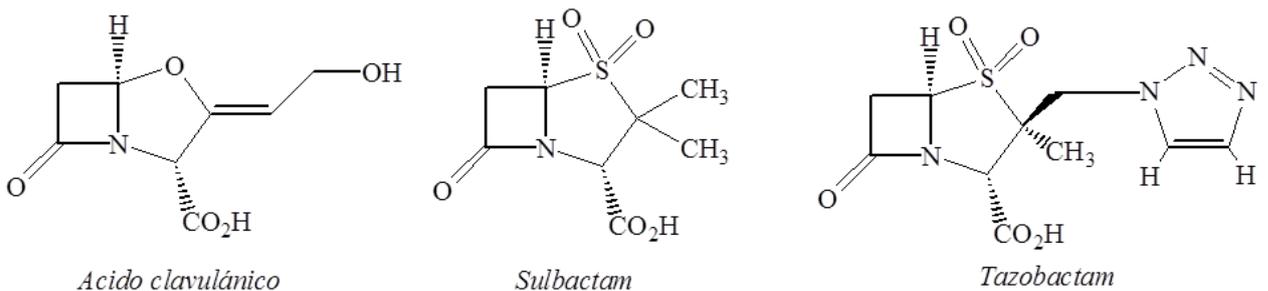
Figura 1.11: Estructuras químicas de Imipenem y Meropenem. (Adaptado de [44]).



Inhibidores de β -lactamasas (Figura 1.12):

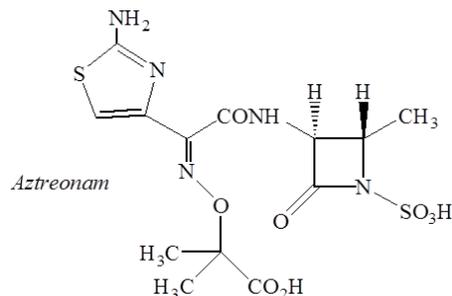
- El ácido clavulánico fue el primer inhibidor de β -lactamasas utilizado clínicamente. Es producido naturalmente por *Streptomyces clavuligerus*. Se trata de un inhibidor “suicida” de β -lactamasas y se lo utiliza en asociación con amoxicilina y ticarcilina. Es un buen inhibidor de un amplio rango de β -lactamasas de clase A, con poca actividad frente a β -lactamasas de clase D y ninguna actividad frente a las de clase B y C (ver más adelante).
- *Sulbactam*, obtenido sintéticamente a partir del 6-APA, es un inhibidor irreversible de muchas β -lactamasas. Comparado con el ácido clavulánico posee menor efecto inhibidor frente a las enzimas de clase A, pero aumenta su acción frente a las β -lactamasas de clase C. Su mecanismo de acción es prácticamente igual al del ácido clavulánico. Generalmente se lo usa asociado a ampicilina.
- Otro derivado sintético es *tazobactam*, que resulta más potente que el sulbactam frente a enzimas de clase A y tiene poca actividad frente a β -lactamasas de clase C. Se lo utiliza en asociación con piperacilina.

Figura 1.12: Estructura química de inhibidores clásicos de β -lactamasas. (Adaptado de [44]).



Monobactámicos (Figura 1.13): Los monobactámicos de origen natural presentan escasa actividad antibacteriana. A partir del ácido 3-amino-monobactámico (3-AMA), se obtuvieron derivados monocíclicos activos, sustituidos generalmente en C3. El más utilizado en la clínica es *aztreonam*, que posee un amplio rango de actividad frente a gram negativos.

Figura 1.13: Estructura química del Aztreonam. (Adaptado de [44]).



2.3 Mecanismos generales de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en bacterias gram negativas

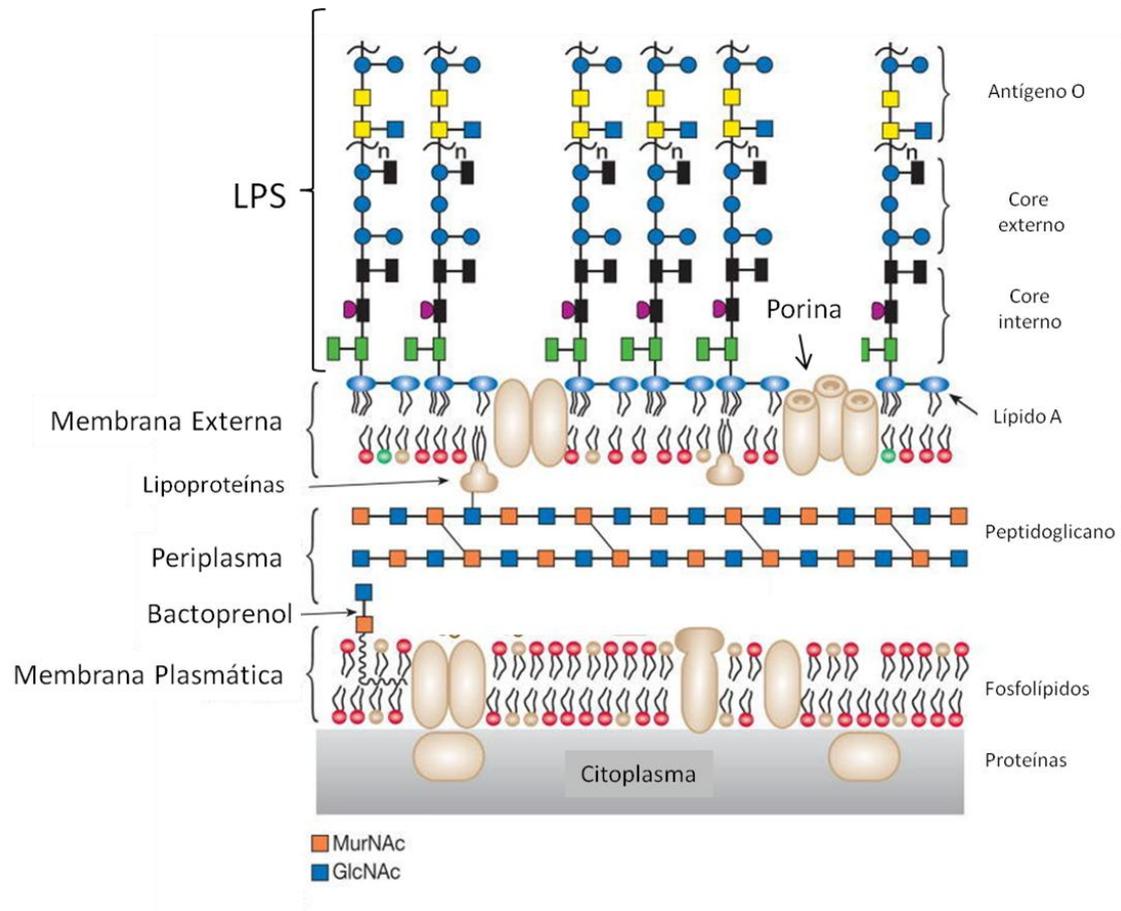
La resistencia frente a β -lactámicos en bacterias gram negativas puede surgir a partir de tres mecanismos posibles:

- El acceso limitado a su blanco molecular (PBPs), ya sea por impermeabilidad de la membrana externa o por expulsión activa mediada por bombas
- La alteración de las PBPs
- La producción de β -lactamasas

A diferencia de lo que ocurre en las bacterias gram positivas, los antibióticos β -lactámicos deben atravesar la membrana externa de la bacteria con el fin de alcanzar su blanco molecular (**Figura 1.14**). Por lo tanto, cualquier impedimento al ingreso, o bien la extrusión del β -lactámico, puede conferir resistencia. Este mecanismo es exclusivo de los gram negativos [20].

Por otro lado, la modificación de las PBPs es la base fundamental para la resistencia a los antibióticos en bacterias gram positivas y es menos frecuente en las bacterias gram negativas [20].

Figura 1.14: Representación esquemática de la pared bacteriana de un microorganismo gram negativo. Se observa el peptidoglicano en el espacio periplásmico. La cara externa de la membrana externa es rica en lipopolisacárido (LPS). (Adaptado de [37]).



2.3.1 Impermeabilidad

La envoltura externa de los microorganismos gram negativos posee canales proteicos inespecíficos denominados porinas que permiten la difusión de nutrientes relativamente pequeños e hidrofílicos, tales como aminoácidos, azúcares, fosfato, etc. La cinética de difusión a través de las porinas se encuentra determinada principalmente por las propiedades fisicoquímicas de la molécula en cuestión (tamaño, forma, carga y polaridad) y por su gradiente de concentración. Los antibióticos β -lactámicos alcanzan su blanco molecular al atravesar dichos canales [45].

Las porinas constan de 16 cadenas de aminoácidos antiparalelas (que alternan aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos) que forman hojas β que se acomodan alrededor de un canal para dar origen a un barril β . Las hojas β anfipáticas están conectadas entre

sí mediante *loops* periplásmicos cortos (1 a 4 aminoácidos) y *loops* extracelulares más largos [46]. Uno de los *loops*, L3, se introduce dentro del canal hasta aproximadamente la mitad de la altura del poro. En asociación con aminoácidos hidrofílicos de las hojas β , esto crea un campo electrostático entre los residuos ácidos de L3 y los residuos básicos de la hoja β opuesta, que juega un rol fundamental en la selectividad que tiene el poro frente a las moléculas que difunden a través de él, de acuerdo a su carga y tamaño [47]. Algunas porinas se encuentran como monómeros mientras que otras se organizan como trímeros. Por ejemplo, en *E. coli*, OmpF y OmpA son ejemplos de porinas trimérica y monomérica respectivamente (**Figura 1.15**) [48].

Cualquier alteración en la cantidad o estructura de las porinas, podría llevar a una disminución en la permeabilidad y por lo tanto en la velocidad con la que el antibiótico alcanza su sitio blanco, evitando así que se alcance la concentración necesaria para producir la muerte celular. Se ha descrito que la disminución en la expresión de la porina OmpF en *E. coli* puede contribuir a la resistencia a imipenem, así como la disminución en la expresión de OmpC contribuye al aumento de la resistencia a meropenem y cefepime. En la **Tabla 1.1** se indican ejemplos de porinas relacionadas con resistencia a distintas familias de antibióticos.

Figura 1.15: Estructura de la porina OmpF de *E. coli*. **A-** Vista del trímero desde arriba. El *loop* L2, de color azul, participa de la interacción entre monómeros. El *loop* L3, de color naranja, vuelve el canal más estrecho. **B-** Vista del monómero desde el lado. Los *loops* L2 y L3 están coloreados como en **A**. **C-** Vista del monómero desde arriba, mostrando la región del canal que se estrecha por acción de L3 y su interacción con las cadenas β . La interacción se produce entre los aminoácidos Glu117 (E117) y Asp113 (D113) de L3, y 4 aminoácidos básicos de la pared opuesta del barril, Lys16 (K16), Arg42 (R42), Arg82 (R82), y Arg132 (R132). (Adaptado de [48]).

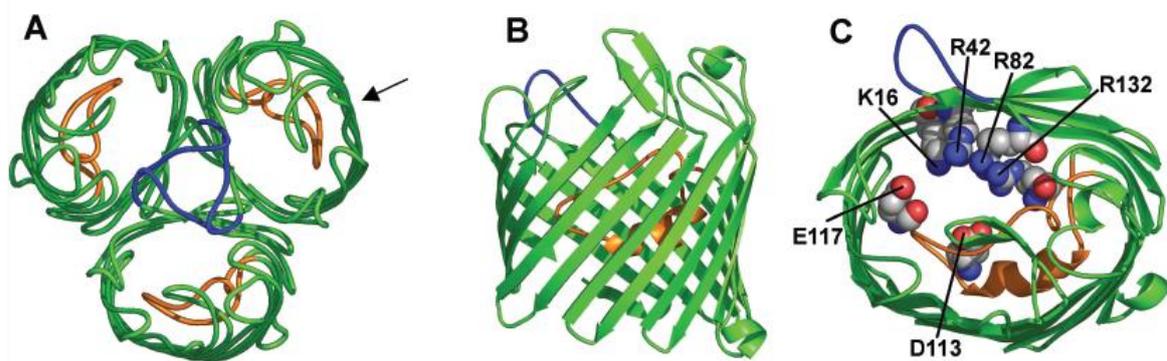


Tabla 1.1: Ejemplos de porinas involucradas en la resistencia a los antibióticos en distintas especies bacterianas. (Adaptado de [47]).

Especie bacteriana	Porina	Antibiótico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OprD	Carbapenemes
<i>Escherichia coli</i>	OmpC	β -lactámicos
	OmpF	β -lactámicos
<i>Serratia marcescens</i>	OmpF	β -lactámicos
	OmpC	β -lactámicos
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OmpK35	Cefalosporinas, carbapenemes, fluoroquinolonas, cloramfenicol
	OmpK36	Carbapenemes
<i>Enterobacter cloacae</i>	OmpF	Carbapenemes
<i>Enterobacter aerogenes</i>	OmpC	Carbapenemes
	OmpF	Carbapenemes
	Omp36	Imipenem, cefepime, cefpirome
<i>Klebsiella oxytoca</i>	OmpK36	Carbapenemes
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PIB	β -lactámicos, tetraciclinas, fluoroquinolonas
<i>Salmonella enterica</i>	OmpC	Cefalosporinas
	OmpF	Cloramfenicol, imipenem
<i>Vibrio cholerae</i>	OmpU	Cefalosporinas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CarO	Carbapenemes

Resistencia mediada por mutaciones en los genes codificantes de porinas: La cantidad y tipo de porinas que posee un microorganismo gram negativo en su membrana externa determinará su permeabilidad y por lo tanto su susceptibilidad a la entrada de moléculas hidrofílicas de antibiótico. Las mutaciones que afectan la expresión y/o la función de las porinas tienen un impacto directo en los niveles de resistencia. Estas mutaciones pueden llevar a la pérdida de una porina, a una modificación en el tamaño o conductancia del canal hidrofílico, o bien a una disminución en la expresión de la porina [47].

Regulación adaptativa mediada por alteración en los niveles de expresión de porinas: Es muy común que las bacterias, ante determinadas señales ambientales, puedan disminuir la expresión de las porinas de la membrana externa. Un buen ejemplo de esto es la regulación de las porinas OmpC y OmpF de *E. coli*. OmpF tiene un tamaño de poro un poco mayor al de OmpC, por lo tanto, las proporciones relativas de estas dos proteínas tienen un impacto dramático en el tipo y la cantidad de solutos que pueden

entrar en la célula. Así, cuando el entorno que rodea a las bacterias tiene una baja osmolaridad, hay un aumento considerable en la presencia de OmpF en la membrana externa, lo que facilita la captación de nutrientes. En contraste, en entornos ricos en nutrientes en los que la osmolaridad es alta, sería perjudicial expresar altos niveles de OmpF, dado que ingresarían compuestos tóxicos a la célula. Por lo tanto, bajo condiciones de alta osmolaridad, hay una regulación que lleva a la disminución de OmpF y al aumento de OmpC en la membrana externa, lo que conduce a mayores niveles de resistencia a los β -lactámicos [47].

Sin embargo, la disminución de la permeabilidad por sí sola no es suficiente para transformar a un microorganismo en resistente, sino que debe actuar sinérgicamente con algún otro mecanismo que involucre la expulsión activa o la inactivación del antibiótico. Así, **la presencia de β -lactamasas periplásmicas que hidrolizan el antibiótico a medida que éste ingresa lentamente por las porinas sería el mecanismo de mayor relevancia clínica en bacilos gram negativos [49-51].**

2.3.2 *Sistemas de eflujo*

Las bacterias pueden evitar la acumulación de productos tóxicos (detergentes, colorantes, solventes orgánicos, antibióticos, etc) en su interior a través del bombeo mediante sistemas de transporte dependientes de energía. Se trata de bombas de eflujo constituidas por complejos proteicos asociados a membranas que disminuyen la concentración efectiva de la sustancia que ingresó a la célula [50].

Hoy se conocen numerosísimos ejemplos de bombas de eflujo tanto en microorganismos gram negativos como gram positivos que participan en la resistencia a los antibióticos [47].

Los sistemas de eflujo bacterianos se han agrupado en cinco súper-familias de acuerdo a su secuencia de aminoácidos, la fuente de energía requerida para lograr la expulsión de las moléculas y la especificidad de sustratos [52]:

- *Major Facilitator Superfamily* (MFS)
- *ATP-Binding Cassette family* (ABC)
- *Resistance-Nodulation-Division family* (RND)
- *Small Multidrug Resistance family* (SMR)

- *Multidrug And Toxic compound Extrusion family* (MATE)

En los transportadores de tipo ABC la energía necesaria para la expulsión de sustancias es provista por la hidrólisis de ATP, en los transportadores MATE depende del antiporte Na^+/H^+ y en los eflujos de tipo MFS, RND y SMR deriva de la fuerza protón motriz.

Las bombas de eflujo pueden presentarse como sistemas de un solo componente; en general en este caso se trata de sistemas de espectro acotado que sólo reconocen unos pocos agentes o bien a varios pero pertenecientes a la misma familia. Por otro lado, como ocurre con la familia RND, existen bombas de eflujo tripartitas cuyo espectro de acción es más amplio.

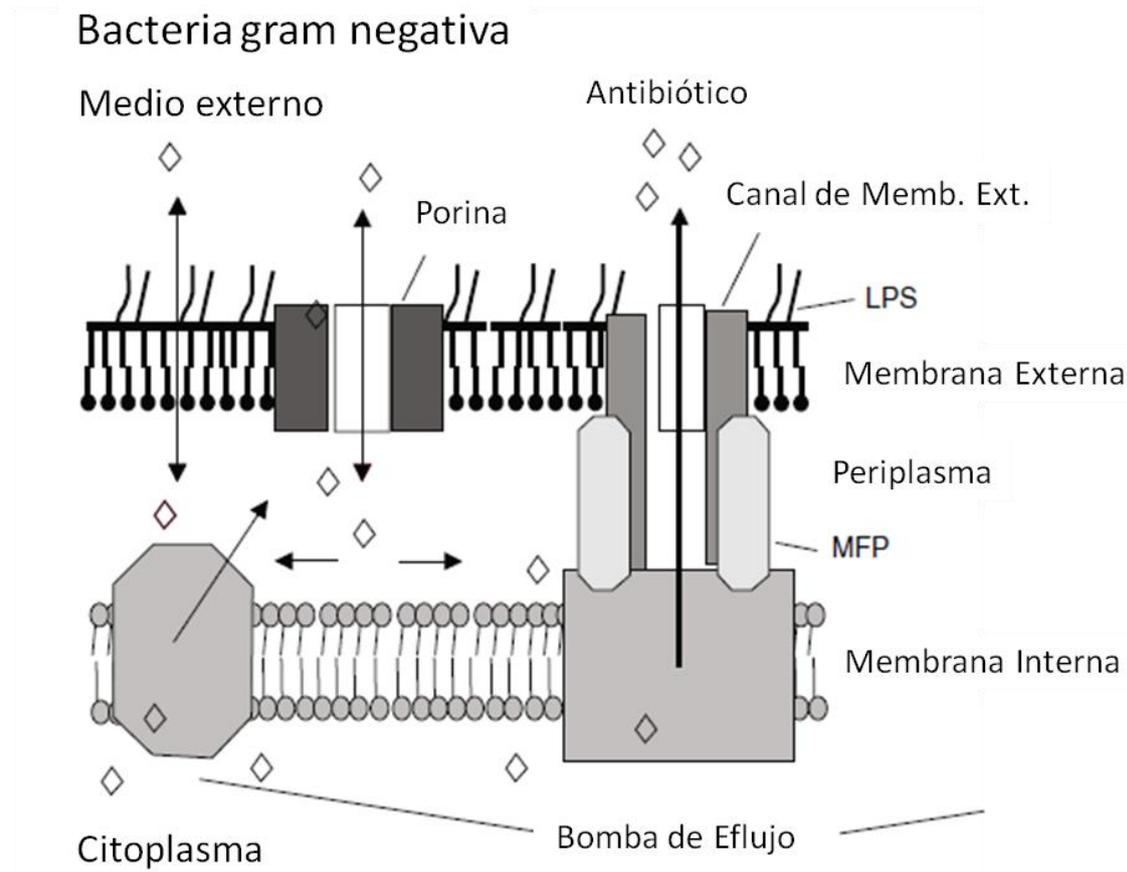
En términos generales, las bombas captarían la molécula de antibiótico luego de que ésta queda transitoriamente embebida en la membrana citoplasmática o inmersa en el espacio periplásmico para luego ser bombeada hacia afuera utilizando la energía provista (**Figura 1.16**) [52].

Bombas de eflujo en *E. coli* y otras enterobacterias [53, 54]: El sistema de eflujo más relevante clínicamente en este grupo de microorganismos es el RND, que está típicamente constituido por una proteína inmersa en la membrana citoplasmática encargada del bombeo, una proteína de fusión de membranas (MFP) y una proteína canal inmersa en la membrana externa (OM) (**Figura 1.16**).

En *E. coli*, la bomba AcrAB-TolC, organizada como en este modelo, es la más frecuentemente utilizada para la expulsión de antibióticos. Se trata de un transportador de amplio espectro que puede expulsar numerosas familias de antibióticos (aminoglucósidos, β -lactámicos, cloranfenicol, entre otros), solventes orgánicos, colorantes, sales biliares, etc [54].

La presencia de bombas de eflujo contribuye a la multirresistencia intrínseca de un patógeno. De hecho, la mayor resistencia intrínseca observada en microorganismos gram negativos comparada con microorganismos gram positivos se explica como resultado de la cooperación entre la barrera de impermeabilidad impuesta por la composición de la membrana externa y las bombas de eflujo de amplio espectro [54].

Figura 1.16: Esquema que representa la organización de las bombas de eflujo en gram negativos. En los microorganismos gram negativos la droga atraviesa la membrana externa a través de las porinas o bien atraviesa la membrana externa directamente. Una vez que alcanza el citoplasma, puede ser expulsada hacia el periplasma por acción de un transportador simple (esquemático como un octágono en el dibujo). Los sistemas de eflujo tripartitos pueden capturar drogas desde el periplasma o desde la hemioja externa de la membrana citoplasmática y expulsarlas directamente al medio. **MFP:** Proteínas de fusión de membrana. (Adaptado de [53]).



2.3.3 Alteración de los blancos moleculares

La modificación de la estructura de las PBPs por mutaciones puntuales o recombinación homóloga, o bien la adquisición de una PBP extranumeraria de baja afinidad, pueden llevar a una disminución en la afinidad por el β -lactámico. De esta manera, aumentaría la concentración mínima del antibiótico (CIM) necesaria para inhibir la proliferación del microorganismo al tiempo que se conservaría la actividad enzimática de la PBP. Si en estas circunstancias la CIM no puede ser alcanzada mediante un esquema terapéutico convencional, el microorganismo se comportará como resistente [55]. Este mecanismo es de mayor importancia en gram positivos.

2.3.4 Inactivación enzimática

La producción de enzimas inactivantes o β -lactamasas es el mecanismo de resistencia más común a los antibióticos β -lactámicos. Estas enzimas son producidas tanto por bacterias gram positivas como gram negativas y según el perfil de sustrato preferencial que posean, se las puede clasificar de manera simplificada en penicilinasas (penicilina), cefalosporinasas (cefalosporinas clásicas), β -lactamasas de amplio espectro (penicilinas y cefalosporinas clásicas), β -lactamasas de espectro extendido (penicilinas y cefalosporinas resistentes a β -lactamasas de amplio espectro) y carbapenemasas (carbapenemes) [49, 56-59]. También se distinguen según su perfil de inhibición y su composición aminoacídica (ver más adelante).

Las β -lactamasas de microorganismos gram positivos son extracelulares. Este tipo de microorganismos, al carecer de membrana externa, alcanzan niveles de resistencia cuando son capaces de producir grandes cantidades de enzimas de alta afinidad, ya que la liberación extracelular lleva a la dilución enzimática en el medio. En consecuencia, a medida que aumenta la densidad bacteriana productora de β -lactamasa, aumenta la resistencia poblacional.

En contraste, los microorganismos gram negativos producen β -lactamasas que se encuentran concentradas casi exclusivamente en la región periplásmica ubicada entre la membrana externa y la membrana citoplasmática. Por lo tanto, no requieren una producción masiva de la enzima ni tampoco una eficiencia hidrolítica elevada sobre el β -lactámico para conferir niveles altos de resistencia a estos microorganismos [60, 61].

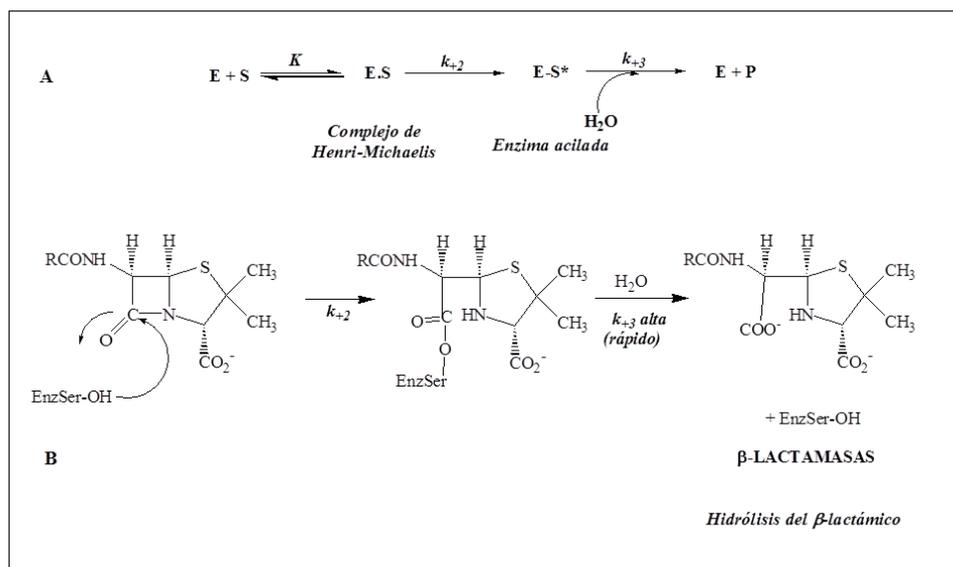
3 Las β -lactamasas

La mayoría de las β -lactamasas pertenecen, junto a las PBPs, a la familia de las peniciloil-serino-transferasas, enzimas que poseen un residuo de serina en su sitio activo y que tienen afinidad por los antibióticos β -lactámicos. Algunos autores postulan que las β -lactamasas habrían evolucionado a partir de las PBPs como consecuencia de la presión selectiva ejercida por los β -lactámicos liberados al ambiente por microorganismos productores del suelo [62]. Sin embargo, **mientras que las PBPs son inactivadas por los β -lactámicos, las β -lactamasas pueden hidrolizarlos eficientemente** [40, 41]. Esta diferencia cualitativa entre ambos tipos de enzimas se

explica cuantitativamente si analizamos su cinética de reacción frente a un β -lactámico: mientras que las primeras presentan valores de k_{+3} muy bajos, casi nunca mayores a $0,001 \text{ seg}^{-1}$, las β -lactamasas pueden tener valores de hasta 10.000 seg^{-1} . Como resultado, cuando una serino- β -lactamasa se une al antibiótico, se forma un complejo covalente a través de una unión de tipo éster en el que el anillo β -lactámico es atacado por el hidroxilo libre de la serina, liberándose luego la enzima activa por un lado y el antibiótico hidrolizado e inactivo por otro (**Figura 1.17**) [40, 63].

También existe otra clase de β -lactamasas, las metalo- β -lactamasas, que requieren zinc para su actividad y cuya catálisis no involucra un intermediario covalente, sino que atacan al antibiótico a través de un ión hidróxido que se estabiliza por acción del zinc del sitio activo [60, 64]. Algunas de estas enzimas han cobrado gran relevancia clínica debido a que son capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos, con excepción de los monobactámicos.

Figura 1.17: A *Reacción general entre una serino- β -lactamasa y un antibiótico β -lactámico.* E representa a la enzima y S al antibiótico β -lactámico, ES y ES* representan el **complejo no covalente y covalente**, respectivamente; P representa el producto de hidrólisis del antibiótico. K (k_{-1}/k_{+1}), constante de disociación del complejo de Henri-Michaelis; k_{+2} , constante de acilación; k_{+3} , constante de desacilación. k_{+3} es muy baja si E es una PBP transpeptidasa, pero muy elevada cuando E es una β -lactamasa, lo que lleva rápidamente a la hidrólisis del antibiótico y la regeneración de la enzima. **B** *Mecanismo de acción de las β -lactamasas.* EnzSer-OH, serino- β -lactamasa. (Adaptado de [44]).



3.1 Clasificación de las β -lactamasas

La primera β -lactamasa detectada fue reportada en 1940. Se trataba de una enzima producida por una cepa de *Bacillus coli*, ahora conocida como *Escherichia coli*, que poseía la capacidad de neutralizar la acción bactericida de la penicilina sobre las células bacterianas [3, 14]. Desde entonces, la aparición y detección de nuevas β -lactamasas en bacilos gram negativos se ha sucedido de manera continua y pueden distinguirse cuatro etapas clave en su evolución a lo largo de estos años (**Figura 1.1**) [65]:

La **etapa inicial** incluye la emergencia de β -lactamasas de espectro reducido tras el uso masivo de ampicilina y las primeras cefalosporinas orales. El aumento de la prevalencia de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de TEM-1 y SHV-1 respectivamente, resultó en el desarrollo de nuevos antibióticos β -lactámicos capaces de combatirlos, como las cefalosporinas de tercera generación, los carbapenemes y el aztreonam.

La **segunda etapa** comenzó en los años 80 e involucró el surgimiento de resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido debido principalmente a la acumulación de mutaciones puntuales en TEM-1 y SHV-1 de *K. pneumoniae*. La combinación de estas nuevas variantes con el aumento en la expresión de la β -lactamasa debido a cambios en el promotor y el acceso reducido del antibiótico al espacio periplásmico como consecuencia de la disminución de la expresión de porinas llevó a altos niveles de resistencia.

La **tercera etapa** se solapó con la segunda y se caracterizó por la emergencia y diseminación de la familia CTX-M, cefalosporinasas naturales derivadas del cromosoma de especies de *Kluyvera spp.*

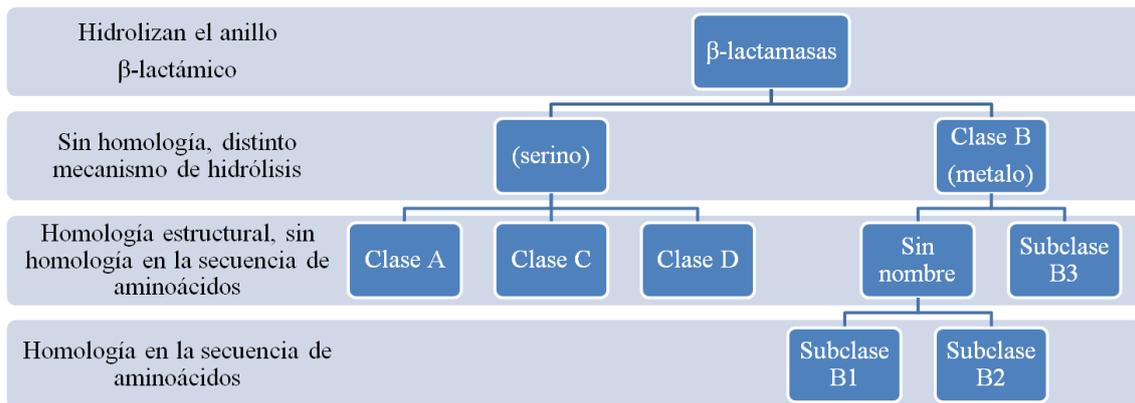
La **última y cuarta etapa**, que llega hasta nuestros días, consiste en la emergencia y diseminación de las carbapenemasas.

En la actualidad, ya han sido reportadas más de 1.300 β -lactamasas únicas. Para facilitar su estudio, estas enzimas se han separado en grupos, ya sea de acuerdo a sus secuencias de aminoácidos o de acuerdo a sus propiedades de inactivación frente a diferentes clases de β -lactámicos [66, 67].

Según su secuencia proteica, las β -lactamasas pueden clasificarse en 4 clases moleculares de Ambler (A, B, C y D) [62]. Las β -lactamasas de clase A, C y D son peniciloil-serino-transferasas con serina en su sitio activo y poseen similitud estructural

suficiente como para poseer un ancestro común; las de clase B son metalo-enzimas que requieren al menos de la presencia de un átomo de Zn^{2+} para su actividad y cuyo ancestro es distinto al de las serino- β -lactamasas. Se las puede subdividir en subclases moleculares B1, B2 y B3, teniendo B1 y B2 la homología suficiente como para agruparse juntas a partir de un mismo gen ancestral. (**Figura 1.18**) [68] .

Figura 1.18: Clasificación de Ambler. (Adaptado de [68])



Si bien la clasificación estructural de Ambler es simple y estable, existe una clasificación funcional propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995 y actualizada en el año 2010 que correlaciona la estructura proteica de la β -lactamasa con el perfil clínico de resistencia, lo que la transforma en un esquema más útil para el médico y el microbiólogo, aunque variable en el tiempo según van evolucionando las propiedades hidrolíticas de estas enzimas (**Figura 1.19** y **Tabla 1.2**) [56, 67, 69-71].

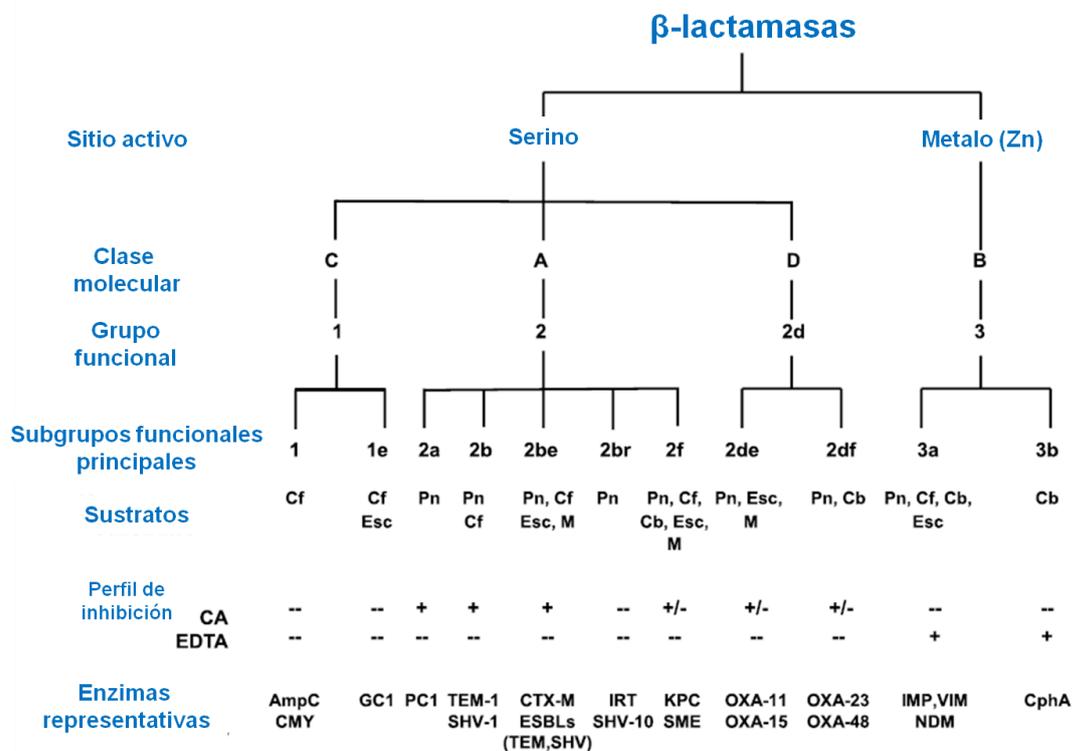
Como puede verse en la **Figura 1.19**, que relaciona ambos esquemas de clasificación, las β -lactamasas de la clase molecular C están asociadas a dos subgrupos funcionales, 1 y 1e, en los cuales se agrupan las enzimas que hidrolizan eficientemente cefalosporinas de primera generación y no se ven afectadas por los inhibidores clásicos de β -lactamasas; las enzimas del subgrupo 1e, llamadas también ESACs (del inglés, *extended spectrum AmpC*), pueden además hidrolizar cefalosporinas de tercera generación como ceftazidima.

El grupo funcional 2 de β -lactamasas que incluye a las clases moleculares A y D, contiene múltiples subgrupos funcionales que, consideradas como un todo, pueden hidrolizar a todos los β -lactámicos. Dentro de la clase A se encuentran dos de los subgrupos más importantes, las BLEE (subgrupo 2be) y las serino-carbapenemasas (subgrupo 2f). La mayoría de las enzimas dentro de esta clase son inhibidas por el ácido

clavulánico. Las β -lactamasas de clase D suelen hallarse en cepas de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Las β -lactamasas de clase B del grupo funcional 3 son metalo-enzimas que pueden hidrolizar todos los β -lactámicos con excepción de los monobactámicos. Estas enzimas no son inhibidas por ningún inhibidor de uso clínico disponible, ni siquiera por aquéllos en etapas tardías de desarrollo.

Figura 1.19: Características moleculares y funcionales de los grupos principales de β -lactamasas. Cb, carbapenemes; Cf, cefalosporinas de primera generación; CA, ácido clavulánico; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; Esc, cefalosporinas de espectro expandido; M, monobactámicos; Pn, penicilina. (Adaptado de [67]).



En la **Tabla 1.2** se alinean tanto la clasificación estructural como la funcional según los perfiles de hidrólisis frente a clases específicas de β -lactámicos y a las propiedades de inhibición frente a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

A continuación se describen en detalle las características de cada subgrupo.

Tabla 1.2: Clasificación de las β -lactamasas bacterianas más prevalentes a nivel mundial según Bush-Jacoby. En este esquema, los grupos de β -lactamasas mayoritarios son clasificados por su afinidad e hidrólisis de diferentes sustratos y por su susceptibilidad a la inhibición por varios inhibidores de β -lactamasas.(Adaptado de[71]).

Grupo Funcional	Clase Molecular	Sustrato Distintivo	Inhibible por AC o TZB	Inhibible por EDTA	Enzimas representantes
1	C	CEFALOSPORINAS	NO	NO	AmpC de enterobacterias
2a	A	PENICILINAS	SÍ	NO	PC1 y otras penicilinasas de estafilococos
2b	A	PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS	SÍ	NO	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	CEFALOSPORINAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y MONOBACTÁMICOS	SÍ	NO	BLEE-TEM, BLEE-SHV, CTX-M y PER
2br	A	PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS	NO	NO	TEM Resistentes a Inhibidores (IRTs)
2ber	A	PENICILINAS, CEFALOSPORINAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y MONOBACTAMES	NO	NO	Mutantes Complejas de TEM (CMTs)
2c	A	CARBENICILINAS	SÍ	NO	PSE-1 CARB-3
2d	D	CLOXACILINA	VARIABLE	NO	OXA-1, OXA-10
2de	D	PENICILINAS Y CEFALOSPORINAS DE ESPECTRO EXTENDIDO	VARIABLE		OxAs de espectro extendido
2df	D	CARBAPENEMES	VARIABLE	NO	OXA-23, OXA-48
2e	D	CARBAPENEMES, CLOXACILINA, OXACILINA	VARIABLE	NO	CepA
2f	A	CARBAPENEMES	VARIABLE	NO	KPC-2, IMI-1, SME-1
3	B	CARBAPENEMES	NO	SÍ	IMP, VIM

AC: Ácido clavulánico; TZB: Tazobactam; EDTA: Ácido etilen-diamino-tetra-acético

- **β -lactamasas del grupo 1 de Bush-Jacoby [67, 71, 72]:** Son cefalosporinas denominadas AmpC pertenecientes a la clase C de Ambler. Incluye enzimas codificadas por genes cromosómicos de muchas enterobacterias y genes plasmídicos. Son más activas frente a cefalosporinas clásicas que a bencil-penicilina y usualmente son resistentes a la inhibición por ácido clavulánico. Actúan también sobre cefamicinas (cefexitina). Poseen alta afinidad por aztreonam. En muchos microorganismos, incluyendo *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, la expresión de AmpC es baja pero

inducible en presencia de ciertos β -lactámicos como amoxicilina, ampicilina, cefoxitina, imipenem y ácido clavulánico. Otros microorganismos, incluyendo *E. coli* y *Acinetobacter baumannii*, carecen de uno o más de los componentes del sistema de inducción. Cuando estas enzimas se producen en grandes cantidades, especialmente ante la presencia de baja concentración del β -lactámico, pueden otorgar resistencia a carbapenemes. Las contrapartes plasmídicas de este grupo son las CMY, ACT, DHA, FOX y MIR. Este grupo incluye también a las β -lactamasas *AmpC de espectro extendido* (ESAC por *Extended Spectrum AmpC*) que poseen mayor actividad frente a ceftazidima como resultado de sustituciones aminoacídicas, inserciones o deleciones. Incluyen CMY-10, CMY-39 y CMY-37, entre otras. Son de importancia clínica en aquellos microorganismos en los cuales existe otro mecanismo de resistencia a los β -lactámicos.

- ***β -lactamasas del grupo 2 de Bush-Jacoby [67, 71, 72]:*** Formado por un grupo heterogéneo de enzimas de amplio espectro de sustrato pertenecientes a la clase A y D de Ambler (penicilinasas, cefalosporinasas, oxacilinasas y carbapenemasas). **Se dividen en diferentes subgrupos, uno de los cuales (2be) incluye las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE):**
 - *El subgrupo 2a está formado por penicilinasas que poseen un espectro limitado de actividad hidrolítica, preferentemente sobre bencil-penicilina y otros derivados de la penicilina con escasa actividad sobre cefalosporinas, carbapenemes o monobactámicos. La mayoría de estas enzimas son de codificación cromosómica, aunque hay penicilinasas estafilocócicas de codificación plasmídica.*
 - *El subgrupo 2b incluye a las β -lactamasas denominadas de espectro ampliado (BLEA). Hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de primera generación como cefaloridina y cefalotina y son fuertemente inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam. Incluyen a las enzimas plásmidicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1.*
 - *El subgrupo 2be está constituido por las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Poseen la actividad de las β -lactamasas del subgrupo 2b, sumada a la capacidad de hidrólisis de diferentes oximino-cefalosporinas como cefotaxima, ceftazidima, y aztreonam. A este subgrupo pertenecen las variantes mutacionales*

derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, y las CTX-M, además de otras menos frecuentes. Estas enzimas son inhibibles por ácido clavulánico.

- El subgrupo 2br comprende a las BLEA que además han adquirido resistencia a los inhibidores de β -lactamasas, como el ácido clavulánico. Son enzimas pertenecientes a las familias TEM y SHV, por ejemplo TEM-30 y TEM-31 (denominadas IRT-2 e IRT-1, respectivamente, por Inhibitor Resistant TEM).
- El subgrupo 2ber incluye enzimas de la familia TEM con espectro extendido que además poseen resistencia relativa a la inhibición por ácido clavulánico, también conocidas como CMT (Complex Mutant TEM).
- El subgrupo 2c está formado por penicilinasas con capacidad de hidrolizar carbenicilina o ticarcilina más rápidamente que penicilina. Estas β -lactamasas son inhibidas fácilmente por el ácido clavulánico y el tazobactam.
- El subgrupo 2ce contiene a la carbenicilinasas de espectro extendido (RTG-4 o CARB-10) con actividad expandida frente a cefepime y ceftiprome.
- El subgrupo 2d incluyó originalmente a las β -lactamasas capaces de hidrolizar oxacilina o cloxacilina más rápidamente que bencil-penicilina. Son enzimas que definieron a la familia OXA. Hoy se definen por motivos aminoacídicos conservados en lugar de su perfil de hidrólisis. Muchas de las enzimas pertenecientes a este subgrupo pueden ser inhibidas por NaCl.
- El subgrupo 2de son enzimas tipo OXA con espectro extendido. En general, la resistencia a ceftazidima es mayor que a cefotaxima o aztreonam.
- El subgrupo 2df comprende a las β -lactamasas OXA con actividad frente a carbapenemes. Sin embargo, aunque los microorganismos productores son altamente resistentes a estos antibióticos, los transformantes o transconjugantes de *E. coli* son por lo general sensibles y además, resistentes al ácido clavulánico. Se encuentran frecuentemente en el cromosoma de cepas de *Acinetobacter baumannii*, aunque se han identificado OXA plasmídicas de este subgrupo en *Enterobacteriaceae*, como OXA-23 y OXA-48.

- *El subgrupo 2e son cefalosporinasas con capacidad de hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido y son inhibibles por ácido clavulánico y tazobactam. A este subgrupo pertenecen las cefalosporinasas cromosómicas inducibles de la tribu Proteae. La única diferencia con la mayoría de las AmpC del grupo 1 o las BLEE es su escasa afinidad por aztreonam.*
- *El subgrupo 2f son serino-carbapenemasas de espectro extra-extendido que hidrolizan a algunos carbapenemes. Se inhiben mejor por tazobactam que por ácido clavulánico. Las cefalosporinas de espectro extendido como ceftazidima no son bien hidrolizadas, pero sí el aztreonam. A este subgrupo pertenecen algunas enzimas de las familias SME, GES, IMI, KPC.*
- β -lactamasas **del grupo 3 de Bush-Jacoby [67, 71, 72]**: Pertenecen a la clase molecular B de Ambler. Se trata de enzimas que requieren Zn^{2+} para su actividad (metalo- β -lactamasas; MBLs) y que son inhibidas por agentes quelantes como EDTA. La localización de los genes codificantes de las β -lactamasas de clase B puede ser cromosómica o plasmídica. Hidrolizan eficientemente carbapenemes, pero a diferencia de las serino- β -lactamasas, no hidrolizan monobactámicos y no son inhibidas por el ácido clavulánico. Se las divide estructuralmente en tres subclases (B1, B2 y B3), o funcionalmente, en dos subgrupos (3a y 3b):
- *El subgrupo 3a incluye a las MBLs plasmídicas de las familias IMP y VIM. Generalmente se encuentran en bacterias no fermentadoras de glucosa, pero también en algunas enterobacterias. Hidrolizan cefalosporinas, penicilinas y carbapenemes, pero no monobactámicos.*
- *El subgrupo 3b es un grupo pequeño de MBLs que hidrolizan preferentemente carbapenemes a diferencia de penicilinas y cefalosporinas.*

3.2 Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

La detección de estas enzimas se produjo poco después de la introducción de las oximino-cefalosporinas al esquema terapéutico antimicrobiano en la década del 80. Se trata de enzimas codificadas generalmente en plásmidos que hidrolizan cefalosporinas de primera (cefalexina, cefalotina, cefazolina), segunda (cefaclor, cefuroxima), tercera (cefotaxima, ceftazidima, cefixima y ceftriaxona), cuarta generación (cefepime y

cefpirome) y monobactámicos (aztreonam). No hidrolizan carbapenemes ni cefamicinas, y son inhibidas por los inhibidores clásicos de β -lactamasas como el ácido clavulánico [14, 73].

Se conocen múltiples familias de BLEE, entre las cuales se destacan las de clase A de las familias TEM, SHV y CTX-M, frecuentemente identificadas en *K. pneumoniae* y *E. coli* [13]. Además, existen muchas otras variantes, aunque minoritarias, tales como OXA, PER, GES, BEL, TLA, SFO, BES, IBC [62].

Las primeras BLEE identificadas a finales de la década de 1980 fueron variantes mutacionales puntuales de β -lactamasas de espectro ampliado de tipo TEM y SHV (grupo 2b de Bush-Jacoby) [74].

La primera β -lactamasa de tipo TEM, TEM-1, fue detectada en 1960 en una cepa de *E. coli* codificada en el transposón Tn3 de un plásmido conjugativo [74]. El rápido aumento de su prevalencia se explica justamente debido a su localización genética. Las BLEE de tipo TEM, la mayoría de las cuales son de localización plasmídica, son mutantes puntuales de TEM-1 y/o TEM-2. Éstas son β -lactamasas de espectro ampliado que hidrolizan ampicilina eficientemente, pero carecen de actividad frente a oximinocefalosporinas. Se cree que TEM-3 fue la primera BLEE de esta clase en ser caracterizada en 1988, aunque TEM-12 fue detectada en una cepa de *Klebsiella oxytoca* resistente a ceftazidima en Inglaterra en 1982. Éstas y otras variantes fueron surgiendo a partir de la acumulación de mutaciones puntuales en codones codificantes de determinados aminoácidos, siendo las más prevalentes y relevantes en la adquisición del perfil de BLEE las sustituciones aminoacídicas Gln39Lys, Glu104Lys, Arg164Ser/His/Cys, Gly238Ser, y Glu240Lys [66]. El análisis de la estructura cristalográfica de TEM-1 sugiere que cuando sufre estas sustituciones, se acomodan mejor los sustratos voluminosos en la cavidad del sitio activo, como las cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, aunque estas sustituciones expanden el espectro de acción, provocan una disminución en la eficiencia catalítica frente a ampicilina. Las BLEE de tipo TEM son y han sido asociadas frecuentemente a brotes hospitalarios, solas o acompañadas por otras clases de BLEE y metalo- β -lactamasas como VIM e IMP [74].

La β -lactamasa de espectro ampliado SHV-1 fue descrita por primera vez en una cepa de *K. pneumoniae* y luego en otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Los análisis evolutivos y de secuencia confirman que SHV-1 fue movilizada desde el

cromosoma de *K. pneumoniae* hacia plásmidos por la secuencia de inserción IS26. Al igual que para las TEM, las variantes BLEE de SHV-1 plasmídica surgieron tras la acumulación de mutaciones puntuales. SHV-1 hidroliza penicilinas y cefalosporinas de primera generación. Un único cambio aminoacídico Ser238Gly la transforma en SHV-2, una BLEE que amplía su espectro de actividad a cefalosporinas de tercera generación. SHV-2 fue la primera BLEE de tipo SHV detectada y pertenecía a una cepa de *Klebsiella ozaenae* aislada en Alemania en 1983. Desde entonces, han surgido otras variantes, pero en su mayoría poseen la sustitución Ser238Gly junto a otras. Particularmente importante es el cambio Glu240Lys, presente en SHV-5. Ambas sustituciones son críticas a la hora de determinar el fenotipo de BLEE, dado que Ser238 y Lys240 tienen un rol muy importante en la hidrólisis de cefotaxima y ceftazidima. Ambas sustituciones también se encuentran entre las variantes BLEE de la familia TEM [74].

Las cepas con BLEE tienen distribución mundial. Durante un tiempo el problema estuvo localizado en hospitales y los principales tipos enzimáticos pertenecían a las familias TEM y SHV. Esta situación ha cambiado de forma drástica en la última década, en la que se han comenzado a aislar de forma cada vez más frecuente cepas productoras de BLEE en el medio extrahospitalario, habiéndose observado un crecimiento enorme de las β -lactamasas de la familia CTX-M, y describiéndose, además, en otras especies (*P. mirabilis*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella enterica*, etc.). El predominio de enzimas CTX-M, tanto en *E. coli* como en *K.pneumoniae*, y el incremento de infecciones fuera del entorno hospitalario se está observando en todo el mundo [13]. Esto puede atribuirse a la diseminación de plásmidos y otras plataformas genéticas móviles, así como también a la expansión de clones epidémicos portadores de los genes. Como consecuencia, la prevalencia de variantes específicas de CTX-M alcanza proporciones endémicas en algunos países (ver más adelante) [75].

Las primeras dos BLEE de tipo CTX-M fueron identificadas aproximadamente al mismo tiempo a principios de la década de 1990 en Europa occidental y Argentina. Desde entonces, **se han transformado en la familia de BLEE más prevalente de todo el mundo** [76].

3.3 La familia CTX-M

Las β -lactamasas CTX-M son BLEE que hidrolizan preferencialmente cefotaxima y ceftriaxona. Actualmente este grupo está constituido por 163 miembros (<http://www.lahey.org/studies/webt.asp>; enero 2015), entre variantes plasmídicas y cromosómicas, agrupadas en al menos 5 *clusters* o sub-familias, siendo CTX-M-3 (originalmente CTX-M-1), CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 las propuestas como representantes de cada uno. El grado de divergencia en las secuencias aminoacídicas entre cada grupo está entre el 9-25% y es menor al 4% dentro de cada sub-familia [77]. Las enzimas CTX-M plasmídicas confieren altos niveles de resistencia a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos. Entre las cefalosporinas de tercera generación, la mayoría de los microorganismos portadores de estas β -lactamasas presenta valores de CIM mayores para cefotaxima o ceftriaxona que para ceftazidima, la otra oximino-cefalosporina más utilizada clínicamente, para la cual incluso a veces se encuentran dentro del rango de “sensible”. Por esta razón, estas enzimas también se conocen como “**cefotaximasas**”.

Aunque los primeros reportes ocurrieron a fines de los '80, la mayoría de los microorganismos productores no fueron detectados hasta que el CLSI modificó las recomendaciones para la detección de BLEE. Al principio, los test confirmatorios recomendaban el uso de ceftazidima solamente para la detección de estas enzimas. Dado que la mayoría de las CTX-M hidrolizan cefotaxima más eficientemente, muchas de ellas no eran detectadas, excepto en países como la Argentina, donde el uso mayoritario corresponde a ceftriaxona. En Argentina, el sistema de relevamiento de la resistencia local (SIR, organizado por la Subcomisión de Antimicrobianos de la Asociación Argentina de Microbiología) comenzó a detectar estas enzimas mucho antes que el CLSI estableciera nuevos métodos de detección y la modificación de los puntos de corte, y de hecho modificó localmente estos puntos de corte que fueron rápidamente adoptados por otros países de la región. Hoy, en cambio, los microorganismos productores de BLEE son fácilmente detectados siguiendo las normas del CLSI que finalmente recomiendan el uso de cefotaxima y ceftazidima para sospechar de la presencia de BLEE en cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus spp.*. En aquellos microorganismos productores de AmpC inducible suele ser útil emplear como drogas indicadoras cefepime o ceftodoxime.

La mayoría de las enzimas de tipo CTX-M pueden ser encontradas en microorganismos hospitalarios y de la comunidad de aislamiento frecuente como *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *M. morganii* y otras especies de *Enterobacteriaceae*, pero también se han encontrado en *P. aeruginosa*, *Aeromonas sp.* e incluso *Vibrio cholerae* [74, 78].

En la actualidad muchos países presentan una situación endémica relacionada con la amplia presencia de algunos tipos de CTX-M en particular, como es el caso de CTX-M-9 y CTX-M-14 en España, CTX-M-1 en Italia y CTX-M-2 en muchos países sudamericanos, Japón e Israel, mientras que CTX-M-15 ha sido detectada en todo el mundo [79].

A continuación se describen brevemente aspectos epidemiológicos de cada una de las subfamilias de CTX-M [44, 74, 80] (**Figura 1.20**):

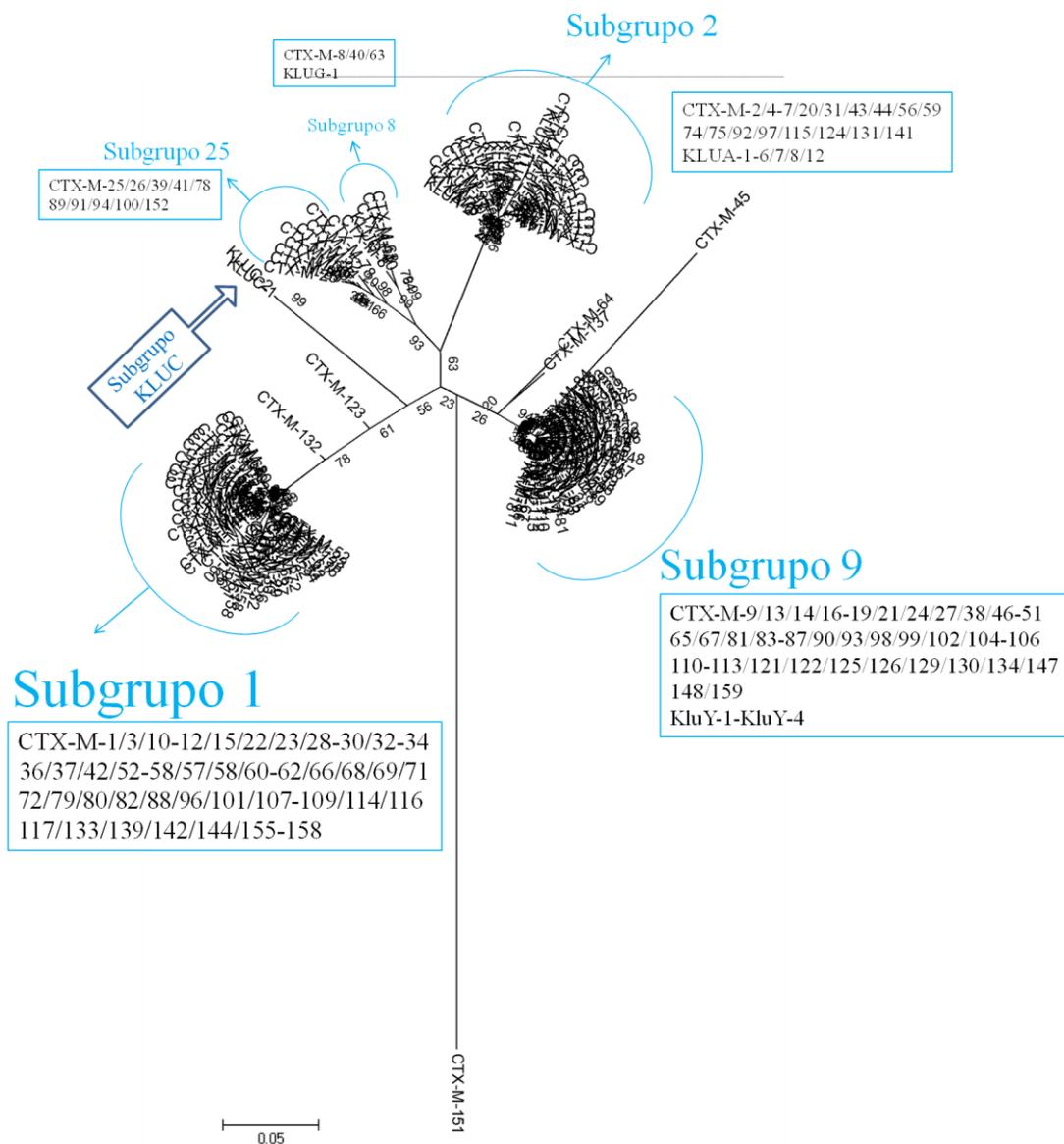
Subgrupo CTX-M-1: *FEC-1 fue probablemente la primera enzima reportada de este subgrupo, producida por una cepa de E. coli aislada en Japón en 1986. Esta enzima poseía un perfil típico de “cefotaximasa” con alta eficiencia de hidrólisis (si bien medidas como $V_{m\acute{a}x}/K_m$) frente a amino-penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación y frente a algunas oximino-cefalosporinas como cefotaxima y ceftriaxona, mientras ceftazidima e imipenen no eran hidrolizados.*

La β -lactamasa CTX-M-1/MEN-1 fue detectada y aislada casi al mismo tiempo en Alemania y Francia, a partir de aislamientos de Salmonella Typhimurium y Klebsiella oxytoca respectivamente en 1989. MEN-1 fue la primera BLEE secuenciada distinta a las variantes BLEE de TEM y SHV prevalentes en ese momento, con las que compartía menos del 40% de identidad aminoacídica.

