UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

Maestría en Microbiología Molecular

Caracterización Genética de una Nueva ß-lactamasa Aislada de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139

Lic. Roberto G. Melano

Director: **Dr. Alejandro Petroni**

Servicio Antimicrobianos

INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

2002

"¿En qué hondonada esconderé mi alma

para que no vea tu ausencia...

que brilla definitiva y despiadada?"

Jorge Luis Borges,

Fervor de Buenos Aires (1923)

En Memoria de la Dra. María Alicia Rossi, nuestra querida Ali

AGRADECIMIENTOS

A (Eberto) Alejandro Petroni, mi querido gordo, por ser mi Maestro en estas "lides procarióticas" y mi amigo en la vida.

A Marcelo Galas y Alejandra Corso, por enseñarme que "a veces un antibiograma es mejor que una PCR". Y por conservar el empuje y el ambiente de amistad que logró Ali, tan importantes para esta etapa mía…

A Alex Saka (el sobrino de Pijus), Alicia Garutti y Laura Mange, mis compañeros vibriónicos, sin cuyo arduo trabajo y amena compañía esto habría demorado un poquitín más en gestarse.

A Paola Ceriana y Fernando Pasterán, por estar en los momentos precisos, esos en los que uno necesita saber que hay alguien detrás…

A Ale, Marce, Pao, Fer, Melina Rapoport (la japo), Celeste Lucero (la Chele), Paula Gagetti, Ezequiel Tuduri, Marianita Miranda, Blanca Carballo, Gustavo López, Marisa Rodriguez, Diego Faccone, Adrianita Vicente, Patricia Andrés (Patito), mis AMIGOS del Laboratorio, por bancarme en las buenas, pero especialmente en las malas (incluyendo cabronadas, bajones, decepciones, etc., etc., etc.).

Al Dr. Claudio Bidau, mi profe de Genética en la Facu, una fuente de inspiración en muchos sentidos, aunque él no lo sepa.

A mis hijos (Juli y Martincho), que son el motor que me mueve, siempre para adelante, siempre para adelante… Los amo con todo mi ser.

A Sandra, por su apoyo constante, por su amor y su compañía.

Los resultados de esta Tesis de Maestría fueron publicados en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July 2002, Vol. 46, No. 7, p. 2162–2168.

Índice

Capítulo 1 - Introducción 1

1.1. Generalidades 2

1.2. ß-lactamasas 3

1.3. Nomenclatura de *V. cholerae* 7

1.4. Resistencia a antibióticos en *V. cholerae* 10

1.5. Mecanismos de dispersión de la resistencia a antibióticos 12

Resistencia intrínseca 12

Resistencia adquirida 12

Mutaciones 12

de genes preexistentes 13

de genes adquiridos 13

Transformación 14

Transducción 15

Conjugación 16

Transposones e integrones 16

1.6. Integrones en *V. cholerae* 21

1.7. Estudios preliminares 25

Objetivos 27

Capítulo 2 - Materiales y Métodos 28

2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo 29

2.2. Agentes antimicrobianos y pruebas de sensibilidad 30

2.3. Preparación de ß-lactamasas 31

2.4. Isoelectroenfoque (IEF) analítico 31

2.5. Ensayos de conjugación 32

2.6. Manipulación de ADN 32

Electroporación 33

2.7. Hibridación (dot blot) 34

2.8. Amplificación por PCR 35

2.9. Secuenciación de ADN y análisis de secuencias 37

Capítulo 3 – Resultados 38

3.1. Sensibilidad a los antibióticos 39

3.2. Identificación del determinante de resistencia 40

3.3. Transferencia de la resistencia por conjugación 41

3.4. Clonado y secuenciación del determinante de resistencia a ampicilina 41

3.5. Análisis de las regiones flanqueantes del gen *bla*$_{\text{CARB-7}}$ 49

Capítulo 4 – Discusión 53

Bibliografía 59

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

La terapia antimicrobiana ha jugado un rol vital en el tratamiento de las enfermedades infecciosas humanas en el siglo XX. Con el descubrimiento de la penicilina en la década del ´20 y el desarrollo de otros antibacterianos en años subsiguientes, se creyó que finalmente se contaba con herramientas para vencer de modo definitivo a los patógenos bacterianos. Sin embargo, la aparición de microorganismos con resistencia a antibióticos fue casi simultánea al uso de estas drogas. Actualmente, esta crisis está agravada por la emergencia global de microorganismos con resistencia múltiple (Swartz, 1994), constituyéndose en un problema cada vez más preocupante, sobre todo en el caso de las infecciones intrahospitalarias.

Existen claras evidencias de que en algunas regiones esta emergencia ocurre con una velocidad mucho más alarmante que en otras. La proporción de aislamientos resistentes a antibióticos es mayor en países en desarrollo, lo que sugiere que las diferencias en las condiciones sanitarias y los patrones de uso de estas drogas tienen roles importantes (Murray, 1994). Estos factores, denominados en conjunto “ambiente selectivo”, crean un medio especial en el cual un microorganismo con nuevas características fenotípicas es más apto para sobrevivir

y proliferar en relación con el ancestro que le dio origen. En este concepto están reunidos, además de la presión antibiótica, factores que involucran a los pacientes (su estado inmunológico, factores fisiológicos como la desigual distribución de un antibiótico en diferentes compartimientos del cuerpo del paciente, automedicación, etc.), la epidemiología de los centros de salud (infraestructura del hospital, flujo del material sanitario o del personal dentro de la institución, la prescripción indiscriminada de drogas, etc.) y a hábitos en ámbitos relacionados (el masivo uso de antibióticos como aditivos en los alimentos para animales, el consumo de alimentos que tienen este tipo de aditivos, las prescripciones veterinarias, etc.). Como ejemplo, los factores que inciden en la persistencia de *Vibrio cholerae* son el ambiente acuático en el que se desarrolla, el incremento de la densidad de las poblaciones humanas (lo cual provee nuevos ambientes, y facilita su transmisión), la carencia de una vacuna efectiva y la protección limitada de la inmunidad natural (Tauxe y col., 1994), entre otros.

1.2. ß-lactamasas

Entre las bacterias gram negativas, la inactivación de los antibióticos ß-lactámicos, mediante la producción de enzimas denominadas **ß-lactamasas**, es el mecanismo más común de resistencia a estas drogas. El proceso comienza con la unión de la enzima con el antibiótico de un modo **no covalente**. El anillo ß-

lactámico de la droga es atacado por un grupo hidroxilo libre presente sobre la cadena lateral de un residuo serina situado en el sitio activo de la enzima, produciendo un acil-éster **covalente**. La hidrólisis del éster finalmente libera a la enzima activa y a la droga inactivada (Figura 1). Todas las ß-lactamasas de clase molecular A, C y D (ver más adelante) actúan mediante este mecanismo, mientras que las de clase B emplean un ion zinc para atacar al anillo ß-lactámico.

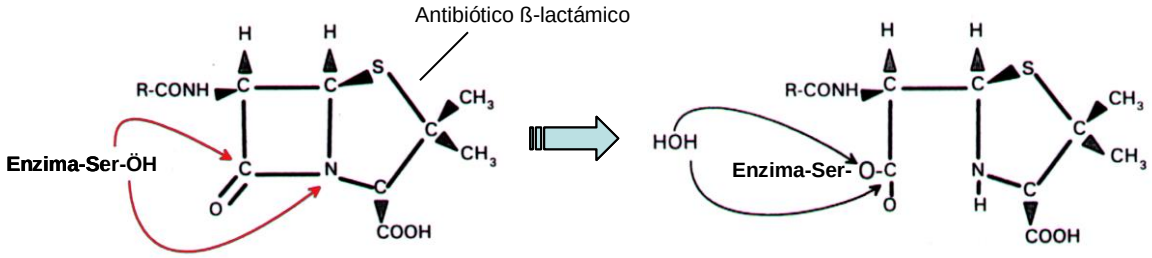


Figura 1. Acción de las serín ß-lactamasas.

Muchas ß-lactamasas son inherentes y características de una determinada especie bacteriana, pero se desconoce si tienen un rol fisiológico específico o si han persistido como un mecanismo de resistencia contra antibióticos ß-lactámicos que se encuentran en la naturaleza. La mayoría de las ß-lactamasas tienen un sitio activo Ser-XX-Lys en común con las proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), enzimas bacterianas localizadas en la membrana citoplasmática responsables de la síntesis de la pared celular. Por este motivo se supone que las serín- ß-lactamasas evolucionaron de las PBPs como protección contra los antibióticos ß-lactámicos

producidos por mohos en el medio ambiente. Las PBPs también reaccionan con los ß-lactámicos para dar serín-ésteres, pero, a diferencia de los formados por las ß-lactamasas, estos no se hidrolizan rápidamente.

Se han desarrollado numerosos esquemas de clasificación que pretenden agrupar a las ß-lactamasas. El conocimiento de las secuencias aminoacídicas de algunas de ellas permitió conformar una clasificación molecular de estas enzimas (Ambler y col., 1980). Un esquema de clasificación más reciente (Bush y col., 1995) tiene en cuenta la localización genética, cromosómica o plasmídica, el perfil de sustratos, la sensibilidad a los inhibidores y algunas características físicas de la enzima, como su punto isoeléctrico, el peso y la clase molecular. Las ß-lactamasas plasmídicas, de mayor incidencia por su capacidad de transmisión horizontal (ver punto **1.5**) se encuentran dentro de la clase A de la clasificación de Ambler. En la clasificación propuesta por Bush y col., estas enzimas se ubican en el grupo 2, y entre otras se pueden mencionar las ß-lactamasas de amplio espectro (grupo 2b, p. e. TEM-1, SHV-1, que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de menor espectro), de espectro extendido (grupo 2be, p. e. SHV-5, CTX-M-2, PER-2, cuyos substratos son penicilinas, todas las cefalosporinas y monobactames), y aquellas que hidrolizan carbenicilinas (grupo 2c, p. e. la familia CARB-, que hidrolizan penicilinas incluyendo carbenicilinas).

La primer ß-lactamasa plasmídica descripta en bacterias gram negativas fue TEM-1, la cual fue detectada en un aislamiento de *Escherichia coli* en Grecia a

principio de la década del ’60. Esta enzima es capaz de hidrolizar penicilinas y las denominadas cefalosporinas de primera generación, tales como cefalotina y cefaloridina. TEM-1 es la ß-lactamasa más comúnmente detectada en bacterias gram negativas. Otra enzima plasmídica común en algunos géneros de enterobacterias es SHV-1. A partir de estas enzimas, y con el desarrollo de nuevos antibióticos ß-lactámicos con un mayor espectro de acción, se observó la emergencia de nuevas ß-lactamasas derivadas de aquellas, que causaban resistencia a estas drogas. Se supone que la presión selectiva provocada por el uso y abuso de estos nuevos antibióticos en el tratamiento de pacientes es la responsable de la selección de estos mecanismos. Actualmente hay más de 90 enzimas del tipo TEM- y 25 del tipo SHV- (Jacoby, G., and K. Bush. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant ß-lactamases, [http://www.lahey.org/studies/webt.htm]), ampliamente diseminadas en Estados Unidos y Europa. Otra nueva familia de ß-lactamasas plasmídicas es la llamada CTX-M-, que incluye enzimas con fuerte actividad de cefotaximasas descriptas en Asia, África, Europa y Sudamérica (Tzouvelekis y col., 2000). Dentro de esta familia se encuentra la enzima CTX-M-2, la cual se encuentra ampliamente diseminada en la Argentina y en países vecinos (Rossi y col., 1995; Power y col., 1999; Galas y col., 1998; Galas y col., 1999; Pasterán y col, 1999; Tzouvelekis y col., 2000). Otro ejemplo está constituido por la familia PER-, que incluye 2 ß-lactamasas plasmídicas, hidrolizan con mayor eficiencia ceftazidima y fueron

aisladas en Francia (Nordmann y col., 1993), Turquía (Vahaboglu y col, 1995; Vahaboglu y col., 1997) y Argentina (Bauernfeind y col., 1996; Galas y col., 1998; Galas y col., 1999; Pasterán y col, 1999).