*CTX-M-3 difiere de CTX-M-1 en cuatro posiciones aminoacídicas, y fue detectada por primera vez en Polonia en 1996 en aislamientos de enterobacterias. A partir de su primera descripción, CTX-M-3 comenzó a diseminarse dentro de Polonia y rápidamente en un amplio rango de países: Francia, Grecia, Japón, Taiwán, China, y en diferentes especies bacterianas, principalmente especies de enterobacteria (*E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Salmonella Typhimurium*, entre otras). Actualmente, CTX-M-3 se encuentra ampliamente diseminada en toda Europa (Polonia, Francia, Italia, Turquía, Bulgaria,*

Noruega, Gran Bretaña), Asia (China, India, Corea, Tailandia, Japón), Oceanía (Australia) y África (Argelia).

Figura 1.20: Divergencia molecular de la familia CTX-M. El diagrama del árbol indica la similitud entre las enzimas de la familia CTX-M en base al alineamiento obtenido con el programa MEGA5 a partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas maduras, obtenidas de la base de datos de *Lahey Clinic* (<http://www.lahey.org/Studies/>). El tamaño de cada rama refleja la cantidad de variantes en cada subgrupo. Al costado de cada rama se señalan en el recuadro las CTX-M's integrantes del subgrupo. KLUC-1 y KLUC-2 formarían parte de un subgrupo nuevo, que algunos autores bautizaron *Subgrupo KLUC* [81] CTX-M-45/64/123/132 y 137 son, aparentemente, variantes híbridas de otras dos CTX-M por recombinación. CTX-M-151 parece ser una variante híbrida atípica, con inserciones y mutaciones puntuales con respecto a CTX-M-14 y CTX-M-15, pero su caracterización no ha sido publicada.



Algunas β -lactamasas prevalentes de este subgrupo son: CTX-M-1, que se encuentra en Italia, España, Francia, Portugal, Grecia y Gran Bretaña), CTX-M-32 (España, Portugal, Italia, Corea) y CTX-M-15 (todo el mundo).

Subgrupo CTX-M-2: El primer miembro reportado en este subgrupo fue CTX-M-2, el cual se ha diseminado desde finales de los años '80. Hizo su aparición en forma "explosiva" entre aislamientos de *Salmonella* sp. resistentes a cefotaxima, en los que fue originalmente detectada por ensayos fenotípicos, aislados inicialmente en un hospital de La Plata (Sor María Ludovica) a partir de los que se diseminó luego muy rápidamente a salas de neonatología de dos hospitales de Buenos Aires, Hospital de Pediatría S.A.M.I.C "Prof. Dr. Juan P. Garrahan y Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez". El gen codificante de CTX-M-2 se encontraba en un plásmido, la β -lactamasa tenía gran actividad hidrolítica sobre cefotaxima y era susceptible a inhibidores. Cuando se obtuvo la secuencia del gen en 1990, se confirmó que se trataba de una nueva variante que poseía 84% de identidad aminoacídica con CTX-M-1 y 78% de identidad con la β -lactamasa cromosómica de *Klebsiella oxytoca*. Desde su aparición, CTX-M-2 se ha hallado en casi todos los microorganismos de nuestro país resistentes a cefotaxima aislados de la clínica y la comunidad, en enterobacterias y pseudomonas. CTX-M-2 se ha convertido en la BLEE más prevalente en Sudamérica (aunque en algunos casos no existen reportes "oficiales"), especialmente en Uruguay, Perú, Bolivia y Paraguay, y también está distribuida en Japón e Israel. Se han notificado otros reportes (algunos de ellos esporádicos) en diferentes países incluyendo Bélgica y Francia, Brasil, Gran Bretaña, Italia, Turquía, Sudáfrica y Colombia.

Subgrupo CTX-M-8: Este grupo incluye pocos representantes, siendo CTX-M-8 la primera enzima detectada en tres enterobacterias productoras de AmpC (*E. cloacae*, *E. aerogenes* y *Citrobacter amalonaticus*) que fueron aisladas en Brasil. Desde su primera descripción, fue reportada en un número de casos limitado, al igual que lo sucedido con otros miembros de este subgrupo como CTX-M-40 y CTX-M-41/63 (la secuencia aminoacídica de estas dos últimas enzimas es idéntica).

Subgrupo CTX-M-9: La primera enzima reportada de este grupo fue CTX-M-9, aislada de una cepa de *E. coli* resistente a cefotaxima en 1996 en España, donde se detectó nuevamente un año más tarde en cuatro aislamientos de *Salmonella* Virchow. Durante el mismo período se reportaron otros aislamientos productores de enzimas

CTX-M-9, todos recolectados en Brasil, incluyendo un aislamiento productor de una nueva variante: CTX-M-16.

Hacia fines de los '90, CTX-M-9 junto a CTX-M-14 se volvieron prevalentes en varios países (España, Francia, Portugal, Gran Bretaña, China, Japón, Corea, Tailandia, Hong Kong, Túnez, Egipto, Estados Unidos, Canadá, Perú, entre otros).

Subgrupo CTX-M-25: *Este grupo incluye ocho miembros, siendo CTX-M-25 y CTX-M-26 los primeros en ser descritos; fueron detectados en un aislamiento de E. coli aislado en Canadá, y en un aislamiento de Klebsiella pneumoniae de Gran Bretaña, respectivamente. En sus comienzos estas dos β -lactamasas fueron consideradas como parte del subgrupo CTX-M-8 debido a su similitud, pero hoy representan un subgrupo emergente y en aumento. Otras β -lactamasas pertenecientes a este subgrupo son CTX-M-39, -89, -91, -94, -100. Estas enzimas fueron detectadas en Israel y Estados Unidos.*

Otras CTX-M [82-85]: *Existe otro grupo de β -lactamasas CTX-M que no pueden agruparse adecuadamente dentro de los subgrupos existentes debido a la falta de una relación filogenética estrecha.*

Un ejemplo atípico es CTX-M-45, anteriormente conocida como TOHO-2. El gen de esta enzima carece de seis nucleótidos que producen saltos en el marco de lectura. Cuando se realiza el alineamiento de su secuencia teniendo en cuenta dichos "saltos", el porcentaje de identidad de bla_{CTX-M-45} se eleva hasta alcanzar un valor similar al de las demás secuencias alineadas dentro del subgrupo CTX-M-9. Esta enzima fue descrita en un aislamiento de E. coli resistente a cefotaxima aislado en Japón en 1995 y desde entonces no ha sido detectada en ninguna otra ocasión.

Por otro lado, existen otras β -lactamasas de tipo CTX-M que parecen ser híbridos generados por recombinación homóloga entre otras dos enzimas, una del subgrupo 1 y otra del subgrupo 9. Tal es el caso de CTX-M-64, -123, -132 y -137. Estos cuatro híbridos han sido detectados en el sur de China, tanto en seres humanos como en animales y sus derivados.

En Argentina y países limítrofes, más del 80% de la resistencia a oximinocefalosporinas en aislamientos de microorganismos gram negativos se debe principalmente a la producción de alguna variante de CTX-M, esencialmente CTX-M-2 como la más prevalente y CTX-M-15 como emergente [86, 87]. En un estudio epidemiológico realizado en Argentina en el año 2010 [88], más del 90% de las

enterobacterias resistentes a oximino-cefalosporinas aisladas de diferentes hospitales producían al menos una β -lactamasa CTX-M derivada. De todas las cepas productoras de CTX-M, 55% producían CTX-M-2 y 40% CTX-M-15. Esto demuestra que si bien CTX-M-2 continúa siendo la BLEE más prevalente en el país, tal y como se reportara en el 2003, en el que más del 90% de las cepas productoras de CTX-M poseían CTX-M-2, la emergencia y diseminación de CTX-M-15 está desplazándola, tal y como lo hace con cualquier otra CTX-M anteriormente prevalente en otras partes del mundo. La emergencia de CTX-M-15 fue observada tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*.

3.3.1 Elementos móviles: Origen y movilización de la familia CTX-M

A diferencia de lo ocurrido con las BLEE de las familias TEM y SHV, las CTX-M no parecen haber surgido por alteraciones o mutaciones puntuales en enzimas de espectro de menor actividad ya diseminadas en plásmidos, sino por reclutamiento de genes preexistentes en el DNA cromosómico de especies de *Kluyvera* [76, 89-93]. Éstos son microorganismos sensibles a las oximino-cefalosporinas encontrados habitualmente en el ambiente y aislados sólo esporádicamente en el ámbito hospitalario, a partir de los cuales fueron capturados los genes bla_{CTX-M} como genes “preformados” por medio de unos pocos eventos de recombinación y movilización [62, 77, 94, 95].

Los genes bla_{CTX-M} (originalmente bla_{KLU}) preexistentes en el cromosoma de *Kluyvera* son expresados muy débilmente en su contexto original y requieren de promotores fuertes corriente arriba para elevar los niveles de CIM y en consecuencia dar origen a un fenotipo de resistencia a las oximino-cefalosporinas. Estos promotores han sido provistos por secuencias de inserción (IS) en cepas resistentes pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, siendo las más prevalentes *ISEcp1* e *ISCRI* [78, 89, 96-99]. Genes codificantes de β -lactamasas CTX-M pertenecientes a los subgrupos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 y CTX-M-25 han sido hallados corriente abajo de *ISEcp1*, mientras que miembros de los sugrupos CTX-M-2 y CTX-M-9 lo han sido de *ISCRI* encontrada en integrones complejos de clase 1 [76].

La asociación de los genes bla_{CTX-M} con elementos móviles como secuencias de inserción (IS), genes cassette/integrones y transposones de las familias Tn3 y Tn5053, asociados a su vez a plásmidos, es lo que ha permitido su diseminación y persistencia a lo largo del tiempo (**Figura 1.21**) [100]:

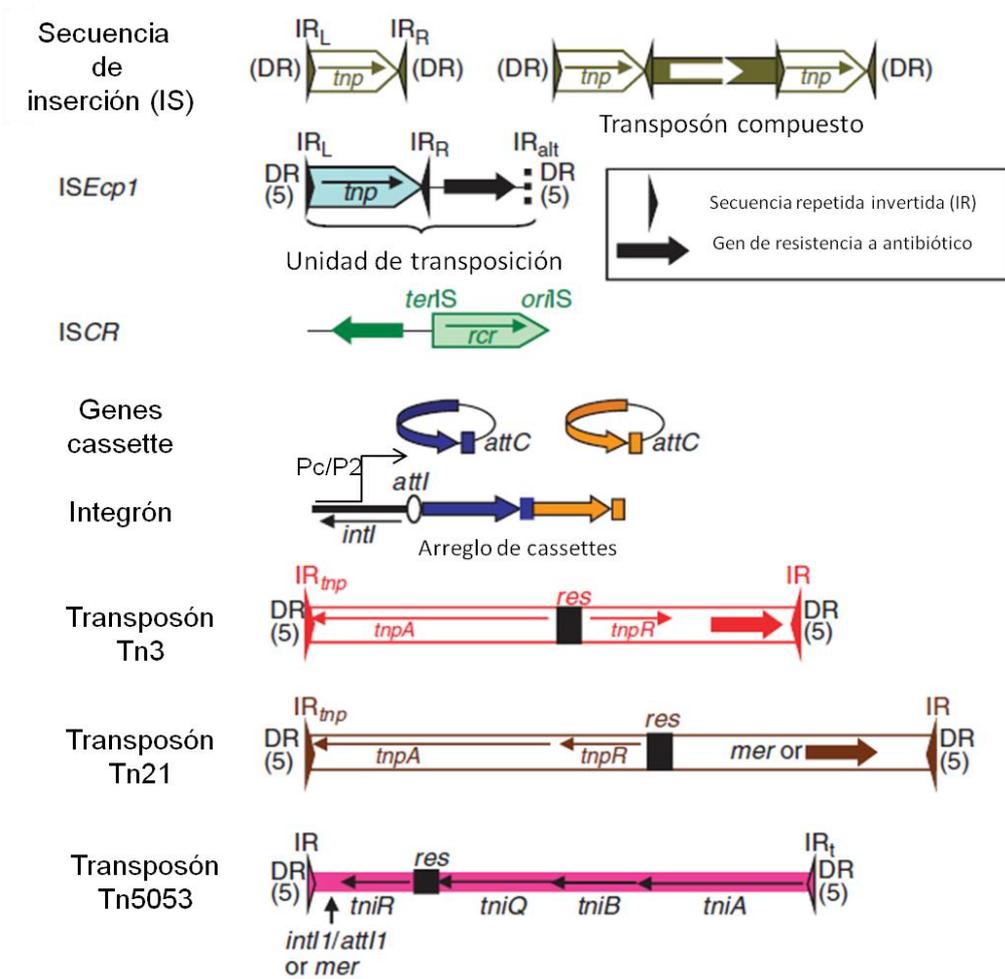
- **Secuencias de Inserción**

Las IS son los elementos genéticos más pequeños (menos de 2,5 kb) y abundantes capaces de movilizarse o trasponerse de manera independiente. Codifican una enzima denominada transposasa que es la responsable de su movilización e inserción; el gen de la transposasa se encuentra entre dos secuencias repetidas invertidas cortas que son los sitios reconocidos para iniciar la transposición, IR_L a la izquierda en relación a la dirección de transcripción del gen de la transposasa, e IR_R a la derecha (IR por *Inverted Repeats*) (**Figura 1.21**). Cuando la transposasa reconoce estas regiones, se produce la movilización de la IS a un nuevo sitio mediante un proceso de “corte y pegue” o bien “copie y pegue” desde su sitio de inserción original, dependiendo de las características de la IS en particular. La transposición de la mayoría de las IS genera repeticiones directas (DR, por *Direct Repeats*) de ADN en ambos extremos en el nuevo sitio de inserción, de aproximadamente 2 a 14 pares de bases de longitud [101, 102].

Aunque una IS clásica no transfiere genes de resistencia, cuando dos copias de la misma IS (o bien dos copias de IS relacionadas) se insertan a ambos lados de un gen de resistencia, forman un transposón compuesto que puede movilizarse como una sola unidad. Además de causar mutaciones insercionales, rearrreglos genómicos y movilización y diseminación de genes de resistencia y virulencia, las IS pueden activar la expresión de genes vecinos. **En particular, ISEcp1 e ISCR1 son IS no clásicas dado que una única copia puede capturar y movilizar genes de resistencia asociados** [101].

Los **elementos ISCR** poseen un mecanismo de transposición característico en *círculo rodante*. Estos elementos, en lugar de encontrarse flanqueados por IR, presentan un origen de replicación oriIS río abajo del gen codificante de una supuesta recombinasa en círculo rodante o *rcr* (el nombre sugerido para la “transposasa” de estas estructuras), y uno de terminación llamado terIS ubicado río arriba, cada uno de los cuales incluye repeticiones cortas (**Figura 1.21**) [101]. Aparentemente, luego de iniciada la replicación desde oriIS y ante la falla en el reconocimiento de terIS, estos elementos replicarían y movilizarían genes adyacentes a su secuencia y no generarían repeticiones directas al insertarse en un nuevo sitio [103].

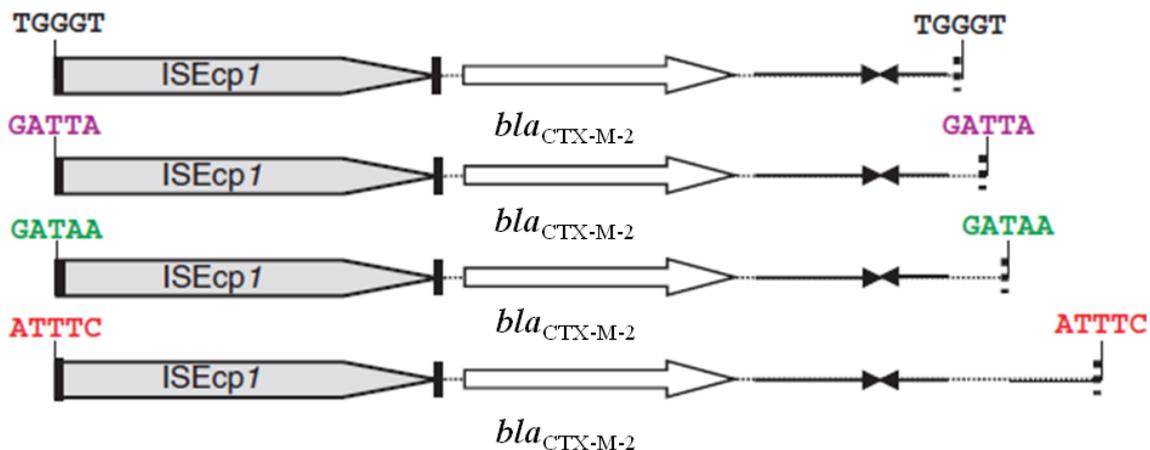
Figura 1.21: Esquema que resume las características de los elementos genéticos móviles involucrados en la captura y movilización de genes de resistencia a antibióticos en bacterias gram negativas. *tnp*, *tni*, funciones de transposición; IR_L e IR_R , repeticiones invertidas izquierda y derecha; IR_{alt} , IR alternativa; *rcr*, replicasa en círculo rodante; *oriIS*, origen de replicación de ISCR; *terIS*, señal de terminación de la replicación de ISCR; *res*, sitio *res*. Los elementos que generan repeticiones directas DR cuando se insertan y la longitud de DR están indicados, salvo para las IS, cuyas DR son de tamaño variable. La subfamilia de transposones Tn21 puede transportar resistencia en integrones de clase 1 insertos cerca del sitio *res*. (Adaptado de [102]).



Por otro lado, **ISEcp1** pertenece a la familia *IS1380*, tiene una longitud de 1.656 pares de bases (bp), está flanqueado por IR de 14 bp y moviliza regiones vecinas a través de un mecanismo conocido en inglés como *one-ended transposition*. Durante esta transposición, la transposasa falla en reconocer IR_R y emplea una secuencia río abajo poco relacionada con IR_L que puede designarse IR_{alt} (por alternativa). De esta manera, cuando se combinan IR_L e IR_{alt} , se genera una unidad de transposición de tamaño variable. Es casi imposible asignar una secuencia consenso para IR_{alt} , por lo que *ISEcp1*

tiene el potencial de movilizar regiones que, al tener tamaño variable, pueden incluir más de un gen de resistencia (**Figura 1.22**) [101].

Figura 1.22: Unidades de transposición de *ISEcp1*. Se esquematizan unidades de transposición de *ISEcp1* transportando *bla*_{CTX-M-2}. IR_L e IR_R se indican con rectángulos negros, IR_{alt} con barras punteadas. (Adaptado de [102]).



- **Genes en cassette e integrones**

Según la definición propuesta por Hall y Collis en 1995, un integrón es un “elemento dinámico que contiene los determinantes genéticos de los componentes de un sistema de recombinación específica de sitio que reconoce y captura genes en cassette móviles” [104, 105].

La estructura mínima de un integrón incluye (**Figura 1.21**):

- 1- El gen para la integrasa (*intI*), que codifica una tirosina-recombinasa específica de sitio.
- 2- Un sitio adyacente de recombinación (*attI*), el cual es reconocido por la integrasa y actúa como receptor de los genes en cassette.
- 3- Al menos un promotor (Pc o P2), orientado para la expresión de los genes capturados. El gen *intI* contiene su propio promotor y, en general, se expresa en forma divergente a los genes capturados.

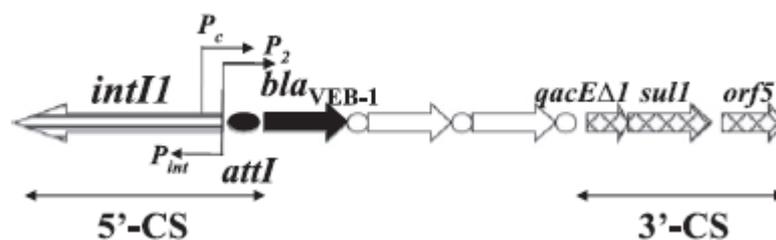
Los cassettes son elementos móviles cuya secuencia incluye el marco de lectura de un gen y un sitio de recombinación específico para integrasa conocido como elemento 59-be o sitio *attC*. La integrasa cataliza la recombinación específica de sitio entre *attI* y *attC* o bien entre dos *attC* para insertar o liberar los cassettes del integrón. Muchos

cassettes pueden ser integrados en tándem creando un arreglo cuya expresión será dirigida por P_c/P_2 . Los genes en cassette pueden existir dentro de la célula bacteriana como moléculas circulares a la espera de ser reclutadas, pero no codifican el mecanismo necesario para su propia movilidad, por lo que en general son hallados insertos en integrones y, sólo ocasionalmente, en sitios secundarios [106].

Los integrones encontrados más usualmente son los de clase 1 “clínicos” o de tipo “*sulI*”. Son los más prevalentes en bacilos gram negativos y en general presentan pocos genes en cassette asociados. Contienen dos segmentos conservados que flanquean una región central (región variable), donde se insertan los cassettes que codifican la resistencia a antibióticos. El segmento 5’ conservado (5’-CS) incluye al gen de la integrasa y el sitio adyacente de recombinación *attI1*. El segmento 3’ conservado (3’-CS) en general incluye un gen truncado que codifica resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔI*), otro de resistencia a sulfonamidas (*sulI*), y uno o dos marcos de lectura abiertos (*orf5* y *orf6*) de función desconocida (**Figura 1.23**). Los genes en cassette son integrados en la región variable [100].

Se describieron desde integrones con región variable nula, como en In0, hasta algunos con más de siete genes en cassette; sin embargo, la presencia de dos o tres cassettes suele ser lo más habitual en las secuencias depositadas en las bases de datos. Los más de 100 cassettes descritos confieren resistencia a casi todas las familias de antibióticos (β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima, sulfonamidas, cloranfenicol, rifampicina, lincosaminas, macrólidos, quinolonas), desinfectantes y antisépticos [104].

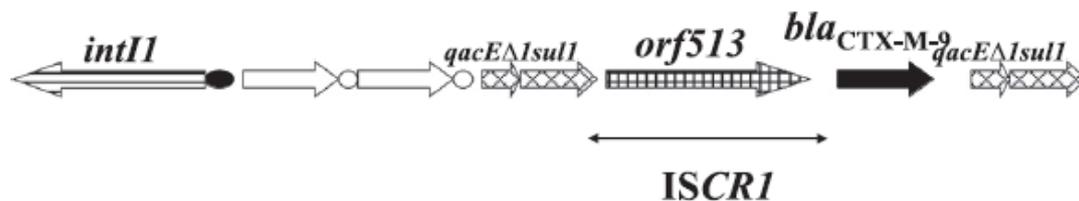
Figura 1.23: Integron de clase 1. Se indican las regiones conservadas 5’-CS y 3’-CS y el gen en cassette *bla_{VEB-1}* entre ellas. *intI1*, gen de la integrasa; *attI*, sitio de recombinación; flechas blancas, genes en cassette con su respectiva región 59-be indicada con un círculo blanco; P_c y P_2 , promotores. (Adaptado de [100]).



En los años '90, Stokes y colaboradores identificaron integrones inusuales o complejos de clase 1 que contenían regiones comunes CR (CR, de *Common Region*) ubicadas

entre dos copias de la región conservada 3'-CS del integrón. Cuando se corroboró la relación de aquéllas con la familia IS91, se las denominó ISCR. ISCR tiene una longitud de 2,1 kb idéntica en todos los casos, seguida por una región variable que contiene genes de resistencia (**Figura 1.24**). En la región idéntica se encuentra un marco de lectura abierto denominado orf513 (anteriormente orf341), que podría codificar una recombinasa que reconocería otro sitio de recombinación donde se insertarían los genes de resistencia carentes de *attC* (y que por lo tanto, no son genes en cassette) [107].

Figura 1.24: Integrón inusual de clase 1. Nótese el gen *bla*_{CTX-M-9} asociado a ISCR1 y la duplicación del fragmento *qacE* Δ 1/*sul1*. (Adaptado de [100]).



En los integrones complejos de clase 1, los genes de resistencia se encuentran adyacentes al extremo oriIS de ISCR1. La transposición en círculo rodante de ISCR1 propuesta por Toleman seguida de recombinación homóloga, podría explicar los cambios estructurales observados en los integrones inusuales [108, 109].

Los análisis realizados sobre estos elementos han concluído que contienen en su secuencia posibles regiones promotoras -10 y -35 que permitirían o reforzarían la expresión de los genes de resistencia adyacentes [104].

- **Transposones de la familia Tn5053**

Los transposones de esta familia poseen tres genes que codifican para la transposasa, *tniA*, *tniB* y *tniQ* (o *tniD*) separados del gen de la resolvasa *tniR* por el sitio *res*, y están flanqueados por IR de 25 bp de longitud. Las proteínas TniA, TniB y TniQ median la formación de un cointegrado que se resuelve mediante recombinación catalizada por TniR en el sitio *res*. Se generan DR de 5 pb durante la transposición. Los miembros de Tn5053 usan como blanco de recombinación el sitio *res* de la subfamilia Tn21 y regiones relacionadas llamadas *par* en plásmidos y pueden transportar integrones de clase 1 y/o operones de resistencia al mercurio [102, 110].

- **Transposones de la familia Tn3**

Esta familia incluye dos subfamilias, Tn3 y Tn21. Ambos tipos se encuentran flanqueados por IR de 38 bp e incluyen el gen de la transposasa *tnpA*, el gen de la resolvasa *tnpR* y el sitio de resolución *res*. Estos transposones se movilizan de manera replicativa, lo que involucra el reconocimiento de secuencias IR por TnpA y la generación de un cointegrado intermediario formado por la molécula dadora del transposón y la molécula receptora, ambas separadas por dos copias de aquél. El cointegrado es resuelto por recombinación específica de sitio por la resolvasa TnpR entre sitios *res* orientados de manera directa. El mecanismo de transposición genera DR de 5 bp. Los dos subgrupos se distinguen entre sí por diferencias en su secuencia y la organización de sus genes [102, 110].

El reclutamiento de los elementos descritos pudo haber sido el resultado del azar combinado con cierto grado de preselección. Es claro que sólo una pequeña parte de todos los elementos móviles disponibles ha sido reclutada en los patógenos desde el ambiente, pero la selección los ha hecho extraordinariamente prevalentes [101, 111].

En resumen, existe una clara tendencia a que los elementos descritos antes, formen rearrreglos de asociación complejos que podemos llamar “regiones de multirresistencia” o MRR (del inglés, *multi-resistance region*). Estas interacciones multifactoriales incrementan las oportunidades de reclutamiento de nuevos genes de resistencia en microorganismos patógenos [102, 111].

Por último, los rearrreglos que acabamos de describir se han acumulado recientemente en plásmidos promiscuos, de manera tal que se alcanza la eficiencia máxima a la hora de acelerar la evolución de los mecanismos de resistencia.

- **Plásmidos**

Los plásmidos son moléculas extracromosomales de ADN que pueden replicarse de manera autónoma. Pueden adquirir elementos genéticos móviles como transposones y secuencias de inserción que sean portadores a su vez de genes de resistencia a antibióticos, incluyendo β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprima, macrólidos y quinolonas. Según si poseen un rango de huésped amplio o estrecho y su eficiencia de conjugación, son capaces de transferir resistencia horizontalmente [112].

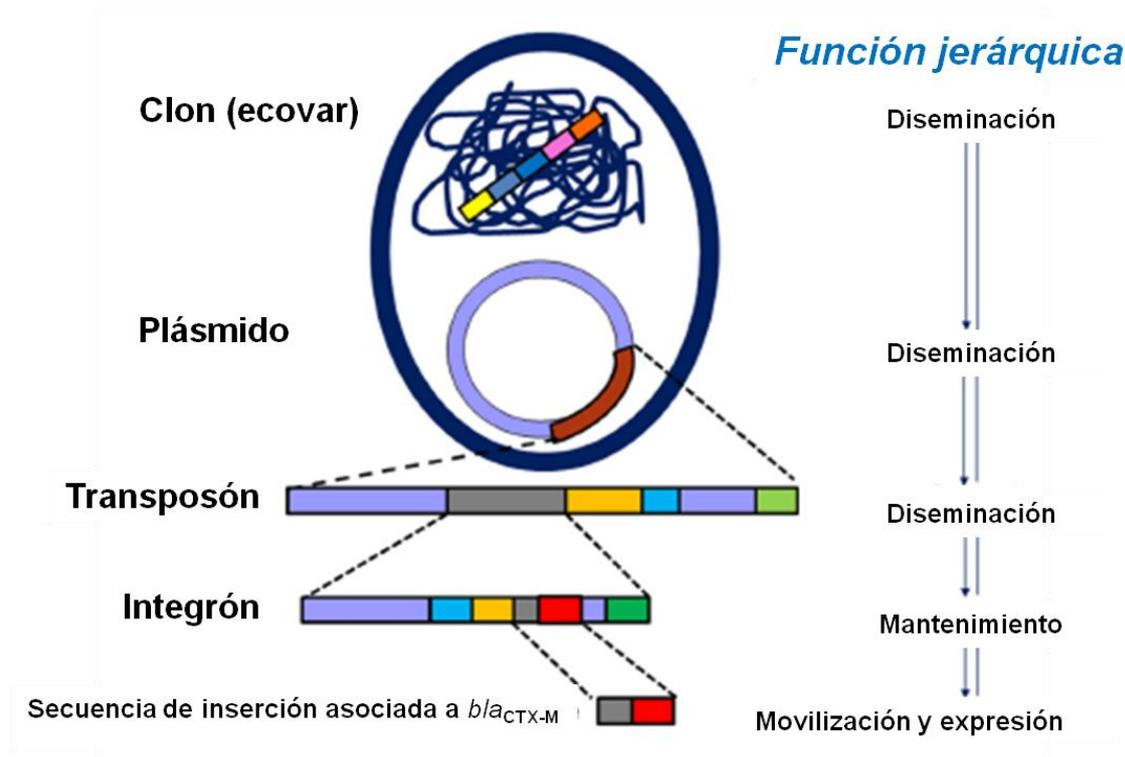
Los plásmidos contienen un replicón básico que consiste en el origen de replicación *ori* y genes codificantes de proteínas Rep iniciadoras de la replicación que regulan el proceso de replicación y el número de copias. Dos plásmidos que comparten el mismo replicón no pueden ser propagados en la misma célula bacteriana. Este fenómeno se conoce como incompatibilidad plasmídica y ha sido utilizado para clasificar a los plásmidos en grupos de incompatibilidad *Inc*. Esto significa que los plásmidos que comparten el mismo sistema de control de la replicación son incompatibles mientras que no lo son si aquél es distinto. La amplificación por PCR del replicón es un método sencillo para tipificar las familias más importantes de plásmidos circulantes entre las enterobacterias [113].

CTX-M y su entorno genético

Como mencionáramos antes, los genes *bla*_{CTX-M} han sido descritos dentro de contextos genéticos variados que incluyen IS, integrones y transposones. Éstas estructuras están integradas a su vez en otras más complejas tales como plásmidos conjugativos de grupos de incompatibilidad variados y clones bacterianos exitosos que se diseminan con increíble facilidad (**Figura 1.25**). Muchos de estos elementos genéticos y plásmidos son portadores también de genes de resistencia que codifican β -lactamasas de tipo AmpC, carbapenemasas, mediadores plasmídicos de resistencia a quinolonas (PMQR) como genes *qnr* y metilasas de aminoglucósidos, lo que lleva al mantenimiento de *bla*_{CTX-M} debido al proceso de **coselección** [78, 100].

Diferentes IS han sido encontradas río arriba de los genes *bla*_{CTX-M}, como *ISEcp1*, *ISCR1*, *IS10* e *IS26*, y en casos aislados han sido hallados elementos relacionados con fagos. Sin embargo, *ISEcp1* e *ISCR1* son las más habituales. Por eso han sido propuestos dos mecanismos principales de reclutamiento y movilización desde el cromosoma de *Kluyvera*, uno mediado por *ISEcp1* para miembros de los clusters 3, 2, 9 y 25, demostrado experimentalmente, y otro relacionado con *ISCR1* asociada con integrones complejos de clase 1 y miembros de los clusters 2 y 9. En la **Figura 1.26** se esquematizan entornos asociados con distintos miembros de los clusters 2, 3, 9 y 25, los cuales evidencian eventos de movilización independientes [97, 114].

Figura 1.25: Complejidad jerárquica de la asociación de los genes bla_{CTX-M} con elementos genéticos y clones bacterianos. (Adaptado de [78]).



ISEcp1, ubicado río arriba del gen bla_{CTX-M} cromosomal de *Kluyvera*, es suficiente para movilizarlo por transposición a otra localización [98].

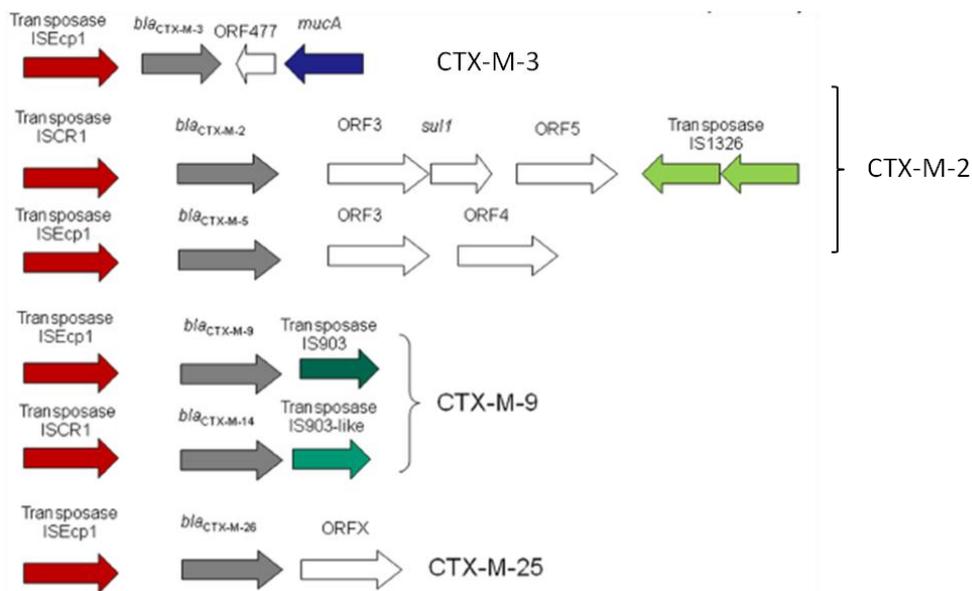
En el caso de los genes bla_{CTX-M} asociados a ISCR, ésta transpondría primero adyacente al gen cromosomal de *Kluyvera* y luego lo haría nuevamente pero de manera aberrante al no reconocer $terIS$, movilizándolo bla_{CTX-M} y secuencias adyacentes a un plásmido conjugativo. La formación de un integrón complejo sería entonces consecuencia de la recombinación homóloga entre la secuencia ISCR asociada a bla_{CTX-M} y otra ISCR asociada al extremo 3' de un integrón de clase 1 [108].

Estudios *in vitro* han demostrado la movilización de $bla_{CTX-M-2}$ desde *Kluyvera ascorbata* como resultado de un mecanismo de transposición mediado por ISEcp1 [96, 114]. Si bien aún no ha podido demostrarse experimentalmente el mismo fenómeno a través de la participación de ISCR1, sí se ha comprobado la capacidad de la proteína Orf513 de unirse a la región propuesta como $oriIS$ [99, 108, 109].

Si bien aún existen muchas preguntas con respecto al origen de las CTX-M y la razón de su comportamiento pandémico, y todavía resulta necesaria la caracterización de mayor número de aislamientos de *Kluyvera*, sus genes bla_{CTX-M} y sus entornos

genéticos, la comunidad científica acepta que el gen cromosomal $bla_{\text{CTX-M-3}}$ presente en *Kluyvera ascorbata* sería el ancestro del cluster CTX-M-3, bla_{KLUA} de *Kluyvera ascorbata* sería el origen del cluster CTX-M-2 y tres genes bla cromosómicos diferentes de *Kluyvera georgiana*, bla_{KLUG} , bla_{KLUY} y $bla_{\text{CTX-M-78}}$ lo serían de los clusters CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25, respectivamente [91, 93-95, 115, 116].

Figura 1.26: Movilización de $bla_{\text{CTX-M}}$. Representación esquemática de los entornos genéticos asociados a genes $bla_{\text{CTX-M}}$ que corresponden a los eventos primordiales de movilización desde el cromosoma de especies de *Kluyvera* (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-25). (Adaptado de [78]).



La pandemia actual de CTX-M puede explicarse si se tiene en cuenta la gran capacidad de diseminación y prevalencia de ciertos plásmidos y clones bacterianos.

El caso de $bla_{\text{CTX-M-15}}$, el gen de BLEE más prevalente en el mundo, es paradigmático. Éste se encuentra asociado principalmente a plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncF. Los plásmidos pertenecientes a este grupo son los detectados con mayor frecuencia en enterobacterias, son de bajo número de copias, rango de huésped estrecho, tienen un tamaño de más de 100 kb y poseen más de un replicón que promueve el inicio de la replicación (FIA, FIB y FII), lo que aumenta su estabilidad en una célula y compensa el hecho de que posean un rango de huésped acotado. Se los denomina “plásmidos epidémicos de resistencia” debido a su alta propensión a adquirir resistencia y transmitirse entre bacterias. Estos plásmidos han incorporado además otros determinantes de resistencia a familias de antibióticos distintas a los β -lactámicos, lo que favorece el proceso de coselección de $bla_{\text{CTX-M-15}}$ [61, 117].

Por otro lado, los genes de la familia *bla*_{CTX-M} también son diseminados a través de plásmidos de amplio rango de huésped como IncN, IncII e IncL/M. Algunos de estos plásmidos han sido hallados en cepas de *Salmonella* spp. y *E. coli* aisladas de animales empleados en alimentación humana. En general, se acompañan de marcadores de resistencia para quinolonas, como *qnr* y *aac(6′)-Ib-cr*. Más recientemente, estos plásmidos han adquirido genes codificantes de carbapenemasas, como *bla*_{NDM-1}, y han sido identificados como plásmidos epidémicos en países donde la resistencia a carbapenemes es un problema prevalente [112, 113].

La asociación de genes *bla*_{CTX-M} a *E. coli* del secuenciotipo ST 131 es uno de los eventos más relevantes en la diseminación de la resistencia a los β-lactámicos. Éste clon pertenece al grupo filogenético B2 y es considerado una cepa virulenta responsable de la diseminación internacional de CTX-M-15. El clon ST 131 también puede llevar otras CTX-M pertenecientes al subgrupo 1 (CTX-M-15, CTX-M-1, CTX-M-3 y CTX-M-10) o bien a otras como CTX-M-9 y CTX-M-14 (subgrupo CTX-M-9) [78, 113].

Por otro lado, en cepas de *K. pneumoniae* del ST 258 se ha prestado especial atención a la diseminación de carbapenemasas de clase A (KPC), aunque también este clon se ha asociado a la producción de CTX-M. Además, muchos otros ST (ST11, ST14) también están involucrados en la diseminación de CTX-M de diversos subgrupos filogenéticos, como CTX-M-15 y CTX-M-14. Algunos de estos clones fueron capaces de adquirir CTX-M y carbapenemasas debido a su preferencia por plásmidos incFII, IncN e IncL/M [112].

En Argentina y países vecinos, los genes *bla*_{CTX-M-2} descritos se han encontrado asociados a integrones complejos de clase 1 (**Figura 1.27**). El análisis de sus secuencias nucleotídicas ha demostrado que el marco abierto de lectura de orf513 está asociado a la inserción de un fragmento de ADN que posee entre un 96 a 99% de identidad con un fragmento homólogo proveniente de *Kluyvera ascorbata*. Dentro de este fragmento se encuentra el gen de la β-lactamasa *bla*_{CTX-M-2} [118].

En el caso de *bla*_{CTX-M-15}, se encontraron dos contextos genéticos distintos, tanto en cepas de *E. coli* ST131 como en cepas de *K. pneumoniae* ST11. Por un lado, algunos aislamientos presentaron una copia completa de *ISEcp1*, 48 bp río arriba del gen de la β-lactamasa, lo que se ha dado en llamar “el entorno genético internacional de *bla*_{CTX-M}”.

15”. Otros aislamientos, en cambio, presentaron una copia truncada de *ISEcp1*, pero con el mismo promotor funcional del entorno provisto por la copia completa (**Figura 1.28**) [88, 119].

3.3.2 Emergencia y diseminación

Durante los últimos diez años, las β -lactamasas de tipo CTX-M han desplazado a las BLEE prevalentes derivadas de TEM y SHV. Este fenómeno se ha producido como consecuencia de:

- 1- La presencia de genes *bla*_{CTX-M} en plataformas genéticas móviles como plásmidos y transposones.
- 2- La asociación de dichas plataformas genéticas con clones exitosos.
- 3- La asociación de CTX-M con resistencia a las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos, con la consecuente coselección de mecanismos.

La evolución temporal de la diseminación de este grupo de enzimas puede explicarse en tres períodos [78]:

1° Medios de los años 90: Emergencia de diferentes CTX-M en lugares geográficos distantes, en aislamientos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

La primera publicación que nombró una BLEE de tipo CTX-M data del año 1990 [120] y describía una cepa de *E. coli* aislada en el año 1989 en Alemania, resistente a cefotaxima pero sensible a ceftazidima. La enzima responsable de este perfil de resistencia fue nombrada CTX-M-1 en referencia a su perfil de hidrólisis preferencial por cefotaxima (cuyo acrónimo es CTX) y la M de Munich, ciudad de origen del paciente infectado. Al mismo tiempo, en 1989 tres grupos diferentes de investigadores argentinos reportaban la diseminación “explosiva” de aislamientos de *Salmonella* en diferentes hospitales de Buenos Aires, con el mismo fenotipo de resistencia que la cepa de *E. coli* aislada en Alemania, que luego se diseminaron en Paraguay, Misiones y Uruguay. La enzima responsable de este fenotipo tenía un punto isoeléctrico distinto al de CTX-M-1 y, luego de secuenciar su gen codificante, se la nombró CTX-M-2 [121].

Figura 1.27: Entorno de $bla_{CTX-M-2}$ descrito en Argentina. Integrón complejo de clase 1 encontrado en varias especies de enterobacterias, como *Salmonella Infantis*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* y *Vibrio cholerae*. **REGIÓN 5'CS:** gen de la integrasa *intI1*; sitio *attI1* de recombinación. **REGIÓN VARIABLE:** cassette 1 *aacA4* de resistencia a aminoglucósidos; cassette 2 *bla_{OXA-2}* de resistencia a β -lactámicos; cassette 3 *orfD* marco abierto de lectura de función desconocida. **REGIÓN 3'CS:** gen *qacED1* de resistencia a compuestos de amonio cuaternario; gen *sul1* de resistencia a sulfonamidas. **REGIÓN COMÚN:** *orf513* marco abierto de lectura de recombinasa hipotética; gen $bla_{CTX-M-2}$ de resistencia a β -lactámicos. **DUPLICACIÓN PARCIAL REGIÓN 3'CS:** gen *qacED1* y *orf3*. (Adaptado de [122]).

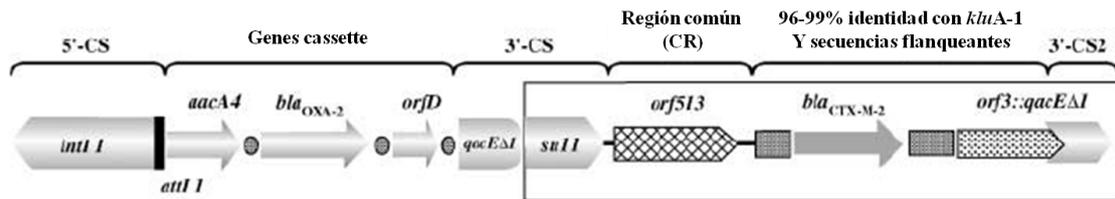
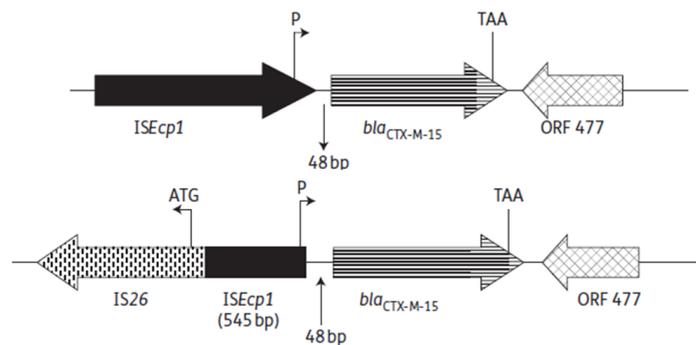


Figura 1.28: Entornos de $bla_{CTX-M-15}$ descritos en Argentina. (Adaptado de [119]).



Si bien CTX-M-1 y CTX-M-2 fueron las primeras enzimas descritas del grupo, Matsumoto y colaboradores ya habían detectado en 1988 una enzima de fenotipo equivalente aislada de una cepa de *E. coli*. Esta β -lactamasa había sido llamada FEC-1 y más tarde pudo ser relacionada con CTX-M-3 [123].

A partir de estos dos primeros reportes, las β -lactamasas CTX-M comenzaron a distribuirse y detectarse en países de Europa Central, Sudamérica y Japón, en un amplio rango de especies bacterianas, siendo los microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (especialmente *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis*) los principales productores y portadores de estas enzimas.

2° Medios de los años 90 al 2000: Emergencia de las variantes más prevalentes en la actualidad que incluyen CTX-M-3, CTX-M-15 (derivada mutacional de CTX-M-3), CTX-M-9 y CTX-M-14.

Durante estos años, no sólo se detectaron las mismas enzimas en países muy distantes, sino que también comenzó su diversificación mutacional. Esto indicaba tanto su potencial de aparición independiente como así también su notable capacidad de diseminación [124-129].

Este período se caracteriza por el establecimiento de variantes específicas en determinadas regiones, como CTX-M-2 en Sudamérica, CTX-M-3 en Polonia, CTX-M-10 en el área mediterránea (Francia y España), CTX-M-15 en el Reino Unido (a partir del 2001), CTX-M-15 en Estados Unidos (a partir del 2005), etc [130-133].

3° A partir del 2000: Dispersión y permanencia de las variantes que emergieron en el período anterior, con el desplazamiento de las BLEE de tipo TEM y SHV. Diseminación a otros grupos de microorganismos distintos a Enterobacteriaceae, como Pseudomonas spp y Acinetobacter spp.

Este período se caracteriza sobre todo por dos etapas. La primera involucra el desplazamiento de las variantes TEM y SHV por las β -lactamasas de tipo CTX-M emergentes en cada región señaladas en el período anterior. La segunda se caracteriza por la expansión de CTX-M-15.

Este modelo podría indicar que cuando CTX-M-15 penetra en un ambiente donde otras BLEE están presentes, el incremento de esta enzima y desplazamiento de otra BLEE es un proceso lento. Este sería el caso de Sudamérica, donde CTX-M-2 ha sido la CTX-M más prevalente durante años, pero cuyos niveles de prevalencia están siendo alcanzados por los de CTX-M-15 [87, 88, 134].

En nuestros días además encontramos que CTX-M se ha transferido exitosamente a otros bacilos gram negativos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio spp.* y *Aeromonas spp* [74].

3.3.3 Fenotipo de Resistencia

Las enzimas CTX-M plasmídicas confieren altos niveles de resistencia a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, incluyendo amino-penicilinas (ampicilina y amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y ureído-penicilinas (piperacilina), y las cefalosporinas clásicas o de primera generación (como cefalotina y cefaloridina) y de segunda generación como cefuroxima. Los microorganismos productores de estas

enzimas se mantienen sensibles frente a cefamicinas (cefotaxima) y carbapenemes (imipenem, meropenem).

Entre las cefalosporinas de tercera generación u oximino-cefalosporinas, la mayoría de los microorganismos que producen las β -lactamasas plasmídicas CTX-M presenta valores de CIM mayores para cefotaxima o ceftriaxona que para ceftazidima, para la cual, si bien aumentan los valores de CIM, a veces se mantienen dentro del rango de “sensible”. Este fenotipo también se asocia con resistencia a aztreonam y con valores moderados de resistencia a cefalosporinas de cuarta generación (cefepime o cefpirome). Al igual que otras BLEE de clase A, se inhiben por inhibidores de β -lactamasas como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (siendo este último, en general, el inhibidor más potente), lo que se traduce en la recuperación a diferentes valores de CIMs que dependen en gran medida de los niveles de expresión de la β -lactamasa producida. El perfil general de resistencia que otorgan a los microorganismos productores hace que las enzimas tipo CTX-M se clasifiquen comúnmente como “cefotaximasas”.

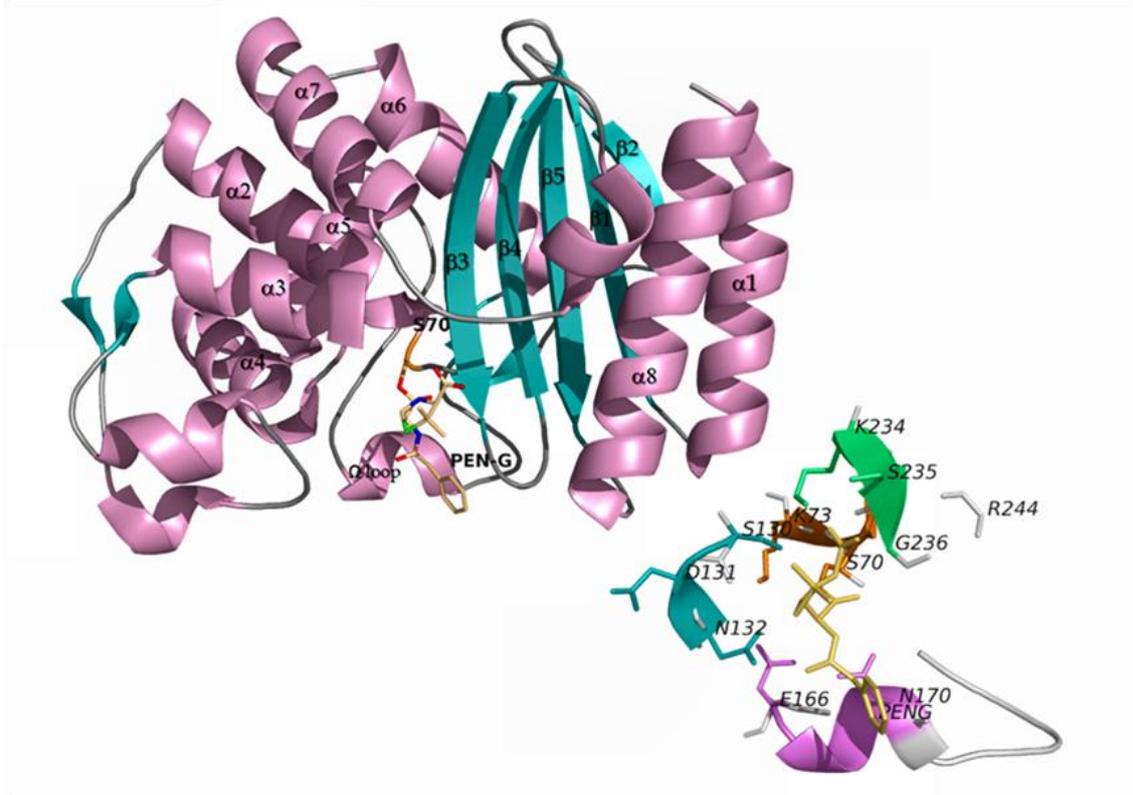
Existen variantes “emergentes” de CTX-M que muestran mayores valores de resistencia frente a ceftazidima, tales como CTX-M-15 y CTX-M-16, que otorgan valores de CIM ocho veces mayores con respecto a los correspondientes a las enzimas más estrechamente relacionadas.

3.3.4 Mecanismo de acción de las β -lactamasas de clase A y estructura molecular de la familia CTX-M

Todas las enzimas de clase A poseen un dominio estructural “todo α ” y otro dominio “ α/β ” entre los cuales se encuentra el sitio activo. En la región N terminal de la primera hélice del dominio “todo α ” (hélice α_2) se ubica el residuo de serina activa involucrado directamente en el proceso de catálisis (**Figura 1.29**) [44, 135].

Como mencionáramos antes, cuando una β -lactamasa se une al antibiótico, se forma inicialmente un complejo no covalente. Luego, el anillo β -lactámico es atacado por el hidroxilo libre de la serina catalítica formándose un éster, tras lo cual se produce la liberación de la enzima activa y el antibiótico hidrolizado (**Figura 1.17**) [135].

Figura 1.29: Modelo del complejo entre TEM-1 y bencil-penicilina (PEN-G). Se observan las estructuras secundarias y la cavidad del sitio activo; Derecha: detalle del sitio activo de TEM-1 (β -lactamasa de clase A) con los principales aminoácidos implicados en la interacción enzima- β -lactámico (PEN-G en amarillo). (Adaptado de [44]).



Asociados con el residuo de serina activo, en la estructura terciaria de la β -lactamasa, se encuentran otros aminoácidos altamente conservados que participan directa o indirectamente en la hidrólisis del antibiótico y constituyen la cavidad del sitio activo (*Tabla 1.3*) [72, 135]:

Elemento 1, el motivo “S-X-X-K”: El primer elemento conservado constituye el fondo de la cavidad del sitio activo. Contiene el residuo serina 70 (Ser70), de acuerdo a la nomenclatura de Ambler para β -lactamasas de clase A, el único de todos los aminoácidos conservados en estas enzimas para el cual ha sido atribuida una función catalítica inequívoca, dado que estudios de mutagénesis dirigida que reemplazaron la serina con otros aminoácidos (incluso Thr que está altamente relacionado), dieron como resultado una enzima inactiva. El mecanismo general de hidrólisis involucra el ataque nucleofílico de Ser70, luego de su activación mediada por Lys73 o Glu166, sobre el carbono carbonílico del anillo β -lactámico, dando como resultado una enzima intermediaria acilada.

Elemento 2, el motivo “S-X-N”: Este segundo elemento se ubica en el *loop* del dominio “todo α ”, formando una de las paredes de la cavidad catalítica. Está formado por un primer aminoácido hidroxilado, que en las β -lactamasas de clase A es casi exclusivamente serina (Ser130), y el tercero casi siempre es asparagina (Asn132).

El residuo de Ser130 participaría en la “movilización” del protón del grupo hidroxilo de Ser70 hacia el átomo de nitrógeno del anillo β -lactámico. Asparagina 132 facilitaría por su parte el adecuado posicionamiento del sustrato para que ocurra el ataque nucleofílico por el oxígeno de la cadena lateral de Ser70.

Elemento 3, el motivo “K-T(S)-G”: Este elemento se sitúa frente al elemento 2, en la más interna de las hojas β (β_3) del dominio “ α/β ”, formando la pared opuesta de la cavidad catalítica. El primero de los residuos (Lys234) es un aminoácido con cadena lateral cargada positivamente, seguido por otro con grupo hidroxilo (Ser o Thr). El tercer residuo debe carecer de cadena lateral, ya que, de lo contrario, impediría el acercamiento del sustrato. La cadena lateral de lisina 234 forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo del residuo serina del elemento 2 (Ser130), y contribuye a estabilizar el sustrato por formación de un puente de hidrógeno con el grupo carboxilo libre del β -lactámico.

Las cadenas laterales de Ser130 y Lys234 están unidas por puentes de hidrógeno, uniendo los dominios “todo α ” y “ α/β ”, estabilizando así el sitio activo de la enzima.

Elemento 4, el “ Ω loop”: Este cuarto elemento consiste en un bucle de 16 residuos (Arg164-Asp179). En la mayoría de los casos, el Ω loop incluye la secuencia Glu166-X-Glu-Leu-Asn170, en la cual los residuos Glu166 y Asn170 parecen ser esenciales para el correcto posicionamiento conservado de una molécula de agua muy cerca de Ser70, o “agua catalítica”. Se acepta que este residuo de Glu166 actuaría como una base general (secuestrador de protones), incrementando primero la nucleofilicidad de la serina activa permitiendo la acilación de la proteína, y luego activando la molécula de agua durante el paso de hidrólisis del intermediario acilado entre el β -lactámico y la enzima (acil-enzima). Por lo tanto, su presencia sería imprescindible para que una β -lactamasa pueda también llevar a cabo eficientemente el proceso de desacilación.

Tabla 1.3: *Secuencias conservadas de las serino- β -lactamasas.* Se indican en negrita los motivos más comunes de las serino- β -lactamasas; las secuencias alternativas se señalan entre paréntesis, en las que la X indica que puede ser sustituida por cualquier aminoácido.

Secuencias conservadas de las tres clases moleculares de las serino- β -lactamasas						
Clase molecular	Tamaño molecular (kDa)	Motivos aminoacídicos característicos			" Ω loop"	
A	<31	Ser ⁷⁰ ThrSerLys (SerXXLys)	-	Ser ¹³⁰ AspAsn (SXXN)	Glu ¹⁶⁶ XXLeuAsn	Lys ²³⁴ ThrGly
C	>35	Ser ⁶⁴ ThrSerLys (SerXXLys)	-	Tyr ¹⁵⁰ AlaAsn (YXN)	-	Lys ³¹⁵ ThrGly (LysSerGly)
D	<31	Ser ⁷⁰ ThrPheLys	Ser ¹¹⁸ XVal	Tyr ¹⁴⁴ GlyAsn (TyrGlyAsn)	-	Lys ²¹⁶ ThrGly (LysSerGly)

3.3.5 Evolución y especialización de la familia CTX-M

Como mencionáramos anteriormente, las CTX-M hidrolizan preferencialmente cefotaxima o ceftriaxona más eficientemente que ceftazidima. Esta característica se atribuye a la existencia de un ambiente en el sitio activo más favorable para el reconocimiento e interacción con penicilinas, cefalosporinas de primera generación y cefotaxima con respecto a ceftazidima, que posee un sustituyente más voluminoso y por lo tanto no podría introducirse tan profundamente en el bolsillo catalítico. Esto explicaría los valores de k_{cat} insignificantes y K_m no medibles obtenidos en ensayos cinéticos frente a este antibiótico [136, 137].