1.3. Nomenclatura de *V. cholerae*

El género *Vibrio* contiene varias especies, de las cuales *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son los patógenos humanos más importantes. Mientras *V. parahaemolyticus* es una causa importante de enfermedad diarreica, las infecciones por *V. vulnificus* pueden producir desde gastroenteritis autolimitada e infecciones en heridas hasta infecciones necrotizantes severas de tejidos blandos y septicemia fatal (West, 1989). *V. mimicus* también ha sido implicado en enfermedades diarreicas, siendo algunas cepas de esta especie productoras de la toxina colérica o de una toxina termoestable (Ramamurthy y col., 1994; Mukhopadhyay y col., 1998**).** *V. cholerae* está clasificado, sobre la base de su antígeno somático (antígenos O), en serovariedades o serogrupos. Actualmente, de acuerdo con este criterio, se han descripto cerca de 200 serogrupos (Beltrán y col., 1999). Hasta hace poco tiempo, se suponía que el serogrupo O1 incluía a todas las cepas responsables del cólera epidémico y endémico; este serogrupo está integrado por dos serotipos principales, Ogawa e Inaba, siendo el serotipo Hikojima raramente reportado. A su vez, estos serotipos pueden ser clasificados en dos

biotipos, clásico y El Tor, de acuerdo a propiedades bioquímicas y a la sensibilidad a bacteriófagos (Figura 2) (Sakajaki, 1970).

Los vibrios **no-O1** poseen características bioquímicas y morfológicas muy similares a las de los vibrios productores de cólera, no aglutinan el antisuero polivalente O:1 pero si sus propios antisueros. En un principio, los serogrupos no-O1 de *V. cholerae* fueron asociados solamente a casos esporádicos de diarrea y a infecciones extraintestinales, hasta que en 1993 un gran brote similar a cólera en Bangladesh e India fue causado por una cepa de *V. cholerae* no-O1 (Albert y col., 1993). Este organismo no pertenecía a ninguno de los 138 serogrupos O de *V. cholerae* conocidos hasta ese momento sino a uno nuevo, el cual posteriormente fue designado O139 (Shimada y col., 1993). Desde entonces, *V. cholerae* O139 ha persistido como el segundo agente etiológico del cólera. Por lo tanto, hay dos serogrupos, O1 y O139, asociados con la enfermedad epidémica, pero además existen cepas de estos serogrupos que no producen toxina colérica y que no están involucrados en epidemias.

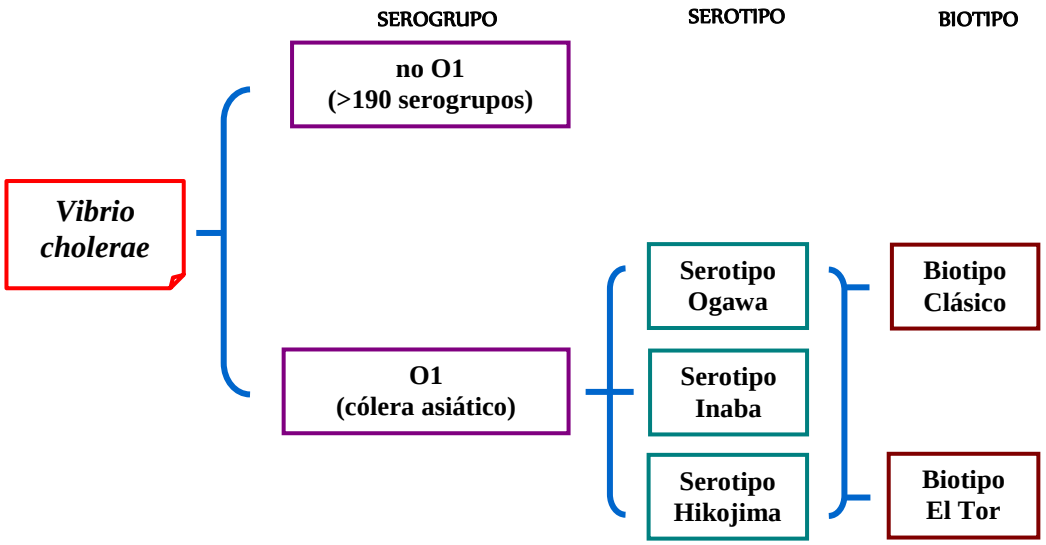


Figura 2. Clasificación de *V. cholerae*

Las cepas de *V. cholerae* no-O1, no-O139 son parte de la flora bacteriana normal en áreas de estuarios. Han sido aisladas de agua en todos los continentes. Su crecimiento está influenciado por la salinidad y temperatura de la misma, siendo los crustáceos su principal reservorio (Tison, 1999). La transmisión esta asociada con la ingestión de agua y/o alimentos contaminados, y la manifestación clínica más común es la gastroenteritis, aunque también han sido aislados de sangre, heridas, tejidos blandos y oído. La enfermedad asociada con este microorganismo es mejor categorizada como esporádica, es decir, ocurren casos con una baja tasa en un número determinado de áreas geográficas. Si se tiene en cuenta la elevada frecuencia con que es aislado en el ambiente, se podría pensar

que solo una minoría de las cepas porta los factores de virulencia necesarios para causar enfermedad humana.

1.4. Resistencia a antibióticos en *V. cholerae*

La mayoría de los casos de diarrea causados por *V. cholerae* pueden ser tratados adecuadamente dando una solución oral de sales de rehidratación, pero los pacientes con deshidratación grave deben rehidratarse por vía endovenosa (Kaper y col., 1995).