Sin embargo, más del 60% de las variantes de CTX-M circulantes en la actualidad serían capaces de conferir resistencia a cefotaxima y ceftazidima simultáneamente. Esto indicaría que la presión selectiva ejercida por ceftazidima sería uno de los factores que podrían contribuir a la evolución de esta familia de BLEE [78].

Las β -lactamasas son proteínas en las que unas pocas posiciones aminoacídicas parecen ser críticas para la hidrólisis de los β -lactámicos. Hoy en día hay descritas al menos 136 posiciones polimórficas en las CTX-M. Algunos de estos cambios tendrían influencia en el aumento del espectro de hidrólisis mientras que otros modularían o restaurarían efectos antagonistas generados por ciertas modificaciones [138, 139].

Existen estudios acerca de la importancia de la conservación de determinados residuos aminoacídicos para la hidrólisis adecuada de las oximino-cefalosporinas. Por ejemplo, los residuos Ser237 y Arg276 (equivalente a Arg244 en las TEM y SHV de espectro extendido) parecen estar involucrados en la eficiente hidrólisis de cefotaxima y la modulación de la actividad oximino-cefalosporinasa, respectivamente, y están presentes en todas las variantes de CTX-M, sean de codificación plasmídica o cromosómica. De hecho, estudios realizados sobre algunas CTX-M sugieren que mutaciones en la posición 276 modificarían en diferente grado la capacidad de hidrolizar cefotaxima, aunque no llevaría a una mejor hidrólisis de ceftazidima ni a la obtención de mutantes resistentes a los inhibidores, como se esperaría por considerarse equivalente a la posición 244 en TEM, que al modificarse confiere resistencia a los inhibidores clásicos de β -lactamasas (*inhibitor-resistant TEM* o IRT) [140-143].

Por otro lado, la supuesta actividad aumentada sobre ceftazidima es atribuída a una serie de modificaciones aminoacídicas, de las cuales se destaca la mutación Asp240Gly presente por ejemplo en CTX-M-15 (subgrupo 1), CTX-M-43 (subgrupo 2), CTX-M-16 y CTX-M-27 (subgrupo 9), derivadas de CTX-M-3, -44, -9 y -14 respectivamente, y que se postula fueron seleccionadas luego de la utilización masiva de ceftazidima en algunos centros hospitalarios de Estados Unidos y Europa, donde estas variantes son más frecuentes [76, 77].

La mutación que resulta en el cambio Asp240Gly en las llamadas “**ceftazidimasas**” llevaría a una flexibilidad incrementada en la cadena β 3, remodelando el sitio activo de la enzima y volviéndolo más accesible al sustituyente voluminoso de la molécula de ceftazidima. En las variantes de TEM y SHV con actividad hidrolítica eficiente sobre cefotaxima y ceftazidima, en cambio, la mayor capacidad de hidrolizar ceftazidima es atribuída a un bolsillo catalítico expandido mutacionalmente capaz de interactuar con moléculas voluminosas, con lo cual la eficiencia hidrolítica sobre ambas oximino-cefalosporinas es similar [137].

Estudios de mutagénesis dirigida han revelado nuevas mutaciones que aún no han sido seleccionadas en la naturaleza, pero que podrían emerger bajo la presión selectiva de ceftazidima. Estos y otros resultados sugieren que la posibilidad de adaptación de la familia CTX-M aún no ha alcanzado su estasis evolutiva [144, 145].

Hipótesis y Objetivos

“El hombre no es ni una piedra ni una planta, y no puede justificarse a sí mismo por su mera presencia en el mundo. El hombre es hombre sólo por su negación a permanecer pasivo, por el impulso que lo proyecta desde el presente hacia el futuro y lo dirige hacia cosas con el propósito de dominarlas y darles forma...”

Simone de Beauvoir

Capítulo 2 - Hipótesis y objetivos de la investigación

Las β -lactamasas CTX-M son serino-enzimas de clase A que al ser expresadas desde una plataforma genética extracromosomal otorgan naturalmente niveles de resistencia a cefotaxima elevados. Sin embargo, a diferencia de otras BLEE, las CTX-M hidrolizan ceftazidima con mucha menor eficiencia.

Existen reportes de variantes naturales dentro de la familia CTX-M que presentan una mejora en la capacidad de hidrolizar ceftazidima, de manera tal que los microorganismos productores y los clones recombinantes que contienen el gen clonado presentan valores de CIM a ceftazidima sensiblemente superiores a los otorgados por las variantes cefotaximasas correspondientes, mientras que los valores de CIM a cefotaxima se mantienen equivalentes.

Entre las modificaciones aminoacídicas que resultarían en la supuesta actividad de ceftazidimasa se encuentran los cambios Pro167Ser/Thr y Asp240Gly, que podrían representar los pasos iniciales en la diversificación molecular de la familia CTX-M.

La mutación Asp240Gly es la más estudiada por su mayor prevalencia y porque estudios de evolución molecular *in vitro* han demostrado que estas variantes se verían más favorecidas en un ambiente en el que tanto cefotaxima como ceftazidima simultáneamente, y no una u otra, actúan como agentes de selección [146]. El reemplazo de ácido aspártico por glicina en la posición 240 de la cadena β_3 remodelaría el sitio activo debido a la mayor flexibilidad de la cadena β , la cual es importante estructuralmente porque contiene al motivo conservado 3, lo que permitiría el acceso de sustratos más voluminosos al sitio activo [137]. Sin embargo, según estudios realizados sobre CTX-M-27, modificaciones en esa posición se correlacionarían con una menor estabilidad de la β -lactamasa, y las eficiencias hidrolíticas reales sobre ceftazidima, si bien aumentan (menor K_m y mayor k_{cat}), no llegan a ser del mismo orden de magnitud que para cefotaxima, **siendo en algunos casos más de 1.000 veces menor** [76, 147]. Además, la mayor parte de los estudios más completos de estas mutantes fueron realizados con CTX-M de los clusters 3 y 9, por lo que carecemos de datos a partir de los otros grupos.

Nosotros postulamos que el aparente incremento en la capacidad hidrolítica sobre ceftazidima se debe en realidad a la interacción de varios mecanismos. Los valores de CIM elevados serían producto de una sumatoria de factores que incluirían:

4. La permeabilidad del microorganismo (a través de las porinas) por los antibióticos.
5. Las propiedades catalíticas de las β -lactamasas.
6. Las propiedades estructurales, que determinan tanto la actividad catalítica como la estabilidad de la proteína.
7. Su modo de producción (que incluye la actividad relativa de los promotores y el número de copias de los plásmidos portadores).

Por ejemplo, existen evidencias que demuestran que el ingreso de cefotaxima a través de la porina OmpF en *E. coli* es al menos dos veces mayor que el de ceftazidima [148]. Por lo tanto, una enzima que hidrolice ceftazidima con una eficiencia moderada, como podría ser el caso de las mutantes con actividad de ceftazidimasa, podría alcanzar para incrementar notoriamente los valores de CIM.

La generación de mutantes *in vitro* de miembros de los cinco clusters de las β -lactamasas CTX-M permitirá evaluar cuáles son los residuos más importantes tanto para las propiedades catalíticas de la enzima como así también para el mantenimiento de la estructura, esperando establecer el posible rol de algunos residuos como potenciales blancos de modificación y probable surgimiento de mutantes enzimáticas con diferentes propiedades hidrolíticas.

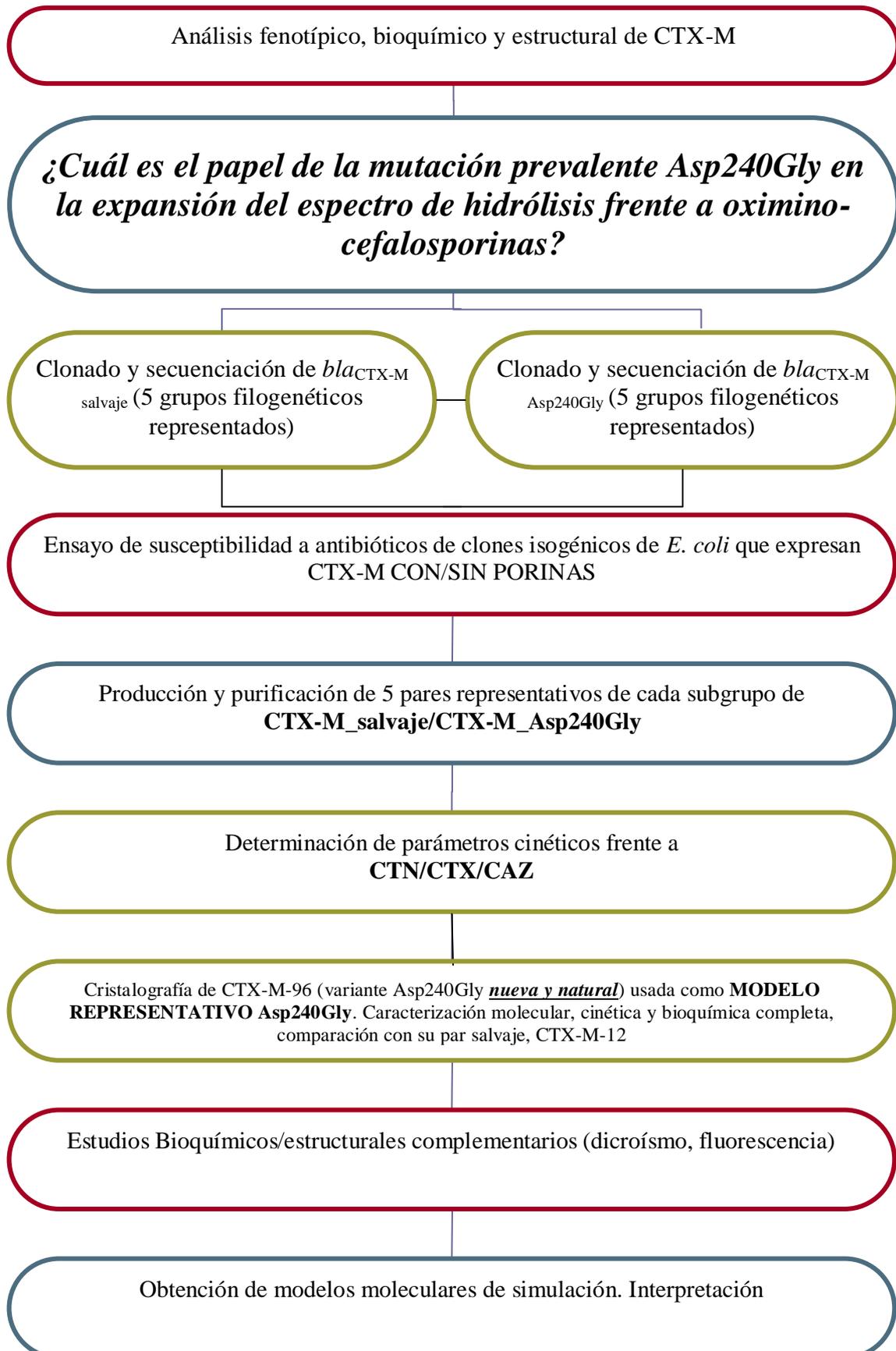
En particular nos interesa evaluar la influencia de las mutaciones en posición 240 en la actividad sobre ceftazidima, y su asociación con la resistencia fenotípica y la permeabilidad diferencial de ambas oximino-cefalosporinas. Esto será evaluado además mediante la generación de modelos de simulación *in silico*, intentando determinar posiciones aminoacídicas que puedan participar en la modificación de la actividad enzimática.

En particular los objetivos del presente plan de tesis serán:

- 1- *Generar mutantes enzimáticas in vitro por mutagénesis dirigida de miembros de los cinco clusters de CTX-M, tanto plasmídicas como cromosómicas de Kluyvera, apuntadas a las posiciones postuladas como responsables de la actividad de “ceftazidimasa” Se trabajará además con algunas “mutantes” seleccionadas in vivo.*
- 2- *Clonar los genes “salvajes” y mutados en vectores apropiados para la expresión de los genes bajo condiciones similares en un sistema genéticamente homogéneo (cepas particulares de E. coli), y en presencia y ausencia de los promotores propios para evaluar la influencia de ellos en la expresión “natural”.*
- 3- *Determinar las concentraciones inhibitorias mínimas de los clones recombinantes obtenidos.*
- 4- *Producir, purificar y determinar las propiedades cinéticas de las β -lactamasas (salvajes y mutantes derivadas) en condiciones experimentales equivalentes.*
- 5- *Obtener la estructura cristalográfica de β -lactamasas de interés mediante cristalografía y difracción por rayos X*
- 6- *Analizar la influencia de las mutaciones en el plegamiento y estabilidad estructural de las variantes.*
- 7- *Evaluar la relación de la resistencia fenotípica observada y las propiedades cinéticas con la permeabilidad de las oximino-cefalosporinas.*

Materiales y Métodos

Resumen esquemático de la metodología



Capítulo 3 - Materiales y Métodos

1 Aislamientos bacterianos empleados

1.1 Cepas bacterianas de origen clínico

Se emplearon aislamientos de enterobacterias de origen clínico caracterizados previamente en nuestro laboratorio como productores de enzimas CTX-M. Se seleccionaron los aislamientos de manera tal de incluir al menos un representante de cada uno de los 5 subgrupos filogenéticos propuestos para esta familia de β -lactamasas (2, 1/3, 8, 9 y 25) [77, 91, 93, 134, 149, 150]. En la **Tabla 3.1** se detallan el origen, el gen bla_{CTX-M} presente en cada uno de ellos y su correspondiente subgrupo.

Tabla 3.1: Aislamientos bacterianos provistos por terceros utilizados en este trabajo

Aislamiento	Descripción	bla_{CTX-M}	Subgrupo	Origen
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1338	Cepa de origen nosocomial, proveniente de Colombia. Cedida por la Dra. Marcela Radice	$bla_{CTX-M-12}$	1/3	P
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 293235	Cepa de origen nosocomial, proveniente de Colombia. Cedida por la Dra. Marcela Radice	$bla_{CTX-M-96}$	1/3	P
<i>Kluyvera ascorbata</i> 69	Cepa de origen ambiental. Cedida por la Dra. María Margarita Rodríguez	$bla_{CTX-M-3}$	1/3	C
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 76	Cepa de origen nosocomial, proveniente de Colombia. Cedida por la Dra. Marcela Radice	$bla_{CTX-M-15}$	1/3	P
<i>Kluyvera cryocrescens</i> 169	Cepa de origen nosocomial. Cedida por la Dra. María Margarita Rodríguez	$bla_{CTX-M-37}$	1/3	C
<i>Morganella morganii</i> PP07	Cepa de origen nosocomial proveniente de Argentina. Cedida por el Dr. Pablo Power	$bla_{CTX-M-2}$	2	C
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 206	Cepa de origen nosocomial, proveniente de Uruguay. Cedida por el Dr. Rafael Vignoli	$bla_{CTX-M-8}$	8	P
<i>Enterobacter cloacae</i> García	Cepa de origen nosocomial, proveniente de Uruguay. Cedida por el Dr. Rafael Vignoli	$bla_{CTX-M-9}$	9	P
<i>Kluyvera georgiana</i> 14751	Cepa de origen nosocomial. Cedida por la Dra. María Margarita Rodríguez	$bla_{CTX-M-78}$	25	C

C: Cromosómico P: Plasmídico

1.2 Cepas bacterianas comerciales y de referencia

Se emplearon diferentes cepas comerciales y de referencia para realizar ensayos estandarizados de susceptibilidad a los antibióticos, transferencia de genes y producción de proteínas. En la **Tabla 3.2** se detallan sus características.

Tabla 3.2: Cepas comerciales y de referencia utilizadas en este trabajo

Cepa	Descripción	Ensayo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Control de calidad de ensayos de susceptibilidad. Cepa comercial de ATCC	Antibiograma y CIM
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Productora de TEM-1. Control de calidad de ensayos de susceptibilidad. Cepa comercial de ATCC	Antibiograma y CIM
<i>Escherichia coli</i> XL1BLUE	Sensible a Kanamicina y β -lactámicos	Transformación bacteriana
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Sensible a Kanamicina y β -lactámicos	Transformación bacteriana
<i>Escherichia coli</i> K12	Sensible a Kanamicina y β -lactámicos	Transformación bacteriana
<i>Escherichia coli</i> JF 700	Sensible a Kanamicina y β -lactámicos Derivada de <i>E.coli</i> K12. OmpF ⁻ . OmpA ⁻	Transformación bacteriana
<i>Escherichia coli</i> JF 701	Sensible a Kanamicina y β -lactámicos Derivada de <i>E.coli</i> K12. OmpC ⁻	Transformación bacteriana
<i>Escherichia coli</i> JF 703	Sensible a Kanamicina y β -lactámicos Derivada de <i>E.coli</i> K12. OmpF ⁻	Transformación bacteriana
<i>Escherichia coli</i> JF 694	Sensible a Kanamicina y β -lactámicos Derivada de <i>E.coli</i> K12. OmpF ⁻ . OmpC ⁻	Transformación bacteriana
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Sensible a Kanamicina	Expresión de proteínas recombinantes
<i>Escherichia coli</i> J53	Sensible a β -lactámicos Resistente a Azida sódica. F ⁻	Conjugación bacteriana

El cultivo y mantenimiento de las enterobacterias utilizadas en esta tesis como fuente de genes *bla*_{CTX-M} y de los clones recombinantes construídos (cuyo uso y finalidad se detallan en las secciones siguientes correspondientes), se realizó en medios de cultivo líquidos y sólidos de uso común, ya que se trata de cepas bacterianas sin requerimientos nutricionales especiales. Se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Agar Tripteína Soja o Caldo (TSA o TSB): Utilizado para recuperar las cepas a partir de la muestra original, aislamiento y control de pureza.

Agar Luria Bertani o Caldo (LBA o LB): Utilizado para extracción de ADN, ensayos de transferencia de genes y ensayos de inducción para purificación de proteínas.

Agar Mueller Hinton: Utilizado para la realización de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Caldo Cerebro Corazón (Caldo BHI): Utilizado para la conservación de los cultivos bacterianos.

La composición exacta de cada uno de los medios de cultivo se detalla en el Anexo A.

En general, las cepas bacterianas se incubaron a 35-37°C por períodos de 18 a 24 hs en atmósfera aerobia, con el agregado de antimicrobianos a modo de selección cuando resultó necesario.

Todas las cepas fueron conservadas en caldo LB ó BHI adicionado con glicerol al 20% a -20°C para el trabajo dentro de los 4-6 meses, y a -196°C para conservarlas por períodos mayores a 1 año.

2 Metodologías empleadas para la manipulación de ADN

2.1 Extracción de ADN

2.1.1 Extracción de ADN total mediante lisis de colonias de las cepas bacterianas de origen clínico

Se obtuvieron cultivos puros luego de 24 horas de incubación a 35°C de cada uno de los microorganismos detallados en la **Tabla 3.1** en medio TSA. Luego, se tomaron 4 ó 5 colonias aisladas de cada uno, las cuales fueron resuspendidas en 200 µl de agua milliQ estéril y se sometieron a un baño de agua en ebullición durante 10 minutos. Finalmente,

las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 13.000 rpm en microcentrífuga (*Micro Centaur, SANYO*) y se conservaron los sobrenadantes a -20°C para su utilización posterior en las reacciones de amplificación por PCR de los genes *bla*_{CTX-M}.

2.1.2 Extracción de ADN plasmídico recombinante

En los ensayos en los que se requirieron preparaciones de ADN plasmídico de alta pureza, como clonado, secuenciación y digestión con endonucleasas de restricción, se utilizaron diversos *kits* comerciales, como *GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biosciences)*, *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)* y *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermoscientific)*, entre otros. En todos los casos se siguieron las indicaciones del fabricante.

2.1.3 Extracción de ADN plasmídico de alto peso molecular

En el marco de un proyecto de colaboración con la Dra. María Virginia Villegas, se caracterizaron en nuestro laboratorio cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en el año 2002 en un estudio multicéntrico que incluyó 9 hospitales universitarios de Colombia [149]. En dicho estudio se detectó por primera vez la circulación de β -lactamasas de tipo CTX-M pertenecientes al subgrupo filogenético 1/3 en 5 cepas de *K. pneumoniae* de origen nosocomial. Dos de esas cepas provenían del mismo hospital; una de ellas era productora de CTX-M-12 y la otra de CTX-M-96, nueva variante mutacional Asp240Gly de la primera (**Tabla 3.1**).

Al tratarse CTX-M-96 de una variante nueva circulante en Sudamérica nunca antes descrita, se decidió realizar una caracterización molecular, bioquímica y estructural exhaustiva de la misma, y a su vez utilizar el par CTX-M-12/CTX-M-96 como modelo para analizar el comportamiento de las variantes mutacionales Asp240Gly emergentes en nuestro medio y el resto del mundo.

Para comenzar, se procedió a la extracción de ADN plasmídico de los aislamientos productores de CTX-M-12 y CTX-M-96, *K. pneumoniae* 1138 y *K. pneumoniae* 293235 respectivamente, mediante la técnica de extracción con fenol según el protocolo propuesto por Kado y colaboradores [151]. Esta metodología permite la extracción de plásmidos de alto peso molecular que pueden ser utilizados luego como molde en reacciones de PCR, transformaciones y/o digestiones con enzimas de restricción.

Se evaluó la calidad del ADN extraído por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%.

A continuación se detalla paso a paso el protocolo de extracción:

1. Centrifugar 3 ml de un cultivo *overnight* (ON) en caldo LB a 13.000 rpm en microcentrífuga (*Micro Centaur, SANYO*) durante 2 minutos.
2. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento bacteriano en 1 ml de buffer E.
3. Agregar a la suspensión bacteriana 2 ml de solución de lisis suplementada con 20 µg de RNasa. Mezclar suavemente por inversión.
4. Incubar a 58°C durante 20 minutos.
5. Añadir 1 ml de mezcla de fenol-cloroformo-isoamilico (24:24:1). Mezclar utilizando vortex.
6. Centrifugar 15 minutos a 13.000 rpm en microcentrífuga (*Micro Centaur, SANYO*).
7. Transferir 400 µl de la fase acuosa, que contiene el ADN plasmídico, a tubos eppendorf.
8. Añadir 40 µl de NaCl 5M (cc final: 0,3-0,5 M) y 800 µl (2 volúmenes) de etanol 96%.
9. Incubar ON a -20 °C para que precipite el ADN plasmídico.
10. Centrifugar 15 minutos a 13.000 rpm en microcentrífuga (*Micro Centaur, SANYO*).
11. Lavar con 1 ml de etanol 70%. No mezclar ni remover el sedimento. Centrifugar 15 minutos a 13.000 rpm en microcentrífuga (*Micro Centaur, SANYO*).
12. Extraer el alcohol y dejar secar el sedimento de ADN plasmídico a T° ambiente.
13. Resuspender en 50-100 µl de agua MilliQ estéril.

Se recomienda conservar la extracción de plásmidos a 4°C y emplear tips estériles cada vez que se manipule. Siguiendo estas indicaciones, el ADN suele preservarse por más de un año.

Buffers y soluciones

1. *Solución de lisis*: 3% de SDS, Tris 50 mM, pH 12,6 (llevar a pH con 1,5 ml de NaOH 2N aproximadamente para un volumen final de 100 ml de solución). Esterilizar por filtración.
2. *Buffer E*: Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8. Esterilizar con calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.
3. Fenol-cloroformo-isoámilico (24:24:1).
4. NaCl 5M
5. Etanol 96%, calidad analítica.

La composición del LB y el origen de los reactivos empleados se describen en el Anexo A.

2.2 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta metodología se empleó para la amplificación de genes *bla*_{CTX-M} (de 900 bp de longitud aproximadamente) que fueron clonados luego en distintos vectores (ver en detalle a continuación), o bien para dilucidar el entorno genético asociado a los genes *bla*_{CTX-M-12} y *bla*_{CTX-M-96}.

De modo general, cada reacción se realizó en un volumen final de 25 µl, utilizando 1 a 5 µl de ADN; 1,25 µl de dNTPs 10 mM; 2,5 µl de buffer de reacción 10X; 2,5 µl de cloruro de magnesio 25 mM; 2,5 µl de cada cebador de oligonucleótidos; 0,2 µl de *Pfu DNA polymerase* (Promega) o *Taq* polimerasa (Thermoscientific), según correspondiera; agua MilliQ estéril csp 25 µl. Los parámetros de amplificación para la mayoría de las reacciones de PCR fueron: desnaturalización del DNA a 95°C durante cinco minutos; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante un minuto, 1 minuto de *annealing* a 55°C, 1 minuto de polimerización a 72°C; período de extensión final de 10 minutos a 72°C. Cuando fue necesario ajustar las condiciones se hicieron gradientes de temperatura de *annealing* de 10°C, tomando como valor central para el gradiente el detallado aquí. Las reacciones fueron realizadas en un ciclador *T-Gradient de Biometra* (Biometra Inc., USA).

En el caso particular del mapeo por PCR del entorno genético de *bla*_{CTX-M-12} y *bla*_{CTX-M-96}, la temperatura de *annealing* de los cebadores en cada ciclo se fijó como 3°C por

debajo del T_m más bajo (temperatura de disociación en °C de las hebras del cebador) del par de cebadores utilizados. El tiempo de elongación a 72°C fue de 1 minuto en aquellas reacciones en las que se esperaba un amplicón inferior a 1000 bp, y de 2 minutos cuando se esperaba un amplicón de mayor tamaño (ver sección 2.2.4)

2.2.1 Amplificación por PCR de genes *bla*_{CTX-M} salvajes

Para reacciones de amplificación de genes *bla*_{CTX-M} salvajes y posterior clonado y secuenciación en pK19, se utilizó la enzima *Pfu DNA polymerase (Promega)*, una enzima termoestable derivada de *Pyrococcus furiosus*, que cataliza la incorporación de nucleótidos dependiente de molde en presencia de magnesio. Además, exhibe actividad de exonucleasa 3'→5' a prueba de errores, con lo que cualquier inserción errónea de nucleótidos (normalmente de baja frecuencia) durante la polimerización es corregida por la enzima, y además sintetiza amplicones con extremos romos, a diferencia de otras polimerasas que normalmente dejan extremos de pocos nucleótidos en 3'. Es por esto que se utiliza en reacciones que requieren una elevada fidelidad en la síntesis de ADN. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la **Tabla 3.3**.

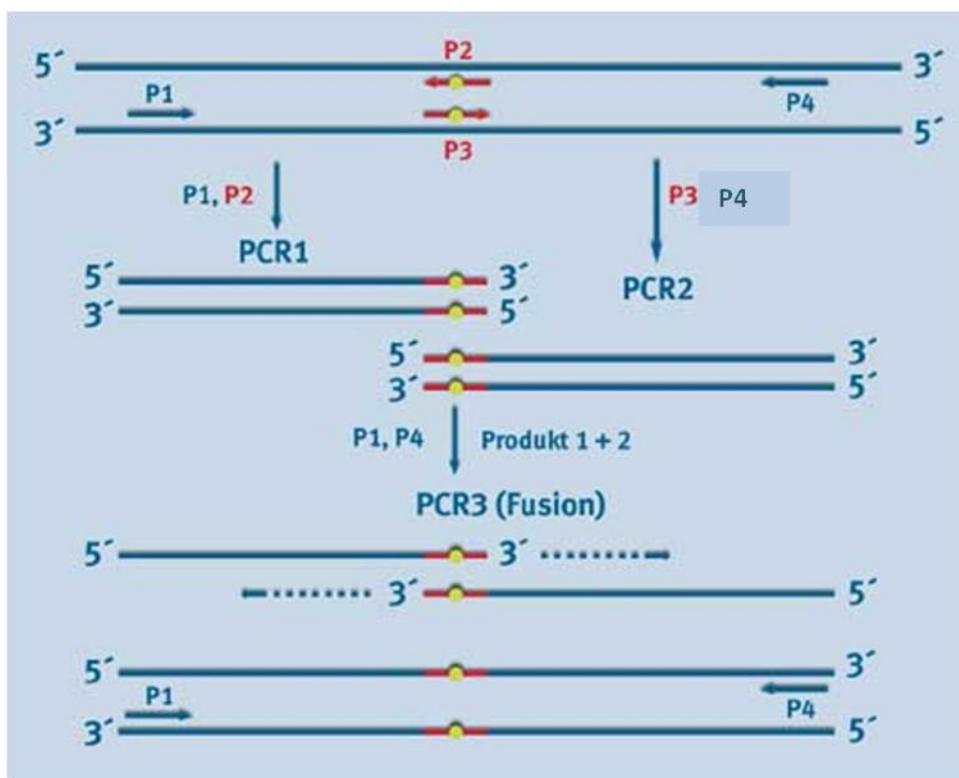
Tabla 3.3: Oligonucleótidos diseñados para amplificar genes *bla*_{CTX-M}. Nótese que el cebador *Forward* fue diseñado de manera tal que el gen *bla*_{CTX-M} quedara en fase con el promotor de la β-galactosidasa del plásmido comercial pK19 digerido con la enzima de restricción *Sma*I.

Cebador	Secuencia	<i>bla</i> _{CTX-M}	Grupo filogenético CTX-M
CTX-M-1 FpK	AAATGGTTAAAAAATCACTGC	3-15-12-96-37	1/3
CTX-M-1 RpK	CTACAAACCGTCGGTGACGAT		
CTX-M-2 FpK	TAATGATGACTCAGAGCATTCGC	2	2
CTX-M-2 RpK	GCATCAGAAACCGTGGGTACG		
CTX-M-8 FpK	AGATGATGAGACATCGCGTTAAGC	8	8
CTX-M-8 RpK	TTAATAACCGTCGGTGACG		
CTX-M-9 FpK	AGATGGTGACAAAGAGAGTGC	9	9
CTX-M-9 RpK	TTACAGCCCTTCGGCGATG		
CTX-M-78 FpK	GGATGATGAGAAAAAGCGTAAGGC	78	25
CTX-M-78 RpK	GGACTAATAACCGTCGGTGAC		

2.2.2 Generación de mutantes puntuales Asp240Gly de bla_{CTX-M} por PCR

La estrategia de mutagénesis dirigida empleada en este trabajo fue la metodología del *megaprimer*. Ésta consiste básicamente en la generación de una mutación puntual por PCR secuencial, usando un par de cebadores que poseen la mutación deseada y son complementarios entre sí (**Figura 3.1**).

Figura 3.1: Mutagénesis dirigida mediante el método del *megaprimer*. Esquema que representa las dos reacciones de PCR secuenciales necesarias para la introducción de la mutación puntual (adaptado de www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden). Ver explicación en el texto.



En el primer paso se realizan dos reacciones de PCR por separado para generar los productos de amplificación primarios, designados en el esquema de arriba PCR1 y PCR2. Ambos productos de amplificación contienen la mutación puntual y una región de solapamiento. La PCR1 se realiza usando los cebadores P1 y P2 en el esquema, mientras que la PCR2 se realiza con los cebadores P3 y P4. Los cebadores P2 y P3 son los poseedores de la mutación. Ambos productos de la primera reacción son purificados desde un gel de agarosa.

Como segundo paso, los productos de las PCR1 y PCR2 son usados como molde de ADN en cantidades equimolares. En el primer ciclo de la tercera reacción de PCR, los dos productos de PCR primarios conteniendo la mutación deseada se solapan y son extendidos para formar un único gen mutado.

En la **Tabla 3.4** se detallan los oligonucleótidos diseñados para la generación de los genes *bla*_{CTX-M} mutados y sus características.

Tabla 3.4: Oligonucleótidos diseñados para generar enzimas CTX-M con la mutación puntual que codifica para el cambio Asp240Gly en la secuencia aminoacídica. Nótese que el cebador *Forward* fue diseñado de manera tal que el gen *bla*_{CTX-M} quedara en fase con el promotor de la β -galactosidasa del plásmido comercial pK19 digerido con la enzima de restricción *Sma*I.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Mutante D240G	Grupo CTX-M
CTX-M-1 FpK	AAATGGTTAAAAAATCACTGC	CTX-M-37 Asp240Gly	1/3
CTX-M-1 RpK	CTACAAACCGTCGGTGACGAT		
CTX-M-37 GxA Fw	GCAGCGGTGGCTATGGTAC		
CTX-M-37 CxT Rv	GTACCATAGCCACCGCTGC		
CTX-M-2 FpK	TAATGATGACTCAGAGCATTCGC	CTX-M-131*	2
CTX-M-2 RpK	GCATCAGAAACCGTGGGTACG		
CTX-M-2 GxA Fw	GCAGCGGAGGTTATGGCAC		
CTX-M-2 CxT Rv	GTGCCATAA ^C CTCCGCTGC		
CTX-M-8 FpK	AGATGATGAGACATCGCGTTAAGC	CTX-M-8 Asp240Gly	8
CTX-M-8 RpK	TAAATAACCGTCGGTGACG		
CTX-M-8 GxA Fw	CAGCGGTGGTTATGGTACGACG		
CTX-M-8 CxT Rv	CGTCGTACCATAA ^C CACCGCTG		
CTX-M-9 FpK	AGATGGTGACAAAGAGAGTGC	CTX-M-16*	9
CTX-M-9 RpK	TTACAGCCCTTCGGCGATG		
CTX-M-9 GxA Fw	GGCGGCTACGGCACCACCAATG		
CTX-M-9 CxT Rv	CATTGGTGGTGCCGTAG ^C CGCC		
CTX-M-78 FpK	GGATGATGAGAAAAAGCGTAAGGC	CTX-M-78 Asp240Gly	25
CTX-M-78 RpK	GGACTAATAACCGTCGGTGAC		
CTX-M-78 GxA Fw	GCGGCGGTTATGGTACGACGAATG		
CTX-M-78 CxT Rv	CATTCGTCGTACCATAA ^C CGCCGC		

* CTX-M-16 y CTX-M-131 existen como mutantes naturales y su secuencia se encuentra depositada en la base de datos de NCBI. En cambio, las variantes Asp240Gly de CTX-M-37, CTX-M-8 y CTX-M-78 aún no han sido descritas.

Los oligonucleótidos GxA y CxT son los poseedores de la mutación deseada. El cambio se señala en **negrita**.

La mezcla de reacción y las condiciones de amplificación usadas fueron las indicadas al comienzo de esta sección, pero agregando como templado en la tercera reacción de PCR

los dos productos obtenidos en la primera, tal y como se describió en el esquema de la **Figura 3.1**:

- Fragmento de PCR1 según esquema **Figura 1** es generado al combinar
cebador Fpk + cebador CxT Rv
- Fragmento de PCR2 según esquema **Figura 1** es generado al combinar
cebador GxA Fw + cebador RPK

2.2.3 Amplificación por PCR de genes bla_{CTX-M} salvajes y mutados para subclonado en pET28a(+)

Para la construcción de plásmidos productores de CTX-M utilizando pET28a(+) como vector de expresión, se construyeron previamente plásmidos de clonado pTZ57R/T (ver más adelante) conteniendo los genes bla_{CTX-M} modificados de manera tal de incorporar sitios de corte para endonucleasas de restricción (ER). De esta manera, se estabilizan los productos de PCR clonados en pTZ57R/T, se verifica luego la secuencia del gen y la incorporación del sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción y finalmente, se digiere y liga el inserto bla_{CTX-M} de manera direccionada en pET28a(+) para garantizar su correcta expresión a partir del promotor del fago T7. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la **Tabla 3.5** y la **Tabla 3.6**, donde se indica el sitio de reconocimiento de la ER en **negrita**.

Tabla 3.5: Oligonucleótidos diseñados para subclonar genes bla_{CTX-M} salvaje y mutante en pET28a(+) en fase con el promotor. Nótese que el cebador Forward fue diseñado de manera tal de construir una proteína madura (carente de péptido señal) fusionada a una cola de histidinas en el extremo amino-terminal para encarar un esquema de purificación por cromatografía de afinidad.

Cebador	Secuencia 5'-3'	ER	Grupo CTX-M
PFNdeG1ht	CTGC CATATG CAAACGGCGGACG	<i>NdeI</i>	3
PRHindG1ht	AAGCTT ACAAACCGTCGGTGACG	<i>HindIII</i>	
PFNheG2ht	GCTAGC CAGGCGAACAGCGTGCAA	<i>NheI</i>	2
PREcoG2ht	GAATTC TCAGAAACCGTGGGTT	<i>EcoRI</i>	
PFNheG8/25ht	CTGTAT GCTAGC GCGAACGA	<i>NheI</i>	8
PRHindG8/25ht	AAGCTT AATAACCGTCGGTG	<i>HindIII</i>	
PFNdeG9ht	CTT CATATG CAGACGAGTGCGG	<i>NdeI</i>	9
PRHindG9ht	AAGCTT ACAGCCCTTCGGC	<i>HindIII</i>	
PFNheG8/25ht	CTGTAT GCTAGC GCGAACGA	<i>NheI</i>	25
PRHindG8/25ht	AAGCTT AATAACCGTCGGTG	<i>HindIII</i>	

Tabla 3.6: Oligonucleótidos diseñados para subclonar el gen $bla_{CTX-M-96}$ en $pET28a(+)$ en fase con el promotor. Nótese que el cebador *Forward* fue diseñado de manera tal de construir una proteína sin modificaciones adicionales, poseedora de su péptido señal, para encarar un esquema de purificación por intercambio iónico.

Cebador	Secuencia 5'-3'	ER	Grupo CTX-M
PF1NcoIFII	<u>CCATGGT</u> TAAAAAATCACTGCGCC	<i>NcoI</i>	1/3
PR1HindG1ht	<u>AAGCTT</u> ACAAACCGTCGGTGACG	<i>HindIII</i>	

2.2.4 Mapeo por PCR del entorno genético de $bla_{CTX-M-12}$ y $bla_{CTX-M-96}$

Para analizar el entorno genético de $bla_{CTX-M-12}$ y $bla_{CTX-M-96}$ se tomaron como referencia las descripciones previas de Dhanji y colaboradores (**Figura 3.2**) [119]. Los fragmentos obtenidos por PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 0,8%, teñidos con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y visualizados con el transiluminador UV. Estos fueron purificados y secuenciados, y las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y el programa VECTOR NTI 11 (*Invitrogen*). En la **Tabla 3.7** se señalan los cebadores empleados para el mapeo y en la **Figura 3.3** se esquematiza el sitio de hibridación de cada uno. En el Anexo D se detallan las secuencias obtenidas para ambos entornos.

Figura 3.2: Entorno asociado a $bla_{CTX-M-15}$ de mayor prevalencia internacionalmente, también encontrado en Argentina [88] y el Reino Unido [119]. La secuencia de inserción *ISEcp1* se encuentra río arriba a $bla_{CTX-M-15}$, en el mismo sentido de transcripción que el gen de la β -lactamasa y separada de ella por una secuencia espaciadora de 48 bp. (Adaptado de [119]).

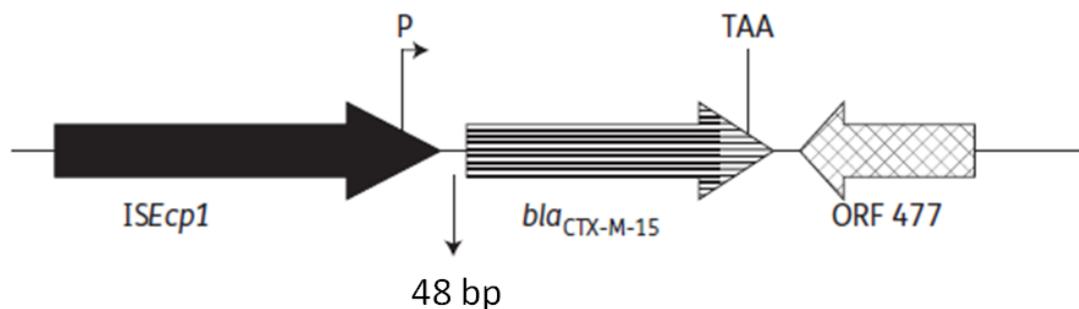


Tabla 3.7: Oligonucleótidos diseñados para dilucidar el entorno asociado a $bla_{CTX-M-12}$ y $bla_{CTX-M-96}$

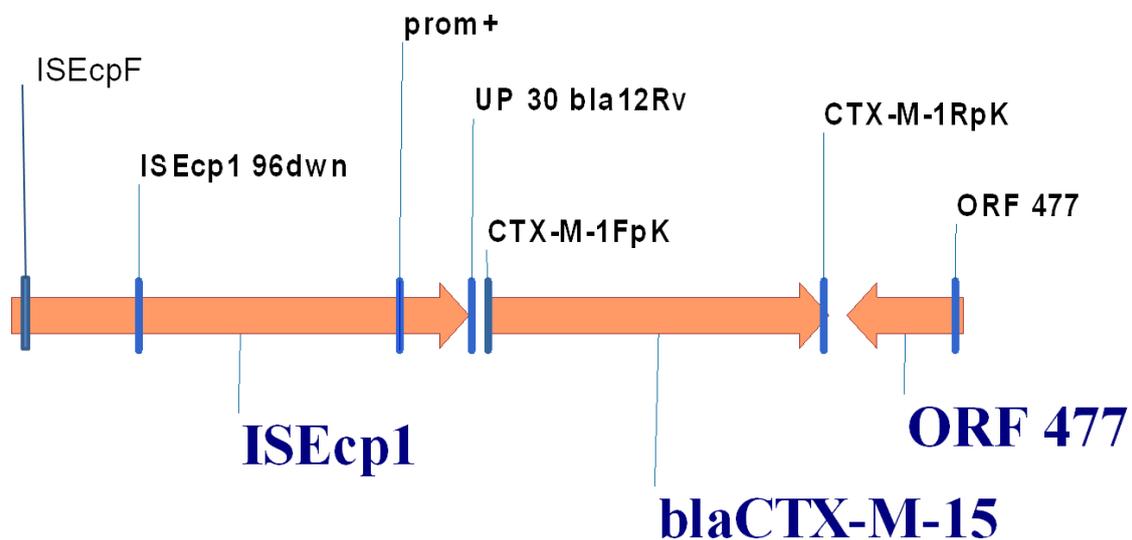
Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia	Tm (C°)
prom+ (Fw)	TGCTCTGTGGATAACTTGC	[119]	52
ISEcpF (Fw)	GCAGGTCTTTTCTGCTCC	Esta tesis	54
CTX-M-1FpK (Fw)	AAATGGTTAAAAAATCACTGC	Esta tesis	50
CTX-M-1RpK (Rv)	TTACAAACCGTCGGTGAC	Esta tesis	52
ISEcp1_96dwn (Fw)	ATTTCTGAATGGATAGTGG	Esta tesis	50
ISEcp1_96UP_rev (Rv)	ATGAAGTGACCGCAGAGC	Esta tesis	54
UP_30_bla12Rv (Rv)	ACAACAACATGAATAGTCC	Esta tesis	50
ORF 477 (Rv)	CTGGGACCTACGTGCGCCCG	[119]	68

Fw: Cebador *Forward*

Rv: Cebador *Reverse*

Tm: Temperatura en °C de disociación de las hebras del cebador

Figura 3.3: Esquema de los sitios de hibridación de los cebadores utilizados para realizar el mapeo por PCR del entorno genético asociado a $bla_{CTX-M-12}$ y $bla_{CTX-M-96}$. Nótese que el cebador ISEcp1_96UP_rev no posee sitio de hibridación en el entorno descrito en la **Figura 3.2**; fue diseñado tras la secuenciación del entorno asociado a $bla_{CTX-M-96}$.



2.3 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de amplificación por PCR y de digestión con ER fueron resueltos en geles de agarosa de 0,8% a 1,5%. Los productos a analizar se mezclaron con buffer

muestra 10X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xylene cyanol, 30 % de glicerol) para ser sembrados en el gel. Las corridas se realizaron a 90 voltios durante 30 a 40 minutos, utilizando buffer TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, EDTA 1 mM, pH 8). El gel fue revelado con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y las bandas resultantes visualizadas en un transiluminador UV (*Molecular Imager GelDoc XR Sistem, Life Science Research, Bio-Rad*). El origen de los reactivos empleados se describen en el Anexo A.

2.4 Purificación de ADN

El clonado de productos de PCR y la digestión enzimática con endonucleasas de restricción requieren de preparaciones de ADN con un grado de pureza adecuado, para evitar la presencia de componentes que alteren o interfieran con las reacciones, como polimerasas, oligonucleótidos, dNTPs, etc. Por ello, en este trabajo se utilizó el kit *GeneJET Gel Extraction Kit (Thermoscientific)* para purificar productos de PCR, plásmidos recombinantes y productos de digestión con ER, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las purificaciones fueron realizadas a partir de las mezclas de reacción (PCR con producto único de amplificación, plásmidos) o luego de la resolución en geles de agarosa y extracción por corte de la zona del gel donde se encuentra la banda deseada (PCR con productos múltiples, digestiones, etc.).

2.5 Técnicas de clonado

2.5.1 Clonado de *bla*_{CTX-M} en pK19

- **Clonado de productos de PCR:** En términos generales, los genes *bla*_{CTX-M} amplificados con *Pfu DNA polymerase* y purificados fueron clonados en el vector pTZ57R/T utilizando el kit comercial *insTACloning (ThermoScientific)*, previo agregado de una extensión de poli-adeninas en el extremo 3' para facilitar la ligación con el vector. Las construcciones fueron transformadas en *E. coli* XL1BLUE. A partir de los transformantes obtenidos se realizó una extracción de plásmidos utilizando el kit comercial *GeneJet Plasmid Mini Prep (ThermoScientific)* y los mismos se secuenciaron para controlar si el inserto presentaba la secuencia deseada. Posteriormente, los plásmidos fueron utilizados como molde para amplificar los genes *bla*_{CTX-M} con *Pfu DNA polymerase (Promega)* y se ligaron en el vector pK19 de expresión constitutiva digerido con *SmaI*, que porta un marcador de

resistencia a kanamicina. Los plásmidos recombinantes pK-CTX-M se utilizaron para transformar:

E. coli DH5 α (**Tabla 3.8**)

E. coli K12 y sus derivadas carentes de porinas Omp (**Tabla 3.9**)

Los transformantes obtenidos fueron seleccionados en placas de TSA conteniendo 30 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina.

Tabla 3.8: Clones de pK19 en *E. coli* DH5 α obtenidos en este trabajo (continúa pág. sig.)

Nombre del clon	Nombre del plásmido	Descripción	Uso
DH5apK19	pK19	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19	Cepa control
DH5apK-3	pK3	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-3} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly en CTX-M-15, variante mutacional natural postulada como derivada de CTX-M-3, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas
DH5apK-15	pK15	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-15} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly en CTX-M-96, variante mutacional natural postulada como derivada de CTX-M-12, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas
DH5apK-12	pK12	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-12} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly, generada <i>in vitro</i> en CTX-M-37, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas
DH5apK-96	pK96	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-96} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly, generada <i>in vitro</i> en CTX-M-37, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas
DH5apK-37	pK37	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-37} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly, generada <i>in vitro</i> en CTX-M-37, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas
DH5apK-37Asp240Gly	pK37Asp240Gly	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-37Asp240Gly} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly, generada <i>in vitro</i> en CTX-M-37, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas

Nombre del clon	Nombre del plásmido	Descripción	Uso
DH5apK-2	pK2	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-2} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly en CTX-M-131, variante mutacional natural postulada como derivada de CTX-M-2, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas
DH5apK-131	pK131	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-131} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	
DH5apK-9	pK9	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-9} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly en CTX-M-16, variante mutacional natural postulada como derivada de CTX-M-9, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas
DH5apK-16	pK16	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-16} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	
DH5apK-78	pK78	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-78} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly, generada <i>in vitro</i> en CTX-M-78, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas
DH5apK-78Asp240Gly	pK78Asp240Gly	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido de clonado pK19 con <i>bla</i> _{CTX-M-78Asp240Gly} en fase con el promotor de la β -galactosidasa	

Tabla 3.9: Clones de pK19 en *E. coli* K12 y derivadas *Omp^r* obtenidos en este trabajo

Nombre	<i>E. coli</i>	plásmido	Uso
K12-pK	K12	pK19	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly en CTX-M-96, variante mutacional natural derivada de CTX-M-12, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas en una cepa de <i>E. coli</i> que expresa todas sus porinas
K12-pK12		pK12	
K12-pK96		pK96	
JF694-pK	JF694	pK19	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly en CTX-M-96, variante mutacional natural derivada de CTX-M-12, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas en una cepa de <i>E. coli</i> <i>OmpF</i> - y <i>OmpC</i> -
JF694-pK12		pK12	
JF694-pK96		pK96	
JF700-pK	JF700	pK19	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly en CTX-M-96, variante mutacional natural derivada de CTX-M-12, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas en una cepa de <i>E. coli</i> <i>OmpF</i> - y <i>OmpA</i> -
JF700-pK12		pK12	
JF700-pK96		pK96	
JF701-pK	JF701	pK19	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly en CTX-M-96, variante mutacional natural derivada de CTX-M-12, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas en una cepa de <i>E. coli</i> <i>OmpC</i> -
JF701-pK12		pK12	
JF701-pK96		pK96	
JF703-pK	JF703	pK19	Evaluación del rol de la mutación Asp240Gly en CTX-M-96, variante mutacional natural derivada de CTX-M-12, en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas en una cepa de <i>E. coli</i> <i>OmpF</i> -
JF703-pK12		pK12	
JF703-pK96		pK96	

2.5.2 Clonado de bla_{CTX-M} en pET28a(+) con cola de histidinas

En esta sección del trabajo se realizó el clonado de fragmentos de ADN siguiendo dos estrategias diferentes, según la finalidad de cada construcción:

- **Clonado de productos de PCR:** Esta técnica fue utilizada para el clonado de genes codificantes de bla_{CTX-M} (variante salvaje y su respectiva mutante Asp240Gly) con sitios de corte para diferentes endonucleasas incorporados por PCR, en el vector de clonado pTZ57R/T (*kit insTACloning de ThermoScientific*), para estabilizar el inserto y luego digerirlo y subclonarlo en el vector de expresión pET28a(+), previo agregado de una extensión de poli-adeninas en el extremo 3' para facilitar la ligación con el vector. Las construcciones fueron transformadas en *E. coli* XL1BLUE. A partir de los transformantes obtenidos se realizó una extracción de plásmidos utilizando el equipo comercial *GeneJet Plasmid Mini Prep (ThermoScientific)* y los mismos se secuenciaron para controlar si el inserto presentaba la secuencia deseada. En la **Tabla 3.10** se detallan los clones construídos en pTZ57R/T y transformados en *E. coli*.

Tabla 3.10: Clones en pTZ57R/T obtenidos en este trabajo (Continúa pág. sig.)

Nombre	Descripción	Uso
pFMT12ht	<i>E. coli</i> XL1BLUE conteniendo el vector de clonado pTZ57R/T con $bla_{CTX-M-12}$	Estabilización de bla_{CTX-M} para su posterior digestión y clonado en el vector de expresión pET28a Digestión con <i>NdeI</i> y <i>HindIII</i>
pFMT96ht	<i>E. coli</i> XL1BLUE conteniendo el vector de clonado pTZ57R/T con $bla_{CTX-M-96}$	
pFMT2ht	<i>E. coli</i> XL1BLUE conteniendo el vector de clonado pTZ57R/T con $bla_{CTX-M-2}$	Estabilización de bla_{CTX-M} para su posterior digestión y clonado en el vector de expresión pET28a Digestión con <i>NheI</i> y <i>EcoRI</i>
pFMT131ht	<i>E. coli</i> XL1BLUE conteniendo el vector de clonado pTZ57R/T con $bla_{CTX-M-131}$	

Nombre	Descripción	Uso
pFMT8ht	<i>E. coli</i> XL1BLUE conteniendo el vector de clonado pTZ57R/T con <i>bla</i> _{CTX-M-8}	Estabilización de <i>bla</i> _{CTX-M} para su posterior digestión y clonado en el vector de expresión pET28a
pFMT8D240Ght	<i>E. coli</i> XL1BLUE conteniendo el vector de clonado pTZ57R/T con <i>bla</i> _{CTX-M-8Asp240Gly}	Digestión con <i>NheI</i> <i>HindIII</i>
pFMT9ht	<i>E. coli</i> XL1BLUE conteniendo el vector de clonado pTZ57R/T con <i>bla</i> _{CTX-M-9}	Estabilización de <i>bla</i> _{CTX-M} para su posterior digestión y clonado en el vector de expresión pET28a
pFMT16ht	<i>E. coli</i> XL1BLUE conteniendo el vector de clonado pTZ57R/T con <i>bla</i> _{CTX-M-16}	Digestión con <i>NdeI</i> y <i>HindIII</i>
pFMT78ht	<i>E. coli</i> XL1BLUE conteniendo el vector de clonado pTZ57R/T con <i>bla</i> _{CTX-M-78}	Estabilización de <i>bla</i> _{CTX-M} para su posterior digestión y clonado en el vector de expresión pET28a
pFMT78_{Asp240Gly}ht	<i>E. coli</i> XL1BLUE conteniendo el vector de clonado pTZ57R/T con <i>bla</i> _{CTX-M-78Asp240Gly}	Digestión con <i>NheI</i> y <i>HindIII</i>

- **Clonado de fragmentos de restricción:** Esta técnica fue utilizada para el subclonado de genes *bla*_{CTX-M} en el vector de expresión pET28a(+), obtenidos luego de la digestión de la construcción correspondiente en pTZ57R/T. En la **Tabla 3.11** se detallan los clones construidos en pET28a(+) y transformados en *E. coli* XL1BLUE primero, para su estabilización, y luego en *E. coli*. BL21 (DE3) para inducir la expresión. Todos ellos fueron construidos de manera tal que expresaran la correspondiente CTX-M madura sin péptido señal y con cola de poli-histidinas en el extremo amino terminal, para encarar luego un esquema de purificación mediante cromatografía de afinidad con columnas de níquel.

Tabla 3.11: Clones en pET28a obtenidos en esta sección

Nombre	Descripción	Uso
pET12ht	<i>E.coli</i> BL21 conteniendo el vector de expresión pET28a(+) con <i>bla</i> _{CTX-M-12}	Expresión de la β-lactamasa para su purificación posterior por cromatografía de afinidad
pET96ht	<i>E.coli</i> BL21 conteniendo el vector de expresión pET28a(+) con <i>bla</i> _{CTX-M-96}	
pET2ht	<i>E.coli</i> BL21 conteniendo el vector de expresión pET28a(+) con <i>bla</i> _{CTX-M-2}	Expresión de la β-lactamasa para su purificación posterior por cromatografía de afinidad
pET131ht	<i>E.coli</i> BL21 conteniendo el vector de expresión pET28a(+) con <i>bla</i> _{CTX-M-131}	
pET8ht	<i>E.coli</i> BL21 conteniendo el vector de expresión pET28a(+) con <i>bla</i> _{CTX-M-8}	Expresión de la β-lactamasa para su purificación posterior por cromatografía de afinidad
pET8D240Ght	<i>E.coli</i> BL21 conteniendo el vector de expresión pET28a(+) con <i>bla</i> _{CTX-M-8Asp240Gly}	
pET9ht	<i>E.coli</i> BL21 conteniendo el vector de expresión pET28a(+) con <i>bla</i> _{CTX-M-9}	Expresión de la β-lactamasa para su purificación posterior por cromatografía de afinidad
pET16ht	<i>E.coli</i> BL21 conteniendo el vector de expresión pET28a(+) con <i>bla</i> _{CTX-M-16}	
pET78ht	<i>E.coli</i> BL21 conteniendo el vector de expresión pET28a(+) con <i>bla</i> _{CTX-M-78}	
pET78Asp240Glyht	<i>E.coli</i> BL21 conteniendo el vector de expresión pET28a(+) con <i>bla</i> _{CTX-M-78Asp240Gly}	Expresión de la β-lactamasa para su purificación posterior por cromatografía de afinidad

2.5.3 Clonado de *bla*_{CTX-M-96} en pET28a(+) sin modificaciones adicionales

Con el objetivo de obtener cristales de CTX-M-96, decidimos encarar un esquema de purificación sin modificaciones adicionales sobre la proteína para obtener un modelo representativo de las β -lactamasas CTX-M y sus variantes mutacionales Asp240Gly.

Se amplificó por PCR el gen codificante de la β -lactamasa a partir del ADN plasmídico de *K. pneumoniae* 293235 (CTX-M-96), utilizando *Pfu DNA polymerase* (Promega) y los cebadores PF1NcoIF y PR1Hind. Una vez purificado el amplicón, se ligó en el vector pJET1.2 utilizando el sistema comercial de *ThermoScientific*. Esta construcción fue utilizada para secuenciar el inserto y corroborar la secuencia utilizando cebadores provistos por el kit. El plásmido resultante, pJET96, fue digerido con *NcoI* y *HindIII* y el inserto sub-clonado en el vector pET28a(+). La ligación fue introducida por transformación en células competentes de *E.coli* XL1BLUE y, luego de la selección de clones recombinantes y de la extracción del plásmido, éste se introdujo por transformación en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3). La selección fue realizada en placas de LBA suplementadas con kanamicina 30 μ g/ml. Los clones positivos fueron confirmados por digestión enzimática del inserto clonado (utilizando las mismas endonucleasas de restricción) y secuenciación (**Tabla 3.12**).

Tabla 3.12: Clones obtenidos en esta sección

Nombre	Descripción	Uso
pJET96	<i>E.coli</i> XL1BLUE con el vector de clonado pJET1.2 con <i>bla</i> _{CTX-M-96}	Estabilización de <i>bla</i> _{CTX-M} para su posterior digestión y clonado en el vector de expresión pET28a(+) Digestión con <i>NcoI</i> y <i>HindIII</i>
pET96II	<i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector de expresión pET28a(+) con <i>bla</i> _{CTX-M-96}	Expresión de la β -lactamasa para su purificación posterior por intercambio iónico Obtención de cristales de CTX-M-96 madura

El origen de los reactivos y las mezclas de reacción utilizadas en la sección 2.5 se describen en los Anexos A y C respectivamente.

2.6 Obtención de células competentes de *Escherichia coli*

Como esta especie no tiene la capacidad natural de captar ADN libre, se utilizó un tratamiento con soluciones que contenían CaCl_2 ó RbCl , y luego un *shock* térmico, para inducir un estado transitorio de competencia, a través del cual las células pudieron captar ADN.

2.6.1 Introducción de plásmidos recombinantes por transformación en células competentes con CaCl_2

Se utilizó esta metodología para introducir, en células competentes, construcciones conteniendo fragmentos de ADN clonados en los vectores pK19, pTZ57R/T, pJET y pET28a(+), tanto para su estabilización y secuenciación como así también para ensayos de producción de β -lactamasas. A continuación se detalla paso a paso el protocolo utilizado:

Preparación de células competentes

1. A partir de un cultivo ON de la cepa adecuada (*E. coli* DH5 α , *E. coli* XL1BLUE, *E. coli* BL21, *E. coli* K12 y derivadas) realizar una dilución 1/100 en caldo LB. Incubar a 37°C hasta obtener una densidad óptica entre 0,4-0,6 unidades de absorbancia a una longitud de onda (λ) de 550 nm ($\text{DO}_{\lambda 550}$).
2. Distribuir 1 ml de este cultivo en tubos eppendorf estériles (un tubo por cada reacción de transformación, incluyendo controles positivo, negativo y de viabilidad).
3. Cosechar las células mediante centrifugación a 5.000 rpm en microcentrífuga (*Micro Centaur*, *SANYO*) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Resuspender el sedimento bacteriano obtenido en 500 μl de ST1.
5. Centrifugar 5 minutos a 5.000 rpm en microcentrífuga (*Micro Centaur*, *SANYO*) a temperatura ambiente.
6. Resuspender el sedimento bacteriano obtenido en 500 μl de ST2.
7. Incubar al menos 15 minutos en baño de hielo 0°C.
8. Centrifugar 5 minutos a 5.000 rpm en microcentrífuga (*Micro Centaur*, *SANYO*) a temperatura ambiente.
9. Resuspender las células en 100 μl de ST2.

Transformación de células competentes:

10. Agregar 3 μl del ADN a transformar a la suspensión de células competentes obtenidas en el paso 9.
11. Incubar 1 hora en baño de hielo.
12. Realizar un *shock* térmico en baño de agua a 42°C por 45 segundos.
13. Agregar 1 ml de LB e incubar 1 hora a 37°C con agitación.
14. Centrifugar 2 minutos a 13.000 en microcentrífuga (*Micro Centaur, SANYO*) y descartar 1 ml del sobrenadante.
15. Resuspender las células en los 100 μl del sobrenadante restante y sembrar en placas de LBA con el antibiótico de selección adecuado.
16. Incubar 16-20 horas a 37°C.

Controles

Un **control negativo** de células competentes sin agregado de ADN. Sembrar en placas de LBA suplementadas con el antibiótico de selección.

Un **control de viabilidad** de células competentes sin agregado de ADN. Sembrar en placas de LBA sin antibiótico.

Un **control positivo** de transformación, para evaluar el grado de competencia de las células. Agregar 10 ng/ μl de un plásmido pequeño que contenga resistencia al antibiótico utilizado en la placa de la selección. Por ejemplo para ampicilina utilizar el vector pUC18 y para kanamicina el vector pK19.

Soluciones de transformación

ST1: MOPS 10 mM, KCl 10 mM, pH 7. Ajustar a pH 7 con NaOH. Esterilizar por filtración.

ST2: MOPS 100 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, pH 6.5. Ajustar a pH con NaOH. Esterilizar por filtración.

2.6.2 *Introducción de plásmidos de alto peso molecular por transformación en células competentes con RbCl*

Se usó para transformar *E. coli* DH5 α con el plásmido extraído de Kpn 293235 [152]. A continuación se detalla paso a paso el protocolo utilizado:

Preparación de células competentes

1. Inocular 5 ml de caldo LB con dos o tres colonias de un aislamiento fresco e incubar a 37°C durante 18 horas, con agitación.
2. Diluir el cultivo en caldo LB termostatzado previamente a 37°C hasta obtener una suspensión de $DO_{\lambda 550}$ aproximada de 0,1 unidades de absorbancia.
3. Incubar a 37°C, en agitación constante, hasta $DO_{\lambda 550}$ de 0,5 unidades de absorbancia (aproximadamente 2 horas de incubación). A partir de aquí trabajar siempre en baño de hielo.
4. Transferir los cultivos a tubos de centrifuga pre-enfriados de 50 ml y separar las células por centrifugación a 4.000 rpm en centrifuga *Sorvall* (rotor SS34) a 4°C durante 10 minutos.
5. Resuspender los sedimentos en 15 ml de solución TfbI fría por cada 50 ml de la dilución de partida, agitando suavemente con pipeta de vidrio pre-enfriada, y no con *vortex*. Incubar durante 90 minutos en hielo.
6. Centrifugar en las mismas condiciones del punto 4. Descartar el sobrenadante y secar con hisopo estéril las paredes del tubo para quitar el RbCl remanente.
7. Resuspender el sedimento suavemente en 2 ml de TfbII frío.
8. Fraccionar la suspensión en criotubos plásticos de 0,5 ml pre-enfriados, de a 100 μ l. Las células se pueden almacenar a -70°C durante 90 días aproximadamente.

Transformación de células competentes:

9. Agregar 3 μ l del ADN a transformar a la suspensión de células competentes obtenidas en el paso 8.
10. Incubar 1 hora en baño de hielo.
11. Realizar un *shock* térmico en baño de agua a 42°C por 45 segundos.
12. Agregar 1 ml de LB e incubar 1 hora a 37°C con agitación.
13. Centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm en microcentrifuga (*Micro Centaur*, *SANYO*) y descartar 1 ml del sobrenadante.
14. Resuspender las células en los 100 μ l del sobrenadante restante y sembrar en placas de LBA con el antibiótico de selección adecuado.
15. Incubar 16-20 horas a 37°C.

Controles

Un **control negativo** de células competentes sin agregado de ADN.

Un **control de viabilidad** de células competentes sin agregado de ADN.

Un **control positivo** de transformación.

Soluciones de transformación

TfbI: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM AcK, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 15% v/v glicerol, pH 5,8. *Preparación:* Para 250 ml, mezclar 0,74g AcK, 0,37g CaCl₂·2H₂O y 37,5ml glicerol con agua destilada, llevar a pH 7,9, agregar 3,02g RbCl y 1,57g MnCl₂, quedando un pH 5,8 (ajustarlo si es necesario con AcH 0,2M). Esterilizar con calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

TfbII: 10 mM MOPS pH 7,0, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂·2H₂O, 15 % v/v glicerol, pH 6,5. *Preparación:* Para 250 ml, mezclar 0,52g MOPS, 0,28g RbCl, 2,75g CaCl₂·2H₂O y 37,5ml glicerol con agua destilada, llevar a pH 6,5 con NaOH. Esterilizar con calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

La composición del LB y el LBA y el origen de los reactivos empleados se describen en el Anexo A.

2.7 Análisis de los transformantes obtenidos

Para analizar las colonias transformantes conteniendo los plásmidos recombinantes, se observó si las colonias desarrolladas poseían las características fenotípicas deseadas, como resistencia a los antibióticos utilizados para la selección y también presencia de α -complementación en el caso de los clones poseedores de pTZ57R/T. Los clones fueron repicados en placas de LBA y amplificados en un volumen de 5 ml de caldo LB, conteniendo el antibiótico adecuado para ejercer presión selectiva y evitar la pérdida del plásmido. Se incubaron al menos 18 hs a 37°C con agitación. Se extrajeron los plásmidos, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa, y se realizaron reacciones de PCR sobre el material obtenido para verificar la presencia del gen inserto en el vector. Los clones que fueron identificados como portadores del plásmido recombinante se conservaron en caldo LB con 20% glicerol a -20°C; los plásmidos se purificaron por sistemas comerciales de extracción para su posterior secuenciación.

2.8 Secuenciación automatizada de ADN

Todas las secuencias nucleotídicas fueron analizadas según el método de Sanger. Esta metodología se basa en la síntesis de la cadena complementaria al molde de ADN, adicionando los correspondientes *deoxi-nucleótidos* (dNTPs), y análogos que no poseen el grupo 3'-OH, *dideoxi-nucleótidos* (ddNTPs), a partir de cebadores de oligonucleótidos, los cuales pueden ser *universales*, que hibridan con las secuencias flanqueantes del *polilinker* de los vectores, o los mismos cebadores utilizados para las amplificaciones por PCR.

Las secuenciaciones se realizaron en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, o en la empresa Macrogen de Corea.

2.9 Análisis de las secuencias

Se utilizaron varios programas y aplicaciones para el análisis de las secuencias de ADN, los cuales se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3.13: Herramientas y programas de bioinformática utilizados para el análisis de secuencias de ADN

Programa	Utilidad	URL / Fuente
<i>BLAST</i>	Similitud de secuencias	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
<i>ClustalW</i>	Alineamiento de secuencias	http://www2.ebi.ac.uk/
<i>Web Cutter</i>	Perfiles de restricción	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/
<i>Chromas 1.45</i>	Análisis de electroferogramas	http://www.technelysium.com.au/chromas.html
<i>EMBL Database</i>	Depósito de secuencias	http://www.ebi.ac.uk/embl/

2.10 Conjugación

Se realizaron ensayos de conjugación para evaluar la capacidad de transferencia de los plásmidos portadores de *bla*_{CTX-M-12} y *bla*_{CTX-M-96}. Como cepa receptora se utilizó *E. coli* J53 (F⁻, resistente a azida sódica 100 µg/ml). En el caso de Kpn 293235 se realizaron los ensayos tanto en medio sólido como líquido, mientras que para Kpn 1138 solamente en medio líquido.

2.10.1 Conjugación en medio sólido

Se incubaron *E. coli* J53 y Kpn 293235 por separado en caldo TSB a 37° con agitación durante 18 horas. El cultivo de la cepa dadora se diluyó 1/20 en TSB y se incubó durante 3 horas más con agitación para obtener un cultivo en fase logarítmica. En una placa conteniendo medio TSA se colocó una membrana de acetato de celulosa estéril (tamaño de poro 0,2-0,45 µm). Sobre la membrana se colocaron 50 µl de células dadoras y receptoras y se incubó la placa a 37°C durante 18 horas. Luego, las células se resuspendieron transfiriendo las membranas a tubos plásticos de 15 ml los cuales contenían 3 ml de solución fisiológica estéril. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron 5 minutos a 5.000 rpm a temperatura ambiente en centrífuga *Rolco*. Se descartaron tanto el sobrenadante como la membrana, y el pellet de células se resuspendió en 100 µl de solución fisiológica estéril y se sembró por extensión en placas que contenían TSA suplementado con azida sódica 100 µg/ml y ceftriaxona 20 µg/ml.

2.10.2 Conjugación en medio líquido

Se incubaron *E. coli* J53, Kpn 293235 y Kpn 1138 por separado en caldo TSB a 37° con agitación durante 18 horas. El cultivo de la cepa dadora (Kpn 293235 ó Kpn 1138) se diluyó 1/20 en TSB y se incubó durante 3 horas más con agitación para obtener un cultivo en fase logarítmica. Se mezclaron ambas cepas en una proporción 1:10 (dadora:receptora) en tubos de ensayo estériles y se incubaron durante 16 horas sin agitación. Para seleccionar los transconjugantes, se transfirió la mezcla a un tubo eppendorf y se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos en microcentrífuga (*Micro Centaur*, *SANYO*). El pellet se resuspendió en 100 µl de TSB y se sembró por extensión en TSA suplementado con azida sódica 100 µg/ml y ceftriaxona 20 µg/ml.

2.11 Determinación del tamaño molecular de los plásmidos portadores de *bla*_{CTX-M-12} y *bla*_{CTX-M-96}

En colaboración con la Dra. Milena Dropa de la Escuela de Salud Pública de la Universidad de San Pablo, San Pablo, Brasil, se determinó el tamaño molecular de los plásmidos portadores de *bla*_{CTX-M-12} y *bla*_{CTX-M-96}.

Las cepas salvajes y sus respectivos transconjugantes y/o transformantes se cultivaron en 30 ml de caldo LB con ampicilina 100µg/mL durante 18 horas a 35°C. Las células se centrifugaron y el sedimento bacteriano se resuspendió en 400µL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0), y luego se transfirió a un tubo eppendorf con agarosa de bajo punto de fusión (*Bio-Rad, CA, EE.UU.*). Se llenaron moldes de *plugs* con la mezcla de células y agarosa hasta la solidificación y se procedió a la lisis celular según el protocolo detallado en el anexo C. Luego, cada *plug* fue incubado con 10U de nucleasa S1 a 37 ° C durante 45 minutos [153]. En las condiciones ensayadas, la enzima S1 corta el ADN plasmídico una sola vez, linealizando y dejando intacto el ADN genómico. Después de eso, las muestras se sometieron a electroforesis de campo pulsado en gel de agarosa al 1,2% preparado en buffer TE, durante 20 h a 6 V/cm, con pulsos de duración de 1 a 40 segundos, utilizando el equipo CHEF-DRII (*Bio-Rad*). Como marcador de peso molecular se utilizó *Lambda Ladder PFGE Marker*. El gel se tiñó con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y se visualizó bajo luz UV (*Epi II Chemi cuarto oscuro, UVP Sistemas Bioimagen*).

2.12 Tipificación molecular de los microorganismos productores de *bla*_{CTX-M-12} y *bla*_{CTX-M-96} por ERIC-PCR

Se realizó la tipificación molecular de los dos aislamientos de *K. pneumoniae* 1138 y 293235 por ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*) [154]. Los productos obtenidos fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en buffer TBE 0,5X (TRIS base 0.89 M, Borato 0.089 M, EDTA disódico 2.5 mM, para TBE 10X a pH 8) a 4,6 voltios/cm, durante 3 horas, revelados con bromuro de etidio 0,5 µg/ml, y luego observados con el transiluminador UV. La secuencia de los cebadores y las condiciones de reacción utilizadas se detallan a continuación:

Cebador	Secuencia 5'-3'
ERIC 1	CACTTAGGGGTCCTCAATGTA
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG
Mezcla de Reacción	Parámetros de amplificación
Buffer 10x	2.50 µl
MgCl ₂ 50 mM	2.5 µl
dNTPs 10 mM	3.00 µl
ERIC 1 10pmol/µl	3.00µl
ERIC 2 10pmol/µl	3.00µl
DNA	5.00 µl
Agua milliQ estéril	5.50 µl
Taq 5U/µl	0.50 µl
	94°C 2 min
	94° C 30 seg
	50° C 1min
	72° C 4min
	72° C. 7min
	} X 30

2.13 Tipificación molecular de los plásmidos portadores de *bla*_{CTX-M}

La tipificación molecular de los plásmidos portadores de *bla*_{CTX-M-12} y *bla*_{CTX-M-96} se llevó a cabo por medio de la identificación del grupo de incompatibilidad de los mismos a partir de la técnica propuesta por Carattoli y colaboradores [155]. La identificación de los grupos de incompatibilidad IncHI1, IncHI2, IncI1, IncX, IncL/M, IncN, IncFIA, IncFIB, IncW, IncY, IncP, IncFIC, IncA/C, IncT, IncFIIS, IncFrepB, IncK e IncB/O se realizó empleando cinco ensayos de PCR *Multiplex* y tres PCR simples. En todos los casos se utilizó como templado ADN plasmídico extraído del transformante y transconjugante obtenidos. Los reactivos empleados, las secuencias de los cebadores y las condiciones de reacción utilizadas se detallan en el anexo C.

3 Ensayos microbiológicos

Ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos y detección de BLEE

Se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) para evaluar el grado de sensibilidad de:

- Los clones construídos en la sección 2.5.1, que expresaban CTX-M a partir del promotor de la β -galactosidasa de pK19, a las cefalosporinas de tercera generación cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ) y otros antibióticos β -lactámicos.
- Kpn 1138 y Kpn 293235, a antibióticos β -lactámicos.

Se incluyeron como cepas control *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 35218, descritas en la **Tabla 3.2**.

- **Test de sinergia para BLEE:** Este ensayo detecta la inhibición de BLEE por inhibidores de β -lactamasas como ácido clavulánico, enfrentando discos conteniendo inhibidor y discos conteniendo una cefalosporina. El mejor sistema utiliza discos comerciales de amoxicilina-clavulánico (20+10 μ g) y discos de cefotaxima y ceftazidima (30 μ g), ubicados a 2,5 centímetros uno del otro (borde a borde). Un agrandamiento en la zona de inhibición de las cefalosporinas, adyacente al disco conteniendo clavulánico, es presuntivo de la presencia de BLEE.
- **Ensayos de detección y confirmación fenotípica de BLEE:** Este ensayo fue propuesto originalmente por el CLSI para *E. coli* y *Klebsiella* spp. para detectar BLEE. El ensayo puede utilizarse, con un elevado grado de especificidad, para otras especies relacionadas. Se realiza en medio sólido colocando discos comerciales de cefalosporinas de tercera generación solas y con clavulanato de litio (10 μ g) (**Tabla 3.14**).

Tabla 3.14: Interpretación del ensayo de búsqueda y confirmación de BLEE, según CLSI 2010

Cefalosporina de tercera generación	Test de difusión en medio sólido (Antibiograma) (diámetro del halo de inhibición)	
	Búsqueda (cefalosporina sola)	Confirmación (cefalosporina más ácido clavulánico)
Ceftazidima	≤ 22 mm	Un aumento de ≥ 5 mm en el diámetro del halo
Cefotaxima	≤ 27 mm	
Ceftriaxona	≤ 25 mm	

- ***Dilución en medio sólido - Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)***: Este ensayo permite determinar la mínima concentración que inhibe el desarrollo bacteriano o CIM. Diferentes concentraciones del antibiótico (1 ml en un factor 10X) fueron mezcladas con 9 ml del medio (Agar Müeller Hinton, Britania) fundido y termostatzado a 42°C; las mezclas se homogeneizaron y volcaron en placas de Petri estériles. Los inóculos bacterianos estandarizados se depositaron sobre la superficie del medio agarizado con la ayuda de un multi-inoculador de Steers.

Todos los antibióticos, reactivos, medios comerciales y protocolos empleados se describen en los anexos correspondiente.

4 Metodologías empleadas para el estudio de proteínas

4.1 Cálculo de actividad específica (AE) de los clones de *E. coli* DH5 α productores de CTX-M obtenidos en 2.5.1

Se procedió al cálculo de la AE para determinar si los clones analizados producían cantidades equivalentes de CTX-M y por lo tanto inferir si los valores de CIM obtenidos para cada uno de ellos eran comparables entre sí.

4.1.1 Preparación de extractos proteicos crudos

Las β -lactamasas son enzimas periplásmicas en los microorganismos gramnegativos, por lo tanto es necesario utilizar alguna metodología que permita su extracción. Para obtener extractos proteicos destinados a la detección y caracterización de algunas propiedades de las β -lactamasas, se partió de volúmenes adecuados de cultivos de 18 hs de incubación realizados en caldo tripténa soja (TSB) o similar. Los cultivos fueron adicionados con una concentración 50 μ g/ml de ampicilina y 30 μ g/ml de kanamicina como seleccionadores de la resistencia de acuerdo con el perfil de sensibilidad de cada clon. Los cultivos fueron centrifugados a 8.000 xg, a 4°C durante 20 min, en centrífuga refrigerada *Sorvall RC5C* (*Sorvall Instruments, DuPont, USA*); las células sedimentadas fueron resuspendidas en buffer de fosfatos 20 mM, pH 7,0, y centrifugadas en las mismas condiciones. Finalmente, las células se resuspendieron nuevamente en el mismo buffer y fueron sometidas a ruptura ultrasónica (40% de potencia, 20 pulsos/minuto,

durante 5 minutos), en baño de hielo, utilizando un sonicador *Vibra-Cell* (*Sonics & Materials, USA*). Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 27.000 xg, a 4°C durante 30 min.

4.1.2 *Detección de actividad de β -lactamasa*

El nitrocefín es una cefalosporina cromogénica (*Oxoid, UK*) que al ser hidrolizada por una β -lactamasa cambia de color amarillo a rojo (producto de la hidrólisis). Representa el método más sensible para la detección de actividad de β -lactamasas.

Se mezclaron 20 μ l de extracto crudo con 5 μ l de nitrocefín 100 μ M, y la aparición de un color rojo intenso dentro de los primeros 60 seg se interpretó como actividad positiva de β -lactamasa.

4.1.3 *Cuantificación de proteínas*

Se puede aprovechar la absorción de algunos residuos aminoacídicos (aromáticos) a longitudes de onda cercanas a 280 nm, por medida espectrofotométrica directa de proteínas en solución y comparación con una curva estándar de BSA, para estimar la concentración de proteínas totales en solución:

1. Preparar diluciones de BSA.
2. Medir la absorbancia a 280 nm de las diluciones de BSA y las muestras a ensayar.
3. Construir la curva estándar y determinar la concentración de las muestras por interpolación en la curva de calibración.

4.1.4 *Cálculo de Actividad Específica (AE)*

Es posible medir espectrofotométricamente la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos por acción de β -lactamasas, ya sea en extractos crudos como en preparaciones puras o semi-puras de enzima. Se define así una *unidad de actividad de β -lactamasa* como aquella que se requiere para hidrolizar 1 μ mol de sustrato (antibiótico) por minuto a una temperatura determinada. Para independizarnos del tipo de preparación que contiene la β -lactamasa de interés (extracto crudo, enzima pura), podemos relacionar este valor de

actividad con la cantidad de proteína presente. Entonces, se define **actividad específica** como el número de unidades de β -lactamasa por miligramo de proteína.

La hidrólisis del β -lactámico fue examinada por análisis espectrofotométrico en un equipo *T80 UV/Vis spectrophotometer (PG Instruments Ltd., UK)* en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso, con lecturas de absorbancia cada 1 seg durante 2 minutos (velocidad inicial V_0), a la longitud de onda óptima para cefalotina. El antibiótico fue utilizado siempre en concentración 100 μ M, preparado en buffer de fosfatos 20 mM, pH 7,0.

Ecuaciones:

1- <i>Según Ley de Lambert-Beer</i>	$\Delta\text{Abs}=\Delta\epsilon.b.c$
2- <i>Moles ATB hidrolizados/min.L</i>	$V_0(\text{UAbs}/\text{min})/b.\Delta\epsilon (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$
3- <i>Actividad Específica (AE)</i>	nmoles ATB hidrolizados/min.mg proteína

- 1- Ley de Lambert-Beer, donde ΔA es la absorbancia a la longitud de onda apropiada; $\Delta \epsilon$ la diferencia entre los coeficientes molares de extinción para el antibiótico (hidrolizado menos no hidrolizado) en particular, a esa longitud de onda; b el paso de la cubeta y c la concentración de sustrato o producto, según lo que se determine.
- 2- Determinación de los moles de antibiótico (ATB) hidrolizados por minuto a partir de la ecuación anterior, de donde surge la determinación de una unidad de actividad de β -lactamasa; V_0 : velocidad inicial.
- 3- Actividad específica de β -lactamasa, relacionando los moles hidrolizados con la concentración de proteína en la reacción.

4.2 Análisis bioquímico y estructural de β -lactamasas CTX-M comparadas con sus respectivas variantes Asp240Gly

4.2.1 Producción de CTX-M

A partir de la placa conteniendo colonias de los clones recombinantes de *E. coli* BL21 transformados con la construcción pET $bla_{\text{CTX-M}}$ correspondiente, se inoculó un cultivo de 20 ml de LB suplementado con 30 μ g/ml de kanamicina. Luego de incubarlo durante 18 horas a 37°C con agitación, se diluyó 1/20 en 200 ml de LB fresco conteniendo 30

$\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Los cultivos diluídos fueron incubados a 37°C con agitación constante de 200 rpm hasta DO a 600 nm entre 0,7 y 0,9 unidades de absorbancia. Una vez alcanzada, se adicionó IPTG en una concentración final de 1mM para inducir la expresión de la β -lactamasa. Los cultivos fueron incubados durante 18 horas a 28°C con agitación constante a 200 rpm.

4.2.2 Purificación

Se obtuvieron los extractos crudos en buffer TRIS-HCl 50mM pH 8 por ruptura ultrasónica, en baño de hielo, utilizando un sonicador *Vibra-Cell* (*Sonics & Materials, USA*). Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a $27.000 \times g$, a 4°C durante 30 min. Los sobrenadantes clarificados fueron dializados durante 18 horas a 4°C frente a buffer TRIS-HCl 50mM pH 8. El dializado fue cargado en una columna de afinidad *HisTrap HP* de 1 ml de capacidad (*GE Healthcare, USA*) conectada a un sistema de purificación *ÄKTA-prime purifier* (*GE Healthcare, USA*), previamente equilibrado con el mismo buffer. La columna fue lavada exhaustivamente para remover las proteínas no unidas y la β -lactamasa fue eluída con un gradiente lineal de imidazol de 0 a 500 mM, pH 8,0. Las fracciones con actividad de β -lactamasa fueron detectadas por monitoreo de la absorbancia a 280 nm y la determinación de la actividad a través de la hidrólisis de nitrocefín. Las fracciones positivas fueron mezcladas y dializadas *overnight* frente a buffer PBS a 4°C . Se verificó la pureza de las fracciones mediante SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida al 12%. Aquellas fracciones con una pureza mayor al 90% se unieron y conservaron a -20°C .

4.2.3 Digestión con proteasa

Las proteínas de fusión sobre-expresadas poseen una secuencia de corte específica reconocida por Trombina. La cola amino-terminal de seis histidinas de la proteína de fusión fue separada del resto de la construcción mediante digestión por Trombina (10 unidades de Trombina por mg de proteína de fusión) a 22°C durante 16-18 hs de incubación. Se corroboró la correcta digestión de las muestras mediante SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida al 15%. La concentración de cada proteína se determinó mediante la medición de la absorbancia a 280 nm y haciendo el cálculo en función del valor de ϵ (coeficiente molar de extinción). Luego se fraccionaron y conservaron a -20°C hasta su uso en los ensayos de cinética enzimática.

4.2.4 Determinación de la masa molecular por SDS PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) permite la separación de las proteínas según sus masas moleculares. La masa molecular de las 10 CTX-M en estudio fue estimada por SDS-PAGE, en geles de poliacrilamida al 12-15% por duplicado, donde se resolvieron las diferentes fracciones de cada paso de purificación. Las muestras se prepararon mezclando 30 μ l de cada fracción recolectada en la purificación con 10 μ l de buffer muestra 4X para SDS-PAGE. Luego de calentar en baño de agua a ebullición durante 10 minutos y centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos en microcentrífuga *Sanyo*, se cargaron 12 μ l en un gel de poliacrilamida al 12% con SDS. Las muestras fueron resueltas a 120 V, en cubas *Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, USA)*.

Una vez finalizada la electroforesis, uno de los geles fue lavado con buffer fosfato 50 mM pH 7,0 durante 30 minutos con agitación constante. Luego fue sumergido en una solución de penicilina (50 mg/ml) durante 1 hora, en agitación, para permitir la re-naturalización de las enzimas. Posteriormente, el gel fue lavado con el mismo buffer durante 30 minutos y se reveló la actividad enzimática de las muestras con el método iodométrico, utilizando ampicilina 500 μ g/ml como sustrato. En este sistema, el almidón forma un complejo de color azul con una solución de I₂/KI, el cual se rompe en medio ácido, decolorándose. El medio ácido es generado por la liberación de productos ácidos luego de la hidrólisis de la ampicilina en este caso (o de otros antibióticos β -lactámicos) por las β -lactamasas [156, 157]. Para prepararlo, se agregó el antibiótico a una mezcla de agar-agar, almidón y I₂/KI termostatizada a 42°C (ver composición exacta en el anexo A), que luego se aplicó con pipeta sobre el gel, formando una capa delgada y pareja.

El segundo gel de poliacrilamida fue revelado utilizando la coloración de *Coomasie Blue*. En la electroforesis se incluyó un marcador de peso molecular comercial (*Broad-Range, Bio-Rad Laboratories, USA*).

4.2.5 Determinación de los principales parámetros cinéticos

La hidrólisis de los antibióticos cefalotina, cefotaxima y ceftazidima por las 10 CTX-Ms purificadas fue monitoreada siguiendo la variación de absorbancia de una solución del antibiótico β -lactámico preparado en PBS en un espectrofotómetro *T80 UV/Vis (PG Instruments Ltd., UK)*.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 500 μl a 25°C, por triplicado para cada concentración de antibiótico, en cubetas de 0,2 ó 1 cm de paso dependiendo de la concentración de sustrato empleada.

Los parámetros K_m y k_{cat} en estado estacionario (*steady state*) se calcularon a partir de las tasas iniciales de hidrólisis, y la linealización se realizó por medio de la transformación de Hanes-Woolf de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = (V_{\max} \times [S]) / (K_m + [S]) \quad (\text{Ecuación 1})$$

En la **Tabla 3.15** se muestra el peso molecular de cada antibiótico, su constante de absorción molar y la longitud de onda a la cual se evaluó la hidrólisis del compuesto.

Tabla 3.15: Longitudes de onda y sus coeficientes molares de extinción correspondientes de los antibióticos utilizados para las determinaciones cinéticas.

Antibiótico	MM	ϵ_M ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	$\Delta\epsilon_M$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ (nm)
Cefalotina	305	+7200	-6300	273
Cefotaxima	454	+16000	-7500	260
Ceftazidima	534	+22000	-9000	260

4.2.6 Caracterización cinética de CTX-M-96 y CTX-M-131

Siendo CTX-M-96 una variante Asp240Gly nueva nunca antes descrita, se decidió realizar una caracterización cinética exhaustiva de la misma frente a distintas clases de antibióticos β -lactámicos, además de cefalotina, cefotaxima y ceftazidima.

Por otro lado, en los comienzos de este trabajo de tesis, la variante Asp240Gly de CTX-M-2, CTX-M-131, no existía como enzima natural, por lo que tuvo que ser generada *in vitro* por mutagénesis dirigida. Años más tarde, fue detectada por Dropa y colaboradores en una cepa de origen clínico de *Providencia rettgeri* (FSP309/05) aislada en un hospital universitario de la ciudad de San Pablo, Brasil [158]. En colaboración con la Dra. Dropa se realizó la caracterización cinética de esta nueva β -lactamasa frente a distintas clases de antibióticos β -lactámicos.

Al igual que en la sección 4.2.5, las reacciones se realizaron en un volumen final de 500 μl a 25°C, por triplicado para cada concentración de antibiótico, en cubetas de 0,2 ó 1 cm de paso dependiendo de la concentración de sustrato empleada.

Los parámetros K_m y k_{cat} en estado estacionario (*steady state*) se calcularon a partir de las tasas iniciales de hidrólisis, y la linealización se realizó por medio de la transformación de Hanes-Woolf de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = (V_{\max} \times [S]) / (K_m + [S]) \quad (\text{Ecuación 1})$$

En el caso de sustratos con valores bajos de K_m , o bajo condiciones en las que el antibiótico se comportó como un sustrato pobre, se determinaron valores de K_m aparentes como constantes de inhibición competitiva ($K_{i \text{ obs}}$), monitoreando la actividad residual de la enzima en presencia de la droga a distintas concentraciones y cefalotina 100 μM o nitrocefín 100 μM (utilizados como sustrato *reporter*).

Luego, se procedió al cálculo de K_i , (cuyo valor corresponde a la afinidad relativa k_{-1}/k_1 del sustrato competidor por la enzima), de acuerdo a la ecuación 2:

$$K_i = K_{i \text{ obs}} / (1 + [S]/K_{m(S)}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde $K_{m(S)}$ y $[S]$ son la K_m y la concentración fija usada del sustrato *reporter*, respectivamente.

Los inhibidores clásicos de β -lactamasas, como ácido clavulánico y tazobactam, fueron procesados de la misma manera. En este caso, además de K_i , se calculó el valor de k_{inact} , que indica el número de moléculas de enzima inactivadas por segundo, siendo entonces K_i en este caso la concentración de inhibidor requerida para alcanzar $1/2 k_{\text{inact}}$.

En la **Tabla 3.16** se indica el peso molecular de cada antibiótico utilizado, su constante de absorción molar y la longitud de onda a la cual se evaluó la hidrólisis del compuesto y en el anexo C se especifican los pasos necesarios para realizar ensayos de cinética de β -lactamasas.

Tabla 3.16: Longitudes de onda y sus coeficientes molares de extinción correspondientes de los antibióticos utilizados para las determinaciones cinéticas.

Antibiótico	MM	$\epsilon_{M\lambda}$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	$\Delta\epsilon_{M\lambda}$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ (nm)
Bencil-penicilina	400	1200	-775	235
Ampicilina	348	1860	-820	235
Piperacilina	540	9900	-820	235
Cefalotina	305	7200	-6300	273
Cefuroxima	423	15000	-7600	260
Cefoxitina	426	8250	-6600	260
Cefotaxima	454	16000	-7500	260
Ceftazidima	534	22000	-9000	260
Cefepime	572	22000	-10000	260
Aztreonam	511	3600	-750	318
Imipenem	298	9000	-9000	300
Nitrocefín	555	17000	15000	482
Clavulanato de Potasio	237	-	-	-
Tazobactam	299	-	-	-

4.2.7 Ensayo de preincubación

Para evaluar la posibilidad de que ceftazidima se uniera covalentemente a las β -lactamasas CTX-M, se preincubó la enzima con concentraciones crecientes de ceftazidima en buffer PBS durante 1 y 2 horas, y luego se midió la actividad remanente usando nitrocefín 100 μ M como sustrato *reporter*. Como control se realizaron ensayos de preincubación con cefalotina 100 μ M.

4.2.8 Dicroísmo circular [159]

La espectroscopía de dicroísmo circular (DC) es una técnica muy sensible y ampliamente utilizada para estudiar los cambios conformacionales en proteínas y ácidos nucleicos.

En el caso particular de las proteínas, el DC es una técnica muy valiosa, ya que permite llevar a cabo estudios estructurales en solución, donde las biomoléculas funcionan normalmente, proporcionando así medidas de cambios estructurales esenciales para su función biológica.

El dicroísmo circular se expresa frecuentemente como la propiedad que poseen algunos materiales de absorber la luz a diferentes grados dependiendo de la forma de polarización del haz incidente. Se dice que un material presenta dicroísmo circular cuando la absorción de la luz circularmente polarizada en una dirección (derecha) es diferente de la absorción de la luz circularmente polarizada en la dirección opuesta (izquierda).

Con frecuencia, es necesario demostrar que una modificación en una proteína genera conformaciones equivalentes para realizar su función adecuadamente. Por ejemplo, después de una modificación en una proteína específica, el DC es una buena técnica para comparar entre formas nativas y modificadas.

Cualquier cambio conformacional en la estructura de macromoléculas se puede evaluar usando DC. De esta manera, el desdoblamiento de biomoléculas (tales como proteínas, ácidos nucleicos, glucósidos, etc.) se mide como un cambio en el espectro de DC, y sirve para dar una medida de la cantidad relativa de cambios que han ocurrido en los componentes. Como para los espectros de absorción, es bien sabido por ejemplo, que las proteínas nativas tienen un espectro de DC característico, con cambios pequeños únicos para cada proteína particular.

El espectro de CD en la región UV cercana (250-350 nm) es único y característico de cada proteína (huella digital o *fingerprint*) y refleja mayoritariamente las contribuciones de las cadenas laterales aromáticas (y puentes disulfuro) ubicadas en ambientes estructurados. Así, las características espectrales aquí reflejarán aspectos de la *estructura terciaria* de la proteína. Esta última característica es sumamente útil para la

comparación de la estructura terciaria entre proteínas relacionadas, por ejemplo entre una variante salvaje y mutantes puntuales, o entre muestras de la misma proteína obtenidas de la fuente natural o en forma recombinante. Por su parte, el análisis en el UV lejano (190-250 nm) proporciona información sobre la estructura secundaria, ya que el principal cromóforo que aporta señal en esta región es el enlace peptídico.

En este trabajo se evaluaron los espectros de DC en un espectropolarímetro *Jasco J-810* (*JASCO, Easton, MD*) para comparar cada una de las cinco CTX-M salvajes purificadas con sus respectivas variantes Asp240Gly, de manera tal de evaluar posibles cambios conformacionales como consecuencia de la mutación. Los datos fueron recolectados en el UV-cercano (250-320 nm) y el UV-lejano (200-250 nm) a 25°C usando una cubeta de cuarzo de 10 mm y 1 mm de paso respectivamente. La velocidad de escaneo fue de 20 nm/min con una constante de tiempo de 1 seg. Cada espectro se midió por triplicado y los datos fueron promediados para disminuir el ruido.

4.2.9 Fluorescencia intrínseca [159]

La fluorescencia es un fenómeno físico mediante el cual ciertas sustancias absorben energía en forma de radiación electromagnética emitiéndola en una longitud de onda mayor en un período de tiempo muy corto. Las sustancias que tienen la capacidad de emitir luz por fluorescencia al ser excitadas por diferentes tipos de radiación son llamadas *fluoróforos*. Dichas sustancias suelen ser moléculas orgánicas poliaromáticas o heterociclos con un sistema de enlaces- π conjugado. Dicha propiedad puede ser usada por ejemplo para realizar estudios de dinámica molecular, análisis estructural de proteínas, cuantificación de iones en compartimentos celulares, microscopía, análisis de potencial de membrana, interacciones entre macromoléculas, etc.

Hay sólo tres aminoácidos aromáticos que absorben luz en la región del ultravioleta cercano ($\lambda > 240$ nm) y son: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp). El espectro de emisión de fluorescencia de las proteínas está determinado por la presencia en la cadena proteica de dichos aminoácidos. Los cambios de la fluorescencia intrínseca pueden ser usados para monitorear cambios estructurales en la proteína.

La fluorescencia de una proteína es una sumatoria de las fluorescencias de los distintos residuos aromáticos que posee, pero usualmente se estudia entre 280-295 nm siguiendo

la fluorescencia del triptófano. Generalmente, se mide la emisión de fluorescencia del triptófano por su mayor rendimiento cuántico y su vida media más prolongada.

En este trabajo se utilizó un espectrofluorímetro *FP-6500 (JASCO)* a 25°C para comparar los espectros de emisión de cada una de las diez CTX-M purificadas, de manera tal de evaluar posibles cambios conformacionales como consecuencia de la mutación Asp240Gly. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm y los datos de emisión fueron recolectados en el rango de 310-410 nm.

4.3 Análisis estructural de CTX-M-96

4.3.1 Producción de CTX-M-96 sin modificaciones

A partir de la placa conteniendo colonias de los clones recombinantes de *E. coli* BL21 transformados con la construcción pET96II, se inocularon tubos de LB suplementado con 30 µg/ml de kanamicina. Los cultivos fueron incubados durante 18 horas a 28°C con agitación rotatoria a 200 rpm. Se diluyeron luego 1/400 en 1,75 L de LB que contenía 30 µg/ml de kanamicina y se cultivó a 37° C con agitación rotatoria a 200 rpm hasta alcanzar 0,6 unidades de DO ($\lambda = 600$ nm). Con el fin de inducir la expresión de la β -lactamasa, se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM y el cultivo se cultivó a 28°C durante 3,5 horas. Después de centrifugar a 8.000 rpm durante 20 min a 4 ° C en una centrífuga *Sorvall RC-5C* (rotor GS3), las células se resuspendieron en buffer MES 50 mM (pH 6,5; buffer A).

4.3.2 Purificación de CTX-M-96 sin modificaciones

El extracto crudo fue obtenido por disrupción mecánica en un homogeneizador *High-Pressure EmulsiFlexy (Avestin Europe GmbH, Alemania)* después de tres pasajes a 1500 bar. Luego de la clarificación por centrifugación a 19.000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga *Sorvall RC-5C* (4 ° C, rotor SS34), los sobrenadantes clarificados que contenían CTX-M-96 se dializaron durante 18 horas frente a 10 L de buffer A a 4°C. Luego se filtraron a través de membranas de tamaño de poro de 0,7 y 0,45 µm y se cargaron en una columna de 24 ml de *SP Sepharose HP (GE Healthcare Europe GmbH, Bélgica)*, conectada a un sistema de purificación *ÄKTA-prime purifier (GE Healthcare, USA)* equilibrada previamente con buffer A. La columna se lavó exhaustivamente para eliminar las proteínas no unidas, y la β -lactamasa se eluyó con un gradiente lineal de

buffer B: buffer A + NaCl 1M (0-60%; 3 ml/min velocidad de flujo). Las fracciones con actividad de β -lactamasa fueron detectadas por monitoreo de la absorbancia a 280 nm y la determinación de la actividad a través de la hidrólisis de nitrocefín. Se verificó la pureza de las fracciones mediante SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida al 12%. Las fracciones con actividad se unieron y dializaron frente a buffer A y se cargaron en una columna *Mono-S GL* (*GE Healthcare Europe GmbH, Bélgica*) equilibrada con buffer A. CTX-M-96 madura se eluyó con un gradiente lineal (0-30%, 1 ml/min velocidad de flujo) de buffer B. Las fracciones con actividad de β -lactamasa fueron mezcladas y dializadas durante 18 horas frente a buffer PBS a 4°C. La concentración y pureza de la proteína se determinaron mediante el ensayo de cuantificación de proteínas BCA (*Pierce, Rockford, IL, EE. UU.*) utilizando BSA como estándar, y mediante análisis de la densitometría de las bandas en geles de SDS-PAGE al 15%, respectivamente.

4.3.3 *Determinación de la estructura cristalográfica de CTX-M-96 por difracción por rayos X*

En colaboración con el Centro de Ingeniería de Proteínas de la Universidad de Liege, Liege, Bélgica (Centre d'Ingénierie des Protéines, Université de Liège, B-4000 Sart Tilman, Liège, Belgium), se obtuvieron cristales de CTX-M-96 pura por difusión de vapor de gota colgante a 20°C, en gotas conteniendo solución de enzima pura (15 mg/ml) y 0,2 μ l de citrato de amonio 2M en buffer Bis-Tris-propano 0,1 M (pH 7).

Los datos de difracción fueron colectados en condiciones criogénicas (100°K), en un detector ADSC Q315r CCD, a una longitud de onda de 0,98011 Å obtenida a partir de un generador de haz Proxima 1, en el *Sincrotron Soleil* (*Saint Aubin, París, Francia*).

La indexación e integración de las intensidades de difracción fueron realizadas por *XDS* [160], y el escalado de las intensidades por *XSCALE* [161].

La obtención de las fases, construcción y refinamiento del modelo se realizaron con *REFMAC5* [162], *TLS* [163] y *Coot* [164].

Para la visualización y representación del modelo se utilizó *PyMol* [165].

4.3.4 Modelos de simulación de CTX-M-96 con oximino-cefalosporinas

La estructura cristalográfica de CTX-M-96 fue utilizada para modelar las estructuras de la acil-enzima con ceftazidima y cefotaxima. Las estructuras de TOHO-1 en complejo con ceftazidima (PDB 2ZQD), y TOHO-1 acilada por cefotaxima (PDB 1IYO), fueron utilizadas para el posicionamiento inicial de cada ligando en la estructura de CTX-M-96. Las estructuras de simulación fueron sometidas a un proceso de minimización de energía con el programa Yasara [166], usando protocolos estándares. El esqueleto de CTX-M-96 fue mantenido fijo durante todo el procedimiento. Los parámetros de la simulación consistieron en el uso de Yasara2 “force field” [167], una distancia de cut-off de 7,86 Å, condiciones de entorno periódicas, y celda acuosa de simulación.

4.4 Análisis bioinformático de proteínas

Programa	Utilidad	URL / Fuente
<i>BLAST</i>	Similitud de secuencias	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
<i>ClustalW</i>	Alineamiento de secuencias	http://www2.ebi.ac.uk/
<i>SignalIP</i>	Predicción de péptido señal	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP
<i>VectorNTI</i>	Predicción de pI, é y MM	Invitrogen
<i>PyMOL</i>	Modelado 3D	http://www.pymol.org
<i>XDS</i>	Análisis de datos de Difracción	http://xds-viewer.sourceforge.net/
<i>XSCALE</i>	Análisis de datos de Difracción	http://xds.mpimf-heidelberg.mpg.de/html_doc/downloading.html
<i>REFMAC5</i>	Análisis de datos de Difracción	http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/murshudov/content/refmac/SourceEtal/source.html
<i>TLS</i>	Análisis de datos de Difracción	[163]
<i>Coot</i>	Análisis de datos de Difracción	http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/
<i>Yasara</i>	Simulación	http://www.yasara.org/

Resultados y Discusión

*"Donde haya un árbol que plantar, plántalo tú. Donde haya un error que enmendar, enmiéndalo tú.
Donde haya un esfuerzo que todos esquivan, hazlo tú. Sé tú el que aparta la piedra del camino."*
Gabriela mistral

Capítulo 4 - Resultados y Discusión

1 Caracterización fenotípica y molecular de microorganismos productores de cefotaximasas

1.1 Análisis del efecto de la mutación Asp240Gly en el perfil de resistencia de clones recombinantes de *Escherichia coli* que expresan CTX-M

Desde el primer reporte de una β -lactamasa de la familia CTX-M, se han descrito más de 150 miembros entre variantes plasmídicas y cromosómicas.

Las β -lactamasas de tipo CTX-M han experimentado una diversificación explosiva en muy poco tiempo a partir de los primeros genes *bla*_{CTX-M} detectados a comienzos de la década del '90 en el ámbito hospitalario. Aparentemente, la exposición de las bacterias productoras de esta clase de enzimas a una gran diversidad de antibióticos β -lactámicos para los que poseen baja eficiencia de hidrólisis como ceftazidima (además de cefepime y carbapenemes), podría haber contribuido a la diversificación y surgimiento de variantes mutacionales con capacidad de hidrólisis mejorada frente a este antibiótico, otorgándole a los microorganismos productores la capacidad de alcanzar niveles de CIM de hasta 256 $\mu\text{g/ml}$ [73].

De acuerdo a las evidencias actuales, podemos postular que las enzimas CTX-M habrían sido reclutadas directamente desde el cromosoma de especies de *Kluyvera* hacia plataformas genéticas móviles, a partir de las cuales se diseminarían ampliamente para ser sometidas a la presión selectiva ejercida por ceftazidima presente en el ambiente hospitalario, lo que resultaría en un proceso de diversificación mutacional posterior [44, 146]. En consecuencia, decidimos definir en este trabajo de tesis como CTX-M “salvaje” a aquella portadora del aminoácido Asp en la posición 240, presente en las variantes reconocidas como “cefotaximasas” clásicas, y “mutante” a la poseedora del aminoácido Gly en dicha localización (CTX-M_{Asp240Gly}), presente en las variantes reportadas por algunos autores como “ceftazidimasas”. Ningún gen detectado en *Kluyvera* tiene este cambio.

En el marco de varios proyectos de cooperación de nuestro laboratorio con investigadores de Venezuela, Colombia, Perú, Brasil y Argentina, con el fin de caracterizar las BLEEs presentes en aislamientos de enterobacterias de origen hospitalario y comunitario, hemos detectado cepas productoras de CTX-M-15 que carecían del perfil esperado de “ceftazidimasa” reportado previamente para ésta y otras variantes con glicina en la posición 240, luego de realizar el ensayo de *screening* de BLEE según las normas del CLSI, mientras que conservaban el perfil clásico de “cefotaximasa”. Además, si bien muchos de esos aislamientos podrían ser considerados en la actualidad como resistentes a ceftazidima de acuerdo a los nuevos puntos de corte del CLSI vigentes desde el año 2010, los valores observados de CIM en algunos casos eran mucho menores que los de cefotaxima e incluso se encontraban dentro del rango de sensibilidad (*resultados personales*).

Por eso decidimos evaluar el papel de esta mutación en un contexto isogénico y bajo la dirección del mismo promotor en al menos un par de clones de *E. coli* representativo de cada uno de los 5 subgrupos filogenéticos más importantes de CTX-M. Cada par está constituido por un clon que expresa la variante de CTX-M conteniendo Asp240 (considerado como salvaje), y otro clon que expresa la variante enzimática conteniendo Gly240 (considerada como la mutante derivada de Asp240). En el análisis se incluyeron tanto β -lactamasas plasmídicas como cromosómicas de especies de *Kluyvera*. Mediante esta estrategia experimental nos propusimos:

1- Caracterizar las variantes mutacionales de CTX-M con perfil de ceftazidimasa más prevalentes en el mundo: Si bien el antibiótico ceftazidima habría ejercido una fuerte presión selectiva llevando al surgimiento de variantes con un perfil de hidrólisis mejorado, el escenario clínico se compone de la presencia en simultáneo de ceftazidima, ceftriaxona y cefotaxima. En estas condiciones, resulta favorecida la ruta evolutiva que lleva al surgimiento y selección de las variantes Asp240Gly, dado que conservarían una alta eficiencia hidrolítica frente a cefotaxima y ceftriaxona. [146, 168]. Esto lleva a suponer que, mientras ambos antibióticos continúen estando presentes en el ambiente hospitalario, las variantes Asp240Gly serán las más prevalentes y diversas en el futuro, mientras que otras mutantes emergentes (como por ejemplo las variantes de CTX-M Pro167Thr/Ser) probablemente vean limitadas sus posibilidades de diversificación y emergencia [146]. Por otro lado, existen variantes

Asp240Gly de elevada prevalencia mundial debido a su asociación a clones epidémicos o bien a plataformas genéticas exitosas (como ocurre con CTX-M-15 y CTX-M-32 [79, 169-172]), dándole entonces grandes posibilidades de ser seleccionadas y por lo tanto, de seguir evolucionando.

2- Determinar si el supuesto perfil de ceftazidimasa otorgado por la mutación *Aps240Gly* se ve influenciado de manera diferencial por los polimorfismos presentes entre los distintos subgrupos de CTX-M: La familia CTX-M puede subdividirse en al menos 5 subgrupos filogenéticos que difieren uno de otro por lo menos en un 10% en su composición aminoacídica [81]; dentro de cada subgrupo se encuentran variantes alélicas menores que difieren una de otra por unas pocas sustituciones aminoacídicas en menos de un 5%. Los subgrupos 1/3 y 9 son los que poseen la mayor cantidad de integrantes, lo que puede sugerir mayor plasticidad evolutiva o bien puede ser consecuencia de su asociación a plataformas genéticas y/o clones exitosos como mencionáramos anteriormente. De forma similar, el subgrupo 1/3 es el que posee mayor presencia de variantes *Asp240Gly* reportadas. Quisimos evaluar, al analizar al menos un representante de cada subgrupo, si estas diferencias podían afectar los niveles de resistencia a ceftazidima y a otros antibióticos β -lactámicos.

3- Independizarnos de otros factores que puedan afectar el fenotipo de resistencia observado frente a ceftazidima, como la impermeabilidad y los niveles de expresión.

Los genes codificantes de las β -lactamasas fueron clonados en el vector de expresión constitutiva pK19 en fase con el promotor del gen codificante de la β -galactosidasa e introducidos por transformación en *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron clones portadores de los genes parentales *bla*_{CTX-M} y de sus respectivas variantes *Asp240Gly*, todas en un mismo entorno genético y con idéntico péptido señal para cada par (esto último garantiza que la traslocación al periplasma sea equivalente dentro de cada par analizado y este factor no influya en los valores obtenidos de CIM [173]). El *screening* de BLEE y los ensayos de susceptibilidad fueron realizados por difusión y dilución según lo recomendado por el CLSI.

En la **Tabla 4.1 y 4.2** se detallan cuáles fueron los resultados del test de sinergia, detección y confirmación fenotípica de BLEE de los aislamientos clínicos utilizados como fuente de genes *bla*_{CTX-M} a modo de referencia y de los clones recombinantes construídos, respectivamente (**Figura 4.1**).

Tabla 4.1: Test de sinergia y perfil de susceptibilidad a cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ) de cepas de origen clínico con *bla*_{CTX-M}. Interpretación según CLSI 2010.

Aislamiento	<i>bla</i> _{CTX-M}	Sinergia CTX *	Sinergia CAZ*	CTX	CAZ	Subgrupo	Origen***
<i>K. pneumoniae</i> 1338	<i>bla</i> _{CTX-M-12} (Salvaje)	Sí	No	R	R	1/3	P
<i>K. pneumoniae</i> 293235	<i>bla</i> _{CTX-M-96} (Mutante)	Sí	Sí	R	R	1/3	P
<i>K. ascorbata</i> 69	<i>bla</i> _{CTX-M-3} (Salvaje)	No	No	S	S	1/3	C
<i>K. pneumoniae</i> 76	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (Mutante)	Sí	Sí	R	R	1/3	P
<i>K. cryocrescens</i> 169	<i>bla</i> _{CTX-M-37} (Salvaje)	No	No	S	S	1/3	C
<i>M. morgani</i> PP07	<i>bla</i> _{CTX-M-2} (Salvaje)	Sí	No	R	S	2	C
<i>K. pneumoniae</i> 206	<i>bla</i> _{CTX-M-8} (Salvaje)	Sí	No	R	S	8	P
<i>E. cloacae</i> García	<i>bla</i> _{CTX-M-9} (Salvaje)	Sí	No	R	S	9	P
<i>K. georgiana</i> 14751	<i>bla</i> _{CTX-M-78} (Salvaje)	No	No	S	S	25	C

Tabla 4.2: Se indican los diámetros de los halos de inhibición en mm de los clones recombinantes y la interpretación según el CLSI 2010

Clon (CTX-M)	Sinergia* CTX	Sinergia* CAZ	DISCO** CTX	DISCO** CTX/CLA	DISCO** CAZ	DISCO** CAZ/CLA
DH5α	NO	NO	41 (S)	>28	37 (S)	>30
DH5αpK19	NO	NO	40 (S)	>28	35 (S)	>30
DH5αpK-3 (CTX-M-3)	SÍ	NO	10 (R)	>28	22 (S)	>30
DH5αpK-15 (CTX-M-15)	SÍ	SÍ	6 (R)	>28	10 (R)	>30
DH5αpK-12 (CTX-M-12)	SÍ	NO	6 (R)	>28	26 (S)	>30
DH5αpK-96 (CTX-M-96)	SÍ	SÍ	6 (R)	>28	14 (R)	>30
DH5αpK-37 (CTX-M-37)	SÍ	NO	14 (R)	>28	23 (S)	>30
DH5αpK-37Asp240Gly (CTX-M-37Asp240Gly)	SÍ	NO	14 (R)	>28	22 (S)	>30
DH5αpK-2 (CTX-M-2)	SÍ	NO	11 (R)	>28	25 (S)	>30
DH5αpK-131**** (CTX-M-131)	SÍ	NO	9 (R)	>28	24 (S)	>30
DH5αpK-8 (CTX-M-8)	SÍ	NO	9 (R)	>28	27 (S)	>30
DH5αpK-8Asp240Gly (CTX-M-8Asp240Gly)	SÍ	NO	9 (R)	>28	23 (S)	>30
DH5αpK-9 (CTX-M-9)	SÍ	NO	12 (R)	>28	19 (S)	>30
DH5αpK-16 (CTX-M-16)	SÍ	SÍ	12 (R)	>28	12 (R)	>30
DH5αpK-78 (CTX-M-78)	SÍ	NO	13 (R)	>28	23 (S)	>30
DH5αpK-78Asp240Gly (CTX-M-78Asp240Gly)	SÍ	SÍ	14 (R)	>28	14 (R)	>30

Puntos de corte mm	S	I	R	Puntos de corte mm	S	I	R
CTX (CLSI 2010)	≥ 26	23-25	≤ 22	CTX (CLSI 2009)	≥ 21	14-20	≤ 13
CAZ (CLSI 2010)	≥ 21	18-20	≤ 17	CAZ (CLSI 2009)	≥ 18	15-17	≤ 14

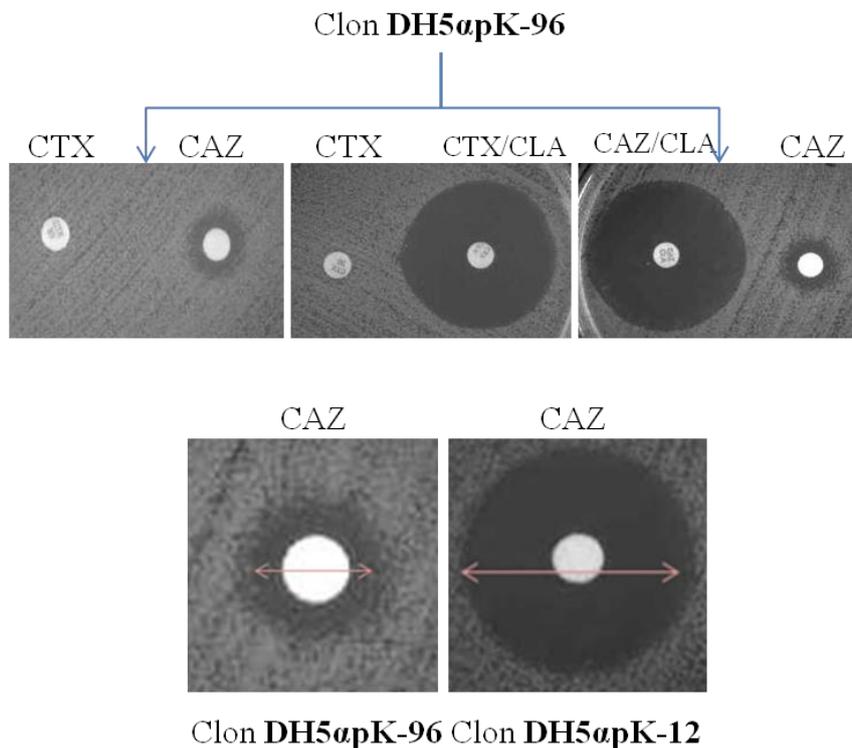
* La sinergia con ácido clavulánico se evidencia como un agrandamiento del halo de inhibición de las cefalosporinas en la zona adyacente al disco conteniendo el inhibidor, lo cual es presuntivo de la presencia de BLEE en la cepa analizada.

** Los discos contienen 30 µg de la cefalosporina y 10 µg de clavulánico (*Laboratorios Britania S.A.*)

*** P, plasmídico; C, cromosómico
(R), Resistente; (S), Sensible

**** *Es importante destacar que cuando comenzamos a trabajar en los objetivos de esta tesis, la variante Asp240Gly de CTX-M-2 aún no había sido reportada como variante natural. En el año 2013, en el marco de una colaboración con la Dra. Milena Dropa de la Escuela de Salud Pública de la Universidad de San Pablo, Brasil, hemos caracterizado cinéticamente esta variante, la cual había sido hallada en una cepa de *Providencia rettgeri* de origen clínico (ver Sección 2.3).*

Figura 4.1: Resultados de la búsqueda y confirmación de BLEE en los clones *DH5apK-12* y *DH5apK-96*.