Los tratamientos antibióticos se emplean con eficacia para reducir el volumen de la diarrea en casos graves y abreviar el período de excreción del microorganismo. También suprime la diarrea dentro de las 48 hs y, por consiguiente, reduce la estancia hospitalaria. El antibiótico de elección en estos casos es la tetraciclina o la doxiciclina. En los niños menores de 7 años y en las mujeres embarazadas, se recomienda trimetoprima-sulfametoxasol, furazolidona o eritromicina. La quimioprofilaxis masiva no es eficaz para evitar la diseminación del cólera, y solo se recomienda el tratamiento preventivo de los contactos familiares sanos de un paciente con cólera (quimioprofilaxis selectiva) (World Health Organization, 1992).

Las cepas clínicas de *V. cholerae* son naturalmente sensibles *in vitro* a la mayoría de los antibióticos. El uso de estas drogas (en particular tetraciclina) en dosis insuficientes para el tratamiento (Glass y col., 1983) o con fines profilácticos

(Mhalu y col., 1979) trajo aparejada la selección de cepas portadoras de plásmidos con determinantes genéticos de resistencia para tres o más drogas diferentes (Hedges y col, 1977; Mhalu y col., 1979; Towner y col., 1979; Threlfall y col., 1980; Glass y col., 1983; Dupont y col., 1985; Ouellette y col, 1988; Yamamoto y col., 1995). Algunos aislamientos que exhibieron resistencia a ß-lactámicos mediada por plásmidos produjeron TEM-1 (Dupont y col., 1985) o SAR-1, una carbenicilinasa con actividad hidrolítica menor que TEM-1, descripta en dos aislamientos de Tanzania (Reid & Amyes, 1986). Más recientemente, una ß-lactamasa denominada CARB-6 fue caracterizada en una cepa clínica de *V. cholerae* no-O1, no-O139 (Choury y col., 1999). En nuestro país se han reportado aislamientos de *V. cholerae* multirresistentes, incluyendo resistencia a ampicilina y a cefalosporinas de última generación (Rossi y col., 1993; Rivas y col., 1996; Petroni y col., 2002). Sin embargo, todos los casos fueron del serogrupo O1, biotipo El Tor. El único estudio en el cual se determinaron los patrones de resistencia a antibióticos en aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 de la Argentina se realizó en el año 2000, pero sin caracterizar los determinantes de esos perfiles de resistencia (Mange y col., 2000).

1.5. Mecanismos de dispersión de la resistencia a antibióticos

Con el avance del conocimiento acerca de los mecanismos y de la epidemiología de la resistencia a antibióticos, queda claro que la persistencia de bacterias patógenas radica en su capacidad para desarrollar resistencia frente a estas drogas. Esta resistencia puede ser de dos tipos:

- **Resistencia intrínseca**, o característica de especie (presente en la mayoría o en toda una especie), que no se presenta como un problema clínico de relevancia. Sin embargo, el estudio de este tipo de resistencias puede ayudar a predecir los problemas potenciales que pueden emerger bajo presión selectiva. Por ejemplo, la emergencia de *Stenotrophomonas maltophilia* como un patógeno nosocomial de importancia se correspondió con la introducción clínica del imipenem, para el cual esta especie bacteriana es intrínsecamente resistente.

- **Resistencia adquirida**, que implica el desarrollo, por parte de un organismo, de resistencia a un agente frente al que antes era sensible, por medio de mutaciones (principalmente puntuales) en su ADN, o por adquisición de ADN foráneo.

Las **mutaciones** puntuales involucran un cambio espontáneo de una o unas pocas bases de la secuencia de ADN de un organismo, debido a "errores" cometidos por el sistema de replicación. Este cambio puede darse en genes **preexistentes** en la bacteria o bien en genes **adquiridos** mediante un proceso de

incorporación de material genético. En ambos casos, la mutación puede ocurrir en un gen estructural codificante de una proteína que constituye un sitio blanco para los antibióticos, en genes que codifican enzimas que confieren resistencia por modificación del antibiótico, en genes regulatorios de estos últimos o en secuencias promotoras de la transcripción.

- **Mutaciones en genes pre-existentes.** Se han observado mutaciones en los genes estructurales *rpsL* (codificante de la proteína ribosomal RpsL), *gyrA* (ADN girasa) y *rpoB* (subunidad ß de la ARN polimerasa), entre otras, que confieren resistencia a estreptomicina, quinolonas y rifampicina, respectivamente **(**Jin & Gross, 1988; Cole, 1994; Heisig & Tschorny, 1994). El ejemplo más conocido de cambios en genes regulatorios es la mutación en *ampD*, que regula la expresión de la ß-lactamasa cromosómica de algunas enterobacterias (AMP-C), lo cual resulta en la aparición de resistencia a prácticamente todos los antibióticos ß-lactámicos, excepto imipenem (Jacobs y col., 1995).

- **Mutaciones en genes adquiridos.** Los ejemplos más claros de este tipo de mutaciones se observan en la aparición de ß-lactamasas de espectro extendido, principalmente de las familias SHV- y TEM-. En estos casos, una mutación puntual produce un cambio de aminoácidos en el sitio activo de la enzima, confiriéndole la capacidad de hidrolizar nuevos ß-lactámicos, es decir, ampliando el espectro de substrato (Jacoby, G., and K. Bush. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant ß-lactamases,

[http://www.lahey.org/studies/webt.htm]**)**. El uso sucecivo de diferentes antibióticos ß-lactámicos (de acción cada vez más potente) generó incrementos en la presión antibiótica, lo cual se tradujo en la selección de nuevos genes con diversas mutaciones puntuales acumuladas. Así, a partir de las ß-lactamasas de amplio espectro TEM-1, TEM-2 y SHV-1, ampliamente distribuidas entre las bacterias gram negativas e incapaces de hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido, han aparecido decenas de enzimas de estas familias (especialmente en el hemisferio norte), cuya presencia impide la utilización clínica de las cefalosporinas de última generación.

Si bien los mecanismos de resistencias derivados de mutaciones pueden tener implicancias clínicas muy importantes, son menos inquietantes que los mecanismos adquiridos vía plásmidos o transposones, ya que las mutaciones son generalmente solo transmitidas en forma vertical, mientras que los plásmidos o transposones también pueden diseminarse horizontalmente.