Se observó sinergia con ácido clavulánico y cefotaxima en todos los clones recombinantes obtenidos, lo cual hace sospechar la presencia de BLEE en cada uno de ellos, aunque para el disco de ceftazidima la sinergia se observó solamente para algunas de las variantes Asp240Gly, no así CTX-M-37_{Asp240Gly}, CTX-M-131 y CTX-M-8_{Asp240Gly}.

De acuerdo a los puntos de corte del CLSI 2010, todos los clones fueron resistentes a cefotaxima. Este resultado se explica dado que las β -lactamasas de tipo CTX-M se comportan como cefotaximasas naturales cuando son expresadas en niveles adecuados. En el caso de los clones construídos en pK19, los niveles de producción son elevados ya que el vector se encuentra en un alto número de copias y le provee a la β -lactamasa un promotor “fuerte” como el de la β -galactosidasa. Por el contrario, cuando el gen bla_{CTX-M} no está asociado a un promotor funcional o con fuerza de expresión suficiente, la cepa portadora del gen suele ser sensible a todas las oximino-cefalosporinas, como ocurre en las cepas de *Kluyvera* utilizadas en este trabajo como fuente de genes bla_{CTX-M} , todas sensibles a esta clase de antibióticos [44].

Pudo observarse además que en la mayoría de los pares de clones (Asp240 vs Gly240) hay una diferencia observable en los diámetros de los halos correspondientes a los discos de ceftazidima, que varía de 7 a 12 mm, siendo menor en el caso del clon que expresa CTX-M_{Asp240Gly}. Sin embargo, para el par 37-37_{Asp240Gly} y 2-131 esa diferencia no es significativa. Incluso, hubo variantes Asp240Gly que resultaron sensibles a ceftazidima de acuerdo a los puntos de corte: 37_{Asp240Gly}, 131 y 8_{Asp240Gly}.

A continuación, se realizaron ensayos de CIM por difusión en medio sólido según las recomendaciones del CLSI. En la **Tabla 4.3** se detallan los resultados obtenidos.

Puede observarse que los clones productores de CTX-M-15, CTX-M-96 y CTX-M-78_{Asp240Gly} mostraron valores de CIM de ceftazidima significativamente mayores que sus respectivos clones productores de CTX-M-3, CTX-M-12 y CTX-M-78 (más de dos diluciones al medio de CIM de diferencia). Sin embargo, la diferencia no fue significativa para los clones productores de las supuestas “ceftazidimasas” de los grupos 2, 8 y 37 (Asp240Gly). En todos los casos los valores de CIM a CTX fueron significativamente mayores a los de ceftazidima, siendo por lo menos \geq a 32. Es decir que las enzimas fueron producidas en cantidad suficiente para otorgar un perfil clásico de cefotaximasa y aún en estas condiciones los niveles de resistencia a ceftazidima fueron bajos.

Tabla 4.3: Valores de CIM por dilución en medio sólido ($\mu\text{g/ml}$) de los clones recombinantes e interpretación según CLSI 2010

Clon (CTX-M)	CTX	CTX/CLA*	CAZ	CAZ/CLA*
DH5 α	$\leq 0,125$ (S)	$\leq 0,125$ (S)	$\leq 0,125$ (S)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK19	$\leq 0,125$ (S)	$\leq 0,125$ (S)	$\leq 0,125$ (S)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-3 (CTX-M-3)	64 (R)	$\leq 0,125$ (S)	0,5 (S)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-15 (CTX-M-15)	128 (R)	$\leq 0,125$ (S)	16 (R)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-12 (CTX-M-12)	>128 (R)	$\leq 0,125$ (S)	1 (S)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-96 (CTX-M-96)	>128 (R)	$\leq 0,125$ (S)	32 (R)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-37 (CTX-M-37)	32 (R)	$\leq 0,125$ (S)	1 (S)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-37 _{Asp240Gly} (CTX-M-37 _{Asp240Gly})	32 (R)	$\leq 0,125$ (S)	2 (S)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-2 (CTX-M-2)	>128 (R)	$\leq 0,125$ (S)	2 (S)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-131 (CTX-M-131)	>128 (R)	$\leq 0,125$ (S)	1 (S)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-8 (CTX-M-8)	>128 (R)	$\leq 0,125$ (S)	2 (S)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-8 _{Asp240Gly} (CTX-M-8 _{Asp240Gly})	>128 (R)	$\leq 0,125$ (S)	8 (I)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-9 (CTX-M-9)	>128 (R)	$\leq 0,125$ (S)	1 (S)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-16 (CTX-M-16)	>128 (R)	$\leq 0,125$ (S)	8 (I)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-78 (CTX-M-78)	>128 (R)	$\leq 0,125$ (S)	1 (S)	$\leq 0,125$ (S)
DH5 α pK-78 _{Asp240Gly} (CTX-M-78 _{Asp240Gly})	>128 (R)	$\leq 0,125$ (S)	16 (R)	$\leq 0,125$ (S)

Puntos de corte CIM	S	I	R	Puntos de corte CIM	S	I	R
CTX (CLSI 2010)	≤ 1	2	≥ 4	CTX (CLSI 2009)	8	16-32	64
CAZ (CLSI 2010)	≤ 4	8	≥ 16	CAZ (CLSI 2009)	≤ 8	16	≥ 32

* La concentración de ácido clavulánico CLA se mantuvo fija en un valor de 4 $\mu\text{g/ml}$ (R), Resistente; (S), Sensible

Para determinar si las diferencias en los valores observados estaban relacionados con niveles de producción de CTX-M diferentes, se prepararon extractos proteicos crudos de cada uno de los clones obtenidos. Se comprobó su actividad al mezclar 20 μl del extracto con 5 μl de nitrocefina, una cefalosporina cromogénica. A partir de los extractos, se determinaron los valores de Actividad Específica (AE) mediante el análisis espectrofotométrico de la hidrólisis de cefalotina 100 μM ($\lambda=273$ nm) (**Tabla 4.4**).

Tabla 4.4: Valores de Actividad Específica de los clones recombinantes

Clon	AE (nanomoles ATB hidrolizados / min.mg proteína)
DH5 α	0,00
DH5 α pK19	0,00
DH5 α pK-3	57,25
DH5 α pK-15	54,05
DH5 α pK-12	34,81
DH5 α pK-96	40,86
DH5 α pK-37	56,5
DH5 α pK-37D240G	39,8
DH5 α pK-2	98,5
DH5 α pK-131	79,2
DH5 α pK-8	81,3
DH5 α pK-8D240G	91,5
DH5 α pK-9	52,2
DH5 α pK-16	62,5
DH5 α pK-78	71,5
DH5 α pK-78D240G	86,1

Puede observarse que los valores de AE fueron similares para todos los clones, de lo cual se desprende que el número de unidades de β -lactamasa por miligramo de proteína era equivalente en todos ellos. A raíz de estos resultados, podemos decir que es metodológicamente correcto comparar los valores de CIM obtenidos dentro de cada uno de los pares de CTX-M, pues estamos en presencia de pares de clones que expresan la enzima en cantidades equivalentes. De forma similar, dado que los valores de AE se encuentran todos dentro del mismo orden de magnitud, podemos comparar los valores de CIM entre todos los clones.

A continuación, se indican en la **Tabla 4.5** los valores de CIM de los clones en estudio frente a otros antibióticos β -lactámicos.

Tabla 4.5: Valores de CIM (en $\mu\text{g/ml}$) frente a otros antibióticos β -lactámicos

ATB	12	96	3	15	37	37 _{mut}	2	131	8	8 _{mut}	9	16	78	78 _{mut}
PIP	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
AMP	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
CTN	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
FOX	4	4	2	4	2	2	1	0,5	4	4	2	4	4	2
FEP	8	2	8	2	2	2	16	32	1	2	2	2	4	2
IMP	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

No se observaron diferencias significativas entre cada par salvaje-mutante salvo en el caso de cefepime para los pares 12/96 y 3/15, por lo que podríamos afirmar que, al menos en la determinación de la CIM en las condiciones ensayadas, la mutación Asp240Gly no alteraría en general la capacidad de hidrólisis frente a otros antibióticos de la familia y sobre todo se conservaría la actividad frente a cefotaxima, lo cual podría justificar la mayor frecuencia y diseminación de las variantes con este cambio.

En el caso particular de cefepime, parecería existir un efecto de antagonismo pleiotrópico que mejora la resistencia a ceftazidima en detrimento de la de cefepime en miembros del grupo 1/3. Dado que este efecto no se observó en el par 37/37_{Asp240Gly}, no podemos generalizar y calificarlo como una característica de los miembros de todo el subgrupo cuando poseen esta mutación, aunque podrían existir diferencias polimórficas entre las β -lactamasas de tipo CTX-M con efectos sutiles sobre la capacidad de hidrólisis frente a antibióticos β -lactámicos.

Novais y colaboradores [146, 168] demostraron que existen mutaciones secundarias, como Ala77Val y Asn106Ser, que tienen aparentemente un rol fundamental en la adquisición de un fenotipo de resistencia más equilibrado frente a distintos antibióticos β -lactámicos cuando se asocian a Pro167Ser y Asp240Gly. Mediante el análisis de la estructura cristalográfica de CTX-M, si bien no observaron cambios significativos en aquella cuando se muta el residuo 106, los cambios en la posición 77 podrían alterar la conformación del Ω loop por proximidad con la posición 167 [127, 174]. Mutantes naturales como CTX-M-33, CTX-M-52, CTX-M-53 y CTX-M-57, que poseen mutaciones en las posiciones 167 ó 240 en combinación con Ala77Val ó Asn106Ser, parecen haber sido seleccionadas debido a la presencia simultánea en el ambiente de cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y/o cefepime, otorgando a los microorganismos

productores un fenotipo de resistencia para los cuatro antibióticos al mismo tiempo. Es decir que podrían existir diferencias polimórficas entre las CTX-M que haga de algunas de ellas proteínas más aptas para la diversificación en presencia de un medio de selección determinado.

A modo de resumen de esta sección, podemos afirmar que:

La mutación Asp240Gly no siempre se asocia a un fenotipo de resistencia a ceftazidima, al menos en clones recombinantes obtenidos in vitro.

Probablemente, la asociación de esta mutación con otros mecanismos de resistencia, como permeabilidad disminuída o niveles de expresión elevados de β -lactamasas en cepas de origen clínico, sea responsable de la franca resistencia a ceftazidima que usualmente se observa en aislamientos productores de “ceftazidimasas”.

1.2 Análisis del efecto de la mutación Asp240Gly en clones recombinantes de Escherichia coli deficientes en porinas

Como mencionáramos en la sección anterior, a pesar de que algunos de los clones recombinantes obtenidos podrían ser considerados resistentes a ceftazidima según CLSI del año 2010, los valores de CIM están muy por debajo de los obtenidos para muchas de las cepas de origen clínico reportadas como productoras de dichas variantes [129, 132, 175]. Por ejemplo, las cepas de *K. pneumoniae* productoras de CTX-M_{Asp240Gly} utilizadas en este trabajo (Kpn 76, productora de CTX-M-15, y Kpn 293235, productora de CTX-M-96) presentaron valores de CIM de CAZ > 256 μ g/ml. Sin embargo, la cepa de *Providencia retgerii* FSP 309/05, portadora de CTX-M-131, una de las enzimas caracterizadas cinéticamente en esta tesis, mostró valores de CIM a ceftazidima de 6 μ g/ml, al igual que su transformante en *E. coli* TOP 10 (*Invitrogen, EE. UU.*), EC 309 [158].

Por tal motivo, se decidió investigar qué sucedía con las construcciones de la sección 1.1 en un modelo de resistencia cooperativo, como es el caso de cepas de *E. coli* productoras de β -lactamasa y deficientes en porinas. Para ello, células de *E. coli* K12, y sus derivadas isogénicas deficientes en las porinas OmpA, OmpF y/o OmpC, fueron transformadas mediante la introducción de las construcciones en pK19 que expresaban CTX-M-12 o CTX-M-96, y luego se determinaron sus valores de CIM de CAZ y CTX.

Se decidió trabajar con este par en particular por dos motivos: Primero, el clon productor de CTX-M-96 resultó ser el responsable de los mayores niveles de CIM a CAZ en *E. coli* DH5 α y, por otro lado, CTX-M-96 era una variante nueva y natural, no caracterizada, de este tipo de mutantes.

En la tabla siguiente se detallan los valores de CIM de cada uno de los clones construidos.

Tabla 4.6: Valores de CIM de Cefotaxima (CTX) y Ceftazidima (CAZ) para *E. coli* K12, JF694, JF700, JF701 y JF703 productoras de CTX-M-12 y CTX-M-96 (en $\mu\text{g/ml}$)

CLON	CTX				CAZ			
	CTX-M-12	CTX-M-96	pK19	-	CTX-M-12	CTX-M-96	pK19	-
<i>E. coli</i> K12	64	64	<0,125	<0,125	2	8	0.06	0.06
<i>E. coli</i> JF694 (OmpC ⁻ OmpF ⁺)	128	256	<0,125	<0,125	16	128	0,125	0,125
<i>E. coli</i> JF700 (OmpA ⁺ OmpF ⁺)	64	128	<0,125	<0,125	4	64	0,25	0,25
<i>E. coli</i> JF701 (OmpC ⁻)	64	64	<0,125	<0,125	0,5	8	<0,016	<0,016
<i>E. coli</i> JF703 (OmpF ⁺)	256	256	<0,125	<0,125	8	128	0,25	0,25

Los clones de *E. coli* K12 y *E. coli* OmpC⁻ que expresaban CTX-M-96 presentaron sensibilidad intermedia a la ceftazidima, mientras que los que carecían de OmpF fueron resistentes. Estos resultados sugieren la cooperación de ambos mecanismos para manifestar un nivel importante de resistencia a ceftazidima.

Es importante remarcar además las diferencias observadas en los valores de CIM de ceftazidima de las cepas productoras de CTX-M-12 y CTX-M-96 en *E. coli* DH5 α (**Tabla 4.3**) y los correspondientes a *E. coli* K12 (**Tabla 4.6**). Si bien no se detectó diferencia significativa en el valor de CIM de ceftazidima en los clones productores de CTX-M-12, sí la hubo en los que expresaban CTX-M-96. Diferencias similares se obtuvieron cuando se utilizó *E. coli* XL1BLUE como célula receptora (**Tabla 4.7**). Esto puede deberse a la diferencia intrínseca en la permeabilidad de las distintas cepas de *E. coli* utilizadas.

Tabla 4.7: Valores de CIM de CTX y CAZ (en $\mu\text{g/ml}$) de clones de *E. coli* productores de CTX-M

	<i>E. coli</i> DH5 α		<i>E. coli</i> K12		<i>E. coli</i> XL1BLUE	
	pK12	pK96	pK12	pK96	pK12	pK96
CTX	>128	>128	64	64	128	256
CAZ	1	32	2	8	1	8

Estos resultados están en consonancia con trabajos en los que se evaluaron mediante la técnica de *patch clamp* las propiedades de transporte de diferentes moléculas de antibiótico a través de las porinas inmersas en la bicapa lipídica de proteoliposomas derivados de *E. coli*.

Según el estudio realizado por Kozhinjampara y colaboradores [176], la fuerza de interacción de algunas cefalosporinas con OmpF seguiría el siguiente orden decreciente: ceftriaxona > cefepime > ceftazidima. Por otro lado, estos investigadores determinaron que ceftriaxona y cefepime pueden interactuar fuertemente con OmpC, mientras que en el caso de ceftazidima la interacción es débil y de corto tiempo.

Cuando un antibiótico interactúa fuertemente con el interior del canal proteico, su flujo hacia el interior de la célula es altamente eficiente. Por ejemplo, la molécula de ceftriaxona, que se encuentra cargada negativamente a pH fisiológico, se une fuertemente y transloca a través de OmpF y OmpC con alta eficiencia. Comparada con OmpF, la porina OmpC se une más débilmente a las tres cefalosporinas, lo que hace que la primera sea más eficiente en el proceso de translocación de antibióticos. Además, el canal de OmpC es más pequeño que el de OmpF, y varios estudios han demostrado que las moléculas de antibióticos con residuos laterales voluminosos ven dificultada su entrada a través de la primera [48, 177].

Es decir que la entrada de ceftazidima a la célula bacteriana se produciría principalmente a través de OmpF, de manera tal que su expresión disminuída afectaría sobre todo a este antibiótico y no tanto a cefotaxima, que podría seguir ingresando a través de OmpC.

Es importante destacar que en ausencia de la β -lactamasa, la alteración de la permeabilidad en las cepas de *E. coli* derivadas de K12 fue insuficiente para otorgar resistencia a ceftazidima. Un efecto similar fue observado por Girlich y colaboradores en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* deficientes en porinas y productoras de CTX-M frente a ertapenem. Este antibiótico selecciona mutantes con sensibilidad disminuída al carbapenem mediada por la alteración en la expresión de OmpC y OmpF en *E. coli*, y OmpK35 y OmpK36 en *K. pneumoniae*, independientemente de la CTX-M expresada (CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9 y CTX-M-15). Según los autores, la contribución de CTX-M a la sensibilidad disminuída a este antibiótico podría responder a dos circunstancias:

1. Las enzimas CTX-M, aunque débilmente, podrían hidrolizar a los carbapenemes. Este efecto se vería potenciado en un modelo de permeabilidad reducida [178-180].
2. Probablemente, las CTX-M unen las moléculas de carbapenemes con muy alta afinidad, de manera tal que ésta tiene un gran efecto inhibitorio sobre la enzima (baja K_i) [177].

Se desprende de los resultados de la sección 1.1 y 1.2, que tanto la deficiencia de determinadas porinas en E. coli como los niveles de expresión elevados de la enzima son necesarios para conferir niveles altos de resistencia a ceftazidima.

Dado que las porinas son los canales a través de los cuales ingresan los β -lactámicos, la disminución de su expresión juega un rol muy importante en el desarrollo de resistencia. Cuando la permeabilidad de la membrana externa disminuye, el número de moléculas de antibiótico que ingresan al periplasma se ve restringido. La magnitud de este efecto y su repercusión en los niveles de resistencia dependerán de las características de la β -lactamasa y de sus niveles de expresión.

Por lo tanto, el término "ceftazidimasas" acuñado actualmente para estas nuevas variantes de CTX-M se debería aplicar cuidadosamente, ya que el fenotipo de resistencia a ceftazidima se expresa cuando se asocia la presencia de la enzima con la disminución de la permeabilidad de la membrana externa.

Un análisis cinético definitivo se debe hacer por lo menos para un par representante de cada grupo para estimar si estas enzimas realmente pueden considerarse

“ceftazidimasas”, o bien ejercen su efecto debido a que unen la molécula de antibiótico con mayor afinidad que sus respectivas variantes salvajes.

Estos resultados además podrían implicar un llamado de atención a los nuevos lineamientos del CLSI a partir del año 2010. Hasta el año 2009, este organismo recomendaba realizar los ensayos de búsqueda y screening de BLEE de manera tal que si la cepa producía una enzima de estas características, debía ser informada como **resistente a todos los β -lactámicos, independientemente de los valores de CIM alcanzados**. Sin embargo, a partir del 2010, y sobre todo con el objetivo de reservar el uso de los carbapenemes para limitar al máximo la selección de microorganismos productores de carbapenemasas, se bajaron los puntos de corte para ceftazidima y cefotaxima y se recomendó informar al médico los valores de CIM solamente, basándose en estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos con regímenes de dosis establecidos e **independientes del mecanismo de resistencia**. De esta manera, cuando una cepa productora de CTX-M presenta valores de CIM de sensibilidad a ceftazidima, éste puede ser considerado como alternativa terapéutica. Si bien estos nuevos lineamientos están basados en estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos, es importante tener en cuenta que [181]:

- Es habitual que en pacientes sometidos a tratamiento antibiótico se seleccionen clones derivados de la cepa original causante de la infección, deficientes en porinas.
- Los ensayos de susceptibilidad a los antibióticos pueden variar su precisión de laboratorio en laboratorio, y aquellos microorganismos cuyas CIM oscilen entre 1 y 8 pueden caer en la categoría de sensible o resistente según el operador y la técnica empleada para medir los valores.
- Si bien hay reportes de infecciones con microorganismos productores de BLEE y carbapenemasas con bajos valores de CIM cuyo tratamiento con β -lactámicos ha resultado efectivo, también existe un número similar de casos donde la aplicación de ese tipo de terapia ha llevado al fracaso terapéutico.
- Como ya hemos explicado anteriormente, y como demuestran los resultados obtenidos en esta sección, las CTX-M confieren clara resistencia a cefotaxima, **pero tienen efectos variables sobre ceftazidima**.

Los aislamientos productores de CTX-M-15, hoy por hoy la BLEE más diseminada mundialmente, en general presentan valores de CIM de cefotaxima $> 128 \mu\text{g/ml}$, alrededor de $64 \mu\text{g/ml}$ para cefepime, y entre $16\text{-}32 \mu\text{g/ml}$ para ceftazidima, en clara coincidencia con lo observado en nuestros clones recombinantes (salvo para cefepime). Sin embargo, existen aislamientos de *E. coli* productores de esta variante pertenecientes al ST131 (“secuenciotipo” 131; cepa “A”) que expresan esta enzima en bajos niveles, confiriendo valores de CIM entre 1 y $4 \mu\text{g/ml}$ [130, 182]. Es decir que en algunos casos, con las recomendaciones actuales, estaríamos reportando como cepas sensibles microorganismos productores de BLEEs (sobre todo de BLEEs especializadas), favoreciendo de este modo su diseminación en la población. Dichas bacterias podrían transformarse en cepas francamente resistentes por selección intratratamiento de variantes carentes de porinas.

Es importante destacar además que la evidencia existente sobre el éxito del tratamiento con ceftazidima de infecciones producidas por enterobacterias que expresan CTX-M con valores bajos de CIM (1 a $4 \mu\text{g/ml}$) es contradictoria y escasa [183]. Si bien en la literatura se describen fracasos de tratamiento en aislamientos portadores de BLEE, independientemente del valor de la CIM, estos son mayores cuando la CIM se ubica entre 2 y $8 \mu\text{g/ml}$. Incluso se ha propuesto que los microorganismos que expresan CTX-M presentan un marcado efecto inóculo frente a ceftazidima. Se define como efecto inóculo al aumento de 8 veces al valor de la CIM en presencia de un inóculo bacteriano 100 veces más denso que el empleado en los ensayos de rutina estandarizados por CLSI. En estos ensayos se observó que cuando se usaba un inóculo menos denso se registraba una sensibilidad frente a ceftazidima del $82,1\%$ de los aislamientos de *E. coli* en estudio, mientras que cuando se usaba un inóculo alto todos se comportaban como resistentes, lo que determina que éste no sea un agente terapéutico adecuado para el tratamiento de infecciones complicadas como abscesos intra-abdominales [184].

*Teniendo en cuenta nuestros resultados, y dado que la aplicación de las normas actuales del CLSI lleva a que microorganismos productores de CTX-M sean reportados como sensibles a ceftazidima (y cefepime) en un contexto epidemiológico mundial en el que cada vez hay mayor prevalencia de variantes Asp240Gly, y a la espera de estudios más concluyentes acerca de la eficacia de la utilización de ceftazidima en infecciones producidas por *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de CTX-M, parece relevante*

continuar con la caracterización fenotípica de los aislamientos para detectar la presencia de BLEE e interpretar los puntos de corte recomendados teniendo en cuenta la prevalencia de los mecanismos de resistencia, la localización de la infección y las opciones terapéuticas disponibles, las cuales son muy limitadas [183, 185].

1.3 Caracterización fenotípica y molecular de *K. pneumoniae* que expresan CTX-M-12 y CTX-M-96. Entornos, evolución molecular y diseminación de CTX-M's

Como complemento al análisis bioquímico y estructural de CTX-M-96, se caracterizó la cepa de *Klebsiella pneumoniae* portadora de esta nueva variante de CTX-M. Kpn 293235, productora de CTX-M-96 (CTX-M_{Asp240Gly}), fue aislada junto a Kpn 1138, productora de su respectiva variante salvaje CTX-M-12, en un hospital universitario de Colombia en el año 2002.

1.3.1 Ensayos de susceptibilidad a los antimicrobianos y detección de BLEE

Se determinó la susceptibilidad de ambos aislamientos por difusión y dilución de acuerdo a las normas del CLSI y se interpretaron los resultados según las normativas vigentes desde el año 2010. En la **Tabla 4.8** se indican los valores obtenidos.

Tabla 4.8: Se indican los valores de los diámetros de los halos de inhibición del antibiograma y los valores de CIM por dilución en medio sólido y su interpretación según el CLSI 2010

ATB	CAZ	CAZ/CLA**	CTX	CTX/CLA**	AMP	CTN	FEP	FOX	IMI
1138	11 (R)	28	12 (R)	32	6 (R)	6 (R)	14 (R)	22 (S)	24 (S)
293235	15 (R)	27	6 (R)	28	6 (R)	6 (R)	17 (R)	22 (S)	25 (S)
ATB	CAZ	CAZ/CLA**	CTX	CTX/CLA**	AMP	CTN	FEP	FOX	IMI
1138	64 (R)	2	128 (R)	2	>256 (R)	>1024 (R)	64 (R)	8 (S)	0,5 (S)
293235	>256 (R)	2	>256 (R)	2	>256 (R)	>1024 (R)	32 (R)	4 (S)	0,5 (S)

**Los discos contienen 30 µg de la cefalosporina y 10 µg de clavulánico (Laboratorios Britania S.A.)
(R), Resistente; (S), Sensible

Ambos aislamientos mostraron el perfil clásico de un microorganismo productor de BLEE, con franca resistencia hacia penicilinas, cefalotina y oximino-cefalosporinas, y sensibilidad frente a cefoxitina y carbapenemes. Ambos aislamientos fueron resistentes a ceftazidima, lo cual indica, al menos en la cepa productora de CTX-M-12, la presencia de otros mecanismos de resistencia, como impermeabilidad o eflujo, ya que por PCR se

descartó la presencia de otras β -lactamasas de espectro extendido que normalmente hidrolizan eficientemente ceftazidima (TEM, PER-2 y SHV).

1.3.2 Análisis de la localización y capacidad de transferencia de los genes *bla*_{CTX-M}

Se determinó la sensibilidad a azida sódica por dilución en medio sólido de ambas cepas de *K. pneumoniae* con el objetivo de usar como célula receptora a *E. coli* J53 en ensayos de transferencia de genes. Los dos aislamientos en estudio tuvieron una CIM a azida sódica < 25 μ g/ml, por lo que se pudo emplear como medio de selección de posibles transconjugantes TSA con azida y cefotaxima.

Solo se obtuvieron transconjugantes (TC) en las condiciones ensayadas para Kpn 1138 (TCJ53-1138). Por tal motivo, se realizaron ensayos de transformación de los plásmidos extraídos de Kpn 293235 en *E. coli* DH5 α competente y se realizó la selección de los posibles transformantes en placas de LBA suplementadas con CTX 10 μ g/ml, hasta obtener clones de *E. coli* resistentes (TFDH5-293235).

La confirmación de la transferencia de *bla*_{CTX-M} en TC y TF se realizó a través de la determinación de la sensibilidad a antibióticos, extracción de plásmidos y amplificación por PCR y posterior secuenciación con cebadores específicos.

Dado que la presencia de *bla*_{CTX-M} ha sido asociada tanto a plásmidos conjugativos como también a algunos que sólo pueden ser transferidos por transformación o movilización, no podemos afirmar que el plásmido portador de *bla*_{CTX-M-96} no sea conjugativo. Los eventos de conjugación pueden estar afectados por numerosos factores indirectos como el tamaño y la densidad relativa de las poblaciones de células dadoras y receptoras que pueden tener una gran influencia en la frecuencia de la transferencia plasmídica. No existe un consenso sobre cuál es el mejor sistema para evaluar el grado de transferencia de un plásmido y es difícil comparar resultados de distintos estudios.

Se decidió entonces investigar si la diseminación de este marcador de resistencia en dicha especie podría corresponder a la propagación de un único clon de *K. pneumoniae* o bien a la dispersión del elemento genético.

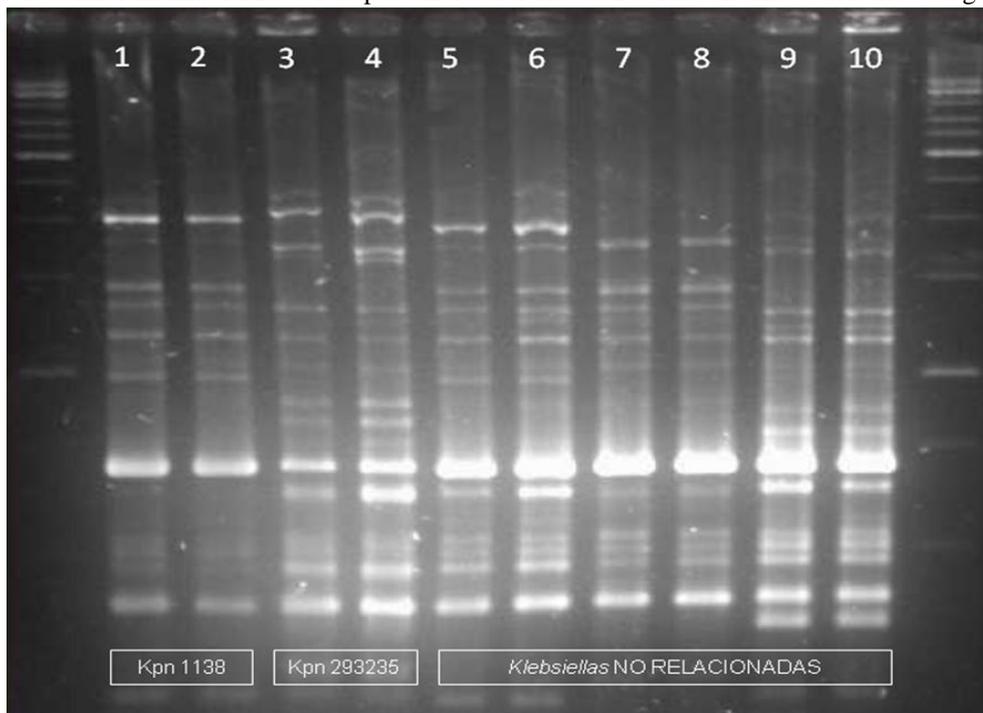
1.3.3 Tipificación molecular de *K. pneumoniae* productora de CTX-M

La tipificación empleando técnicas de PCR se caracteriza por ser rápida, de bajo costo, reproducible, fácil de analizar, y no requiere de equipos especiales de electroforesis. Sin embargo, tiene menor poder de discriminación con respecto al PFGE para distinguir subtipos entre cepas relacionadas clonalmente. A pesar de ello, resulta útil para diferenciar grupos de cepas que no lo están.

Para caracterizar los 2 aislamientos de *K. pneumoniae* productores de CTX-M incluidos en esta sección, se llevó a cabo la tipificación molecular mediante ERIC-PCR, la cual se basa en la amplificación de secuencias de ADN consenso, intergénicas y repetitivas, y fue diseñada para ser aplicada especialmente en enterobacterias. El polimorfismo generado depende de la variedad en la distribución de las secuencias ERIC dentro del genoma y de la distancia entre ellas.

Como se observa en la **Figura 4.2**, la comparación de los patrones de bandas obtenidos para los dos aislamientos permite confirmar que éstos no estaban clonalmente relacionados.

Figura 4.2: Tipificación molecular de *Kpn 1138* y *Kpn 293235* por ERIC-PCR. La mezcla de reacción se sembró por duplicado, calles 1-2 para *Kpn 1138*, calles 3-4 para *Kpn 293235*. En las calles 5 a 10 se sembraron mezclas de reacción de *Klebsiellas* no relacionadas con las cepas en estudio a modo de control interno. Marcador de peso molecular 1kb de *Bio-Rad* en ambos extremos del gel.



1.3.4 Tipificación molecular y determinación del tamaño molecular de los plásmidos portadores de *bla*_{CTX-M}

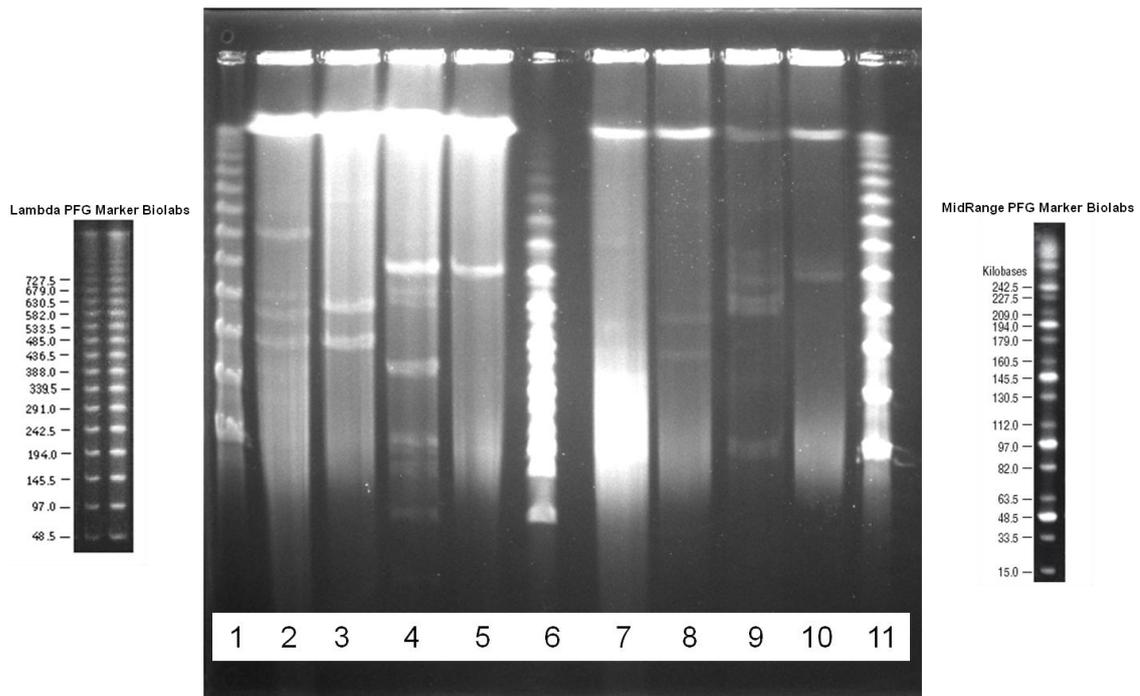
Como se describió anteriormente, los aislamientos no correspondieron a un único clon. Por consiguiente nos propusimos tipificar los plásmidos portadores de *bla*_{CTX-M} para evaluar si la posible diseminación de este marcador se debió a la dispersión de un único plásmido. La caracterización de los mismos se realizó mediante la determinación del tamaño molecular y el grupo de incompatibilidad a los cuales pertenecen (**Figura 4.3**).

En la estimación del tamaño molecular de los plásmidos mediante digestión con nucleasa S1 y posterior análisis por PFGE de Kpn 1138, Kpn 293235, TCJ53-1138 y TFDH5-293235, pudimos determinar que:

- Los aislamientos de Kpn 1138 y Kpn 293235 poseen varios plásmidos cada uno.
- La célula transformante TFDH5-293235 internalizó un único plásmido de 242,5 kb de tipo **IncFIA/B**.
- La célula transconjugante TCJ53-1138 captó dos plásmidos de gran tamaño durante el proceso de conjugación, uno de 145,5 kb y otro de 198 kb. La reacción de tipificación de grupos de incompatibilidad por PCR dió como resultado los grupos **IncA/C** e **IncL/M**

Figura 4.3: PFGE previa digestión con nucleasa S1.

1- Marker Lambda; 2- Kpn 1138 con S1; 3- TCJ53-1138 con S1; 4- Kpn 293235 con S1; 5- TFDH5-293235 con S1; 6- Marker Mid Range; 7- Kpn 1138 sin digerir ; 8- TCJ53-1138 sin digerir; 9- Kpn 293235 sin digerir ; 10- TFDH5-293235 sin digerir; 11- Marker Lambda



Los plásmidos pertenecientes a IncF han sido asociados en todo el mundo a la emergencia de BLEE, especialmente CTX-M-15. Se trata de plásmidos de rango de huésped limitado a las enterobacterias, alto tamaño molecular (> 100kb) y asociados a más de un replicón [186]. La detección de dos replicones en el plásmido portador de *bla*_{CTX-M-96} es algo cada vez más habitual, sobre todo en aquéllos vinculados al grupo de incompatibilidad IncF. La presencia de plásmidos con multirreplicones en una célula bacteriana permite que varios plásmidos puedan coexistir en la célula aún a pesar de compartir el mismo grupo de incompatibilidad. Esto se debe a que la replicación del plásmido con multirreplicones es llevada a cabo a partir de un replicón diferente al presente en el/los otros plásmidos residentes, garantizando así su segregación a las células hijas y conservación en la población bacteriana.

Los resultados obtenidos en esta sección de la tesis demuestran que la diseminación y diversificación de *bla*_{CTX-M-96} no parecen estar asociadas a la transferencia y dispersión del mismo plásmido o a la diseminación de un único clon portador de *bla*_{CTX-M-12}, sino que correspondería a la diseminación del gen asociado a una plataforma móvil.

1.3.5 Mapeo por PCR del entorno genético de *bla*_{CTX-M}

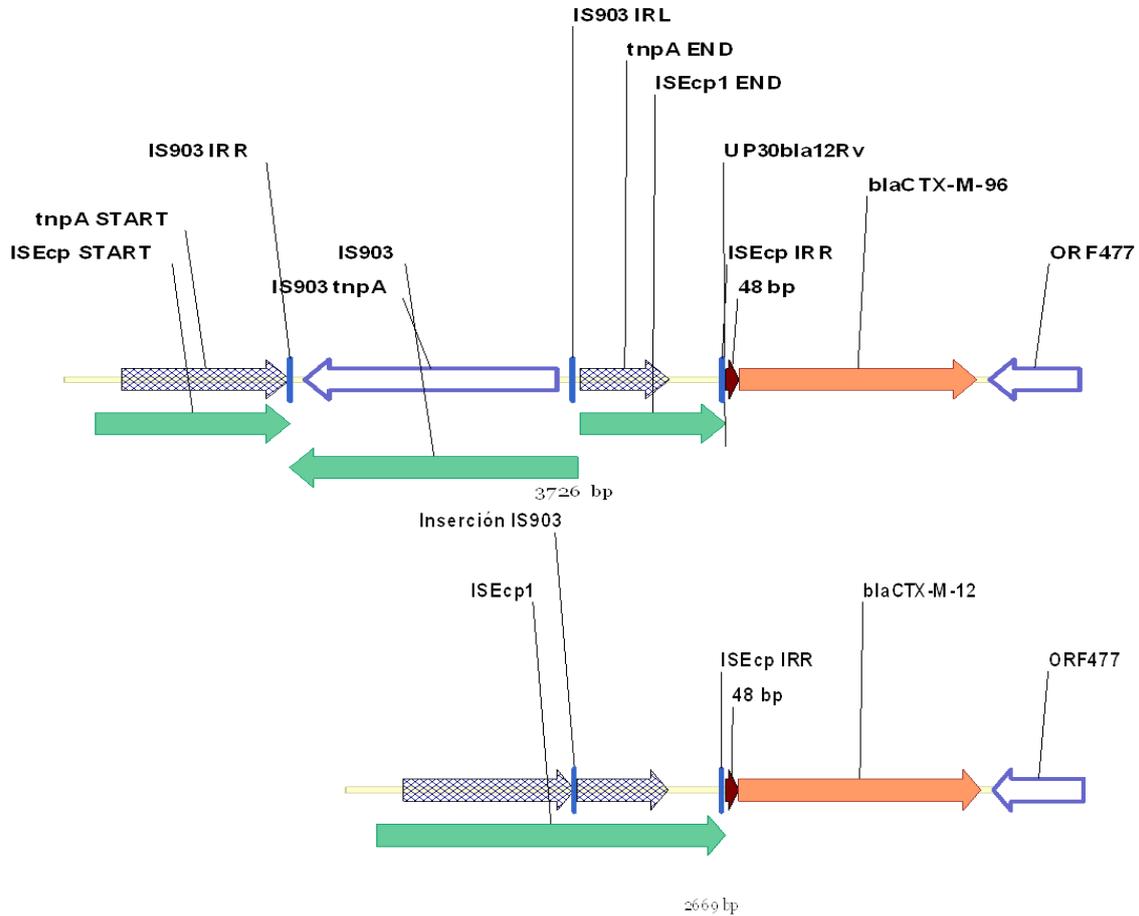
El entorno genético se estudió por mapeo por PCR usando como referencia las descripciones hechas por Dhanji y colaboradores [119].

Se detectó la presencia de la secuencia de inserción *ISEcpI* ubicada corriente arriba de *bla*_{CTX-M}. Esta estructura genética ha sido reportada previamente como responsable tanto de la diseminación de genes codificantes de esta familia de β-lactamasas (*bla*_{CTX-M-12}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-17}, *bla*_{CTX-M-19}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-32}) [78, 187, 188], como de su expresión, ya que los elementos -35 y -10 de las regiones promotoras están localizados cercanos a las secuencias IRr.

En la **Figura 4.4** se indica el entorno genético asociado a *bla*_{CTX-M-12} en Kpn 1138 y a *bla*_{CTX-M-96} en Kpn 293235.

Se observó que, al igual que en el entorno asociado a *bla*_{CTX-M-15} diseminado internacionalmente, la secuencia IRr de *ISEcpI* se encuentra inserta 48 bp río arriba con respecto a *bla*_{CTX-M-12}.

Figura 4.4: Entornos asociados a $bla_{CTX-M-96}$ (arriba) y $bla_{CTX-M-12}$ (abajo). Ver explicación en el texto.



En el caso de $bla_{CTX-M-96}$, la secuencia codificante de la transposasa está interrumpida por $IS903$, dando origen a un nuevo entorno asociado a bla_{CTX-M} hasta ahora no descrito. En este último caso, también se encuentra intacta la región de 48 pb, de manera tal que ambas variantes de CTX-M conservan las secuencias del promotor (–35 TTGAA) y (–10 TACAAT) provistas por el extremo 3' no codificante de la secuencia de inserción $ISEcp1$.

Río abajo, ambas estructuras comparten la presencia del marco de lectura $orf477$, ya encontrado por Dhanji asociado a $bla_{CTX-M-15}$ [189] y presente además en el cromosoma de ciertas especies de *Kluyvera* [44].

A modo de resumen, hemos corroborado en esta sección lo que han expuesto ya otros autores con respecto a la diseminación de los genes bla_{CTX-M} : **Su diseminación seguiría**

un patrón alodémico en el que participan múltiples clones y/o diversos elementos genéticos móviles [88].

Como ha sido reportado previamente para otras CTX-Ms del subgrupo 1, *bla*_{CTX-M-96} forma parte de una plataforma genética móvil asociada a *ISEcp1* que no ha sido descrita previamente, a partir de la cual la β -lactamasa se habría estado diseminando entre microorganismos.

Es generalmente aceptado que las variantes Asp240Gly de CTX-M han emergido como consecuencia del uso intensivo y sostenido de ceftazidima, por lo que podríamos postular, basándonos en el trabajo de Novais y colaboradores [190] que **CTX-M-12** sería una enzima derivada de **CTX-M-3** reclutada inicialmente del cromosoma de *Kluyvera ascorbata* [93] por *ISEcp1* y que, tras su diseminación entre patógenos clínicos expuestos a ceftazidima y otros antibióticos β -lactámicos, habría sufrido su diversificación hasta adquirir los cambios Thr12Ala, Asn89Ser y Val279Ile. Finalmente, la continua exposición a ceftazidima y cefotaxima llevó a la emergencia de la variante con la mutación Gly240: **CTX-M-96**. Algo similar habría ocurrido con **CTX-M-15** en Polonia, ya que esta variante parece haber emergido por evolución directa desde el gen *bla*_{CTX-M-3} presente en plásmidos de enterobacterias [191] (y no por importación del clon pandémico de *E. coli* ST131 [78] desde otra región), y con **CTX-M-131** en Brasil, que parece haber evolucionado a partir del gen *bla*_{CTX-M-2} presente en el integrón complejo de clase 1 ampliamente diseminado por toda Sudamérica [158].

Es importante destacar que, aunque Novais y colaboradores no predijeron la trayectoria evolutiva que diera origen a CTX-M-96, sí han postulado el surgimiento de CTX-M-60, una variante natural Ala77Val de CTX-M-12. Sería lícito preguntarse en este punto si las variantes Asp240Gly/Ala77Val (como por ejemplo CTX-M-57, CTX-M-69 y CTX-M-79, derivadas polimórficas de CTX-M-3 con el cambio Asp240Gly/Ala77Val), cuyo fenotipo de resistencia parecería ser favorecido en un ambiente de doble selección cefotaxima/ceftazidima, o bien otras variantes con capacidad de hidrólisis mejorada frente a ceftazidima, no estarán ya circulando ampliamente en el ambiente clínico.

Como vimos en las secciones anteriores, las variantes Asp240Gly no otorgarían valores elevados de CIM a ceftazidima, por lo que no serían tan favorablemente seleccionadas en presencia de niveles altos del antibiótico. Sin embargo, las cepas clínicas con dichas

mutaciones probablemente sean más resistentes debido a la coexistencia de varios mecanismos, como la impermeabilidad disminuída al antibiótico o el aumento en la expresión favorecido por la presencia de secuencias de inserción (que a su vez pueden aportar elementos promotores eficientes) y su asociación a plataformas genéticas fácilmente transferibles, presentes a su vez en plásmidos de diversos grupos de incompatibilidad.

Tal como fuera postulado por nuestro grupo de trabajo en el pasado, es hoy claro que los genes codificantes de las β -lactamasas CTX-M se reclutarían mediante procesos de adquisición independientes directamente a partir de sus reservorios naturales (genoma de *Kluyvera*) y posteriormente se diseminan a través de secuencias de inserción, transposones o integrones asociados a éstos [44, 74, 93, 150, 192]. A partir de estos, surgirían las variantes con mayor capacidad adaptativa, que verían afectada su prevalencia de acuerdo a la asociación con clones y/o plataformas genéticas de alta capacidad de transmisión o mantenimiento.

2- Caracterización bioquímica de cefotaximasas

2.1 Producción, purificación y caracterización cinética y bioquímica de β -lactamasas de tipo CTX-M portadoras de la mutación Asp240Gly

De acuerdo a los resultados obtenidos en la sección anterior, nos propusimos demostrar si las mutaciones que ocurren en esta posición son efectivamente responsables del incremento en los valores de CIM a ceftazidima como consecuencia de un aumento en la eficiencia hidrolítica de la enzima, o si hay en realidad otros fenómenos involucrados. Para ello, decidimos caracterizar cinéticamente al menos un representante de cada uno de los cinco subgrupos filogenéticos más importantes de CTX-M y compararlo con su respectiva mutante Asp240Gly, en las mismas condiciones experimentales. El hecho de comparar los parámetros cinéticos de estas variantes en idénticas condiciones resulta ventajoso si tenemos en cuenta que al revisar la literatura nos encontramos con valores muy dispares incluso para las mismas enzimas cuando estos fueron determinados en laboratorios diferentes, sobre todo en el caso de antibióticos que no se comportan como buenos sustratos, como sería el caso de ceftazidima para las CTX-M (**Tabla 4.8**).

Como mencionáramos en otras secciones, y de acuerdo a lo observado en la **Tabla 4.8**, las β -lactamasas de tipo CTX-M exhiben una actividad natural de oximino-cefalosporinasa, que se evidencia en cepas clínicas con valores elevados de CIM de cefotaxima y ceftriaxona. Como vimos además, algunas variantes también otorgan altos valores de CIM de ceftazidima.

Se desprende del análisis de los valores de eficiencia hidrolítica (k_{cat}/K_m) de la tabla que en todos los casos, a pesar de la variabilidad observada entre laboratorios, cefotaxima es mucho mejor sustrato que ceftazidima, incluso para las variantes que fueron reportadas como “ceftazidimasas” y poseen la sustitución Asp240Gly.

Por otro lado, los carbapenemes y cefoxitina son sustratos para los cuales prácticamente no se detecta hidrólisis. Sin embargo, existen reportes de cepas de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de CTX-M que se han asociado con resistencia a carbapenemes [74, 179, 193], pero siempre en un contexto de permeabilidad alterada.

Por último, la inhibición mediada por tazobactam es mayor que la producida por clavulanato o sulbactam.

Tabla 4.8: Comparación de parámetros cinéticos de CTX-M's reportadas por otros autores. Se indican de a pares CTX-M salvaje y su respectiva mutante Asp240Gly (Adaptado de [74])

CTX-M	CEFALOTINA			CEFOTAXIMA			CEFTAZIDIMA		
	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_m (μ M)	k_{cat}/K_m (μ M ⁻¹ .seg ⁻¹)	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_m (μ M)	k_{cat}/K_m (μ M ⁻¹ .seg ⁻¹)	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_m (μ M)	k_{cat}/K_m (μ M ⁻¹ .seg ⁻¹)
1	2450	115	21,3	317	125	2,5	1	50*	0,02
32	928	211	4.4	320	322	1	0,91	271	0,003
3	2800	96	29	380	113	3,4	<0,01	>3000	ND
	114.7	163,7	0,7	47,1	71,1	0,66	ND	ND	ND
	408	91,3	4,47	22,5	10,3	2,18	ND	1670*	0,001**
15	35	43	0,8	150	54	2,8	2	1760	0,001
44	480	39	12	250	120	2,1	21	7900	0,0013
43	11,3	10,2	1,1	70	30	2,3	ND	1600*	ND
9	3000	150	20	450	120	3,7	2	600	0,003
16	2800	83	33,7	1400	150	9,3	15	350	0,04
14	2700	175	15,4	415	130	3,2	3	630	0,004
	510	27	19	1400	41	34	ND	13000	ND
27	232	83	2,8	113	150	0,75	3	330	0,009
25 ***	230	190	1,2	101	28	3,6	33	13	2,6

ND: No determinado

* Corresponde al valor de K_m aparente o K_i obtenida en ensayos competitivos usando sustratos reporteros

** Obtenido como velocidad inicial de hidrólisis a bajas concentraciones de sustrato

*** Se desconoce su variante Asp240

Si bien todas las enzimas agrupadas en la **Tabla 4.8** evidencian un perfil de hidrólisis preferencial hacia cefalotina y cefotaxima, los valores informados de eficiencia son variables, incluso para la misma enzima frente al mismo sustrato realizado por investigadores diferentes. Como reportaran Ishii y colaboradores para CTX-M-14, estas diferencias pueden deberse a variaciones sobre todo en la temperatura, el pH del buffer, la presencia o ausencia de SAB (seroalbúmina bovina) en la mezcla de reacción, etc. [180]. Esto dificulta muchas veces comparar una nueva CTX-M con otras variantes ya caracterizadas. Si analizamos los resultados en valores de k_{cat}/K_m , a excepción de CTX-M-25, las variantes Asp240Gly de la tabla (CTX-M-32, CTX-M-15, CTX-M-43, CTX-

M-16, CTX-M-27) son muy poco eficientes frente a ceftazidima (los valores de k_{cat}/K_m están en el orden de 10^{-2} o 10^{-3} seg^{-1}).

Cabe destacar aquí la diferencia observada con CTX-M-25 (k_{cat}/K_m $2,6 \mu\text{M}^{-1}.\text{seg}^{-1}$), que puede explicarse si tenemos en cuenta que ésta posee la sustitución A77V. Como comentáramos anteriormente, tal cambio parecería ser responsable de mejorar la eficiencia hidrolítica frente a ceftazidima [194]. Sin embargo, Vervoort y colaboradores no observaron efecto alguno sobre la CIM de ceftazidima de clones recombinantes de *E. coli* expresando CTX-M-94 y CTX-M-100, dos variantes Asp240Gly pertenecientes al subgrupo CTX-M-25 portadoras de la sustitución A77V [195], mientras que Novais y colaboradores observaron un incremento de dos veces en el valor de la CIM de cefotaxima y ceftazidima cuando introdujeron la mutación A77V en CTX-M-15 [146].

Una vez más, nos encontramos ante el hecho de que diferencias polimórficas, en este caso entre los subgrupos CTX-M-1 y CTX-M-25, podrían repercutir diferencialmente en la conformación del sitio activo o en la estabilidad de la enzima, aunque no lo hagan de manera evidente, y por lo tanto en el fenotipo de resistencia obtenido [138].

En este trabajo se purificaron, mediante cromatografía de afinidad en columnas de Níquel, 10 β -lactamasas CTX-M, dado que cada una de ellas fue construída de manera tal que:

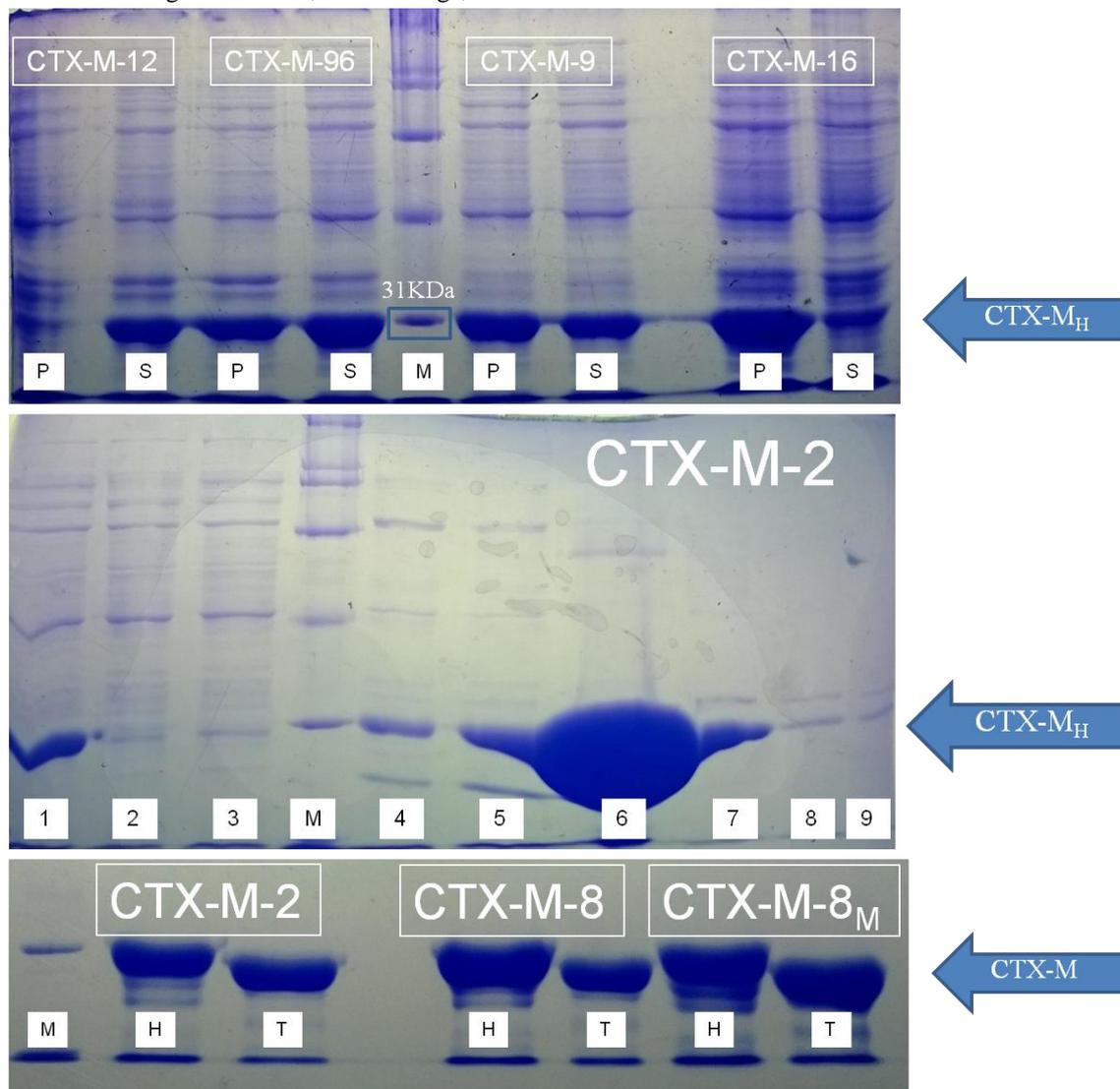
- Tuvieran una cola de seis histidinas capaz de interactuar con los iones de Níquel unidos químicamente a la resina de la columna
- El único cambio aminoacídico presente entre una variante salvaje y mutante fuera Asp240Gly

En cada uno de los 10 procesos de purificación se obtuvieron excelentes rendimientos ya que la mayoría de las proteínas endógenas de *E. coli* BL21 pudieron ser eliminadas, alcanzándose una pureza mayor al 90% en todas las CTX-M purificadas (**Figura 4.5**).

Después del paso de purificación con columna de Níquel, se digirió con trombina la cola de seis histidinas para comenzar con los ensayos cinéticos en condiciones de estado estacionario (*steady state*) (**Figura 4.5**). Las construcciones nos permitieron, además de

comparar entre pares dentro de cada subgrupo filogenético, comparar también las diez CTX-M entre sí.

Figura 4.5: Fracciones de purificación de las CTX-M y digestión con trombina. SDS-PAGE (12%) para evaluar las fracciones post-cromatografía de afinidad. **P**, pellet bacteriano del extracto crudo post-sonicado; **S**, fracción soluble del extracto crudo post-sonicado; **1 a 9**, fracciones del gradiente de imidazol; **H**, CTX-M con cola de histidina; **T**, CTX-M digerida con trombina; **M**, SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, BIO-RAD



Los principales parámetros cinéticos en el estado estacionario calculados, k_{cat} , K_m , k_{cat}/K_m y FE (Factor de Eficiencia) se muestran en la **Tabla 4.9** para cefalotina, cefotaxima y ceftazidima. En esta tesis definimos como *Factor de Eficiencia* (FE) a la relación entre las eficiencias catalíticas de cada par de β -lactamasa mutante/salvaje hacia un antibiótico β -lactámico específico.