Los mecanismos para **adquirir** ADN foráneo pueden ser:

- por **transformación** natural, limitado a algunos géneros (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *Haemophilus influenzae*, entre otros). La transformación fue el primer mecanismo estudiado que permite a las bacterias incorporar material genético nuevo (Griffith, 1928; Avery y col., 1944). Este proceso dio lugar, en las especies mencionadas, a la aparición y posterior diseminación de la resistencia a penicilina, la cual está

mediada por modificaciones en las PBPs. Mediante este mecanismo una bacteria sensible capta ADN proveniente de una bacteria resistente, es decir con genes codificantes para PBPs que tienen baja afinidad para penicilina. Por recombinación homóloga hay un intercambio entre fragmentos del gen que codifica para la PBP resistente con los de su alelo sensible, originando un gen mixto, o "gen en mosaico", el cual puede expresar una nueva PBP de baja afinidad para penicilina. Por otro lado, el descubrimiento de las técnicas para la transformación *in vitro* de *E. coli* (Mandel & Higa, 1970), junto con la manipulación del ADN, fue de crucial importancia en el establecimiento de los métodos de ingeniería genética asociados con el desarrollo de la biotecnología moderna.

- por **transducción** a través de virus procarióticos, denominados bacteriófagos o más sencillamente fagos. De los métodos para adquirir material genético, este es el que tiene el rango más acotado de huésped bacteriano, siendo de importancia entre especies cercanamente relacionadas (Kokjohn, 1989). En ciertos casos, durante el ciclo de replicación de los fagos, el genoma viral se integra al cromosoma bacteriano; cuando se escinde de él puede arrastrar fragmentos cromosómicos de la bacteria, adyacentes al sitio de integración del genoma viral. De existir un gen de resistencia en dichos fragmentos, el mismo podría ser empaquetado como ADN viral formándose un fago activo que en un nuevo ciclo de infección constituirá un medio de diseminación de la resistencia. Por este proceso, recientemente se reportó la transferencia de resistencia a ampicilina, cloranfenicol,

estreptomicina, espectinomicina sulfonamidas y tetraciclina entre diferentes serovariedades de *Salmonella enterica*, mediada por un fago que es residente habitual de aislamientos clínicos de esta especie (Schmieger & Schicklmaier, 1999).

- por **conjugación**, a través de plásmidos conjugativos. De los tres procesos, este es el mecanismo más importante por el cual se produce la diseminación de los genes de resistencia. Consiste en la transferencia de ADN de una célula denominada dadora a otra aceptora, para lo cual es necesaria la presencia de múltiples funciones codificadas, en la mayoría de los casos, en extensas regiones de elementos extracromosómicos denominados **plásmidos** (Amábile-Cuevas & Chicurel, 1992). Los plásmidos son moléculas circulares de ADN que poseen un amplio rango de tamaños y de funciones codificadas, entre ellas una gran variedad de genes de resistencia a antimicrobianos. Son capaces de replicarse en forma autónoma del cromosoma y segregarse entre las células hijas luego de la división celular. Las bacterias portadoras de plásmidos conjugativos tienen la capacidad de dispersar estas características entre bacterias del mismo género, y en algunos casos entre géneros no relacionados.

Transposones e integrones. Los **transposones** conforman un sistema de transferencia genética intracelular, que permite el movimiento de fragmentos de ADN entre el cromosoma y los plásmidos. Muchos de estos fragmentos, que contienen genes que codifican para mecanismos de resistencia a antibióticos, están

asociados a transposones. La capacidad de éstos de insertarse (transponer) en diferentes moléculas de ADN independientemente del sistema de recombinación clásico del organismo, hacen que tengan gran importancia epidemiológica como agentes diseminadores (Levesque & Jacoby, 1988; Tolmasky & Crosa, 1993). Los transposones han sido clasificados en tres grupos o clases, de acuerdo a la complejidad de funciones relacionadas al proceso de transposición que tienen codificados. Los más simples son los del **grupo I**, que comprende a los transposones más pequeños (0,7 a 2.5 kb), denominados secuencias de inserción (*IS*). Consisten en un fragmento de ADN que contiene un gen (o muy raramente dos) necesario para la transposición, flanqueado por dos cortas secuencias de ADN (10-40 pb) invertidas y repetidas (IR) necesarias para el proceso de transposición y presentes en todos los transposones. Existe una gran variedad de *IS*, con más de 500 variantes descriptas hasta el presente (Mahillon & Chandler, 1998). Dentro del grupo I están comprendidos los transposones compuestos, formados por dos *IS* que flanquean a un fragmento de ADN de longitud variable el cual, generalmente, contiene un gen de resistencia. Los transposones del **grupo II** presentan una mayor complejidad. Poseen, como mínimo, dos genes codificantes de las funciones necesarias para la transposición, denominadas transposasa y resolvasa. Este grupo ha sido dividido en dos subgrupos, a saber, subgrupo Tn*3* y subgrupo Tn*21*, de acuerdo al sentido transcripcional de estos genes. Actualmente se sabe que los transposones del grupo II son los de mayor importancia clínica, ya que son

extremadamente eficientes desde el punto de vista de la diseminación de genes relacionados con la resistencia a antibióticos, a metales pesados y a determinantes de patogenicidad (Campbell y col., 1979). Los transposones del **grupo III** incluyen a bacteriófagos transponibles, tales como el Mu y sus derivados. El fago Mu es, de hecho, tanto un virus como un transposón y ha sido extremadamente útil en la dilucidación de los mecanismos de transposición de estos elementos (Pato, 1989).

La evolución de una gran variedad de plásmidos y transposones que portan genes codificantes de multirresistencia en bacterias gram-negativas, han tenido a la integración sitio-específica de estos genes como factor de gran relevancia en dicha evolución (Cameron y col., 1986; Wiedemann y col., 1986; Oullette, 1987; Sundström y col., 1988**)**. Esta captación estaría mediada por **integrones**, una familia de elementos de ADN potencialmente móviles (Stokes & Hall, 1989). La mayoría de los integrones descriptos hasta el presente consisten en dos elementos conservados que flanquean unidades discretas integradas como cassettes (Figura 3).

El segmento conservado 5' contiene el gen codificante de una recombinasa sitio-específica (*intI*) de la familia de las integrasas, un sitio único de reconocimiento de la integrasa (*attI*), localizado en adyacencia al gen *intI* y en la cadena opuesta una región promotora, P_{ant}, dirigida hacia la región de integración (Argos y col, 1986; Stokes & Hall, 1989; Hall y col., 1991).

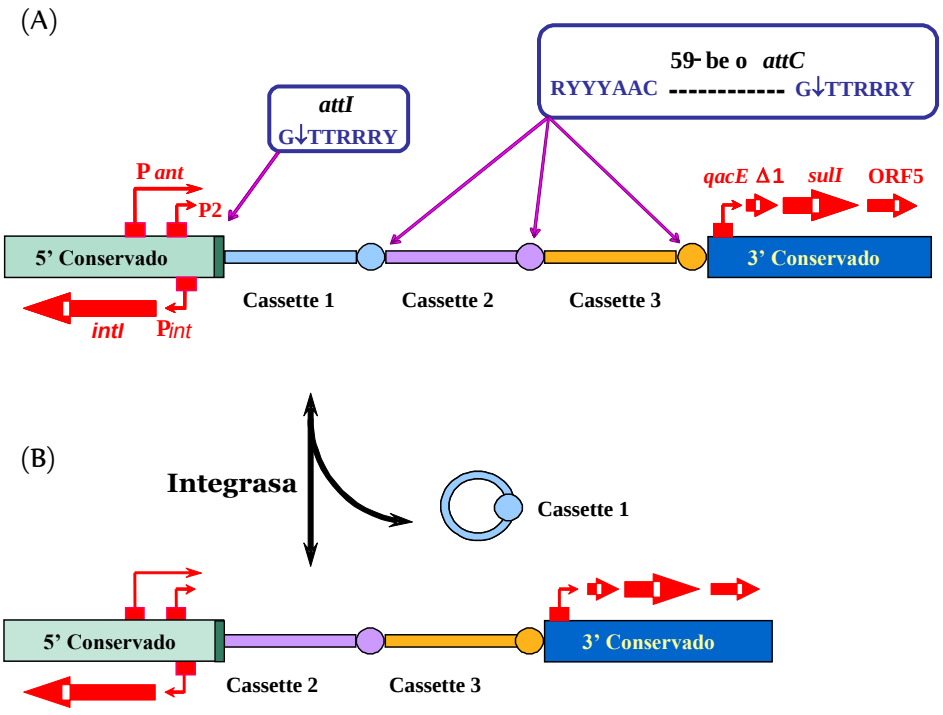


Figura 3. (A) Estructura general de un integrón de clase I. Se muestran las regiones conservadas y de inserción de cassettes génicos. Las flechas muestran la dirección de transcripción. Los elementos de 59 bases (59-be) se indican con círculos. Los sitios de recombinación también son señalados. La localización de los promotores se esquematizan con cuadros rojos; un segundo promotor (P2) para los transcriptos de los genes de resistencia a antibióticos está presente solamente en algunos elementos. (B) Mecanismo de incorporación de cassettes génicos dentro de un integrón. La integrasa reconoce el sitio de unión (59-be) y media la recombinación sitio específica, llevando a la incorporación lineal de un cassette dentro del integrón. El evento inverso lleva a la deleción del cassette, el cual podría integrarse en otro sitio de unión en un sistema multigénico. Adaptado de Rowe-Magnus & Mazel, 1999.

En el segmento conservado 3' se encuentran los genes determinantes de las resistencias a bromuro de etidio y a compuestos cuaternarios de amonio (*qacEΔ1)*, a sulfonamidas (*sulI)* y un marco de lectura abierto (orf5) cuyo producto tiene algunas similitudes con la puromicin-acetiltransferasa (Sundström y col., 1988; Stokes & Hall, 1989; Bissonette & Roy, 1992; Paulsen y col., 1993). Los genes integrados, que comúnmente confieren resistencia a antibióticos, son parte de un cassette móvil discreto formado por el gen y un sitio de recombinación conocido como elemento de 59 bases (59-be o sitio *attC*), localizado en el extremo 3' del gen. Los 59-be son repeticiones imperfectas, invertidas y cortas reconocidas por la integrasa, cuya longitud y secuencia varían considerablemente (de 57 a 141 pb), estando las similitudes restringidas a sus extremos, que corresponden al sitio core inverso (RYYYAAC) y al sitio core (G↓TTRRRY, siendo ↓ el punto de recombinación) (Figura 3A). Los cassettes son unidos en *attI*, el sitio de recombinación primaria. Ensayos que permitieron la formación sitio-específico de plásmidos cointegrados (Martinez & de la Cruz, 1990) y su resolución (Hall y col., 1991) demostraron que IntI cataliza esta recombinación (Figura 3B).

Los cassettes son insertados en la misma orientación de expresión y generalmente no contienen una región promotora, por lo cual su expresión depende del promotor común P_{ant}. Esta región tiene gran similitud con el promotor consenso de *E. coli* (Cameron y col., 1986; Hall y col., 1991**)**. La presencia de este promotor fue demostrada primeramente por inactivación insercional en el

plásmido R388 como el responsable de la transcripción del gen *dhfrII* (Swift y col., 1981), y por mapeo con la nucleasa S1 del transcripto del gen bla_{OXA-2}, asociado a un integrón, en el plásmido R46 (Mossakowska y col., 1989).