Tabla 4.9: Principales parámetros cinéticos determinados para un par CTX-M/CTX-M_{Asp240Gly} representativo de cada uno de los 5 subgrupos filogenéticos de la familia CTX-M. Los ensayos se realizaron evaluando la hidrólisis **directa** de los antibióticos ensayados. **FE, Factor de Eficiencia: Relación entre la eficiencia enzimática kcat/Km de CTX-M mutante versus CTX-M salvaje

	k_{cat} (seg ⁻¹)		K_m (μM)		k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ .seg ⁻¹)		FE**
	CTX-M-12	CTX-M-96	CTX-M-12	CTX-M-96	CTX-M-12	CTX-M-96	
CTN	973 ± 68	120 ± 4	130 ± 5	27 ± 3	7,5 ± 0,8	4,5 ± 0,7	0,6
CTX	78 ± 4	60 ± 2	44 ± 3	34 ± 2	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,9
CAZ*	*No pudieron determinarse por hidrólisis directa				0,0006±6.10 ⁻⁶	0,003 ±3.10 ⁻⁵	5
	kcat		Km		kcat/Km		kcat/Km
	CTX-M-2	CTX-M-131	CTX-M-2	CTX-M-131	CTX-M-2	CTX-M-131	MUT/WILD
CTN	518 ± 30	142 ± 6	98 ± 5	23 ± 3	5,3 ± 0,6	6,0 ± 0,9	1,1
CTX	23 ± 1	93 ± 4	19 ± 2	70 ± 3	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,1
CAZ*	*No pudieron determinarse por hidrólisis directa				0,0004 ±4.10 ⁻⁶	0,006 ±6.10 ⁻⁵	15
	kcat		Km		kcat/Km		kcat/Km
	CTX-M-8	CTX-M-8D240G	CTX-M-8	CTX-M-8D240G	CTX-M-8	CTX-M-8D240G	MUT/WILD
CTN	306 ± 31	229 ± 7	164 ± 10	78 ± 3	1,9 ± 0,3	3,0 ± 0,2	1,6
CTX	12 ± 0,2	21 ± 0,2	14 ± 1	7 ± 1	0,9 ± 0,1	2,9 ± 0,3	3,2
CAZ*	*No pudieron determinarse por hidrólisis directa				0,0004±4.10 ⁻⁶	0,004 ± 2.10 ⁻⁴	10
	kcat		Km		kcat/Km		kcat/Km
	CTX-M-9	CTX-M-16	CTX-M-9	CTX-M-16	CTX-M-9	CTX-M-16	MUT/WILD
CTN	705 ± 28	220 ± 4	188 ± 4	35 ± 2	3,8 ± 0,2	6,4 ± 0,6	1,7
CTX	42 ± 3	68 ± 3	42 ± 4	45 ± 2	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5
CAZ*	*No pudieron determinarse por hidrólisis directa				0,0002 ± 2.10 ⁻⁶	0,003 ± 6.10 ⁻⁵	15
	kcat		Km		kcat/Km		kcat/Km
	CTX-M-78	CTX-M-78D240G	CTX-M-78	CTX-M-78D240G	CTX-M-78	CTX-M-78D240G	MUT/WILD
CTN	289 ± 23	37 ± 1	193 ± 10	13 ± 5	1,5 ± 0,2	2,8 ± 1,0	1,9
CTX	14 ± 1	12 ± 0,2	27 ± 3	8 ± 1	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	2,8
CAZ*	*No pudieron determinarse por hidrólisis directa				0,0003 ±6.10 ⁻⁶	0,003 ±9.10 ⁻⁵	10

En todos los casos se midió la variación de la absorbancia de los antibióticos en estudio en buffer PBS en presencia de la enzima. Cada ensayo se realizó por triplicado y se obtuvieron resultados reproducibles.

Todas las CTX-M mostraron una alta eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) sobre cefalotina, que se comportó como el mejor sustrato. Como ocurre con otras CTX-Ms, también presentaron buena eficiencia de hidrólisis sobre cefotaxima, la cual fue significativamente mayor con respecto a ceftazidima. Para estos dos antibióticos se trabajó con concentraciones nanomolares de enzima. En el caso de ceftazidima, en cambio, no se observó hidrólisis usando concentraciones nanomolares de la enzima, ni siquiera durante reacciones prolongadas (≥ 30 minutos). En cambio, sí se observó hidrólisis del antibiótico aumentando la cantidad de enzima en la reacción (sin alterar las condiciones de estado estacionario) y midiendo la reacción durante un tiempo de por lo menos 5 minutos.

Aún empleando una concentración elevada de enzima, para ceftazidima no pudimos alcanzar $V_{m\acute{a}x}$ (Velocidad Máxima), por lo que en este caso sólo pudimos calcular k_{cat}/K_m de manera directa. Observamos que si bien la eficiencia de la mutante aumentaba con respecto a la salvaje entre 5 y 15 veces, aún se mantenía en el orden de 10^{-3} seg^{-1} , lo que nos indicó que ceftazidima se comportaba como un sustrato muy pobre a pesar del cambio Asp240Gly.

Las variantes se caracterizaron espectroscópicamente por dicroísmo circular (CD) en el UV cercano (**Figura 4.6**) y lejano (**Figura 4.7**) y por fluorescencia (**Figura 4.8**). Los resultados indicaron que todas las mutantes parecen sufrir un plegado similar al de la proteína salvaje, es decir que no se detectaron alteraciones conformacionales significativas entre una y otra variante.

En las secciones anteriores de este trabajo quedó demostrado el notable efecto de la permeabilidad en la susceptibilidad frente a ceftazidima cuando se combina con la hiperproducción de variantes CTX-M_{Asp240Gly}, dado que la introducción del plásmido expresando CTX-M-96 en E. coli JF703 mostró un incremento notable en los valores de CIM a este antibiótico entre la variante salvaje y mutante (8 $\mu\text{g/ml}$ versus 128 $\mu\text{g/ml}$). Sin embargo, la eficiencia hidrolítica de ésta y las otras variantes Asp240Gly analizadas fue muy baja en comparación con la correspondiente a cefotaxima, lo que

nos lleva a preguntarnos si la cooperación de ésta con la impermeabilidad alcanzaría para explicar los niveles elevados de CIM observados en los clones recombinantes construídos o si está involucrado otro fenómeno.

Figura 4.6: Curvas de CD en el UV cercano de CTX-M.

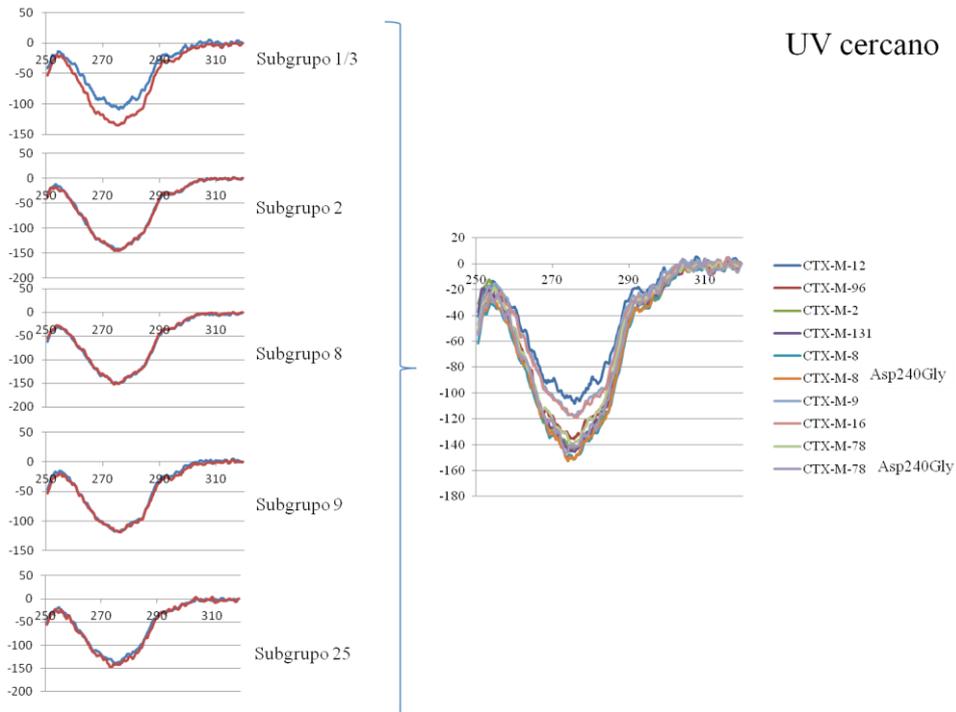


Figura 4.7: Curvas de CD en el UV lejano de CTX-M.

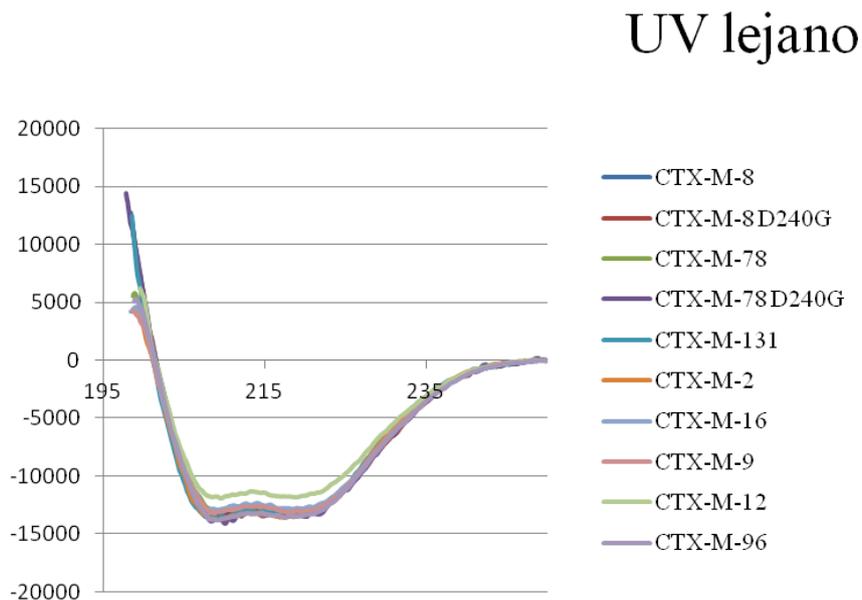
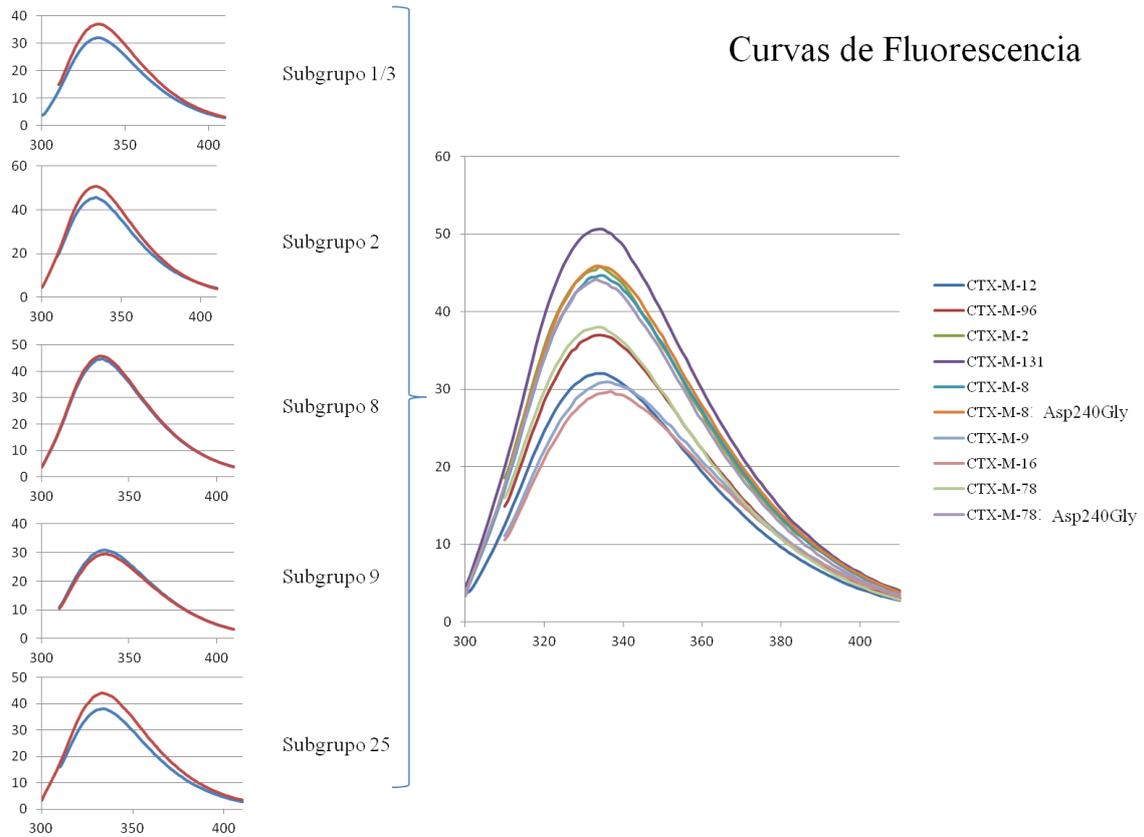


Figura 4.8: Curvas de fluorescencia de CTX-M.



2.2 Caracterización cinética completa de dos nuevas variantes naturales *Asp240Gly: CTX-M-96 y CTX-M-131*

Como se observa en la **Tabla 4.10**, los aislamientos de origen nosocomial de *Klebsiella pneumoniae* productores de CTX-M-12 y CTX-M-96 poseían un perfil de sensibilidad compatible con un microorganismo productor de BLEE, y en ambos casos se detectó resistencia tanto a cefotaxima como ceftazidima. Sólo después de que los correspondientes genes *bla*_{CTX-M} fueron clonados en pK19 y expresados en cepas de *E. coli* sin mecanismos de resistencia acompañantes, se pudo evidenciar el comportamiento diferencial de cada CTX-M: El clon de *E. coli* transformado con la construcción recombinante pK96 presentó un incremento de 32 veces en la CIM de ceftazidima comparado con el clon productor de CTX-M-12. Este comportamiento es equivalente al reportado para otros aislamientos de enterobacterias productores de CTX-M, pero como observamos con otros clones y comentáramos más arriba, muchos de los aislamientos productores de CTX-M son resistentes a cefotaxima y conservan la sensibilidad a ceftazidima o bien presentan sensibilidad disminuída al último cuando producen una variante “ceftazidimasa” [76, 196].

Tabla 4.10: Valores de CIM ($\mu\text{g/ml}$) de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y los clones recombinantes expresando CTX-M-12 y CTX-M-96

Antibiótico	<i>K. pneumoniae</i> 293235	<i>E. coli</i> DH5 α pK-96	<i>K. pneumoniae</i> 1338	<i>E. coli</i> DH5 α pK-12	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> DH5 α pK19
Ampicilina	>256	>1.024	>256	>1.024	2	2
Piperacilina	>256	>256	>256	>256	1	1
Piperacilina + tazobactam*	ND	2	ND	2	0.5	0.5
Cefalotina	>1.024	>1,024	>1.024	>1.024	2	4
Cefotaxima	>256	256	128	128	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Cefotaxima + ácido clavulánico*	2	$\leq 0,125$	2	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Ceftazidima	>256	32	64	1	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Ceftazidima + ácido clavulánico*	2	$\leq 0,125$	2	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Cefepime	32	4	64	8	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Cefoxitina	4	2	8	2	2	2
Imipenem	0,5	$\leq 0,125$	0.5	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$

* La concentración de ácido clavulánico y tazobactam se mantuvo fija en un valor de 4 $\mu\text{g/ml}$ (R), Resistente; (S), Sensible

Por otro lado, se realizó en colaboración con la Dra. Dropa la caracterización cinética de otra nueva β -lactamasa: CTX-M-131. CTX-M-131 es la variante natural Asp240Gly derivada de CTX-M-2, una de las β -lactamasas más prevalentes en Sudamérica. Fue detectada en una cepa de origen clínico de *Providencia rettgeri* (FSP309/05) aislada en un hospital universitario de la ciudad de San Pablo, Brasil [158]. Los valores de CIM para cefotaxima y ceftazidima de este aislamiento fueron $>256 \mu\text{g/ml}$ y $6 \mu\text{g/ml}$ respectivamente, los cuales coincidieron con los obtenidos para el clon de *E. coli* TOP 10 (*Invitrogen*) transformante de FSP309/05, que internalizó por electroporación un plásmido portador de *bla*_{CTX-M-131} de 112 kb. En la **Tabla 4.11** se recopilan los valores de CIM obtenidos para la cepa salvaje y el respectivo transformante [158]. Las diferencias observadas entre ambas se deban probablemente a que *P. rettgeri* es un productor natural de la β -lactamasa AmpC, por lo que el perfil de resistencia observado en la cepa salvaje debe ser la suma de la co-expresión de ambas β -lactamasas.

Tabla 4.11: Valores de CIM ($\mu\text{g/ml}$) de los aislamientos de *P. rettgeri* y el respectivo transformante de *E. coli* expresando CTX-M-131 [158] y de los clones recombinantes DH5apK-2 y DH5apK-131

Antibiótico	<i>Providencia rettgeri</i> FSP309/05	<i>E. coli</i> EC309/05	<i>E. coli</i> DH5apK-131	<i>E. coli</i> DH5apK-2	<i>E. coli</i> DH5a	<i>E. coli</i> DH5apK19
Ampicilina	ND	ND	>256	>256	2	2
Piperacilina	ND	ND	>256	>256	1	1
Amoxicilina + ácido clavulánico**	128	8	ND	ND	ND	ND
Cefalotina	ND	ND	>512	>512	2	4
Cefotaxima	>256	>256	>128	>128	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Cefotaxima + ácido clavulánico*	ND	ND	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Ceftazidima	6	6	1	2	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Ceftazidima + ácido clavulánico*	ND	ND	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Cefepime	64	64	32	16	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Aztreonam	6	6	ND	ND	ND	ND
Cefoxitina	8	4	0,5	1	2	2
Imipenem	4	$\leq 0,125$	$< 0,5$	$< 0,5$	$\leq 0,125$	$\leq 0,125$
Meropenem	0,094	0,75	ND	ND	ND	ND

** La concentración de ácido clavulánico era $\frac{1}{2}$ la concentración de amoxicilina en cada tubo

* La concentración de ácido clavulánico se mantuvo fija en un valor de $4 \mu\text{g/ml}$ cuando se combinó con CAZ o CTX

(R), Resistente; (S), Sensible

ND: No Determinado

A continuación se muestran en las **Tablas 4.12 y 4.13** los parámetros cinéticos obtenidos para estas dos nuevas variantes.

Ambas β -lactamasas presentaron la eficiencia catalítica más alta frente a cefalosporinas de primera y segunda generación y cefotaxima. CTX-M-96 además fue muy eficiente al hidrolizar penicilinas, a diferencia de CTX-M-131.

Para ceftazidima, el valor de FE fue de 5 para el par 96/12 y 15 para el par 131/2, siendo en ambos casos el valor más alto entre los sustratos comparados. Sin embargo, la eficiencia de hidrólisis se mantuvo 600 y 217 veces respectivamente por debajo de la de cefotaxima (0,003 versus $1,8 \mu\text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ para el par 96/12, y 0,006 versus $1,3 \mu\text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ para el par 131/2). Para ambas variantes Asp240Gly, el valor de k_{cat}/K_m frente a cefotaxima permaneció prácticamente invariable con respecto al correspondiente para las β -lactamasas salvajes. Los valores obtenidos sugieren entonces que las mutantes tienen actividad débil frente a ceftazidima, como ya discutiéramos antes [197].

Las dos enzimas fueron inhibidas eficientemente por ácido clavulánico y tazobactam, siendo el último un inhibidor más potente. Sin embargo, la mutación Asp240Gly en CTX-M-96 pareció afectar la habilidad de éste de bloquearla, ya que resultó inhibida con una eficiencia casi 15 veces menor que CTX-M-12 ($k_{\text{inact}}/K_i = 0,22$ vs $3,2 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$, respectivamente).

CTX-M-96 parece perder eficiencia hidrolítica frente a estos antibióticos a costa de ganar mayor actividad de “ceftazidimasa”. Sin embargo, este efecto no sería suficiente para impactar en el fenotipo de resistencia, dado que ambos clones de *E. coli* productores de CTX-M-12 y CTX-M-96 presentaron niveles de resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación equivalentes, y solamente el valor de CIM a ceftazidima fue significativamente diferente entre un clon y otro (**Tabla 5 y Tabla 10**).

CTX-M-131, en cambio, no presentó variaciones significativas en el factor de eficiencia para cefalotina y cefotaxima con respecto a CTX-M-2. Sin embargo, el factor de eficiencia de la mutante fue 15 veces mayor para ceftazidima. Llamativamente, ambos clones recombinantes de *E. coli* mostraron niveles de resistencia equivalentes frente a ceftazidima.

Tabla 4.12: Parámetros cinéticos en estado estacionario de CTX-M-96. Se comparan con los valores correspondientes de CTX-M-12 para antibióticos representativos

Sustratos	CTX-M-96			CTX-M-12			FE ^b
	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ .seg ⁻¹)	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ .seg ⁻¹)	
Bencil-penicilina^a	37 ± 0,7	4 ± 0,1	9,3 ± 0,5	nd	nd		
Ampicilina^a	23 ± 0,5	5 ± 0,2	4,6 ± 0,3	126 ± 4	5 ± 0,05	25 ± 1	0,18
Piperacilina^a	38 ± 1,5	1 ± 0,07	38 ± 6	nd	nd		
Cefalotina	120 ± 4	27 ± 3	4,4 ± 0,7	973 ± 68	130 ± 5	7,5 ± 0,8	0,59
Cefuroxima	45 ± 3	17 ± 3	2,6 ± 0,7	nd	nd		
Cefoxitina^a	3,10 ⁻⁴ ± 5,10 ⁻⁵	52 ± 4	6,10 ⁻⁶ ± 1,10 ⁻⁶	nd	nd		
Cefotaxima	60 ± 2,4	34 ± 2	1,8 ± 0,2	78 ± 4	44 ± 3	1,8 ± 0,2	1
Ceftazidima^a	4 ± 0,9	1.386 ± 249	0,003 ± 0,0001	1 ± 0,3	1.657 ± 464	6,10 ⁻⁴ ± 6,10 ⁻⁶	5
Cefepime	30 ± 6	607 ± 144	0,05 ± 0,02	79 ± 9	566 ± 17	0,14 ± 0,02	0,36
Aztreonam	0,9 ± 0,05	46 ± 28	0,02 ± 0,01	8 ± 0,2	172 ± 10	0,05 ± 0,004	0,4
Imipenem^a	0,0013 ± 9,10 ⁻⁵	71 ± 6	2,10 ⁻⁵ ± 5,10 ⁻⁶	nd	nd		
Inhibidores	k_{inact} (seg ⁻¹)	K_i (μM)	k_{inact}/K_i (μM ⁻¹ .seg ⁻¹)	k_{inact} (seg ⁻¹)	K_i (μM)	k_{inact}/K_i (μM ⁻¹ .seg ⁻¹)	
Clavulanato de litio	0,03 ± 0,002	0,67 ± 0,07	0,045 ± 0,007	nd	nd		
Tazobactam	0,095 ± 0,006	0,43 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,035 ± 0,002	3,2 ± 0,13	

Tabla 4.13: Parámetros cinéticos en estado estacionario de CTX-M-131. Se comparan con los valores correspondientes de CTX-M-2 para antibióticos representativos.

Sustrato	CTX-M-131			CTX-M-2			FE ^b
	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ .seg ⁻¹)	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ .seg ⁻¹)	
Ampicilina^a	18 ± 1	37 ± 9	0,5 ± 0,15	nd	nd		
Cefalotina	142 ± 6	23 ± 3	6,2 ± 0,9	518 ± 30	98 ± 5	5,3 ± 0,6	1,2
Nitrocefín	49 ± 1	17 ± 4	2,9 ± 0,8	nd	nd		
Cefuroxima	85 ± 4	33 ± 4	2,6 ± 0,4	nd	nd		
Cefoxitina^a	9 ± 0,4	28 ± 1,2	0,3 ± 0,02	nd	nd		
Cefotaxima	93 ± 4	70 ± 5	1,3 ± 0,1	23 ± 1	19 ± 2	1,2 ± 0,2	1,1
Ceftazidima^a	7,5 ± 0,8	1.113 ± 116	0,006 ± 6.10 ⁻⁵	nd	nd	0,0004 ± 4.10 ⁻⁶	15
Cefepime	30 ± 3	312 ± 50	0,096 ± 0,022	nd	nd		
Aztreonam	22 ± 1,5	24 ± 2	0,9 ± 0,1	nd	nd		
Imipenem^a	9 ± 0,6	102 ± 7	0,09 ± 0,01	nd	nd		
Inhibidores	k_{inact} (seg ⁻¹)	K_i (μM)	k_{inact}/K_i (μM ⁻¹ .seg ⁻¹)				
Clavulanato de litio	0,031 ± 0,0045	0,64	0,048				
Tazobactam	0,072 ± 0,005	0,18	0,4				

^a Los valores de Km fueron determinados como Ki observada mediante ensayos competitivos con Nitrocefín como sustrato reportero

^b FE (Factor de eficiencia): Cociente entre k_{cat}/K_m de la mutante G240 vs la variante D240

nd: no determinado

En resumen, como parte de esta tesis se caracterizaron dos nuevas variantes naturales Asp240Gly, CTX-M-96 y CTX-M-131, las cuales mostraron un perfil clásico de cefotaximasa acompañado de un leve incremento en la actividad sobre ceftazidima.

2.3 Ensayo de preincubación con ceftazidima

Para evaluar la posibilidad de que ceftazidima se uniera covalentemente a las β -lactamasas CTX-M, se preincubó CTX-M-96 con concentraciones crecientes de ceftazidima y luego se midió la actividad remanente usando nitrocefín 100 μ M como sustrato *reporter*.

Como explicaran hace ya varios años Frere y colaboradores [198], la sensibilidad de una bacteria a los antibióticos β -lactámicos depende de la interrelación de 4 factores independientes:

- 1- La velocidad de acilación y desacilación de las PBP's esenciales.
- 2- El nivel de producción y las propiedades catalíticas de las β -lactamasas del espacio periplásmico que son capaces de hidrolizar el antibiótico.
- 3- La presencia de bombas de eflujo.
- 4- La barrera de difusión impuesta por la membrana externa de las bacterias gram negativas.

El último factor, como ya pudimos corroborar al determinar la CIM de ceftazidima en cepas deficientes en porinas, suele ser insuficiente para lograr incrementos significativos en el nivel de resistencia, pero se torna de relevancia cuando se combina con altos niveles de producción de una β -lactamasa.

De forma similar a lo ocurrido con nuestros clones recombinantes deficientes en porinas y productores de CTX-M resistentes a ceftazidima, se han reportado cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenemes pero carentes de carbapenemasas (KPC, NDM, VIM, IMP y OXA). La explicación de este fenómeno viene dada por la presencia de grandes cantidades de β -lactamasa (AmpC o CTX-M) junto a la permeabilidad alterada de la membrana: *El desbalance extremo entre el número de moléculas de antibiótico ingresando a través de la célula y la gran cantidad de β -lactamasa presente en el periplasma (que puede alcanzar incluso un valor cercano a 1 mM [198]) ha sido propuesto como el mecanismo de resistencia a carbapenemes en este tipo de cepas [199].*

Esta explicación es, sin embargo, controversial, dado que tanto Mammeri como Queenan [200, 201] han demostrado que las β -lactamasas de tipo AmpC y CTX-M presentan actividad hidrolítica prácticamente despreciable frente a los carbapenemes, aunque no nula [199].

Por ese motivo, algunos autores proponen la influencia de otro fenómeno, también controversial: Impresionados por las altísimas cantidades de β -lactamasa encontradas en el periplasma de productores suprimidos de AmpC, algunos autores han propuesto que la formación de un complejo entre la molécula de antibiótico “no hidrolizable” y la enzima, evitaría que el primero alcance su blanco molecular, protegiendo a las PBP’s y elevando en consecuencia los niveles de CIM.

Este mecanismo ha sido demostrado para AmpC y moxalactam [202] y para una mutante de TEM-1 y ceftazidima [203].

Nosotros nos propusimos determinar, al menos de manera aproximada, cuál de los dos modelos se ajustaba mejor al efecto observado para las variantes Asp240Gly de CTX-M frente a ceftazidima.

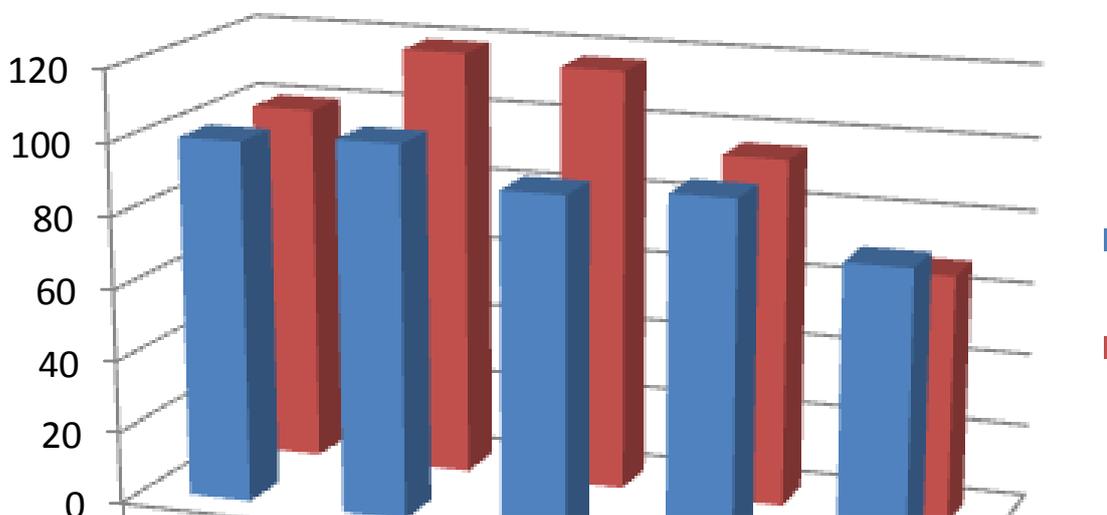
Como vimos en la sección 2.1, al realizar los ensayos de cinética frente a ceftazidima, no pudimos alcanzar la velocidad máxima de la reacción ($V_{m\acute{a}x}$) en condiciones experimentales de estado estacionario, para ninguna de las variantes de CTX-M, por lo que sólo pudimos estimar k_{cat}/K_m por cálculo directo. En estas condiciones, decidimos estimar el valor de K_m aparente por competencia con un sustrato reporter como el nitrocefín para las dos nuevas variantes de CTX-M, CTX-M-96 y CTX-M-131 (**Tabla 4.12** y **Tabla 4.13**).

Tomando como modelo al par de enzimas CTX-M-12 y CTX-M-96, durante los ensayos competitivos entre ceftazidima y nitrocefín, no pudimos observar niveles significativos de inhibición para ninguna de las dos, aún incluso empleando concentraciones de ceftazidima cercanas a 10 mM (**Figura 4.9**), lo cual nos permitió confirmar que la afinidad de ambas enzimas por este antibiótico alcanza valores del orden milimolar, mientras que el valor de k_{cat} fue de 4 seg^{-1} y 1 seg^{-1} , respectivamente (**Tabla 4.12** y **4.14**). Una situación similar se observó para CTX-M-131 (**Tabla 4.13**).

Tabla 4.14: Parámetros cinéticos en estado estacionario de CTX-M-96. Se comparan con los valores correspondientes de CTX-M-12 para ceftazidima.

ATB	CTX-M-96			CTX-M-12			FE ^b
	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ .seg ⁻¹)	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ .seg ⁻¹)	
Ceftazidima	4 ± 0,9	1.386 ± 249	0,003 ± 0,0001	1 ± 0,3	1.657 ± 464	6,10 ⁻⁴ ± 6,10 ⁻⁶	5

Figura 4.9: % V₀ promedio de CTX-M-12 y CTX-M-96 frente a nitrocefín en presencia de ceftazidima como inhibidor competitivo.



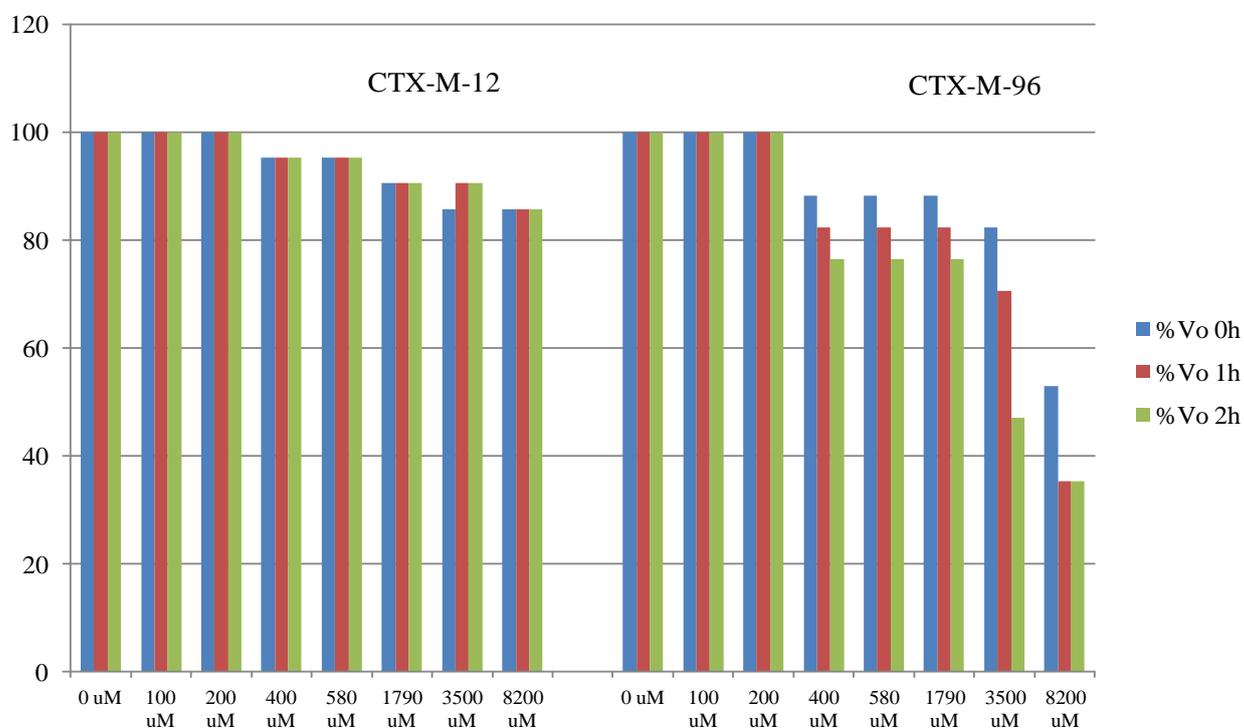
CAZ μM	% V ₀ promedio CTX-M-12 NIT/CAZ	% V ₀ promedio CTX-M-96 NIT/CAZ
0	100	100
1410	103	119
2820	92	117
4932	95	96
8091	81	68

Es importante destacar en este punto que los valores de K_m obtenidos no muestran diferencias significativas entre una y otra variante.

Por otro lado, quisimos evaluar la posibilidad de que la mutante se uniera a ceftazidima irreversiblemente, o al menos estimar que la velocidad de desacilación (representada por k_{+3}) era muy baja o despreciable (lo cual determina en gran medida que los valores de k_{cat} sean bajos). Para ello, realizamos ensayos de pre-competencia, incubando CTX-M-

12 y CTX-M-96 con concentraciones crecientes de ceftazidima durante 1 y 2 horas. En este caso, observamos un porcentaje significativo de inhibición sólo luego de 2 horas de pre-incubación y con concentraciones de ceftazidima muy elevadas, del orden milimolar, muy alejadas del valor de la CIM de los clones recombinantes de *E. coli* (**Figura 4.10**). Estos resultados sugieren que la hidrólisis eficiente de ceftazidima podría ocurrir solamente cuando hay concentraciones muy altas de antibiótico en el medio, condición difícil de alcanzar durante tratamientos *in vivo*.

Figura 4.10: %V₀ promedio de CTX-M-12 y CTX-M-96 frente a nitrocefín en presencia de ceftazidima como inhibidor competitivo luego de 0 horas, 1 hora y dos horas de preincubación.



CAZ	CTX-M-12			CTX-M-96		
	% V ₀ 0h	% V ₀ 1h	% V ₀ 2h	% V ₀ 0h	% V ₀ 1h	% V ₀ 2h
0 uM	100	100	100	100	100	100
100 uM	100	100	100	100	100	100
200 uM	100	100	100	100	100	100
400 uM	95	95	95	88	82	76
580 uM	95	95	95	88	82	76
1790 uM	90	90	90	88	82	76
3500 uM	86	90	90	82	71	47
8200 uM	86	86	86	53	35	35

En el caso de CTX-M-96 se observa cierta tendencia hacia un mayor efecto de inhibición en la hidrólisis de nitrocefín a mayor tiempo de preincubación con ceftazidima; sin embargo, el efecto fue evidente solamente luego de tiempos muy largos (2 hs) y/o a concentraciones de ceftazidima muy elevadas (>400 μM).

Es decir que, aún en el caso de las variantes Asp240Gly, estamos ante la presencia de enzimas que de forma similar a su contraparte salvaje, poseen valores de K_m del orden milimolar y k_{cat} del orden de la unidad de segundo recíproco (seg^{-1}), siendo este último factor el más visiblemente afectado por la sustitución aminoacídica, y el que representa más directamente las modificaciones en las velocidades de desacilación (y probablemente también de acilación), ya que:

$$k_{cat} = \frac{k_{+2} \times k_{+3}}{k_{+2} + k_{+3}}$$

Frente a estos parámetros cinéticos, la contribución del “atrapamiento” a los niveles de resistencia elevados a ceftazidima parece poco probable.

De acuerdo al modelo matemático propuesto por Frère, que relaciona de manera cuantitativa la sensibilidad a los antibióticos β -lactámicos en bacterias gram negativas y la producción de β -lactamasas, sabemos que:

- 1- Aún frente a un sustrato poco hidrolizable, como lo es ceftazidima, podemos tener como resultado aumentos significativos en los valores de CIM, dado que una baja hidrólisis se vería compensada por niveles elevados de β -lactamasa en el periplasma. Incluso valores de k_{cat} tan bajos como $0,001 \text{ s}^{-1}$ (hasta un millón de veces menor que el esperado en moléculas consideradas “buenos sustratos”) pueden verse compensados cuando la producción de enzima es cercana a 1 mM.
- 2- Cuando se determina la CIM, la disponibilidad del antibiótico β -lactámico es mucho mayor que la cantidad de β -lactamasa presente en el periplasma. En estas condiciones, el antibiótico satura a la enzima dentro del periplasma. Siempre y cuando la velocidad de hidrólisis sea suficiente, la vida media de la enzima acilada será significativamente menor al tiempo de generación bacteriano, y en estas condiciones el fenómeno de “atrapamiento” se vuelve irrelevante.

- 3- Es decir que el β -lactámico sólo podría ser atrapado por moléculas de β -lactamasa si la velocidad de entrada del antibiótico es similar a la velocidad de síntesis de nueva enzima y si la velocidad de hidrólisis es lo suficientemente lenta, lo que corresponde a un valor de $k_{\text{cat}} < 0,001$.

Resumiendo, las variantes de CTX-M Asp240Gly analizadas cuando son expresadas en los niveles adecuados en cepas poco permeables a ceftazidima pueden ser responsables de un fenotipo claro de resistencia a este antibiótico. Sin embargo, considerarlas “ceftazidimasas” es a nuestro criterio conceptualmente incorrecto, y debería aplicarse otro término al describir estas variantes, o directamente reservarlo para describir un comportamiento fenotípico de un microorganismo frente a un antibiótico en particular.

Este hecho queda más que claro cuando analizamos los parámetros cinéticos de CTX-M-96, ya que podemos ver que cefotaxima es hidrolizada 15 veces más rápido que ceftazidima ($k_{\text{cat}} = 60$ vs 4 seg^{-1}) y que la afinidad de unión de la primera al sitio activo es 40 veces mayor ($K_m = 34$ vs $1.386 \mu\text{M}$, respectivamente).

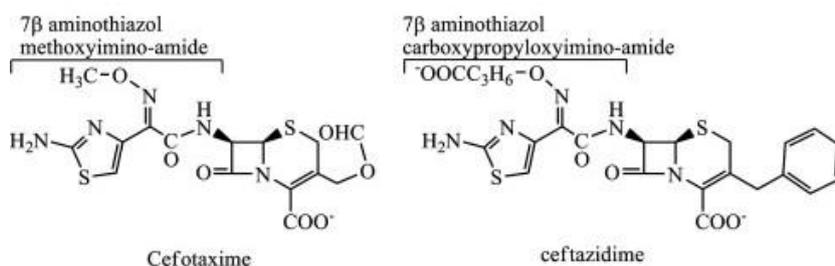
A pesar del hecho de que los valores de k_{cat} son del orden de la unidad, y por lo tanto la hidrólisis no es lo suficientemente lenta para que ocurra un fenómeno de “atrapamiento”, las afinidades por ceftazidima en el orden milimolar llevan a que la eficiencia hidrolítica, aunque de 5 a 15 veces mayor que la correspondiente a las variantes salvajes, continúe siendo mala.

3- Análisis estructural de CTX-M-96

3.1 Obtención y análisis de la estructura cristalográfica de CTX-M-96

A diferencia de otras BLEE, las β -lactamasas tipo CTX-M hidrolizan ceftazidima con poca eficiencia debido a que la molécula voluminosa del antibiótico no podría interactuar favorablemente con residuos clave en la cavidad del sitio activo (**Figura 4.11**).

Figura 4.11: Estructura química de cefotaxima y ceftazidima. Ambos antibióticos están sustituidos en C7 por un grupo aminotiazol-oximino-amida, lo que les otorga menor susceptibilidad a las β -lactamasas de espectro ampliado. El sustituyente metilo del grupo oximino de cefotaxima es reemplazado por carboxipropilo en ceftazidima. (Adaptado de [197]).



Sin embargo, la diversificación de las β -lactamasas CTX-M ha llevado a la emergencia de variantes que poseen mutaciones clave en distintas posiciones aminoacídicas que serían responsables de otorgar a los microorganismos productores niveles de sensibilidad disminuida a la ceftazidima. El surgimiento de dichas variantes probablemente sea consecuencia de su selección tras el uso extensivo de este antibiótico en la práctica clínica (**Figura 4.12**).

La mutación Asp240Gly es la más prevalente y en general su presencia resulta en un aumento de hasta 8 veces el valor de la CIM de los microorganismos productores. Según distintos estudios sobre las propiedades estructurales de variantes de CTX-M, la eficiencia hidrolítica aparentemente aumentada de las mutantes Asp240Gly frente a ceftazidima estaría asociada a una mayor flexibilidad de la cadena β 3, aunque esta sustitución también sería responsable de otorgar a la enzima menor estabilidad. Delmas y colaboradores demostraron que la flexibilidad de estas β -lactamasas, que les permite acomodar al sustrato en su sitio activo a través de un movimiento comparable a la

“respiración torácica”, podría explicar por qué las variantes Asp240Gly acomodan mejor la molécula de ceftazidima en la cavidad del sitio activo [197].

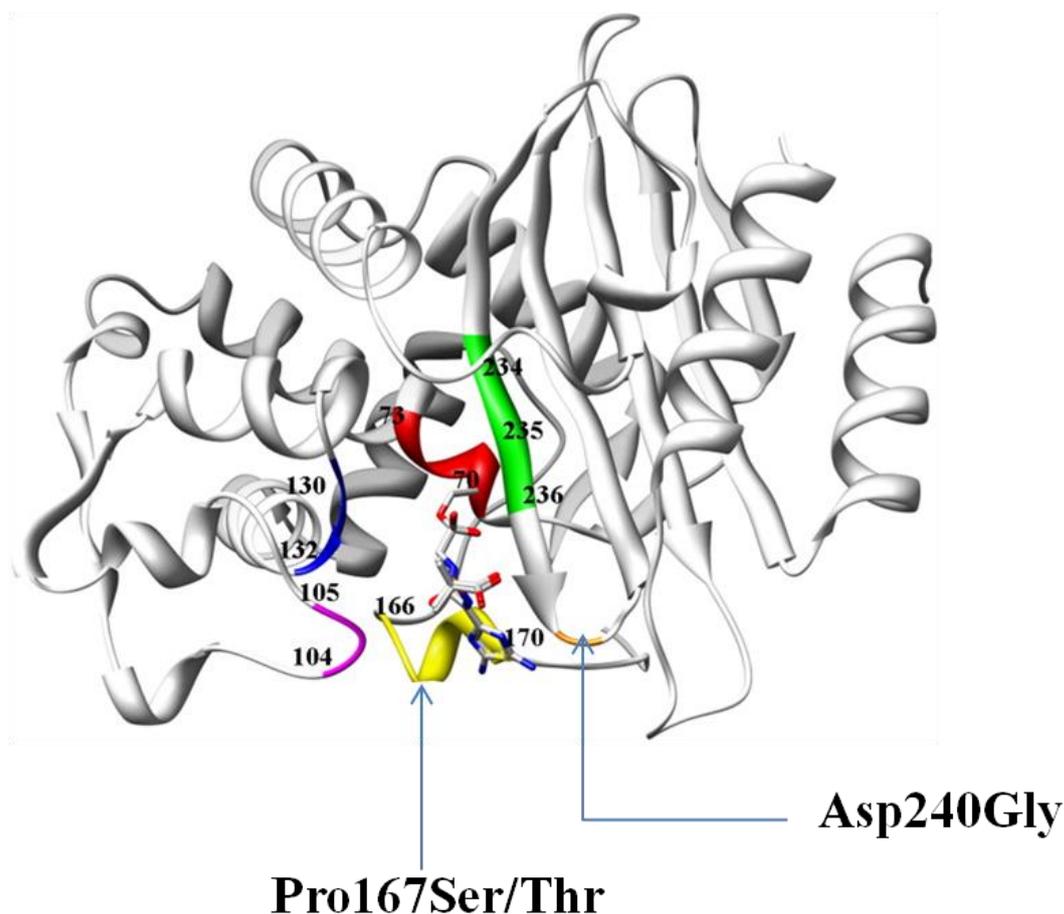
Las mutaciones Pro167Ser/Thr, ubicadas en la vecindad inmediata del Ω loop, también estarían implicadas en el aumento de la actividad ceftazidimasa. Aparentemente, este cambio modificaría el modo de interacción entre la β -lactamasa y la oximino-cefalosporina, lo que resultaría en incrementos significativos en los valores de CIM de las cepas productoras, los que a su vez serían significativamente mayores a los obtenidos para cepas productoras de variantes Asp240Gly. Sin embargo, los cambios en la posición 167 logran aumentos leves en la eficiencia catalítica frente a ceftazidima y además han sido seleccionados menos frecuentemente que el cambio Asp240Gly. Esto último puede responder por un lado al hecho de que modificaciones en el Ω loop resultan en la disminución significativa de la eficiencia catalítica, y por el otro a que la presencia simultánea en el ambiente de cefotaxima y ceftazidima favorece la selección del camino evolutivo que siguen las variantes Asp240, el cual tiene mayores posibilidades de diversificación en estas condiciones. Por el contrario, el camino evolutivo de las variantes Pro167 tiene posibilidades de diversificación limitadas y resulta favorecido cuando hay ceftazidima solamente [204].

Como uno de los principales objetivos de esta tesis nos propusimos estudiar la estructura cristalográfica de la mutante natural Asp240Gly derivada de CTX-M-12, CTX-M-96, perteneciente al subgrupo filogenético 1/3, y evaluar el rol de este cambio en la actividad frente a oximino-cefalosporinas a través del análisis de modelos de simulación en combinación con cefotaxima y ceftazidima.

Como se detalló en la sección 2.2, CTX-M-96 presentó elevada eficiencia hidrolítica frente a bencil-penicilina, cefalotina y cefuroxima. Por el contrario, aún cuando el valor de la eficiencia hidrolítica k_{cat}/K_m de ceftazidima fue 5 veces mayor al de CTX-M-12, aquél se mantuvo 600 veces menor al de cefotaxima (**Tabla 4.12**).

La estructura de CTX-M-96 fue obtenida a alta resolución (código de acceso PDB 3ZNY) y se refinó a 1,20 Å, lo que permitió observar el sitio activo y los principales motivos secundarios de la apo-enzima en detalle. Los datos estadísticos correspondientes a la colección, difracción y obtención de las fases se muestran en la **Tabla 4.15**.

Figura 4.12: Estructura de CTX-M-9 en complejo con un derivado del ácido borónico símil ceftazidima. Se señalan las mutaciones asociadas con el aumento del espectro de actividad frente a ceftazidima. El elemento conservado 1 (Ser70 a Lys73) del sitio activo se indica en rojo; el elemento conservado 2 (Ser130-Asp131-Asn132) en azul; el elemento conservado 3 (Lys234-Thr235-Gly236) en verde; Glu166 a Asn170 del Ω loop en amarillo; los residuos 104 y 105 en violeta y el residuo 240 en naranja. La molécula símil ceftazidima se esquematiza con varillas con los átomos de carbono en gris, los de oxígeno en rojo y los de nitrógeno en azul. (Adaptado de [197]).



La estructura refinada consistió en un monómero por unidad asimétrica. El mapa de densidad electrónica estaba bien definido a lo largo de la cadena principal. El esquema de numeración de aminoácidos utilizado en esta estructura sigue el sistema de consenso propuesto por Ambler. La β -lactamasa madura posee 263 residuos de aminoácidos; el monómero obtenido incluyó 259 aminoácidos, desde Asp28 hasta Leu290. Es decir que sólo se observó el 98 % de los residuos totales de acuerdo a la secuencia aminoacídica de la proteína, estando ausentes los tres primeros de la cadena madura (Gln25-Thr26-Ala27). Además, la estructura se encontraba solvatada por 384 moléculas de agua ordenadas.

Tabla 4.15: Colección de datos, difracción y obtención de fases correspondientes al refinamiento de la estructura de CTX-M-96 en su forma apo.

Parámetro	Valor ^a
Cristal	CTX-M-96 apo
Código PDB	3ZNY
<u>Colección de datos:</u>	
Grupo espacial	P 21 21 21
Parámetros de la unidad de celda (Å)	a = 44,57 b = 45,59 c = 117,40 α = 90,00 β = 90,00 γ = 90,00
Mosaicidad	0,07
Subunidades / unidad asimétrica	1
Rango de resolución (Å)	45,59 – 1,20 (1,26 – 1,20)
Número de reflexiones únicas	75.509 (68.527) ^b
R _{merge} (%)	4,8 (29,2)
Multiplicidad	11,9 (7,4)
Compleitud (%)	98,8 (91,8)
I/σ(I)	28,1 (6,7)
<u>Refinamiento:</u>	
• Rango de resolución	42,5 – 1,20
• No. de átomos de la proteína	2.337
• No. de moléculas de agua	362
• R _{cryst} (%)	14,2
• R _{free} (%)	16,7
• RMSD ^c :	
• Longitud de enlace (Å)	0,008
• Ángulo de enlace (°)	1,366
• Grupos planares (Å)	0,008
• Restricciones de centros quirales (Å ³)	0,086
• Factor B promedio (todos los átomos) (Å ²)	13,78
<u>Ramachandran (resíduos en regions):</u>	
Favorables (%)	98,1
Permitidas (%)	1,9
Atípicas (outliers) (%)	0,0

^a Los datos entre paréntesis corresponden a las estadísticas para la “cáscara” de mayor resolución

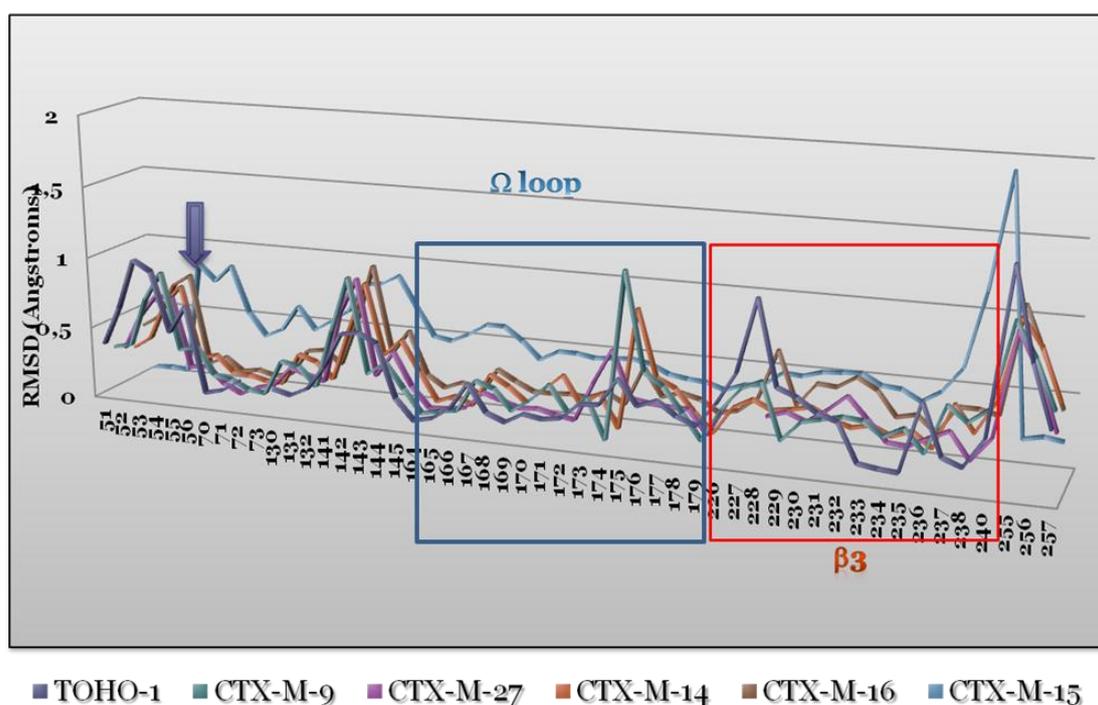
^b Reflexiones únicas por encima de 3σ

^c RMSD: *Root-mean square deviations* o desvíos cuadráticos medios

El plegamiento global de la β -lactamasa CTX-M-96 nativa fue similar al de otras CTX-M reportadas. Además, el bolsillo catalítico se encontraba localizado entre los dos principales dominios, el dominio “todo α ” y el dominio “ α/β ”, la característica estructural distintiva de todas las β -lactamasas de clase A estudiadas.

Se determinaron los valores de los desvíos cuadráticos medios (RMSD, *root mean square deviation*) para los átomos de C α de la cadena principal de CTX-M-96 comparados con otras β -lactamasas de clase A (**Figura 4.13**).

Figura 4.13: Desvíos cuadráticos medios (RMSD) en los motivos conservados y regiones específicas de CTX-M-96 comparada con otras variantes de CTX-M



Se puede apreciar en la **Figura 4.13** que las regiones correspondientes al Ω loop y la cadena β 3 presentaron los mayores valores de RMSD comparadas con el resto de la cadena aminoacídica, lo cual podría explicarse por la mayor flexibilidad en estas regiones, tal como ha sido reportado previamente por Ibuka, Chen y colaboradores [137, 205]. Por otro lado, también en consonancia con lo reportado en otras ocasiones para las β -lactamasas de clase A, las regiones que involucran motivos altamente conservados (SXXK, SDN y KTG) presentan valores de RMSD muy bajos, lo cual concuerda con el hecho de que son regiones de mucha estabilidad que participan en la conformación adecuada del sitio activo.

Si bien los valores de RMSD para el Ω loop de las CTX-M estuvieron entre los de mayor variabilidad, éstos fueron pequeños de todos modos. El mayor grado de conservación se observó al comparar CTX-M-15 con CTX-M-96, ambas agrupadas en el subgrupo filogenético 1/3. Estas observaciones podrían indicar que, aunque la familia CTX-M presenta en su totalidad un alto grado de conservación, podrían existir diferencias sutiles en el sitio activo de los distintos subgrupos que conlleven modificaciones individuales en el comportamiento cinético frente a algunos antibióticos.

Además, los valores de RMSD entre CTX-M-96 (y otras CTX-M) y TEM-1, una β -lactamasa de espectro ampliado, son mayores que entre las CTX-M (casi 0,4 Å). Este valor corresponde a las diferencias de tamaño existentes entre el sitio activo de las β -lactamasas de espectro ampliado y extendido. En el último caso, las enzimas poseen bolsillos catalíticos ensanchados, lo que permite que sustratos con sustituyentes más voluminosos puedan acomodarse de manera tal de interactuar con los residuos responsables de la catálisis y así poseer un espectro de hidrólisis extendido.

En el caso de las variantes de TEM y SHV con espectro de hidrólisis extendido, las sustituciones en posiciones clave como 238, 164 o 179 producen un ensanchamiento de la cavidad del sitio activo, consecuencia de las modificaciones conformacionales que se producen en el Ω loop y la cadena β 3. Como resultado, las moléculas de las cefalosporinas de espectro ampliado se acomodan más fácilmente, incluso ceftazidima.

Como se explicara en la introducción, CTX-M-96 es una β -lactamasa de clase A y, como tal, el sitio activo se ubica en la cavidad formada entre los dos dominios “todo α ” y α/β . Las paredes de la cavidad están formadas por cuatro regiones altamente conservadas (**Figura 4.14**):

- Motivo 1, formado por Ser70-Thr71-Ser72-Lys73, en el que Ser70 es la serina nucleofílica que “ataca” al antibiótico para la formación del complejo acilado.
- Motivo 2, Ser130-Asp131-Asn132, ubicado en el loop entre α 4 y α 5.
- Motivo 3, Lys234-Thr235-Gly236, ubicado en la cadena β 3.
- Ω loop, desde Arg164 hasta Asp179.

La estructura del sitio activo incluye los residuos de aminoácidos más importantes y las dos moléculas de agua catalíticas, el “agua oxianiónica” (AOA) y el “agua de desacidación” (AD). Todos ellos interactúan creando una red de puentes de hidrógeno que estabiliza el bolsillo catalítico (**Figura 4.15**).