1.6. Integrones en *V. cholerae*

Se han descripto tres clases principales de integrones, que presentan características diferenciales (secuencias genéticas codificantes de sus respectivas integrasas, sitio único de reconocimiento *attI*) (Bennett, 1999). La **clase 1** agrupa a la mayoría de los integrones encontrados en los aislamientos clínicos. Estos elementos constituyen los integrones más detalladamente estudiados y son el único grupo para el cual se ha probado experimentalmente el movimiento de los cassettes génicos (Figura 3). Los integrones de **clase 2** fueron encontrados sobre el transposón Tn*7* y elementos relacionados. El integrón encontrado sobre Tn*7* posee tres cassettes génicos integrados adyacentes al gen codificante de una integrasa defectiva y, además, carece de la región 3' conservada (Sundström y col., 1991). Un único integrón de **clase 3** ha sido caracterizado hasta el presente y presenta similitudes con los de clase 1, siendo la mayor diferencia entre ambos, además de la integrasa, la secuencia del sitio *attI* (Arakawa y col., 1995; Collis y col., 2002). En aislamientos de *V. cholerae* se describieron integrones de clase 1 (Falbo y col., 1999; Dalsgaard y col., 2000). Además, de la secuenciación del genoma de *V. cholerae*, se

confirmó la presencia de un mega-integrón localizado en una significativa porción de su cromosoma 2 (integrón de **clase 4**). Esta región está caracterizada por la presencia de muchas secuencias de 123-126 pb con un alto grado de identidad entre si, denominadas "*V. cholerae* repeats" (VCRs) (Barker y col., 1994). La organización de los genes con VCRs es idéntica a la de los cassettes encontrados en integrones multirresistentes: en general los VCRs flanquean genes simples o en algunos casos pares de genes, todos los VCRs están en la misma orientación unos de otros, cada VCR presenta una simetría imperfecta que comienza con un sitio core inverso y termina con un sitio core idéntico al consenso GTTRRRY de los cassettes de integrones, y el sitio core inverso es siempre complementario al sitio core que se encuentra en posición 3' del VCR (Figura 4). Además, se identificó un gen codificante de una integrasa (*intI4*) que comparte un 45-50% de identidad con las otras tres detectadas en los integrones de clase 1, 2 y 3, clasificándose a este mega-integrón como un integrón de clase 4 (Mazel y col., 1998).

La mayoría de los 216 marcos de lectura abiertos descriptos en la región VCR no han mostrado homología con alguna secuencia conocida, y solo tres parecen estar involucradas en la resistencia a drogas (cloranfenicol acetiltransferasa, proteína de resistencia a fosfomicina y glutation transferasa). También se detectaron genes codificantes para varias enzimas del metabolismo de ADN (Mut T, transposasa y una integrasa), genes de virulencia potencial (hemaglutinina y lipoproteínas) y tres genes que codifican productos similares a "proteínas de

adicción al huésped" (*higA*, *higB* y *doc*), las cuales son empleadas por los plásmidos para su propio mantenimiento dentro de la célula huésped (Heidelberg y col., 2000). Hasta el presente no se han descripto en esta región genes que codifiquen para ß-lactamasas.

Se demostró que cassettes génicos que poseen VCRs fueron substrato para la integrasa de clase 1 de integrones (Mazel y col., 1998) y además, en pruebas *in vitro*, fue confirmada la actividad para promover la recombinación sitio-específico de cassettes por parte de IntI4 (Rowe-Magnus y col, 2001). Si bien, desde su relativamente reciente caracterización, los integrones tomaron gran relevancia como elementos captadores de genes de resistencia a antimicrobianos, esta función podría haberse generado a partir del inicio del uso de estas drogas. De estudios con cepas del género *Vibrio* de la era pre-antibiótica (incluidos aislamientos del año 1888) se desprenden evidencias que apoyan la hipótesis que los mega-integrones podrían haber sido (y ser) captadores y dispersadores de genes asociados con la patogenicidad (toxinas estables al calor, hemaglutininas, lipoproteínas) (Mazel y col., 1998).