Figura 4.14: Vista detallada de la estructura del sitio activo de CTX-M-96. El mapa de densidad electrónica $2F_0 - F_c$ contorneado a $1,5 \sigma$ se muestra en gris alrededor de los residuos de aminoácidos más importantes de la cavidad del sitio activo; las moléculas de agua “oxianiónica” y de “desacidación” se indican como esferas de color naranja (Wat77 y Wat135, respectivamente, de acuerdo a la numeración PDB). Todas las distancias están en Angstroms.

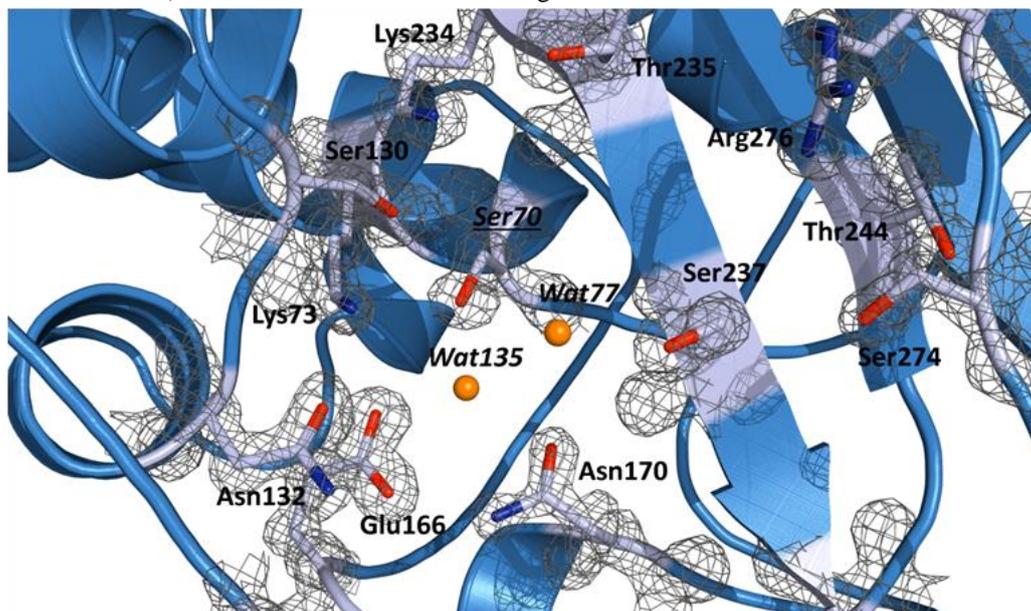
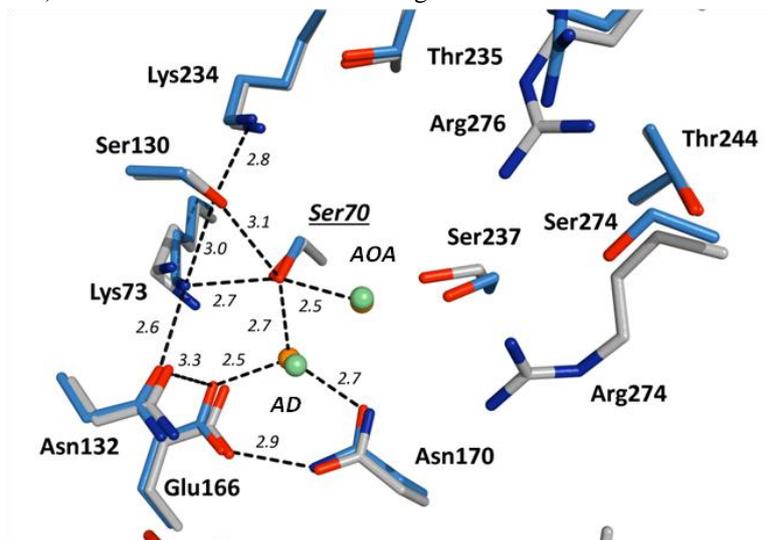
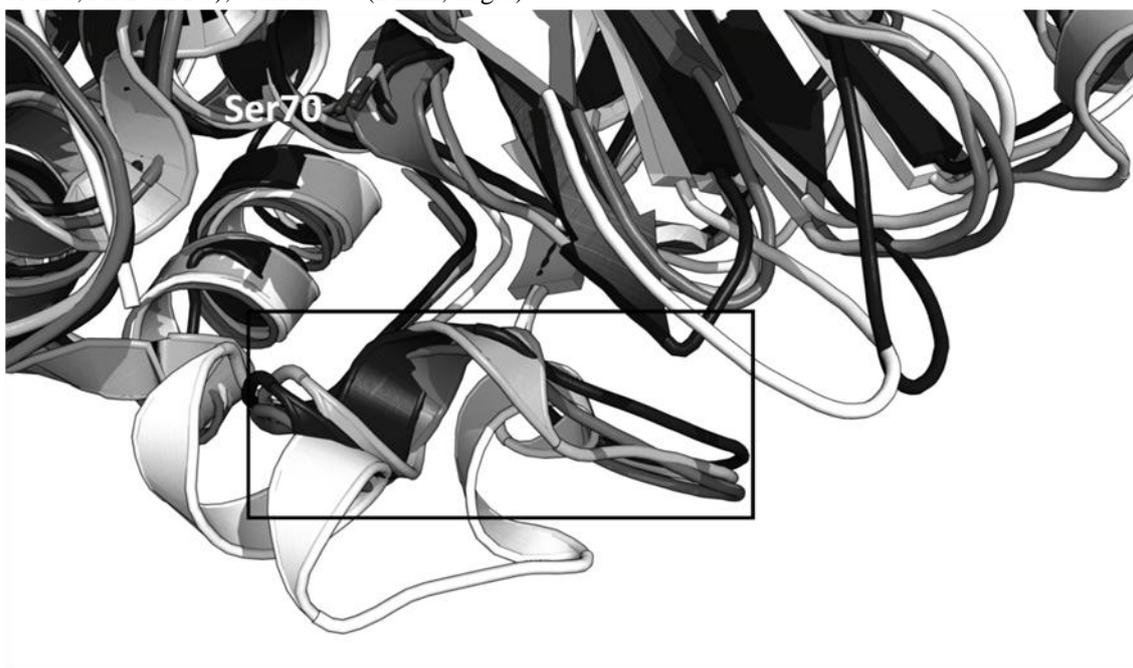


Figura 4.15: Comparación del sitio activo de CTX-M-96 (azul marino) y TOHO-1 (gris). En la figura se indican los principales puentes de hidrógeno (líneas negras punteadas) implicados en la estabilización del sitio activo de CTX-M-96, y las moléculas de agua “oxianiónica” (AOA) y de “desacidación” (AD) (en naranja para CTX-M-96 y en verde para TOHO-1). Oxígeno (rojo); nitrógeno (azul); azufre (verde). Todas las distancias están en Angstroms.



Llamativamente, cuando comparamos la cavidad del sitio activo de CTX-M-96 con el de las BLEE de tipo TEM y SHV, se aprecia que la amplitud parece estar reducida, debido al movimiento del Ω loop unos 0,6 a 2 Å hacia arriba (la distancia es variable dependiendo de la CTX-M) (**Figura 4.16**), lo cual también se observa en la β -lactamasa TOHO-1/CTX-M-44 (PDB: 1IYO). Es decir que, a expensas de la menor amplitud observada, el movimiento del Ω loop hacia la serina del sitio activo actuaría en combinación con otras modificaciones conformacionales para lograr que la arquitectura del sitio activo sea la adecuada para permitir que los sustratos de las oximinocefalosporinas se acomoden en su interior de manera tal que puedan ser hidrolizados con eficiencia.

Figura 4.16: Superposición estructural de diferentes β -lactamasas. Se destacan en el recuadro las diferencias en la amplitud del sitio activo, debido principalmente a modificaciones en el Ω loop. TEM-1 (BLEA, gris oscuro, PDB 1BTL); TEM-72, (BLEE, gris claro, PDB 3P98); PER-2 (BLEE, blanco, PDB 4D20); CTX-M-96 (BLEE, negro).



Del análisis de la estructura se pudo determinar que existe un puente de hidrógeno de 2,7-2,9 Å a la entrada del sitio activo, entre Asn170O y Asp/Gly240N, el cual está altamente conservado en otras β -lactamasas de clase A y que debería romperse para permitir el ingreso de las moléculas de cefotaxima y ceftazidima. Además, la presencia de la sustitución Asp240Gly en CTX-M-96 produce aparentemente un movimiento de 0,5 Å en el extremo C-terminal de la cadena β 3, ubicado en la vecindad de la sustitución.

3.2 Modelos de simulación: Interacción entre CTX-M-96 y oximino-cefalosporinas

Se analizaron modelos de simulación de la β -lactamasa en asociación con las oximino-cefalosporinas cefotaxima y ceftazidima, utilizando la estructura de CTX-M-96 obtenida en esta tesis como molde, y las estructuras aciladas con estos antibióticos de TOHO-1 depositadas en la base de datos del PDB para obtener las coordenadas iniciales de las moléculas de los antibióticos en sus formas enamínicas (hidrolizados y unidos a Ser70). Se intentó correlacionar los efectos fenotípicos observados en los clones recombinantes y el comportamiento cinético de CTX-M-96 con las características estructurales dilucidadas a partir del análisis de la estructura cristalográfica de la apoenzima.

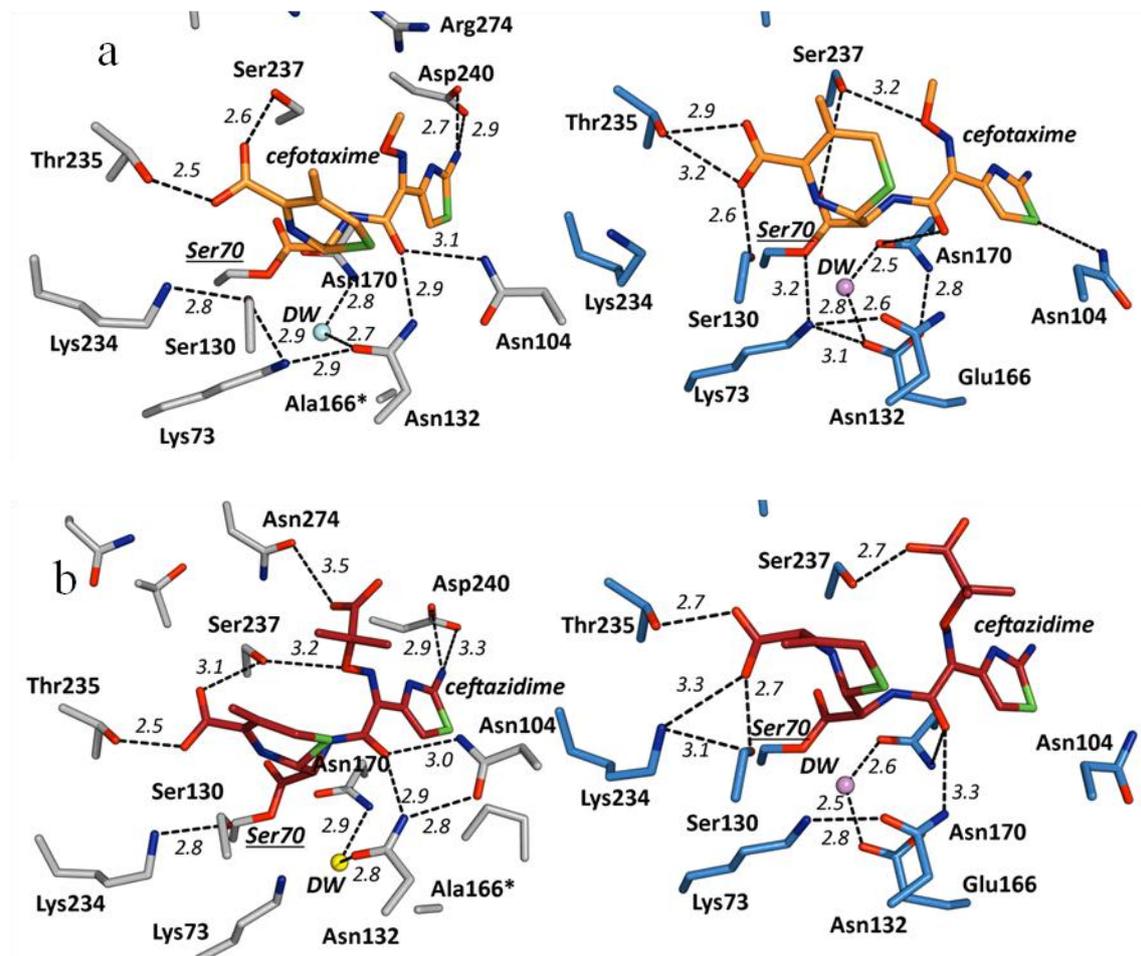
En la **Figura 4.17** se observan los modelos de CTX-M-96 con cefotaxima y ceftazidima, de cuyo análisis se determinó que la interacción de ambos antibióticos con CTX-M-96 es similar a la de TOHO-1. Con sendas β -lactamasas se forma una red de puentes de hidrógeno que involucra residuos importantes como Ser130, Lys234, Thr235 y Ser237, y otros como Asn104, Asn132 and Asn170.

A diferencia de la estructura de TOHO-1 acilada con cefotaxima y ceftazidima (PDB: 1IYO y 2ZQD), en CTX-M-96 ambas cefalosporinas parecen estar ligeramente rotadas dentro del sitio activo, debido a que ciertos aminoácidos y el agua de desacilación se ubican en posiciones ligeramente diferentes. Para el caso particular de la molécula de ceftazidima, el sustituyente voluminoso en C7, un grupo carboxi-propoxiimino, también podría orientarse dentro de la cavidad del sitio activo, aunque probablemente la entrada se produzca lentamente, lo cual se ve reflejado en los bajos valores de afinidad observados ($K_m > 1$ mM, **Tabla 4.12**). Esta característica es común tanto para las variantes salvajes de CTX-M como para las sustituidas con glicina en la posición 240.

También se pudo determinar, luego de la comparación con las estructuras de CTX-M-9 y CTX-M-14 en complejo con oximino-cefalosporinas (PDB: 3HLW, 1YLY y 1YLZ), que residuos como Asn132, Glu166, Pro167 y Asn170 en la estructura de CTX-M-96 en su forma apo parecen estar desviados hasta unos 0,7 Å hacia fuera del bolsillo catalítico, sugiriendo que la presencia del antibiótico podría inducir la aproximación de esos

residuos hacia la molécula de cefalosporina, a través de puentes de hidrógeno que estabilizan esa interacción, en concordancia con los modelos de CTX-M-96 obtenidos.

Figura 4.17: (a) Vista detallada del sitio activo de TOHO-1 en asociación con cefotaxima (panel izquierdo), indicando los puentes de hidrógeno principales (PDB 1IYO), y modelo de simulación de CTX-M-96 y el posicionamiento probable de cefotaxima dentro del sitio activo (panel derecho), en el que se indican los puentes de hidrógeno posiblemente más favorecidos para lograr la estabilización de la molécula de antibiótico; TOHO-1 contiene la mutación Glu166Ala, indicada con un asterisco. (b) Sitio activo de TOHO-1 en asociación con ceftazidima (panel izquierdo), indicando los puentes de hidrógeno principales (PDB 2ZQD), y modelo de simulación de CTX-M-96 mostrando el posicionamiento probable de ceftazidima. Oxígeno (rojo); nitrógeno (azul); azufre (verde), cefotaxima (naranja), ceftazidima (violeta). Todas las distancias están en Angstroms.



Finalmente, es posible también que el ingreso de las oximino-cefalosporinas al sitio activo involucre además la ruptura de un puente de hidrógeno entre los residuos 170-240, tal como fuera sugerido para CTX-M-9 en complejo con cefotaxima [174]; la distancia entre Asn170O y Gly240N en CTX-M-96 es más corta (2,9 Å) que la que

resulta de la acomodación de la cefalosporina dentro del sitio activo en variantes como CTX-M-9 y TOHO-1 (hasta 3,6 Å), de algún modo de acuerdo con esta hipótesis previa.

Estos hallazgos podrían estar relacionados con el fenómeno de “respiración” (*breathing*) propuesto para algunas CTX-Ms, o con una flexibilidad conformacional inducida por la unión del ligando, que podría estar favorecida por el reemplazo Asp240Gly [197]. De acuerdo con este modelo, la inserción del sustituyente lateral de ceftazidima profundamente en el dominio catalítico, junto con un movimiento coordinado de Ser70, la cadena β 3 y el Ω loop, facilitaría la interacción con el antibiótico.

Como resumen, esta enzima posee un sitio activo compacto y una eficiencia hidrolítica mejorada frente a ceftazidima, pero que continúa siendo muy baja comparada con cefotaxima. Las diferencias estructurales con otras CTX-M que no poseen la sustitución Asp240Gly son sutiles y llevarían a cambios leves en la conformación del sitio activo y la flexibilidad ya conocida en las regiones del Ω loop y la cadena β 3 de estas β -lactamasas. Dichas modificaciones estructurales correlacionan, de alguna manera, con las ligeras variaciones en la cinética de hidrólisis encontrada.

Conclusiones

Capítulo 5 - Conclusiones

- 1- *La presencia de la mutación Asp240Gly en β -lactamasas pertenecientes a la familia CTX-M no siempre se asocia a un fenotipo de resistencia a ceftazidima en cepas de E. coli productoras de estas variantes enzimáticas, aún en condiciones en las que el nivel de expresión es lo suficientemente elevado como para otorgar un perfil clásico de “cefotaximasa” al clon productor.*
- 2- *La expresión de las variantes Asp240Gly en clones recombinantes de E. coli sin otro mecanismo de resistencia acompañante no afecta de forma significativa el fenotipo de susceptibilidad frente a otros antibióticos β -lactámicos.*
- 3- *El cambio Asp240Gly en CTX-M y su asociación a un fenotipo claro de resistencia a ceftazidima se manifiesta sólo cuando los clones hiperproductores de esa variante enzimática son además deficientes en alguna de las porinas en la membrana externa. Los clones recombinantes carentes de OmpF presentan valores de CIM de ceftazidima equivalentes a los de cefotaxima, debido a que la entrada de ceftazidima a la bacteria se ve favorecida en mayor medida a través de esta porina con respecto a OmpC y OmpA.*
- 4- *El término que designa a estas variantes como “ceftazidimasas” debería ser reservado para enzimas que puedan hidrolizar ceftazidima de manera preferencial o con elevada eficiencia catalítica, tal y como sucede con el término “cefotaximasa” para las variantes CTX-M cuando se trata de cefotaxima. Aunque las β -lactamasas CTX-M_{Asp240Gly} tienen eficiencias catalíticas frente a ceftazidima entre 5 y 15 veces mayores que las de su contraparte salvaje, éstas continúan siendo por lo menos 200 veces más bajas que las de cefotaxima, lo que determina que sea conceptualmente incorrecto equiparar el claro comportamiento “cefotaximasa” con la capacidad de hidrólisis mejorada de ceftazidima de estas enzimas.*
- 5- *La mutación Asp240Gly actuaría como “modulador” de la actividad enzimática, ya que ejerce efectos sutiles en el comportamiento cinético de la*

enzima, pero puede sin embargo otorgar una gran ventaja selectiva a los microorganismos hiperproductores cuando se combina con impermeabilidad en el ambiente de selección adecuado.

- 6- Las variantes Asp240Gly, al igual que sus respectivas salvajes, poseen muy baja afinidad por ceftazidima (valores de K_m del orden milimolar). El parámetro cinético más afectado por la sustitución aminoacídica es k_{cat} , lo que resulta en la hidrólisis más eficiente del antibiótico. Al estar en el orden de la unidad del segundo recíproco (seg^{-1}), la hidrólisis es lo suficientemente rápida como para descartar la influencia del “atrapamiento enzimático” en el fenotipo de resistencia observado en los clones recombinantes carentes de OmpF.*
- 7- La sustitución Asp240Gly no provoca cambios drásticos en la estructura de la enzima. Los modelos de simulación de CTX-M-96 muestran que la interacción con cefotaxima y ceftazidima es similar a la de TOHO-1, una variante salvaje. Las β -lactamasas CTX-M podrían interactuar con las oximino-cefalosporinas, a pesar de poseer un sitio activo compacto, debido a la flexibilidad conformacional de su estructura: En CTX-M-96 (como en otras variantes Asp240Gly), ceftazidima puede acomodar el sustituyente voluminoso en C7 dentro de la cavidad del sitio activo debido al movimiento coordinado de Ser70, la cadena β_3 y el Ω -loop. La molécula de ceftazidima ingresaría lentamente al sitio activo (lo cual se ve reflejado en los altos valores de K_m de variantes salvajes y mutantes), pero una vez allí, la mayor flexibilidad conformacional de CTX-M_{Asp240Gly} facilitaría la hidrólisis enzimática, lo cual se vio reflejado en el mejoramiento de los valores de k_{cat} .*
- 8- Es altamente esperable que las variantes Asp240Gly continúen emergiendo en nuestro medio (como lo han hecho CTX-M-96 y CTX-M-131), en tanto se mantenga la doble selección en el ambiente hospitalario de cefotaxima (ceftriaxona)/ceftazidima. La sustitución de glicina en la posición 240 no afecta visiblemente la conformación de la enzima (ni su estabilidad en las condiciones ensayadas en este trabajo), lo que se traduce en eficiencias catalíticas conservadas frente a otros antibióticos β -lactámicos, como aminopenicilinas, cefalotina y cefotaxima. Como vimos, aunque el aumento en los*

valores de CIM de ceftazidima pueden no ser significativos en cepas productoras de estas variantes, la combinación con impermeabilidad otorga ventaja selectiva a estas cepas. En general, los aislamientos de origen clínico presentan su permeabilidad alterada e incluso cepas de este tipo pueden ser seleccionadas intratratamiento.

- 9- La evolución de la familia CTX-M, además de depender de la adquisición de mutaciones en la secuencia codificante de la β -lactamasa, también se asocia a la diversificación de los entornos genéticos responsables de la movilización de los genes bla_{CTX-M} . En este trabajo, describimos un entorno nuevo en el que *ISEcp1* se encuentra interrumpido por *IS903* y mantiene intacta su secuencia promotora. El gen $bla_{CTX-M-12}$, al igual que otros genes codificantes de variantes salvajes de CTX-M, circularía entre plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad gracias al mecanismo de transposición provisto por *ISEcp1*, desde donde, una vez adquirida la mutación *Asp240Gly*, tendría más posibilidades de ser seleccionada y movilizada.*

Referencias

Referencias

1. Davies, J. and D. Davies, *Origins and evolution of antibiotic resistance*. Microbiol Mol Biol Rev, 2010. 74(3): p. 417-33.
2. Paphitou, N.I., *Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges*. Int J Antimicrob Agents, 2013. 42 Suppl: p. S25-8.
3. Abraham, E.P. and E. Chain, *An enzyme from bacteria able to destroy penicillin*. Nature, 1940. 146: p. 837.
4. World Health Organization., *Antimicrobial resistance : global report on surveillance.(In IRIS)2014*, Geneva: World Health Organization. xxii, 232 p.
5. Galan, J.C., et al., *Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the beta-lactamases world*. Front Microbiol, 2013. 4: p. 9.
6. Levin, B.R., F. Baquero, and P.J. Johnsen, *A model-guided analysis and perspective on the evolution and epidemiology of antibiotic resistance and its future*. Curr Opin Microbiol, 2014. 19C: p. 83-89.
7. Andersson, D.I. and D. Hughes, *Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics*. Nat Rev Microbiol, 2014. 12(7): p. 465-78.
8. Baquero, F., T.M. Coque, and R. Canton, *Counteracting antibiotic resistance: breaking barriers among antibacterial strategies*. Expert Opin Ther Targets, 2014. 18(8): p. 851-61.
9. Rice, L.B., *Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE*. J Infect Dis, 2008. 197(8): p. 1079-81.
10. Boucher, H.W., et al., *Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2009. 48(1): p. 1-12.
11. Magiorakos, A.P., et al., *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clin Microbiol Infect, 2012. 18(3): p. 268-81.
12. Bush, K., *Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae*. Curr Opin Microbiol, 2010. 13(5): p. 558-64.
13. Martinez-Martinez, L. and J. Calvo, *[The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2010. 28 Suppl 2: p. 25-31.
14. Bush, K., *Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections*. Crit Care, 2010. 14(3): p. 224.
15. Bassetti, M., et al., *New antibiotics for bad bugs: where are we?* Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2013. 12: p. 22.
16. Livermore, D.M., *Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens*. Korean J Intern Med, 2012. 27(2): p. 128-42.
17. Woodford, N., J.F. Turton, and D.M. Livermore, *Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance*. FEMS Microbiol Rev, 2011. 35(5): p. 736-55.
18. Casellas, J.M., *[Antibacterial drug resistance in Latin America: consequences for infectious disease control]*. Rev Panam Salud Publica, 2011. 30(6): p. 519-28.
19. Pfeifer, Y., A. Cullik, and W. Witte, *Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens*. Int J Med Microbiol, 2010. 300(6): p. 371-9.
20. Tang, S.S., A. Apisarnthanarak, and L.Y. Hsu, *Mechanisms of beta-lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria*. Adv Drug Deliv Rev, 2014.

21. Cejas, D., *Prevalencia, Caracterización del Entorno Genético y Evolución in vitro de Genes ampC de Localización Plasmídica, en Enterobacteriaceae*, in *Microbiología, Inmunología y Biotecnología* 2014, Universidad de Buenos Aires: Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
22. Knothe, H., et al., *Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens*. *Infection*, 1983. 11(6): p. 315-7.
23. Philippon, A., R. Labia, and G.A. Jacoby, *Extended spectrum β -lactamases*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989. 33: p. 1131-1136.
24. Nordmann, P. and L. Poirel, *Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes*. *Clin Microbiol Infect*, 2002. 8(6): p. 321-31.
25. Nordmann, P., G. Cuzon, and T. Naas, *The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria*. *Lancet Infect Dis*, 2009. 9(4): p. 228-36.
26. Nordmann, P., T. Naas, and L. Poirel, *Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*, 2011. 17(10): p. 1791-8.
27. Canton, R., et al., *Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe*. *Clin Microbiol Infect*, 2012. 18(5): p. 413-31.
28. Suarez, C. and F. Gudiol, *[Beta-lactam antibiotics]*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2009. 27(2): p. 116-29.
29. Fleming, A., *On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 1929. 10: p. 226-236.
30. Levy, S.B., *The antibiotic paradox. How miracle drugs are destroying the miracle*. 1992, N.Y. and London: Plenum Press.
31. Burton, G., et al., *The β -lactam antibiotics.*, in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery.*, M.E. Wolff, Editor 1997, John Wiley & Sons, Inc.: Betchworth, Surrey, England. p. 277-363.
32. Prescott, L.M., J.P. Harley, and D.A. Klein, *Microbiología*. Cuarta ed, ed. L.M. Prescott, J.P. Harley, and D.A. Klein 1999, Madrid, España: McGraw-Hill - Interamericana.
33. Patrick R. Murray, K.S.R., Michael A. Pfäuer, *Medical Microbiology*. 5 ed 2005: Elsevier.
34. Scheffers, D.J. and M.G. Pinho, *Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005. 69(4): p. 585-607.
35. Barreteau, H., et al., *Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis*. *FEMS Microbiol Rev*, 2008. 32(2): p. 168-207.
36. Höltje, J.-V. and B. Glauner, *Structure and metabolism of the murein sacculus*. *Res. Microbiol.*, 1990. 141: p. 75-89.
37. *Essentials of Glycobiology, 2nd edition* 2009: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
38. Tipper, D.J. and J.L. Strominger, *Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1965. 54: p. 1133-1141.
39. Tomasz, A., *The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillin*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1979. 33: p. 113-137.
40. Ghuysen, J.M., *Serine β -lactamases and penicillin-binding-proteins*. *Annual Review of Microbiology*, 1991. 45: p. 37-67.
41. Frère, J.M., et al., *Mode of action: interaction with the penicillin-binding-proteins.*, in *The Chemistry of β -lactams*, M.I. Page, Editor 1992, Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall: Glasgow, U.K. p. 148-197.
42. Marin, M. and F. Gudiol, *[beta-Lactam antibiotics]*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2003. 21(1): p. 42-55.

43. Zaffiri, L., J. Gardner, and L.H. Toledo-Pereyra, *History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins*. *J Invest Surg*, 2012. 25(2): p. 67-77.
44. Rodriguez, M.M., "Evolución de los mecanismos de resistencia: origen de las beta-lactamasas CTX-M-derivadas", in *Microbiología, Inmunología y Biotecnología 2010*, Universidad de Buenos Aires: Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
45. Nikaido, H., *Porins and specific channels of bacterial outer membranes*. *Mol Microbiol*, 1992. 6(4): p. 435-42.
46. Nikaido, H., *Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes*. *J Biol Chem*, 1994. 269(6): p. 3905-8.
47. Fernandez, L. and R.E. Hancock, *Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance*. *Clin Microbiol Rev*, 2012. 25(4): p. 661-81.
48. Nikaido, H., *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003. 67(4): p. 593-656.
49. Livermore, D.M., *β -Lactamases in laboratory and clinical resistance*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1995. 8: p. 557-584.
50. Nikaido, H., *Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux*. *Science*, 1994. 264: p. 382-388.
51. Poole, K., *Multidrug resistance in Gram-negative bacteria*. *Curr Opin Microbiol*, 2001. 4(5): p. 500-8.
52. Alekshun, M.N. and S.B. Levy, *Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance*. *Cell*, 2007. 128(6): p. 1037-50.
53. Li, X.Z. and H. Nikaido, *Efflux-mediated drug resistance in bacteria*. *Drugs*, 2004. 64(2): p. 159-204.
54. Li, X.Z. and H. Nikaido, *Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update*. *Drugs*, 2009. 69(12): p. 1555-623.
55. Hakenbeck, R. and J. Coyette, *Resistant penicillin-binding proteins*. *Cell Mol. Life Sci.*, 1998. 54(4): p. 332-340.
56. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, *A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 1995. 39: p. 1211-1233.
57. Livermore, D.M., *Acquired carbapenemases*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1997. 39: p. 673-676.
58. Livermore, D.M. and N. Woodford, *Carbapenemases: a problem in waiting?* *Current Opinion in Microbiology*, 2000. 3: p. 489-495.
59. Philippon, A., et al., *Epidemiology of extended-spectrum β -lactamases*. *Infection*, 1989. 17: p. 347-354.
60. Livermore., D.M., *β -lactamases in laboratory and clinical resistance*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1995. 8: p. 557-584.
61. El Salabi, A., T.R. Walsh, and C. Chouchani, *Extended spectrum beta-lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria*. *Crit Rev Microbiol*, 2013. 39(2): p. 113-22.
62. Bradford, P.A., *Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat*. *Clin Microbiol Rev*, 2001. 14(4): p. 933-51.
63. Matagne, A., J. Lamotte-Brasseur, and J.-M. Frère, *Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity*. *Biochemical Journal*, 1998. 330: p. 581-598.
64. Palzkill, T., *Metallo-beta-lactamase structure and function*. *Ann N Y Acad Sci*, 2013. 1277: p. 91-104.
65. Rice, L.B., *Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to beta-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones*. *Mayo Clin Proc*, 2012. 87(2): p. 198-208.

66. Bush, K. and J.F. Fisher, *Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria*. *Annu Rev Microbiol*, 2011. 65: p. 455-78.
67. Bush, K., *Proliferation and significance of clinically relevant beta-lactamases*. *Ann N Y Acad Sci*, 2013. 1277: p. 84-90.
68. Hall, B.G. and M. Barlow, *Revised Ambler classification of {beta}-lactamases*. *J Antimicrob Chemother*, 2005. 55(6): p. 1050-1.
69. Bush, K., *Classification of β -lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989. 33(3): p. 264-270.
70. Bush, K., *Classification of β -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989. 33(3): p. 271-276.
71. Bush, K., Jacoby G. A., *Updated Functional Classification of β -Lactamases*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. 54(3): p. 969-976.
72. Bush, K., *The ABCD's of beta-lactamase nomenclature*. *J Infect Chemother*, 2013. 19(4): p. 549-59.
73. Paterson, D.L. and R.A. Bonomo, *Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update*. *Clin Microbiol Rev*, 2005. 18(4): p. 657-86.
74. Gutkind, G.O., et al., *beta-lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview*. *Curr Pharm Des*, 2013. 19(2): p. 164-208.
75. Falagas, M.E. and D.E. Karageorgopoulos, *Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms*. *J Hosp Infect*, 2009. 73(4): p. 345-54.
76. Rossolini, G.M., M.M. D'Andrea, and C. Mugnaioli, *The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases*. *Clin Microbiol Infect*, 2008. 14 Suppl 1: p. 33-41.
77. Bonnet, R., *Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48(1): p. 1-14.
78. Canton, R., J.M. Gonzalez-Alba, and J.C. Galan, *CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion*. *Front Microbiol*, 2012. 3: p. 110.
79. Canton, R. and T.M. Coque, *The CTX-M β -lactamase pandemic*. *Curr Opin Microbiol*, 2006. 9(5): p. 466-75.
80. Lahlaoui, H., A. Ben Haj Khalifa, and M. Ben Moussa, *Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum beta-lactamase (ESBL)*. *Med Mal Infect*, 2014. 44(9): p. 400-4.
81. D'Andrea, M.M., et al., *CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance*. *Int J Med Microbiol*, 2013. 303(6-7): p. 305-17.
82. Nagano, Y., et al., *Novel chimeric beta-lactamase CTX-M-64, a hybrid of CTX-M-15-like and CTX-M-14 beta-lactamases, found in a Shigella sonnei strain resistant to various oxyimino-cephalosporins, including ceftazidime*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. 53(1): p. 69-74.
83. He, D., et al., *CTX-M-123, a novel hybrid of the CTX-M-1 and CTX-M-9 Group beta-lactamases recovered from Escherichia coli isolates in China*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. 57(8): p. 4068-71.
84. Tian, G.B., et al., *CTX-M-137, a hybrid of CTX-M-14-like and CTX-M-15-like beta-lactamases identified in an Escherichia coli clinical isolate*. *J Antimicrob Chemother*, 2014. 69(8): p. 2081-5.
85. Fursova, N., et al., *The novel CTX-M-116 beta-lactamase gene discovered in Proteus mirabilis is composed of parts of the CTX-M-22 and CTX-M-23 genes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. 57(3): p. 1552-5.
86. Radice, M., et al., *Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. 46(2): p. 602-4.

87. Quinteros, M., et al., *Extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals*. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2003. 47(9): p. 2864-2869.
88. Sennati, S., et al., *Changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15*. Antimicrob Agents Chemother, 2012.
89. Farmer, J.J., 3rd, et al., *Kluyvera, a new (redefined) genus in the family Enterobacteriaceae: identification of Kluyvera ascorbata sp. nov. and Kluyvera cryocrescens sp. nov. in clinical specimens*. J Clin Microbiol, 1981. 13(5): p. 919-33.
90. Decousser, J.W., L. Poirel, and P. Nordmann, *Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from Kluyvera cryocrescens*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(12): p. 3595-8.
91. Rodriguez, M.M., *Novel chromosome encoded CTX-M-78 β -lactamase from a Kluyvera georgiana clinical isolate as a putative origin of CTX-M-25 subgroup*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. 54.
92. Rodriguez, M.M., et al., *Characterisation of KLUA-9, a beta-lactamase from extended-spectrum cephalosporin-susceptible Kluyvera ascorbata, and genetic organisation of bla(KLUA-9)*. Int J Antimicrob Agents, 2007. 29(3): p. 332-7.
93. Rodriguez, M.M., et al., *Chromosome-encoded CTX-M-3 from Kluyvera ascorbata: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. 48(12): p. 4895-7.
94. Barlow, M., et al., *High rate of mobilization for blaCTX-Ms*. Emerg Infect Dis, 2008. 14(3): p. 423-8.
95. Humeniuk, C., et al., *Beta-lactamases of Kluyvera ascorbata, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. 46(9): p. 3045-9.
96. Nordmann, P., M.F. Lartigue, and L. Poirel, *Beta-lactam induction of ISEcp1B-mediated mobilization of the naturally occurring bla(CTX-M) beta-lactamase gene of Kluyvera ascorbata*. FEMS Microbiol Lett, 2008. 288(2): p. 247-9.
97. Poirel, L., et al., *ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(1): p. 447-50.
98. Poirel, L., J.W. Decousser, and P. Nordmann, *Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. 47(9): p. 2938-45.
99. Quiroga, M.P., et al., *"Distribution and functional identification of complex class 1 integrons"*. Infect Genet Evol, 2013. 19: p. 88-96.
100. Poirel, L., R.A. Bonnin, and P. Nordmann, *Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative rods*. Infect Genet Evol, 2012. 12(5): p. 883-93.
101. Toleman, M.A. and T.R. Walsh, *Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria*. FEMS Microbiol Rev, 2011. 35(5): p. 912-35.
102. Partridge, S.R., *Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria*. FEMS Microbiol Rev, 2011. 35(5): p. 820-55.
103. Walsh, T.R., *Combinatorial genetic evolution of multiresistance*. Curr Opin Microbiol, 2006. 9(5): p. 476-82.
104. Di Conza, J.A. and G.O. Gutkind, *[Integrons: gene collectors]*. Rev Argent Microbiol, 2010. 42(1): p. 63-78.
105. Hall, R.M., *Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes*. Ann N Y Acad Sci, 2012. 1267: p. 71-8.
106. Cambray, G., A.M. Guerout, and D. Mazel, *Integrons*. Annu Rev Genet, 2010. 44: p. 141-66.

107. Toleman, M.A., P.M. Bennett, and T.R. Walsh, *ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?* Microbiol Mol Biol Rev, 2006. 70(2): p. 296-316.
108. Toleman, M.A., P.M. Bennett, and T.R. Walsh, *ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century?* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006. 70(2): p. 296-316.
109. Toleman, M.A., P.M. Bennett, and T.R. Walsh, *Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons.* J Antimicrob Chemother, 2006. 58(1): p. 1-6.
110. Partridge, S.R., et al., *Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins.* Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(4): p. 1263-70.
111. Stokes, H.W. and M.R. Gillings, *Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens.* FEMS Microbiol Rev, 2011. 35(5): p. 790-819.
112. Carattoli, A., *Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids.* Int J Med Microbiol, 2011. 301(8): p. 654-8.
113. Carattoli, A., *Plasmids and the spread of resistance.* Int J Med Microbiol, 2013. 303(6-7): p. 298-304.
114. Lartigue, M.F., et al., *In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene blaCTX-M of Kluyvera ascorbata.* Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(4): p. 1282-6.
115. Poirel, L., P. Kampfer, and P. Nordmann, *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, 2002. 46(12): p. 4038-40.
116. Olson, A.B., et al., *Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from Kluyvera georgiana isolated in Guyana.* Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(5): p. 2112-5.
117. Carattoli, A., *Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(6): p. 2227-38.
118. Power, P., et al., *Description of In116, the first blaCTX-M-2-containing complex class 1 integron found in Morganella morganii isolates from Buenos Aires, Argentina.* J Antimicrob Chemother, 2005. 55(4): p. 461-5.
119. Dhanji, H., et al., *Variation in the genetic environments of bla(CTX-M-15) in Escherichia coli from the faeces of travellers returning to the United Kingdom.* J Antimicrob Chemother. 66(5): p. 1005-12.
120. Bauernfeind, A., H. Grimm, and S. Schweighart, *A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli.* Infection, 1990. 18(5): p. 294-8.
121. Bauernfeind, A., et al., *Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases.* Antimicrob Agents Chemother, 1996. 40(2): p. 509-13.
122. Power, P., et al., *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., 2005. 55: p. 461-465.
123. Matsumoto, Y., et al., *Novel plasmid-mediated beta-lactamase from Escherichia coli that inactivates oxyimino-cephalosporins.* Antimicrob Agents Chemother, 1988. 32(8): p. 1243-6.
124. Sturenburg, E., et al., *A novel extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-23 with a P167T substitution in the active-site omega loop associated with ceftazidime resistance.* J Antimicrob Chemother, 2004. 54(2): p. 406-9.

125. Welsh, K.J., et al., *Experimental prediction of the evolution of ceftazidime resistance in the CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. 49(3): p. 1242-4.
126. Bae, I.K., et al., *A novel ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-54, with a single amino acid substitution at position 167 in the omega loop*. *J Antimicrob Chemother*, 2006. 58(2): p. 315-9.
127. Delmas, J., et al., *Prediction of the evolution of ceftazidime resistance in extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-9*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. 50(2): p. 731-8.
128. Kimura, S., et al., *Predictive analysis of ceftazidime hydrolysis in CTX-M-type beta-lactamase family members with a mutational substitution at position 167*. *Int J Antimicrob Agents*, 2007. 29(3): p. 326-31.
129. Celenza, G., et al., *Natural D240G Toho-1 mutant conferring resistance to ceftazidime: biochemical characterization of CTX-M-43*. *J Antimicrob Chemother*, 2008. 62(5): p. 991-7.
130. Livermore, D.M., et al., *CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe*. *J Antimicrob Chemother*, 2007. 59(2): p. 165-74.
131. Gniadkowski, M., et al., *Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(4): p. 827-32.
132. Baraniak, A., et al., *Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland*. *J Antimicrob Chemother*, 2002. 50(3): p. 393-6.
133. Bartoloni, A., et al., *Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in Escherichia coli: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America*. *Clin Microbiol Infect*, 2013. 19(4): p. 356-61.
134. Power, P., et al., *Cefotaxime-hydrolysing beta lactamases in Morganella morganii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1999. 18(10): p. 743-7.
135. Matagne, A. and J.M. Frere, *Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: the case of class A beta-lactamases*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. 1246(2): p. 109-27.
136. Ibuka, A.S., et al., *Crystal structure of extended-spectrum beta-lactamase Toho-1: insights into the molecular mechanism for catalytic reaction and substrate specificity expansion*. *Biochemistry*, 2003. 42(36): p. 10634-43.
137. Chen, Y., et al., *Atomic resolution structures of CTX-M beta-lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability*. *J Mol Biol*, 2005. 348(2): p. 349-62.
138. Perez-Llarena, F.J., et al., *Distant and new mutations in CTX-M-1 beta-lactamase affect cefotaxime hydrolysis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. 55(9): p. 4361-8.
139. Adamski, C.J., et al., *Molecular Basis for the Catalytic Specificity of the CTX-M Extended-Spectrum beta-Lactamases*. *Biochemistry*, 2015. 54(2): p. 447-57.
140. Gazouli, M., N.J. Legakis, and L.S. Tzouveleki, *Effect of substitution of Asn for Arg-276 in the cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase CTX-M-4*. *FEMS Microbiol Lett*, 1998. 169(2): p. 289-93.
141. Perez-Llarena, F.J., et al., *Structure-function studies of arginine at position 276 in CTX-M beta-lactamases*. *J Antimicrob Chemother*, 2008. 61(4): p. 792-7.
142. Gazouli, M., et al., *Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(5): p. 1259-62.

143. Tzouveleakis, L.S., et al., *CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes*. *Int J Antimicrob Agents*, 2000. 14(2): p. 137-42.
144. Perez-Llarena, F.J., et al., *Distant and new mutations in CTX-M-1 beta-lactamase affect cefotaxime hydrolysis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(9): p. 4361-8.
145. Ripoll, A., et al., *In vitro selection of variants resistant to beta-lactams plus beta-lactamase inhibitors in CTX-M beta-lactamases: predicting the in vivo scenario?* *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. 55(10): p. 4530-6.
146. Novais, A., *Evolutionary trajectories of β -lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: Predicting antibiotic resistance*. *Plos pathogens*, 2010. 6(1).
147. Aumeran, C., et al., *Effects of Ser130Gly and Asp240Lys substitutions in extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-9*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. 47(9): p. 2958-61.
148. Nikaido, H., W. Liu, and E.Y. Rosenberg, *Outer membrane permeability and beta-lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methoxyimino substituents*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990. 34(2): p. 337-42.
149. Villegas, M.V., et al., *CTX-M-12 beta-lactamase in a Klebsiella pneumoniae clinical isolate in Colombia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48(2): p. 629-31.
150. Rodriguez, M.M., et al. *A Chromosome-Encoded beta-Lactamase from Kluyvera cryocrescens may be the Origin of the Plasmid-Borne CTX-M-37*. in *45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. Washington, DC, USA.
151. Kado, C. and S.T. Liu, *Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids*. *J. Bacteriol.*, 1981. 145: p. 1365-1373.
152. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed 1989, Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
153. Barton, B.M., G.P. Harding, and A.J. Zuccarelli, *A general method for detecting and sizing large plasmids*. *Anal Biochem*, 1995. 226(2): p. 235-40.
154. Versalovic, J., T. Koeuth, and J.R. Lupski, *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes*. *Nucleic Acids Res*, 1991. 19(24): p. 6823-31.
155. Carattoli, A., et al., *Identification of plasmids by PCR-based replicon typing*. *J Microbiol Methods*, 2005. 63(3): p. 219-28.
156. Labia, R.e.B., M., *L'Enzymogramme des Betalactamases: Adaptation en gel de la methode iodometrique*. *Ann. Microbiol.*, 1979. 130B(3): p. 295-304.
157. Novick, R.P., *Microiodometric assay of penicillinase*. *Biochem. J.*, 1962. 83: p. 236-240.
158. Dropa, M., et al., *Molecular and biochemical characterization of CTX-M-131, a natural Asp240Gly variant derived from CTX-M-2, produced by a Providencia rettgeri clinical strain in Sao Paulo, Brazil*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015.
159. Córscico, B.F.L.L.J.F., Gisela R.; Scaglia, Natalia, *Análisis estructural y funcional de Macromoléculas*. 1ra ed 2013. 411.
160. Kabsch, W., *Xds*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010. 66(Pt 2): p. 125-32.
161. Kabsch, W., *Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010. 66(Pt 2): p. 133-44.
162. Murshudov, G.N., A.A. Vagin, and E.J. Dodson, *Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1997. 53(Pt 3): p. 240-55.
163. Painter, J. and E.A. Merritt, *Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2006. 62(Pt 4): p. 439-50.
164. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004. 60(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.

165. L, S., *The PyMOL Molecular Graphics System*, 2011.
166. Krieger, E., et al., *Making optimal use of empirical energy functions: force-field parameterization in crystal space*. *Proteins*, 2004. 57(4): p. 678-683.
167. Krieger, E., et al., *Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8*. *Proteins*, 2009. 77: p. 114-122.
168. Novais, A., et al., *Mutational events in cefotaximase extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. 52(7): p. 2377-82.
169. Boyd, D.A., et al., *Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48(10): p. 3758-64.
170. Cartelle, M., et al., *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*, 2004. 48(6): p. 2308-13.
171. Coque, T.M., et al., *Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15*. *Emerg Infect Dis*, 2008. 14(2): p. 195-200.
172. Pitout, J.D., et al., *Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community*. *J Antimicrob Chemother*, 2005. 56(1): p. 52-9.
173. Bontron, S., L. Poirel, and P. Nordmann, *In Vitro Prediction of the Evolution of the GES-1 beta-Lactamase Hydrolytic Activity*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015.
174. Delmas, J., et al., *Structural insights into substrate recognition and product expulsion in CTX-M enzymes*. *J. Mol. Biol.*, 2010. 400(1): p. 108-120.
175. Araque, M., et al., *CTX-M-32 beta-lactamase-producing uropathogenic Escherichia coli isolated in Latin America*. *J Infect Dev Ctries*, 2013. 7(5): p. 432-5.
176. Mahendran, K.R., et al., *Permeation of antibiotics through Escherichia coli OmpF and OmpC porins: screening for influx on a single-molecule level*. *J Biomol Screen*, 2010. 15(3): p. 302-7.
177. Pages, J.M., C.E. James, and M. Winterhalter, *The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria*. *Nat Rev Microbiol*, 2008. 6(12): p. 893-903.
178. Girlich, D., L. Poirel, and P. Nordmann, *Do CTX-M beta-lactamases hydrolyse ertapenem?* *J Antimicrob Chemother*, 2008. 62(5): p. 1155-6.
179. Girlich, D., L. Poirel, and P. Nordmann, *CTX-M expression and selection of ertapenem resistance in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. 53(2): p. 832-4.
180. Ishii, Y., et al., *Biochemical characterisation of the CTX-M-14 beta-lactamase*. *Int J Antimicrob Agents*, 2007. 29(2): p. 159-64.
181. Livermore, D.M., et al., *Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly?* *J Antimicrob Chemother*, 2012. 67(7): p. 1569-77.
182. Woodford, N., et al., *Community and hospital spread of Escherichia coli producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK*. *J Antimicrob Chemother*, 2004. 54(4): p. 735-43.
183. Nastro, M., et al., *[Resistance to extended-spectrum cephalosporins in non-inducible AmpC enterobacteria: evaluation of the new MIC breakpoints]*. *Rev Argent Microbiol*, 2012. 44(1): p. 30-5.

184. Kang, C.I., et al., *Extended-spectrum cephalosporins and the inoculum effect in tests with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli: potential clinical implications of the revised CLSI interpretive criteria*. Int J Antimicrob Agents, 2014. 43(5): p. 456-9.
185. Kristo, I., et al., *Susceptibility patterns to extended-spectrum cephalosporins among Enterobacteriaceae harbouring extended-spectrum beta-lactamases using the updated Clinical and Laboratory Standards Institute interpretive criteria*. Int J Antimicrob Agents, 2013. 41(4): p. 383-7.
186. Villa, L., et al., *Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants*. J Antimicrob Chemother, 2010. 65(12): p. 2518-29.
187. Bae, I.K., et al., *Emergence of CTX-M-12 extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in Korea*. J Antimicrob Chemother, 2006. 58(6): p. 1257-9.
188. Lartigue, M.-F., L. Poirel, and P. Nordmann, *Diversity of genetic environment of bla_{CTX-M} genes*. FEMS Microbiology Letters, 2004. 234: p. 201-207.
189. Naseer, U., et al., *Multi-locus variable number of tandem repeat analysis for rapid and accurate typing of virulent multidrug resistant Escherichia coli clones*. PLoS One, 2012. 7(7): p. e41232.
190. Novais, A., et al., *Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: predicting antibiotic resistance*. PLoS Pathog, 2010. 6(1): p. e1000735.
191. Baraniak, A., et al., *Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. 46(1): p. 151-9.
192. Rodríguez, M.M., et al. *Molecular and evolutionary aspects of β -lactamases from Kluyvera: the Pandora's box of the oxyimino-cephalosporins resistance*. in 10th β -Lactamase Meeting. 2008. Eretria, Greece.
193. Cuzon, G., et al., *In vivo selection of imipenem-resistant Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and plasmid-encoded DHA-1 cephalosporinase*. Int J Antimicrob Agents, 2010. 35(3): p. 265-8.
194. Munday, C.J., et al., *Molecular and kinetic comparison of the novel extended-spectrum beta-lactamases CTX-M-25 and CTX-M-26*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. 48(12): p. 4829-34.
195. Vervoort, J., et al., *Characterization of two new CTX-M-25-group extended-spectrum beta-lactamase variants identified in Escherichia coli isolates from Israel*. PLoS One, 2012. 7(9): p. e46329.
196. Gutkind, G.O., et al., *β -Lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview*. Curr. Pharm. Des., 2013. 19(2): p. 164-208.
197. Delmas, J., et al., *Structure and dynamics of CTX-M enzymes reveal insights into substrate accommodation by extended-spectrum beta-lactamases*. J Mol Biol, 2008. 375(1): p. 192-201.
198. Frere, J.M., et al., *Diversity of the mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics*. Res Microbiol, 1991. 142(6): p. 705-10.
199. Goessens, W.H., et al., *Antibiotic trapping by plasmid-encoded CMY-2 beta-lactamase combined with reduced outer membrane permeability as a mechanism of carbapenem resistance in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. 57(8): p. 3941-9.
200. Mammeri, H., et al., *Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. 54(11): p. 4556-60.
201. Queenan, A.M., et al., *Hydrolysis and inhibition profiles of beta-lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. 54(1): p. 565-9.

-
202. Livermore, D.M., *'Covalent trapping' and latamoxef resistance in beta-lactamase-derepressed Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 1987. 20(1): p. 7-13.
 203. Antunes, N.T., et al., *Resistance to the third-generation cephalosporin ceftazidime by a deacylation-deficient mutant of the TEM beta-lactamase by the uncommon covalent-trapping mechanism*. *Biochemistry*. 50(29): p. 6387-95.
 204. Kimura, S., et al., *Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in ceftazidime hydrolysis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48(5): p. 1454-60.
 205. Ibuka, A., et al., *Crystal structure of the E166A mutant of extended-spectrum β -lactamase Toho-1 at 1.8 Å resolution*. *Journal of Molecular Biology*, 1999. 285(5): p. 2079-2087.

Anexos

Anexo A: Medios de cultivo, soluciones stock y reactivos

A.1 Medios de cultivo

Infusión Cerebro Corazón (BHI): Medio de cultivo de uso general. Preparado según recomendaciones del proveedor (*Difco*).

Tripteína Soja Agar o Caldo (TSA o TSB): Medio de cultivo de uso general. Preparado según recomendaciones del proveedor (*Britania*).

Mueller Hinton Agar o Caldo (MHA o MHB): Medio de cultivo para ensayos de susceptibilidad a antibióticos. Preparado según recomendaciones del fabricante (*Britania*).

Luria Bertani (LB): Medio de cultivo utilizado para extracción de ADN, purificación de proteínas y ensayos de inducción. *Composición:* Triptona (*Difco*), 8 g; Extracto de levadura (*Merck*), 5 g; NaCl, 2,5 g; Agua destilada c.s.p. 1 litro. Ajustar el pH a 7,0 con NaOH. Para obtener **LBA** agregar agar-agar (*Difco*) en una concentración final de 1,5%.

A.2 Buffers y soluciones

A.2.1 Soluciones stock para detectar clones con α -complementación

Solución stock 40 mg/ml X-Gal: Se disuelven 400 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (*X-Gal*, *Boehringer, Alemania*) en 10 ml de N,N-dimetil formamida (DMF). Conservar a -20°C y al abrigo de la luz.

Solución stock 100mM IPTG: Disolver 238 mg de isopropil-1-tio- β -D-galactósido (*IPTG*, *Sigma Chemical Co., EE. UU.*) en 10 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración y conservar a -20°C .

A.2.2 Soluciones stock para preparar geles de proteínas

Acrilamida / Bisacrilamida: Se mezclaron 29,2g de acrilamida y 0,8g de N,N'-metilen-bisacrilamida en un volumen de unos 70 ml de agua destilada. Luego de agitar 15 min, se llevó el volumen a 100ml, se filtró y conservó a 4°C al abrigo de la luz.

Buffer de apilamiento (*stacking*), Tris-HCl / SDS 4X, pH 6,8: la solución final es 0,5M Tris, 0,4% SDS. Disolver 6,05g de Tris base (Sigma) en 40ml de agua; ajustar el pH a 6,8 con HCl; agregar 0,4g de SDS (Sigma) y completar a 100ml con agua destilada. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 min y conservar a 4°C.

Buffer de separación (*running*), Tris-HCl / SDS 4X, pH 8,8: solución stock 1,5M Tris, 0,4% SDS. Disolver 91g Tris base en 300 ml de agua; ajustar pH a 8,8 con HCl; agregar 2g de SDS, completar el volumen a 500ml con agua. Esterilizar como el anterior, conservar a 4°C.

Persulfato de amonio (APS) 10%: pesar 1g de la droga, disolver en agua y fraccionar de a 1ml en tubos eppendorf. Conservar a -20°C.

Buffer electrodo 10X: Tris-Glicina-SDS; disolver 60g de Tris base y 288g de glicina en 800 ml de agua; agregar 10g SDS y llevar a 1 litro con agua. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 min y conservar a 4°C. El buffer se utiliza diluido 1/10 en agua destilada (1X).

Buffer muestra 4X: La solución es 0,25M Tris-HCl, pH 6,8; 8% SDS, 20% β -mercapto-etanol, 0,008% azul de bromofenol y 50% glicerol. Se conserva alicuotada a -20°C.

Solución colorante y fijadora de Coomassie blue R-250: disolver 4g de *Coomassie brilliant blue R-250* (Bio-Rad) en 950ml de metanol; agregar luego 800ml de agua destilada y 200ml de ácido acético glacial; filtrar y conservar a temperatura ambiente.

Solución decolorante: mezclar 950ml de metanol, 800ml de agua y 200ml de ácido acético glacial. Conservar a temperatura ambiente.

Agar Almidón Iodo (AAI): Medio soporte para la detección de actividad de β -lactamasa y revelado de geles de IEF y SDS-PAGE, luego de agregar antibióticos adecuados. *Composición:* Agar-agar (*Difco*), 1,5 g; Almidón (*Difco*), 0,5 g; buffer de

fosfatos 10 mM, pH 7,0 c.s.p. 100 ml. Esterilizar por calor húmedo a 121°C durante 15-20 minutos. Termostatar a 42°C y agregar: Solución I₂/KI, 1-2 ml (por 100 ml de medio); Antibiótico c.s.p. concentración final adecuada.

Solución de I₂/KI: disolver 55 g de KI (Merck) y 2 g de I₂ (Merck) en 100 de agua. Guardar en frasco color caramelo o al abrigo de la luz.

A.2.3 Buffers y soluciones varias

Buffer de fosfatos (sodio): Pesar 69g de NaH₂PO₄·H₂O (Merck) y 70,98g de Na₂HPO₄ (Mallinckrodt) y disolver en 1litro de agua destilada para obtener las soluciones madre de 0,5M de cada una; para obtener 50 ml de una solución madre de 0,5 M, pH 7,0, se mezclaron: NaH₂PO₄·H₂O 0,5 M, 19,5 ml; Na₂HPO₄ 0,5 M, 30,5 ml. Las diluciones para obtener la solución de molaridad deseada se realizaron con agua destilada estéril o MilliQ.

Buffer PBS: Pesar 27g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,15g de Na₂HPO₄ y 0,2g de KH₂PO₄. Agregar 900 ml de agudestilada, llevar a pH 7,2 con NaOH y completar el volumen a 1000 ml con agua destilada.

Solución stock de nitrocefín: se disuelven 5,55 mg de nitrocefín (Oxoid, UK) en 1 ml de *dimetil-sulfóxido* (DMSO), obteniéndose una solución madre de 10 mM. Las diluciones pueden realizarse en buffer de fosfatos 10 mM, pH 7,0 o buffer HEPES 10 mM, pH 7,0. Todas las soluciones son estables por unos 6 meses a -20°C.

Buffer TE: solución adecuada para mantener ADN en suspensión. *Composición:* Tris (Sigma, USA), 10 mM; EDTA (Merck), 1 mM; pH 8,0.

Buffer TAE 50X: buffer utilizado, en concentración 1X, para la preparación de geles de agarosa y electroforesis para la separación de fragmentos de ADN. *Composición:* disolver 242g de Tris base (Sigma) y 37,2g EDTA·Na₂·2H₂O (Merck) en 57,1ml de ácido acético glacial y 800ml de agua destilada; llevar a pH 8,5 y completar a 1 litro con agua destilada.

Solución Stock de Bromuro de etidio: pesar 50mg (con barbijo y guantes) y disolver en 100ml de agua destilada. Para descartar el bromuro de etidio, primero hay que inactivarlo de la siguiente manera: llevar a una concentración menor de 0,5mg/ml; agregar 1 volumen de KMnO₄ 0,5M y mezclar, luego 1 volumen de HCl 2,5M y volver

a mezclar; dejar varias horas a temperatura ambiente; neutralizar con 1 volumen de NaOH 2,5N y descartar haciendo correr abundante agua.

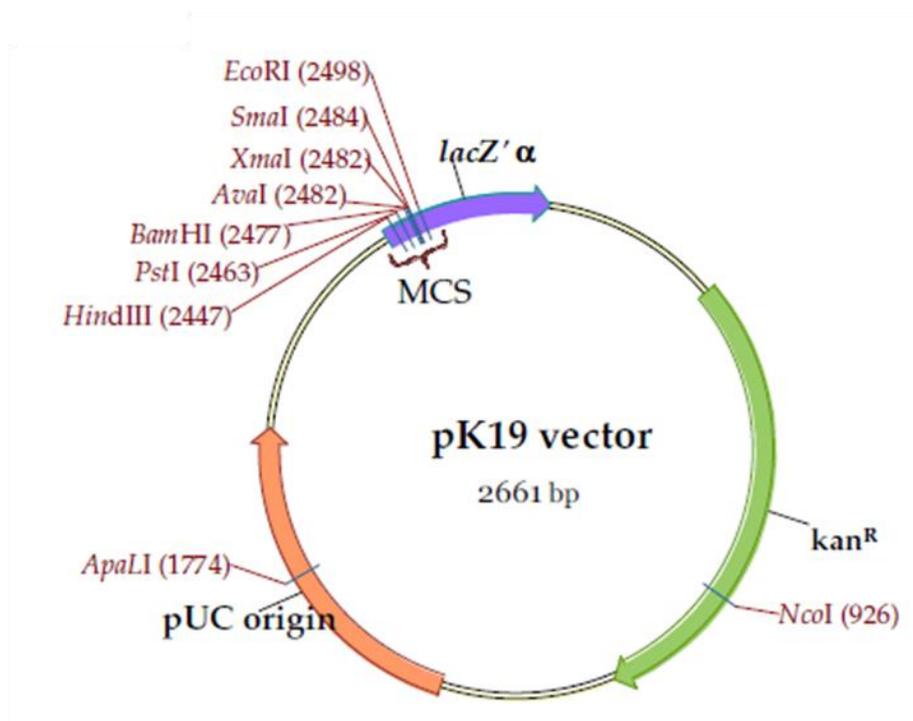
A.3 Otros Reactivos

REACTIVOS	PROVEEDOR
ampicilina polvo	Laboratorios Klonal
azida Sódica	Mallinckrodt
kanamicina líquida	BRISTOL-MYERS SQUIBB
cefalotina polvo	Laboratorios Klonal
cefepime polvo	Laboratorios Klonal
cefotaxima polvo	Laboratorios Klonal
cefoxitina polvo	Laboratorios Klonal
ceftazidima polvo	Laboratorios Klonal
bencil-penicilina polvo	Laboratorios Klonal
piperacilina polvo	Laboratorios Klonal
cefuroxima polvo	Laboratorios Klonal
aztreonam polvo	BRISTOL-MYERS SQUIBB
imipenem polvo	Dr. Moreno Galleni, CIP, Liège, Bélgica
Tazobactam polvo	Dr. Moreno Galleni, CIP, Liège, Bélgica
Clavulanato de Potasio líquido	Fluka
Nitrocefín	Dr. Moreno Galleni, CIP, Liège, Bélgica
discos con amoxicilina/ac. clavulánico (30 µg /10 µg)	Laboratorios Britania S.A.
discos con ceftazidima/ac. clavulánico (30 µg /10 µg)	Laboratorios Britania S.A.
discos con cefotaxima/ac. clavulánico (30 µg /10 µg)	Laboratorios Britania S.A.
discos conteniendo ampicilina (10 µg)	Laboratorios Britania S.A.
discos conteniendo cefalotina (30 µg)	Laboratorios Britania S.A.
discos conteniendo cefepime (30 µg)	Laboratorios Britania S.A.
discos conteniendo cefotaxima (30 µg)	Laboratorios Britania S.A.
discos conteniendo cefoxitina (30 µg)	Laboratorios Britania S.A.
discos conteniendo ceftazidima (30 µg)	Laboratorios Britania S.A.
discos conteniendo imipenem (10 µg)	Laboratorios Britania S.A.

Anexo B: Vectores utilizados

B.1 pK19

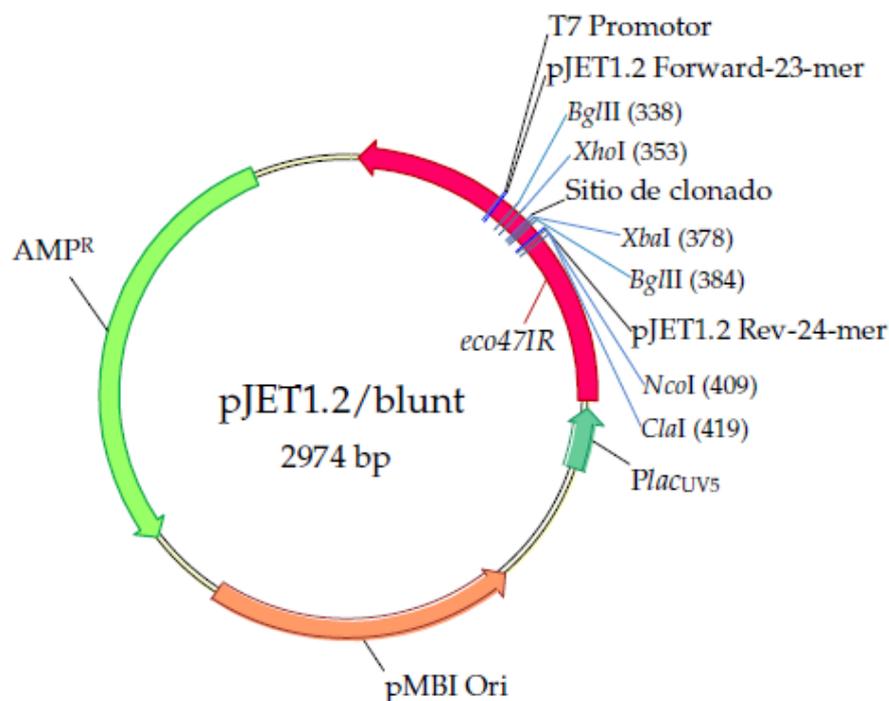
Tamaño	2661 bp
Replicón	pMB1
Marcador de selección	Kanamicina – CDS: 365-1159
Otros marcadores importantes	lacZ α - CDS: 2836-395 (compl.)
Promotor	lacZ' α - CDS: 2429-52
Sitio de clonado múltiple (MCS)	AvaI; BamHI; EcoRI; HindIII; PstI; SmaI; XmaI
Propiedades	Alto número de copias
Referencia	Pridmore, R.D., New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. <i>Gene</i> , 1987. 56(2-3): p. 309-12.



El vector contiene una región codificante de resistencia a kanamicina (kan^R) y de la β-galactosidasa (*lacZ'α*). Dentro de *lacZ'α* se encuentra el *polylinker* o sitio de clonado múltiple (MCS). En el esquema se observa el origen de replicación pUC y los principales sitios de corte para endonucleasa de restricción.

B.2 pJET1.2

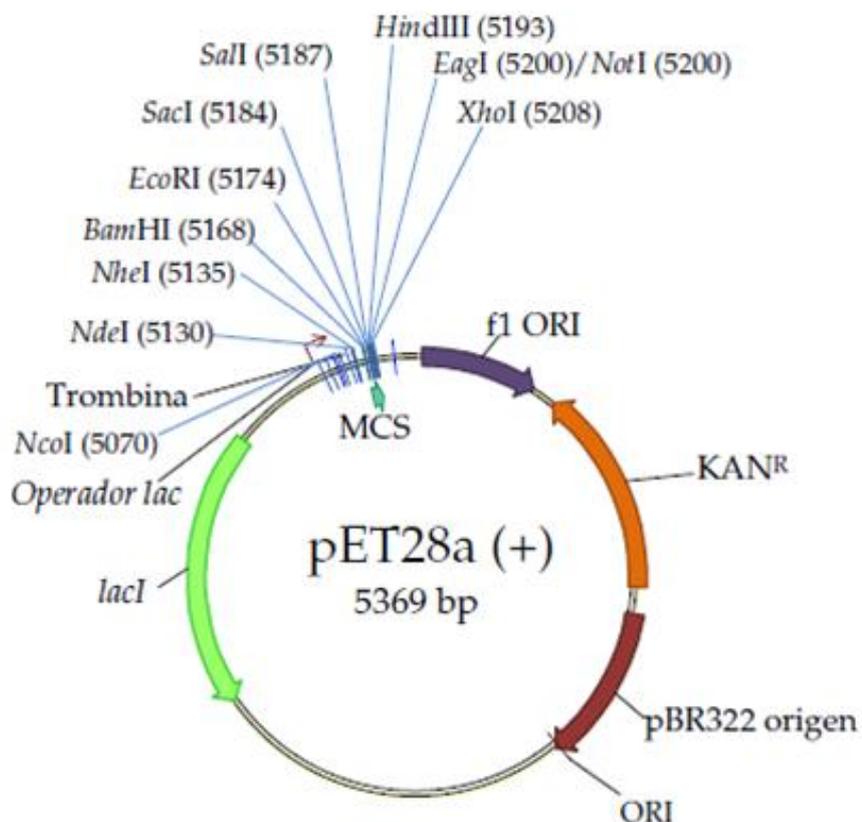
Tamaño	2974 bp
Replicón	pMBI CDS : 1148-1762
Marcador de selección	Ampicilina – CDS: 1922-2782
Otros marcadores importantes	<i>Gen eco47IR</i> : gen letal para asegurar la selección positiva de recombinantes – CDS: 16-753
Promotor	P_{lacUV5} : $Plac$ modificado para la expresión del gen <i>eco47IR</i> PT7 (Promotor T7)
Sitio de clonado múltiple (MCS)	<i>Bgl</i> II; <i>Not</i> I; <i>Psp</i> XI; <i>Xba</i> I; <i>Xho</i> I
Propiedades	Permite clonar productos de PCR con extremos romos
Referencia	Kit comercial <i>CloneJet™ PCR Cloning Kit</i> <i>Thermoscientific</i>



El vector contiene un gen que codifica una enzima de restricción letal, cuyo marco de lectura se interrumpe al momento de insertar (ligar) el ADN a clonar en el sitio de clonado. De esta manera, sólo las bacterias (clones) que posean el plásmido recombinante serán capaces de desarrollar colonias. Si el vector no liga el producto de PCR, se re-circulariza y expresa la enzima de restricción letal matando a las células de *E. coli* luego de la transformación. Esta selección positiva acelera el proceso de búsqueda de células transformantes portadoras de la construcción deseada, eliminando el uso costoso de selección por X-GAL e IPTG (selección colonia azul/blanca).

B.3 pET28a(+)

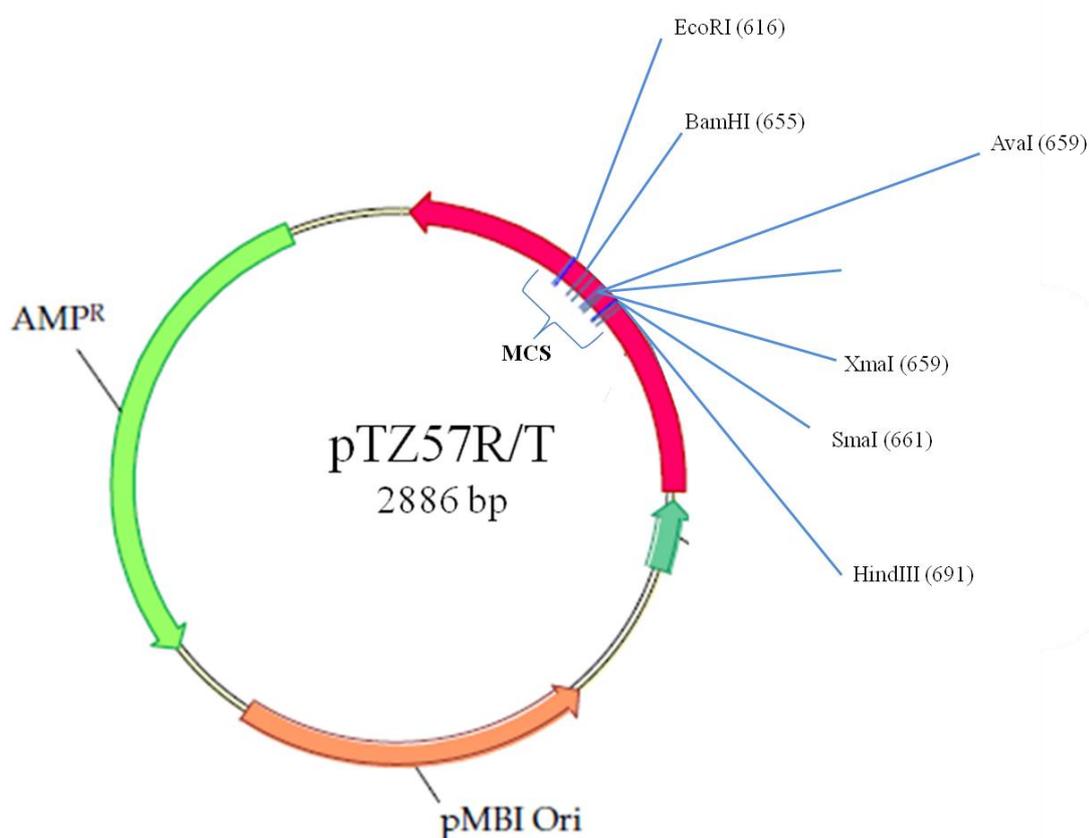
Tamaño	5369 bp
Replicón	pBR322 CDS: 1481-2100 ; f1 CDC: 12-467
Marcador de selección	Kanamicina – CDS: 560-1375
Promotor	PT7 (Promotor T7)
Sitio de clonado múltiple (MCS)	<i>Bam</i> HI; <i>Eco</i> RI; <i>Hind</i> III; <i>Kpn</i> I; <i>Nco</i> I; <i>Nde</i> I; <i>Nhe</i> I; <i>Pst</i> I; <i>Sac</i> I
Propiedades	<i>poli His tag</i> – N terminal: CDC: 5083-5100 Opcional: C terminal <i>His tag</i> CDC: 5213-5230
Referencia	http://www.novagen.com



El vector provee de un excelente sistema para la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor del Fago T7. Utiliza como agente inductor IPTG y permite agregar una cola de seis histidinas en el extremo amino terminal (Nt) de la proteína recombinante, extraíble mediante digestión con trombina. También permite agregar una cola de poli-histidinas en el extremo carboxilo terminal (Ct), aunque ésta no puede eliminarse.

B.4 pTZ57R/T

Tamaño	2886 bp
Replicón	pMB1 CDS: 1122-1736
Marcador de selección	Ampicilina (bla AMP ^R) – CDS: 1896-2756
Promotor	PT7 (Promotor T7)
Sitio de clonado múltiple (MCS)	<i>Bam</i> HI; <i>Eco</i> RI; <i>Hind</i> III; <i>Kpn</i> I; <i>Sma</i> I; <i>Sac</i> I; <i>Xba</i> I
Propiedades	Vector linealizado con extremos ddT para clonado directo de productos de PCR amplificados con <i>Taq</i> polimerasa
Referencia	Kit comercial <i>insTACloning Kit</i> <i>Thermoscientific</i>



Es un vector de clonado de alta eficiencia de ligación de productos de PCR. Al estar linealizado y poseer extremos de T, no puede recircularizarse, lo que resulta en altos rendimientos de ligación. Utiliza el sistema de α -complementación (colonias blancas/azules) para la selección de los clones que incorporaron el inserto deseado.

Anexo C: Protocolos experimentales

C.1 Técnicas de clonado molecular

C.1.1 Clonado de *bla*CTX-M en pK19

1. Se obtuvo ADN total mediante lisis de colonias de cepas de origen clínico productoras de enzimas de tipo CTX-M.
2. Se amplificaron directamente o se generaron mutantes puntuales Asp240Gly de *bla*_{CTX-M} por PCR utilizando cebadores específicos y *Pfu* polimerasa.
3. Los fragmentos resultantes de las reacciones de PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 1,5% y purificados con el kit *GeneJET Gel Extraction Kit (Thermoscientific)*.
4. A los productos de PCR purificados se les agregó una extensión de poli-adeninas en el extremo 3' para facilitar la ligación con el vector pTZ57R/T, según la siguiente reacción:

Reacción de poli-adenilación	
Reactivo	Cantidad (μl)
Fragmento de PCR purificado	6
Buffer 10X	1
Cl ₂ Mg (25 mM)	2
dATP (4 mM)	0,8
<i>Taq</i> DNA polimerasa (<i>Thermo Scientific</i>)	0,20
Incubar a 72°C durante 20 minutos	

5. Los productos de PCR purificados y poli-adenilados se ligaron en el vector pTZ57R/T provisto por el kit *InsTAClone PCR cloning kit (Thermo Scientific)*, según la siguiente reacción:

Reacción de ligación	
Reactivo	Cantidad (μl)
Vector pTZ57R/T	3
Buffer 5X	6
Fragmento de PCR purificado + poli-A	variable
Agua MilliQ	c.s.p. 29
T4 DNA ligasa (<i>Thermo Scientific</i>)	1
Incubar <i>overnight</i> (ON) a 4°C y luego 2 hs a 22°C	

6. 2,5 μ l de la reacción de ligación fueron introducidos por transformación en células competentes de *E. coli* XL1BLUE.
7. La selección de las colonias recombinantes fue realizada en placas de LBA suplementadas con IPTG 30 μ M (isopropil-1-tio- β -D-galactósido, *Sigma Chemical Co.*, EE. UU.), 80 μ g/ml de X-Gal (*Boehringer, Germany*) y ampicilina (100 μ g/ml).
8. Se extrajeron los plásmidos de los transformantes obtenidos en el paso anterior utilizando el kit comercial *GeneJet Plasmid Mini Prep (ThermoScientific)* y los mismos se secuenciaron para controlar si el inserto presentaba la secuencia deseada.
9. Los plásmidos extraídos y secuenciados en el paso anterior fueron utilizados como molde para amplificar los genes *bla_{CTX-M}* con *Pfu DNA polymerase (Promega)*, se purificaron con el kit *GeneJET Gel Extraction Kit (Thermoscientific)*, se fosforilaron con *T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK, Thermo Scientific)* y se ligaron en el vector pK19 digerido con *SmaI (Thermo Scientific)* y defosforilado con *Fosfatasa Alcalina (Promega)*. A continuación se detallan las mezclas de reacción:

Reacción de digestión	
Reactivo	Cantidad (μ l)
pK19	10
Buffer Tango 10X	5
Agua MilliQ	c.s.p. 50
SmaI 10U/ μ l	2
Incubar a 30°C durante 3 horas	

Reacción de defosforilación	
Reactivo	Cantidad (μ l)
pK19	30
Buffer 10X	5
Agua MilliQ	c.s.p. 50
Fosfatasa Alcalina	5
Incubar a 55°C durante 30 minutos	

Reacción de fosforilación	
Reactivo	Cantidad (μ l)
Fragmento de PCR purificado	15
Buffer 10X (con ATP)	2
T4 PNK	1
Agua MilliQ	2
Incubar a 37°C durante 1 hora	

10. Los plásmidos recombinantes pK-CTX-M se utilizaron para transformar *E. coli* DH5 α , *E. coli* K12 y sus derivadas carentes de porinas Omp. Los transformantes obtenidos fueron seleccionados en placas de TSA conteniendo 30 μ g/ml de kanamicina.

Reacción de ligación	
Reactivo	Cantidad (μl)
Fragmento de PCR fosforilado	15
pK19 digerido y defosforilado	2
Buffer 10X	2
T4 DNA ligasa (<i>Thermo Scientific</i>)	1
Incubar <i>overnight</i> (ON) a 4°C y luego 2 hs a 22°C	

C.1.2 Clonado de *bla*_{CTX-M} en pET28a(+) con cola de histidinas

Para la construcción de plásmidos productores de CTX-M utilizando pET28a(+) como vector de expresión, se construyeron previamente plásmidos de clonado pTZ57R/T conteniendo los genes *bla*_{CTX-M} modificados por PCR de manera tal de incorporar sitios de corte para endonucleasas de restricción (ER), siguiendo los pasos detallados en el protocolo descrito anteriormente. Luego, se subclonaron los genes *bla*_{CTX-M} en el vector de expresión pET28a(+):

1. Se realizó la extracción de ADN plasmídico de los clones recombinantes portadores de los genes *bla*_{CTX-M} modificados por PCR con cebadores que incluían sitios de reconocimiento de ER, clonados en pTZ57R/T (llamados **pFMT*bla*_{CTX-M}ht** en la sección Materiales y Métodos), con el kit comercial *GeneJet Plasmid Mini Prep* (*ThermoScientific*). Por otro lado, se extrajo pET28a(+) a partir de la cepa de *E. coli* XL1BLUE donde es mantenido, utilizando el mismo kit.
2. Se realizó la doble digestión de los plásmidos pFMT*bla*_{CTX-M}ht y de pET28a(+) de forma simultánea cuando fue posible, o de manera secuencial cuando la actividad enzimática en el buffer de reacción de una de las enzimas era nula o baja en el buffer de la otra.
3. Los fragmentos resultantes de cada digestión de pFMT*bla*_{CTX-M}ht y pET28a(+) fueron purificados desde geles de agarosa al 1,5% con el kit *GeneJET Gel Extraction Kit* (*Thermoscientific*).
4. Se realizó la ligación entre los fragmentos de *bla*_{CTX-M} liberados desde el ADN plasmídico pFMT*bla*_{CTX-M}ht y el vector digerido.
5. La construcción obtenida luego de la ligación se introdujo por transformación en células competentes de *E. coli* XL1BLUE.
6. Finalmente se realizó la selección de las colonias recombinantes en placas de LBA suplementadas con kanamicina (30 μg/ml).

A continuación se detallan las mezclas de reacción empleadas para la ligación, la digestión con ER y sus características:

Reacción de digestión	
Reactivo	Cantidad (μ l)
DNA plasmídico	10
Buffer TANGO 10X	cantidad necesaria para lograr cc 1X ó 2X según ER
ER (10U/ μ l)	2
Agua MilliQ	c.s.p. 20
Incubar 5 horas a 37°C	

Enzima de restricción	Sitio de corte	T° de reacción	Buffer TANGO (cc final en mezcla de reacción)	Proveedor
<i>NheI</i>	5'...G_CTAGC...3' 3'...CGATC_G...5'	37°C	1X	<i>Thermo Scientific</i>
<i>EcoRI</i>	5'...G_AATTC...3' 3'...CTTAA_G...5'	37°C	2X	<i>Thermo Scientific</i>
<i>NdeI</i>	5'...CA_TATG...3' 3'...GTAT_AC...5'	37°C	2X	<i>Thermo Scientific</i>
<i>HindIII</i>	5'...A_AGCTT...3' 3'...TTCGA_A...5'	37°C	1X	<i>Thermo Scientific</i>

Reacción de ligación	
Reactivo	Cantidad (μ l)
<i>bla</i> _{CTX-Mht} liberado por digestión y purificado	15
peT28a(+) digerido y purificado	2
Buffer 10X	2
T4 DNA ligasa (<i>Thermo Scientific</i>)	1
Incubar <i>overnight</i> (ON) a 4°C y luego 2 hs a 22°C	

C.1.3 Clonado de bla_{CTX-M-96} en pET28a(+) sin modificaciones adicionales

1. Se obtuvo ADN total mediante lisis de colonias de Kpn 293235, cepa de origen clínico productora de CTX-M-96.
2. Se amplificó *bla*_{CTX-M} por PCR utilizando cebadores específicos que incluían sitios de reconocimiento de ER y *Pfu* polimerasa.

3. El producto de PCR fue resuelto en gel de agarosa al 1,5% y purificado con el kit *GeneJET Gel Extraction Kit (Thermoscientific)*.
4. El producto de PCR purificado se ligó en el vector pJET1.2 provisto por el *kit CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific)*, que permite el clonado de productos de PCR con extremos romos, según la siguiente reacción:

Reacción de ligación	
Reactivo	Cantidad (µl)
Vector pJET1.2 (50 ng/µl)	1
Buffer 2X	10
Fragmento de PCR purificado con extremos romos	4
Agua MilliQ	c.s.p. 19
T4 DNA ligasa (<i>Thermo Scientific</i>)	1
Incubar <i>overnight</i> (ON) a 4°C y luego 2 hs a 22°C	

5. 2,5 µl de la reacción de ligación fueron introducidos por transformación en células competentes de *E. coli* XL1BLUE.
6. La selección de las colonias recombinantes fue realizada en placas de LBA suplementadas con ampicilina (100 µg/ml).
7. Se extrajo el plásmido pJET96 de los transformantes obtenidos en el paso anterior utilizando el kit comercial *GeneJet Plasmid Mini Prep (ThermoScientific)* y se secuenció para controlar si el inserto presentaba la secuencia deseada.
8. Se realizó la extracción de ADN plasmídico con el kit comercial *GeneJet Plasmid Mini Prep (ThermoScientific)*. Por otro lado, se extrajo pET28a(+) a partir de la cepa de *E. coli* XL1BLUE donde es mantenido, utilizando el mismo kit.
9. Se realizó la doble digestión de los plásmidos pJET96 y pET28a(+) de forma simultánea con las ER *NcoI* y *HindIII*, como se describió anteriormente en C 1.2.
10. El fragmento liberado de pJET96 por un lado y pET28a(+) digerido en el paso anterior por otro, fueron purificados desde geles de agarosa al 1,5% con el kit *GeneJET Gel Extraction Kit (Thermoscientific)*.
11. Se realizó la ligación entre ambos como se describió en C 1.2.
12. La construcción obtenida luego de la ligación, pET96II, se introdujo por transformación en células competentes de *E. coli* XL1BLUE.

13. Finalmente se realizó la selección de las colonias recombinantes en placas de LBA suplementadas con kanamicina (30 µg/ml).

A continuación se indican las características de las ER empleadas en esta sección:

Enzima de restricción	Sitio de corte	T° de reacción	Buffer TANGO (cc final en mezcla de reacción)	Proveedor
<i>NcoI</i>	5'...C_CATGG...3' 3'...GGTAC_C...5'	37°C	1X	<i>Thermo Scientific</i>
<i>HindIII</i>	5'...A_AGCTT...3' 3'...TTCGA_A...5'	37°C	1X	<i>Thermo Scientific</i>

C.2 Determinación del tamaño molecular de los plásmidos portadores de *bla*_{CTX-M-12} y *bla*_{CTX-M-96}

Lisis celular de los *plugs* de agarosa:

1. Remover cuidadosamente los *plugs* del molde con un asa descartable y colocarlos en tubos de 15 ml conteniendo 1 ml de buffer de lisis. Incubar ON a 37°C.
2. Reemplazar el buffer de Lisis por buffer ES-P. Incubar los *plugs* 24 hs a 50°C.

Lavados de los *plugs* de agarosa:

3. Lavar los *plugs* con buffer TE 1X para eliminar la *proteínasa K*. Realizar este procedimiento al menos 5 veces, dejando actuar cada lavado al menos 30 minutos. Los *plugs* se pueden conservar a 4°C hasta 3-4 meses.

Equilibrado y digestión de *plugs* con S1 nucleasa:

4. Equilibrar los *plugs* con 300 µl del buffer de reacción de S1 1X. Incubar a T° ambiente durante 2-3 horas.
5. Añadir 10 U/µl de S1 nucleasa e incubar durante 18 hs a la T° recomendada por el proveedor.
6. Colocar los *plugs* dentro del gel de corrida (agarosa al 1,2% preparada con buffer TE).

Buffer de lisis pH 7,6	
Composición	Preparación
1M TRIS pH 7.6 1 M ClNa 100 mM EDTA pH 7.6 0,2% Deoxicolato-Na 0,5% Laurilsarcosinato-Na 0,5% Brij-58	100 ml de TRIS 5 M pH 8.0 29,2 gr ClNa 100 ml de EDTA. 0,5 M pH 8.0 1 gr Deoxicolato-Na 2,5 gr Laurilsarcosinato-Na 2,5 gr Brij-58
Agregar agua destilada csp 500 ml. Esterilizar con calor húmedo 20 minutos a 121°C. Agregar 1 mg/ml de <i>Lisozima</i> pH 7.6 y 50 µg/ml de <i>Ribonucleasa A</i> al momento de uso.	
Buffer ES-P (Buffer ES + <i>Proteinasa K</i>)	
Composición	Preparación
0,4M EDTA 1% Laurilsarcosinato-Na	74,45 gr EDTA 5 gr Laurilsarcosinato-Na
Pesar el EDTA y disolver en 400 ml de agua destilada. Ajustar a pH 9.0 agregando lentejas de NaOH. Agregar 5 gr de laurilsarcosina-Na. Ajustar a volumen a 500 ml con agua destilada. Esterilizar con calor húmedo 20 minutos a 121°C. La <i>Proteinasa K</i> se agrega al momento de uso en una cc final de 0,5 mg/ml	

Solución Stock de TRIS 5 M pH 7.6

Pesar 181,2 gr de TRIS y agregar 200 ml de agua destilada. Ajustar a pH 8.0 con HCl concentrado. Completar hasta volumen final de 300 ml con agua destilada.

Solución Stock de EDTA 0.5 M pH 7.6

Pesar 186,1 gr de EDTA (sal disodica, PM: 372,24), agregar 800 ml agua destilada. Mezclar y ajustar a pH 8.0 con aproximadamente 20 gr de lentejas de NaOH. Ajustar el volumen a 1 l con agua destilada. Esterilizar con calor húmedo 20 minutos a 121°C.

C.3 Tipificación molecular de plásmidos según Carattoli y colaboradores

El esquema de clasificación por PCR propuesto por Carattoli y colaboradores [155] incluye 18 pares de cebadores para la amplificación específica de los replicones FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, y FIIA. Este esquema incluye 5 ensayos de PCR múltiple para la amplificación de 3 replicones cada uno y 3 ensayos de PCR simple para la amplificación de los grupos F, K y B/O. Las condiciones

utilizadas para todas las amplificaciones excepto la correspondiente al ensayo de PCR para el replicón F fueron: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, *annealing* a 60°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 1 minuto, seguidos de un paso final de extensión de 5 minutos a 72°C. Las condiciones del ensayo de PCR simple para la amplificación de F fueron equivalentes a las anteriores pero usando una temperatura de *annealing* de 52°C.

A continuación se indican los cebadores empleados y sus respectivas secuencias:

Nombre	Secuencia	Tamaño del Producto de PCR bp	Reacción
HI1 FW HI1RV	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471	Multiplex 1
HI2 FW HI2 RV	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC GGCTCACTACCGTTGTCACTCT	644	
II FW II RV	CGAAAGCCGGACGGCAGAA TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	139	
X FW X RV	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	376	Multiplex 2
L/M FW L/M RV	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785	
N FW N RV	GTCTAACGAGCTTACCGAAG GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	
FIA FW FIA RV	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462	Multiplex 3
FIB FW FIB RV	GGAGTTCGACACACGATTTTCTG CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	762	
W FW W RV	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG GGTGC CGGCATAGAACCGT	242	
Y FW Y RV	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT	765	Multiplex 4
P FW P RV	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534	
FIC FW FIC RV	GTGAACCTGGCAGATGAGGAAGG TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	262	
A/C FW A/C RV	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465	Multiplex 5
T FW T RV	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750	
FIIS FW FIIS RV	CTGTCGTAAGCTGATGGC CTCTGCCACAAACTTCAGC	270	
FrepB FW FrepB Rv	TGATCGTTTAAGGAATTTTG GAAGATCAGTCACACCATCC	270	Simple 1
K/B FW K RV	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC TCTTTCACGAGCCCCGCAAA	160	Simple 2
K/B FW B/O RV	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC CTGCGTTCGCCAAGTTCGA	159	Simple 3

C.4 Cinética de β -lactamasas

Para la determinación de los principales parámetros cinéticos de β -lactamasas se trabaja en condiciones de *steady state*, donde la formación de los intermediarios enzimáticos se mantiene estable. Para ello, la concentración de sustrato se mantiene prácticamente constante en relación a la de producto de hidrólisis.

Para lograr experimentalmente una aproximación al “*steady state*”, es necesario realizar las siguientes consideraciones:

1. La concentración de sustrato es varios órdenes de magnitud mayores a las de enzima: $[S] \gg [E]$. De este modo, la enzima siempre cuenta con sustrato disponible, y se mantiene al mínimo la cantidad de producto de hidrólisis.
2. La V_0 de una reacción se determinará dentro de los primeros 30-60 seg de reacción, o bien cuando la cantidad de producto de hidrólisis obtenido no supere el 5-20% de la concentración inicial puesta en la cubeta (despreciable).
3. La concentración de enzima en la cubeta no debería superar el 5% en relación al volumen de reacción.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se procede de la siguiente manera:

- Ensayar la actividad de 10-20 μl de una dilución de la enzima (1/10, 1/20, 1/50, etc., de acuerdo a la concentración y AE), frente a una solución de ATB 100 μM .
- Determinar la V_0 a la λ adecuada y de acuerdo a la actividad observada considerar al ATB como una de las siguientes categorías, y proseguir como se indica:

Buenos sustratos: la actividad observada (V_0) es elevada, y la absorbancia inicial es “medible” (no es cercana a cero).

1. Realizar una serie de diluciones, abarcando un rango que debería estar entre los siguientes valores: $0.4 < K_m < 4$. Si no se conoce aproximadamente el valor de K_m , comenzar con una dilución 100 μM , y continuar hacia abajo y hacia arriba, hasta que obtengamos valores de absorbancia medibles. Se deben ensayar no menos de 6 o 7 diluciones por triplicado o, al menos, por duplicado.
2. Determinar la V_0 para cada dilución de ATB, frente a la cantidad de enzima puesta a punto anteriormente.
3. Tratamiento de datos y cálculo de k_{cat} y k_{cat}/K_M :

- a. Graficar V_0 en función de la concentración de sustrato. Esta es la curva de Michaelis-Menten, cuya ecuación es:

$$v = V_{\max} \cdot S / K_M + S$$

- b. Si se cuenta con un software apropiado (GraphPad Prism es una buena opción), podrá calcularse la constante K_M y V_{\max} . Otra posibilidad es realizar un tratamiento de los datos para obtener alguna función lineal, como:

Hanes-Woolf: es la que se utilizó en este trabajo, por su mayor rango lineal. Se grafica S/V_0 en función de S . Su ecuación es:

$$S/V_0 = K_M/V_{\max} + S/V_{\max}$$

- c. Para calcular la k_{cat} (número de recambio enzimático), primero hay que determinar la cantidad de enzima presente en la cubeta (en molar) utilizada en las reacciones, considerando además el grado estimado de pureza.
- i. Calcular $[E_0]$ en unidades de M.
 - ii. V_{\max} : ya determinada antes.
 - iii. En condiciones de *steady state*, $V_{\max} \cong k_{cat} \times [E_0]$. Las unidades son entonces seg^{-1} .
- d. Determinar k_{cat}/K_M (eficiencia hidrolítica), y k_{cat}/K_M relativa.

Sustratos pobres: suelen presentar valores de k_{cat} muy bajos, y la actividad observada (V_0) es baja, y la absorbancia inicial puede ser a veces cercana a cero. Además, sustratos con K_M muy bajas ($<20 \mu\text{M}$) deben ser analizados de la misma manera.

Se realizarán ensayos de competencia frente a un sustrato *reporter*, y las K_M “aparentes” serán determinadas como K_i (constante de inhibición competitiva).

1. Fijar una concentración de sustrato a utilizar como “*reporter*”, que generalmente es nitrocefin o cefalotina $100 \mu\text{M}$. Calcular la V_0 dentro de 2-3 min de reacción, siguiendo las mismas consideraciones que para buenos sustratos.

-
2. Realizar 5-7 diluciones del antibiótico a ensayar como inhibidor competitivo, abarcando un rango tal que se observe tanto inhibición completa (V_0 despreciable) como ausencia de inhibición (V_0 igual al control).
 3. Determinar la V_0 (como V_i) para cada dilución de ATB, frente a la cantidad de enzima puesta a punto anteriormente.
 4. Tratamiento de datos y cálculo de k_{cat} y k_{cat}/K_M :
 - a. Graficar V_0/V_i en función de la concentración de sustrato. La pendiente obtenida será: $m = (K_M / K_M + S) \times 1/K_i$; donde K_M : constante de afinidad del sustrato *reporter*; S: concentración utilizada de sustrato *reporter* (100 μM); K_i : K_M aparente a despejar.
 - b. Para calcular k_{cat} , determinar la V_0 a partir de una reacción de hidrólisis completa de una concentración fija de antibiótico de al menos 5X-10X K_M aparente calculada anteriormente, suponiendo que en estas condiciones ($S \gg K_M$) la V_0 obtenida será $\cong V_{m\acute{a}x}$.
 - c. Calcular k_{cat} y k_{cat}/K_M como antes.

Anexo D Entornos genéticos *bla*_{CTX-M-12} y *bla*_{CTX-M-96}

D.1 Entorno genético *bla*_{CTX-M-96}

> 1 a 826 *ISEcp1 incomplete cds*

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium, plasmid incHI2, complete sequence.

Sequence ID: [emb|LN794248.1](#) Length: 300375 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 273010 to 273835

Score	Expect	Identities	Gaps
1526 bits (826)	0.0	826/826 (100%)	0/825 (0%)

(...) [gacctgatttgataatgactcaacaaataaaatcaagatgaatcatataaagaccatgctctgcggtcacttcattggcat](#)
[tgataagttagaacgtctaaagctacttcaaaatgatcccctgcgaacgagttgatattccgtaaaagaacctgaaacagtg](#)
[cacggtttctagaaactcaactcaagacaacccaaatgttagagacattaattttaagctcttaaaaaactgctactaaaa](#)
[gtaaattgacatccattacgattgatattgatagtagttaattaacgtagaaggtcatcaagaaggtgcgcaaaaggatataat](#)
[cctaaagaactgggaaaccgatgctacaatatccaattgcatcttgcgacgaattaaaagcatatgtaccggatttgtaagaag](#)
[tggcaacttacactgcaaacgggtgctgcggaatgatcaaaagaattgtgctaacaatcagacgatttagaaattttatt](#)
[tcgaatggatagtggtactttgatgaaaaaattatcgaacgatagaatctctggatgcaaatatftaaagccaaaagtta](#)
[tttactcactcaccaagcaacgaattcatcaattgtattcgttaaaggagaagaaggtagagaaactacagaactgtataca](#)
[aaattagttaaatgggaaaaagacagaagattgtcgtatctcgcgactgaaaccaaaaaagaagagcacaattatcattt](#)
[tagaaggtccgaatacgaactctttctttgtaacaaatactaccttgcttt\(...\)](#)

> 827 a 1883 *IS903 complete cds* (complementary)

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium plasmid pSe-Kan, complete sequence

Sequence ID: [gb|HQ230976.1](#) Length: 7132 Number of Matches: 2

Related Information

Range 1: 4069 to 5125

Score	Expect	Identities	Gaps
1947 bits (1054)	0.0	1056/1057(99%)	0/1057(0%)

[ggcttggtaataaatcagatttcgggtaagtctccccgtagcgggttggtt](#) **IRr** [TCAGgcaatacgcacgctttcaggcata](#) **IS903 cds**
[cctgcttctgctatttgttcagcgtcgtaccagggccatagcctctgcaacctgaccatcgtagtcacgcagcgtcagtgaa](#)
[ccccgaacagctgtttaccgggtacatcgggttccgctatcgaagcagcgttgtaatctgtgtcatttccaccgcgatta](#)
[ctcccgctcattcgtgattagccactgcacggttacggctctgcatattcaccggccaagtaaccgcacctttcgggggtggg](#)

ataagcgcgctgattttcttacgccgcagttcacgtgacagagccgggtgctgtaagcgccgctctgccgatgctgcctgattt
tctgtgagctgccggataagaccgggaaggcttctgagtcctcacattgttcagcgacaggcagcgagatgatttcat
gtgtttactgtcaacggcgagatgcagcttacgccagatacggcggcgttctggccatgcttttgactttccactgcctca
ccgaagaccttcagcccgggtggaatcaattaccagggtgtgcgatttcaccccgggtgggcgtttgaaactgacattaaccgac
ttgcccgcctgctgacacagctgtaatccgggcagcgtagcggaacgttcatcagagaaaaatggaatcaataaagccctg
cgcagcgcgcagggcagcctgaatacgcgtttaatgaccagcagatcgtgatggcaaggtcagaatagcgcgtgaggctg
cctcgtgaagaagggtgtgctgactcataccaggcctgaatagcttcatcatccagccagaaagttatggagccacggttgatg
aggcctttattgtagggtggccagttgtgattttgaactttgctttgccacggaacggtctgcgttgcgggaagatacgtgac
tgatccttCAActcagcaaaaagttcgattattcaacaagcc
IRI

>1884 a 2476 ISEcp1 incomplete cds

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium, plasmid inCHI2, complete sequence.

Sequence ID: [emb|LN794248.1](#) Length: 300375 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 272426 to 273018

Score	Expect	Identities	Gaps
1016 bits (550)	0.0	589/607 (97%)	14/607 (2%)

(...)ccttgctttctgaaaaagtagttatatactatgaaaagcgtggtaatgctgaaaactatatcaaagaagccaaatacgcacat
ggcgggtgggtcatctctgctaaagtcattttggcgcaatgaagccgtgttcaaatgatgatgctttcatataacctattttgtgtt
caagtttgattccttggactcttcagaatacagacagcaataaagaccttctgttgaagtatgatttcttgcagcaaaaataatc
aaaaccgcaagatagttaatcatgaagttgtcggaaaactatccgtacaagggagtgatgaaaaatgtctggtaTAAtaag
aataatcatcaataa

tnpA incomplete cds

aattgagtgctgctctgtggataacttcagaggttattaagtatcattgcagcaaatgaaatcaatgatttatcaaaaatgattg
aaaggtggtgtaaataatgttacaatgtgtgagaagcagctctaaattctcgtgaaatagtgattttgaaagntaataaaaaaacac
acgtggaatttaggacgtggaatttagggactattcatgtgtgttattntntcttccagaataaggaatcc

IRr

>2477 a 3352 bla_{CTX-M-96} complete cds

Klebsiella pneumoniae bla_{CTX-M-12} variant gene for CTX-M-12a enzyme, strain kpn293235

Sequence ID: [emb|AJ704396.1](#) Length: 876 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1 to 876

Score	Expect	Identities	Gaps
1618 bits (876)	0.0	876/876 (100%)	0/876 (0%)

ATGgttaaaaaatcactgcgccagttcacgctgatggcgacggcagccgtcacgctgtttaggaagtgtccgctgtatcgcaaacggcggagctacagcaaaaactgccgaattagagcggcagtcgggaggcagactgggtgtggcattgattaacacagcggataattcgcaaaactttatcgtgctgatgagcgttcgctgatgtgacgaccagtaaaagtatggccgcgccggtgctgaagaaaagtgaaagcgaaccgagctgttaaatcagcgagttgagatcaaaaaatctgacctgttaactataatccgattgcggaaaagcacgtcaatgggacgatgctactggctgagcttagcgcggccgctacagtacagcgataacgtggcgatgaataagctgattgctcacgttggcggccggctagcgtcaccgcgttccccgacagctgggagacgaaacgttccgtcgcaccgtaccgagccgacgttaaacaccgccattccggcgatccgcgtgataccacttcacctgggcaatggcgaaactctgcggaatctgacgctgggtaaagcattggcgacagccaacgggcgacgctggtgacatggaaggaataaccacgggtgcagcgagcattcaggcaggactgctgcttctgggtgtgggggataaaaccggcagcgggtgctatggcaccacaacgatatcgcggtgattggccaaaagatcgtgcgccgctgattctgtcacttacttaccagcctaacctaaggcagaagccgtcgcgatattagcgtcggcggctaaaatcgtcaccgacggttgTAA

>3353 a 3726 ORF477 incomplete cds (complementary)

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium, plasmid incHI2, complete sequence.

Sequence ID: [emb|LN794248.1](#) Length: 300375 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 271176 to 271549

Score	Expect	Identities	Gaps
691 bits(374)	0.0	374/374 (100%)	0/374 (0%)

Orf 477

tagcggaaacggaatggggaactcattccgttttgttatcgccTTAgacggcaaaagtgtcgcgccacctgcgcttcgcataaccaggccataagctccgtggttctggttctcttccgctggagccagtgcgcatagtatcggcagccacgggtgatagccaccgtgtttacttcaaaaattatgccaccggtatccagcgacagcacggcatgccagggtcctcggccatctccagcaccgtacaggttcccccaatatcgcccgatgggtgacggtaccccgatcgtcaaaattcagcaccacgaaacgaccctaatggcaacagtagctcgaaggtgtgaggggtcgggtcggg (...)

D.2 Entorno genético *bla*_{CTX-M-12}

El entorno genético asociado a *bla*_{CTX-M-12} carece de la inserción de IS903.

> 1 a 1404 *ISEcp1 incomplete cds*

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium, plasmid inCHI2, complete sequence.

Sequence ID: [emb|LN794248.1](#) Length: 300375 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 272426 to 273829

Score	Expect	Identities	Gaps
2593 bits (1404)	0.0	1404/1404 (100%)	0/1404 (0%)

(...)gtatttgataatgactcaacaaataaaatcaagatgaatcatataaa gaccatgctctgcggtcacttcattggcattgataa
 gttagaacgtctaaagctacttcaaaatgatccctcgtcaacga gtttgatattccgtaaaagaacctgaaacagtgctacggg
 ttctaggaaactcaactcaagacaacccaaatgtttagagacattaatTTAAAGTCTTAAAAAACTGCTCACTAAAA GTAAATT
 gacatccattacgattgatattgatagtagtgaattaacgta gaaggtcatcaagaagggtgcgtcaaaaggatataatcctaaga
 aactgggaaaccgatgctacaatatccaattgcatTTTgcgacgaattaaaagcatatgtaccggatttgtaa gaagtggcaat
 actfacactgcaaacgggtgctgcggaaatgatcaaaagaattgttgtaacatcaaatcagacgattfgaaatTTTttcgaatg
 gatagtggtactttgatgaaaaaattatcgaaacgata gaatccttggatgcaaattttaattaaagccaaaaggatttctacac
 tcacctcacaagcaacgaattcatcaattgtattcgttaaaggagaagaaggtaga gaaactacagaactgtatacaaaattag
 taaatgggaaaaagacagaagatttgcgtatctcgcgactgaaaccagaaaaagaaagagcacaattatcattttagaagg
 ttccgaatac gactacttttcttgaacaaatactaccttgctttctgaaaaagtagttatatactatgaaaaagcgtgtaatgctga
 aaactatatacaaaagaa gccaaatac gacatggcgggtgggtcatctctgctaaagtcattttggcgaatgaagccggtttcaa
 atgatgatgctttcatataacctattttgtgttcaagtttgattccttgactcttcagaatacagacagcaataaagaccttctgt
 tgaagtatgtatttctgcagcaaaaatgatcaaaaccgcaagatatgtaatcatgaagttgctggaaaactatccgtacaagg
 agtgatgaaaaatgctcggtaTAA

tnpA incomp. cds

taagaatafcatcaataaaattgagtggtgctctgtggataactgcagagtttattaagtatcattgcagcaaagatgaaatcaatg
 attatcaaaaatgattgaaaggtggtgtaaataatgttacaatgtgtgagaagcagtctaaattctcgtgaaatagtgttttga
 agctaataaaaaaacacacgtggaatttagggactattcatgttggttatttctgtatctccagaataaggaatccc

>1405 a 2280 ^{IB}*bla*_{CTX-M-12} complete cds

Klebsiella pneumoniae insertion sequence *ISEcp1* transposase (tnpA) gene, complete cds; and extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-12 (*bla*_{CTX-M-12}) gene, complete cds

Sequence ID: [gb|DQ821704.2](#) Length: 2659 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1784 to 2659

Score	Expect	Identities	Gaps
-------	--------	------------	------

Anexo E: Aminoácidos

E.1 Código de 1 y 3 letras

<i>Aminoácido</i>	<i>Tres letras</i>	<i>Una letra</i>	<i>Tipo de aminoácido</i>
<i>Alanina</i>	Ala	A	No polar
<i>Arginina</i>	Arg	R	Básico
<i>Asparagina</i>	Asn	N	Polar
<i>Aspártico, ácido</i>	Asp	D	Ácido
<i>Cisteína</i>	Cys	C	Polar
<i>Fenilalanina</i>	Phe	F	No polar
<i>Glutámico, ácido</i>	Glu	E	Ácido
<i>Glutamina</i>	Gln	Q	Polar
<i>Glicina</i>	Gly	G	No polar
<i>Histidina</i>	His	H	Básico
<i>Isoleucina</i>	Ile	I	No polar
<i>Leucina</i>	Leu	L	No polar
<i>Lisina</i>	Lys	K	Básico
<i>Metionina</i>	Met	M	No polar
<i>Prolina</i>	Pro	P	No polar
<i>Serina</i>	Ser	S	Polar
<i>Tirosina</i>	Tyr	Y	Polar
<i>Treonina</i>	Thr	T	Polar
<i>Triptofano</i>	Trp	W	No polar
<i>Valina</i>	Val	V	No polar

E.2 Mutaciones

Para indicar las mutaciones o cambios aminoacídicos en una posición determinada de la secuencia primaria de una proteína se utilizó la siguiente convención:

Residuo original - Posición (según numeración de Ambler) – Residuo nuevo

Ejemplo: El cambio de Glicina en lugar de Ácido aspártico en la posición 240 se indica como Asp240Gly.

Anexo F: Publicaciones

El presente trabajo de tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a congreso:

F.1 Publicaciones

1. Dropa, M., **Ghiglione, B.**, Matté, M.H., Balsalobre, L.C., Lincopan, N., Matté, G.R., Gutkind, G., Power, P. *Molecular and biochemical characterization of CTX-M-131, a natural Asp240Gly variant derived from CTX-M-2, produced by a Providencia rettgeri clinical strain in São Paulo, Brazil*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 59:1815–1817.
2. Casella, T., Rodríguez, M.M., Takahashi, J.T., **Ghiglione, B.**, Dropa, M., Assunção, E., Nogueira, M.L., Lincopan, N., Gutkind, G., Nogueira, M.C. 2015. *Detection of bla_{CTX-M-type} genes in complex class 1 integrons carried by Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Brazil*. International Journal of Food Microbiology. 197:88-91
3. Millán, B., Castro, D., **Ghiglione, B.**, Gutkind, G., Araque, M. 2013. *ISCR1 associated with bla_{CTX-M-1} y bla_{CTX-M-2} genes in IncN and IncFIIA plasmids isolated from Klebsiella pneumoniae of nosocomial origin in Mérida, Venezuela*. Biomédica. 33: 268-75.
4. Sennati, S., Santella G., Di Conza J., Pallecchi L., Pino M., **Ghiglione B.**, Rossolini G.M., Radice M., Gutkind G. 2012. *Changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 56:6003-6005.
5. Millan B., **Ghiglione B.**, Diaz T., Gutkind G., Araque M. 2011. *CTX-M-14 β -lactamase-producing Citrobacter freundii isolated in Venezuela*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 10:22.

F.2 Presentaciones a Congreso

1. 12th Beta-Lactamase Meeting, 28th June – 1st July 2014, Gran Canaria, Spain. **CTX-M-131, a natural D240G CTX-M-2-group variant isolated in a clinical sample from São Paulo, Brazil**. Milena Dropa, Livia Carminato Balsalobre, Nilton Lincopan, **Barbara Ghiglione**, Maria Helena Matté, Gabriel Gutkind, Pablo Power. (Póster)
2. 12th Beta-Lactamase Meeting, 28th June – 1st July 2014, Gran Canaria, Spain. **Prevalent extended-spectrum β -lactamases in Argentina: structural insights into the interaction with oxyimino-cephalosporins and mechanism-based**

- inhibitors.** Pablo Power, Paulette Charlier, **Barbara Ghiglione**, Melina Ruggiero, Moreno Galleni, Gabriel Gutkind, Eric Sauvage. (Oral)
3. XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental 2013. **High resolution X-ray structure and kinetic characterization of the CTX-M-96 extended-spectrum β -lactamase.** **B Ghiglione**, MM Rodríguez, R Herman, F Bouillenne, N Urtasun, M Galleni, P Charlier, G Gutkind, P Power. (Oral)
 4. 157° Jornada Científica de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina, 2013. **Caracterización cinética y estructural de la variante natural D240G CTX-M-96.** **B. Ghiglione**, M. M. Rodríguez, R. Herman, F. Bouillenne, N. Urtasun, M. Galleni, P. Charlier, G. Gutkind, E. Sauvage, P. Power. (Oral)
 5. 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Denver, Colorado, USA, 2013. **High Resolution Crystal Structure of the CTX-M-96 Ceftazidimase: Contribution to the Study of ESBLs Interaction with Oxyimino-cephalosporins by Simulated Modeling.** **B. Ghiglione**, E. Sauvage, R. Herman, F. Bouillenne, M. M. Rodríguez, M. Galleni, G. Gutkind, P. Charlier, P. Power. (Oral)
 6. 5th Congress of European Microbiologists (FEMS) Leipzig from July 21-25, 2013. **Contribution of porin deficiency to the “ceftazidimase” profile in *Escherichia coli* strains producing CTX-M β -lactamases.** **B. Ghiglione**, M. M. Rodríguez, M. Pérez Garófalo, M. Radice, J. Di Conza, P. Power, G. Gutkind. (Póster)
 7. VIII Congreso Panamericano de Infecciones Intrahospitalarias 2011, Santa Cruz, Bolivia. **Plásmidos IncN e IncFIIA median la diseminación de β -lactamasas CTX-M-1 y CTX-M-2 en *Klebsiella pneumoniae* aisladas en una Unidad de Alto Riesgo Neonatal en Venezuela.** Millán Beatriz, **Ghiglione Barbara**; González Ana; Gutkind Gabriel; Araque María. (Póster)
 8. 11th betalactamase meeting June 10th-14th 2011, Leonessa, Italia. **Is the CTX-M-2 era in Argentina coming to an end? The new epidemiology of ESBLs far to the South.** SENNATI, S; SANTELLA, G; PALLECCHI, L; DICONZA, J; FAMIGLIETTI, A; NASTRO, M; VAY, C; PAGNIEZ, G; FERNANDEZ CANIGIA, L; GIOVANAKIS, M; ARGARAÑA, F; SMAYEVSKY, J; NICOLA, F; CITTADINI, R; ALMUZARA, M; **GHIGLIONE, B**; MENDES, E; VIRGOLINI, S; MUTTI, D; CUSIN, V; BERRY, D; AGUIRRE, F; ROSSOLINI, GM; RADICE, M; GUTKIND, G. (Póster)
 9. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Illinois, USA, 2011. **Kinetic Characterization of Novel CTX-M-96**

-
- Harboring D240G Substitution and Its Role in the Phenotypic Resistance to Oxyimino-cephalosporins.** Ghiglione Barbara; Rodríguez María Margarita; Adam Katrin; Blatezky Esteban; Ferrari Alejandro; Di Conza José; Radice Marcela; Power Pablo; Gutkind Gabriel. (Póster)
10. XI Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología, Buenos Aires, Argentina, 2011. **Caracterización de los mecanismos de resistencia en enterobacterias productoras de BLEE aisladas en Lima, Perú.** (póster) SEVILLA ANDRADE, C; PURAY CHAVEZ, M; ALARCON VILLAVERDE, J; CABEZAS SANCHEZ, C; GUEVARA DUNCAN, J; VALENCIA BAZALAR, E; PORTO, A; **GHIGLIONE, B**; RADICE, M; DI CONZA, J; GUTKIND, G. (Póster)
11. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Illinois, USA, 2011. **Extended Spectrum Beta-Lactamases in Different Enterobacterial Isolated in Lima, Peru.** SEVILLA ANDRADE, C; PURAY CHAVEZ, M; ALARCON VILLAVERDE, J; CABEZAS SANCHEZ, C; GUEVARA DUNCAN, J; VALENCIA BAZALAR, E; PORTO, A; **GHIGLIONE, B**; RADICE, M; DI CONZA, J; GUTKIND, G. (Póster)
12. XI Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología, Buenos Aires, Argentina, 2011. **Cefotaximasas en enterobacterias: El fin del paradigma CTX-M-2.** (presentación oral) SENNATI, S; SANTELLA, G; PALLECCHI, L; DICONZA, J; FAMIGLIETTI, A; NASTRO, M; VAY, C; PAGNIEZ, G; FERNANDEZ CANIGIA, L; GIOVANAKIS, M; ARGARAÑA, F; SMAYEVSKY, J; NICOLA, F; CITTADINI, R; ALMUZARA, M; **GHIGLIONE, B**; MENDEZ, E; VIRGOLINI, S; MUTTI, D; CUSIN, V; BERRY, D; AGUIRRE, F; ROSSOLINI, GM; RADICE, M; GUTKIND, G. (Póster)
13. XII Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, Argentina, 2010. **Influencia de la mutación natural D240G en el perfil de resistencia conferido por cefotaximasas pertenecientes al grupo CTX-M-1.** (póster) **Ghiglione, Barbara**; Di Conza, José; Radice, Marcela; Rodríguez, María Margarita; Power, Pablo; Gutkind, Gabriel. (Póster)
14. XX Congreso Latinoamericano de Microbiología, Montevideo, Uruguay, 2010. **Klebsiella pneumoniae productora de CTX-M-2 aislada en una unidad de alto riesgo neonatal en Venezuela.** (póster) **Ghiglione, Barbara**; Millán, Beatriz; González, Ana; Gutkind, Gabriel; Araque, María. (Póster)