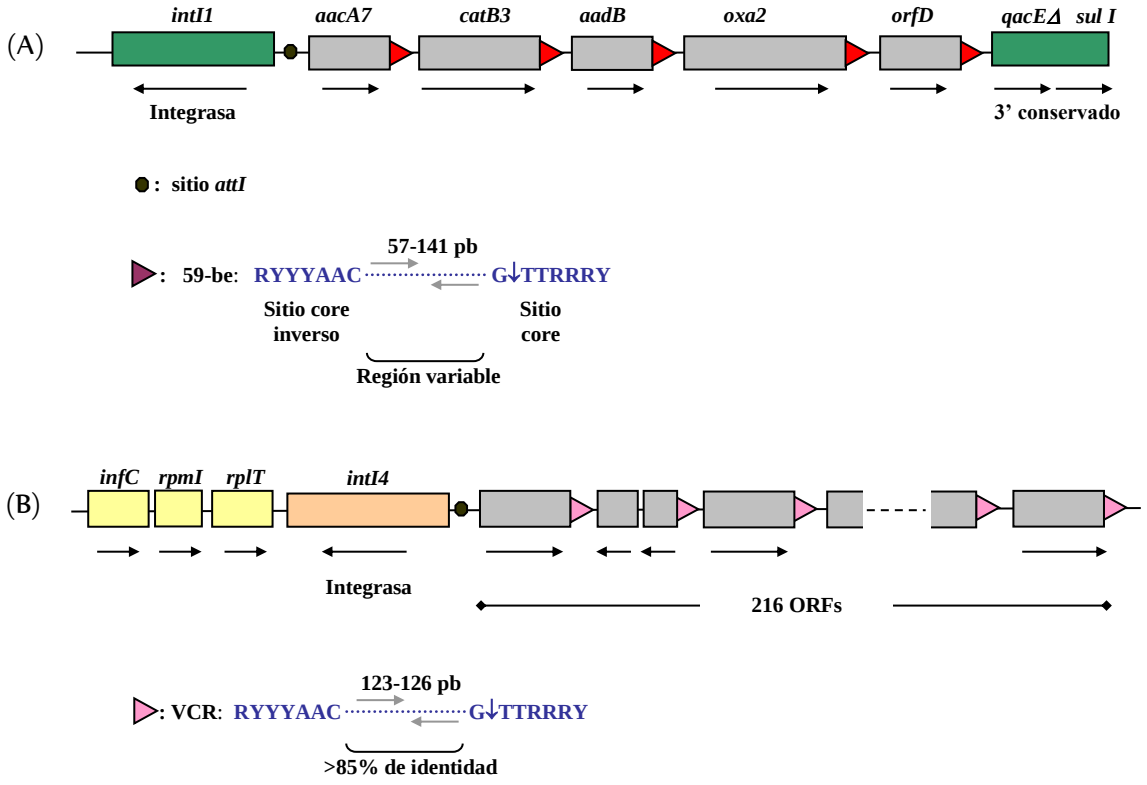


Figura 4. Comparación estructural de (A) un integrón "clásico" y (B) del mega-integrón de *V. cholerae.* (A) Representación esquemática del integrón de resistencia a antibióticos In30; los genes que pertenecen a cassettes génicos (rectángulos grises) están asociados con 59-be (triángulos rojos) de secuencia variable; se muestran las secuencias consenso de las mismas. En verde, los genes no-móviles de los integrones de clase 1. (B) Los marcos de lectura abiertos (ORF) están separados por secuencias altamente homólogas, los VCRs (triángulos rosa). Los rectángulos amarillos representan genes codificantes de proteínas ribosomales y factores de transcripción. Las flechas negras indican la dirección de transcripción. La simetría imperfecta presente tanto en los 59-be como en los VCRs están simbolizados por flechas grises. Adaptado de Mazel y col., 1998.

Se supone, a partir de las similitudes estructurales y funcionales mencionadas con anterioridad, que los integrones podrían haberse originado de estos super-integrones encontrados en diferentes especies de *Vibrio* (*V. mimicus*, *V. anguillarum* y *V. metschnikovii*), *Pseudomonas* (*P. alcaligenes* y *P. mendocina*) y diversos géneros de proteobacterias (Rowe-Magnus & Mazel, 1999; Mazel & Davies, 1999; Rowe-Magnus y col., 2001).

1.7. Estudios preliminares

Entre los años 1992 y 1998 se remitieron al Servicio Fisiopatogenia, Dpto. Bacteriología, del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. C. G. Malbrán", 845 aislamientos de *V. cholerae* no O1, no-O139 provenientes de diferentes muestras (447 de agua, 370 de materia fecal, 9 ambientales y 19 de alimentos) tomadas en distintas provincias de nuestro país. La identificación y serología fue realizada por el Servicio Enterobacterias de dicha institución. A fin de definir el perfil de resistencia presente en este grupo bacteriano, en nuestro Servicio se estudiaron, mediante el método de difusión por discos, 669 cepas (359 de agua, 303 de muestras de materia fecal y 7 de alimentos) provenientes de Capital Federal (n=6) y de 15 provincias (86 de Bs. As., 3 de Chaco, 12 de Córdoba, 4 de Entre Ríos, 125 de Jujuy, 1 de La Pampa, 62 de Mendoza, 2 de Neuquén, 13 de Río Negro, 176 de Salta, 17 de San Juan, 8 de San Luis, 10 de Santa Fe, 1 de

Santiago del Estero y 143 de Tucumán), aisladas entre enero de 1993 y mayo de 1998. Aproximadamente un 30 % de este total mostró el fenotipo no-sensible a ampicilina (categorías resistente más sensibilidad intermedia, AMP^{NS}). A fin de caracterizar el mecanismo enzimático que confiere este perfil de resistencia, se estudiaron 115 de esos *V. cholerae* no-O1, no-O139 AMP^{NS}.

OBJETIVOS

- Analizar la presencia de ß-lactamasas en los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 AMP^{NS} e identificarlas.

- Caracterizar el mecanismo de resistencia a antibióticos ß-lactámicos de mayor prevalencia entre los aislamientos en estudio.

CAPÍTULO 2

MATERIALES y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Se estudiaron 115 aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 que presentaron el fenotipo AMP^{NS}, detectados en nuestro Servicio a partir de un screening inicial realizado sobre un total de 669 aislamientos mediante difusión por discos. Las cepas fueron conservadas en caldo tripticasa-soya con 15% de glicerol a -70°C. La cepa de *V. cholerae* no-O1, no-O139 (denominada ME11762), aislada de una muestra de agua del Canal Capilla, Mendoza, Argentina, se empleó en los ensayos de clonado y secuenciación del determinante de resistencia en estudio. La cepa Pesc37 fue utilizada como control en los análisis de sensibilidad. *E. coli* ER1793 resistente a ácido nalidíxico (Nal^R) fue empleada como cepa receptora en ensayos de conjugación. *E. coli* DH5α fue empleada como huésped de plásmidos recombinantes en los ensayos de clonado.

Los plásmidos pACYC184, que codifica resistencia a tetraciclina y cloranfenicol, y pBGS19, que codifica resistencia a kanamicina (Spratt y col., 1986), fueron empleados como vectores de clonado.

Las células fueron cultivadas en ágar Mueller Hinton (Difco, Becton Dickinson) y LB (agar y caldo) (Sambrook, 1989). En los procedimientos de electroporación se utilizó el medio SOC, el cual contiene:

Triptona	2%
Extracto de levadura	0,5%
Cloruro de sodio	10 mM
Cloruro de potasio	2,5 mM
Cloruro de magnesio	10 mM
Sulfato de magnesio	10 mM
Glucosa	20 mM

2.2. Agentes antimicrobianos y pruebas de sensibilidad

Los antibióticos utilizados fueron obtenidos de los siguientes laboratorios: ampicilina, Bagó; cefoxitina, Merck Sharp & Dohme; cefalotina, Wyeth-Ayerst; piperacilina, Richmond; cefoperazona y sulbactam, Pfizer; ticarcilina, Schering Plough; ácido clavulánico, Smith Kline Beechman; y ácido nalidíxico, Winthrop.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó mediante la técnica de dilución en ágar, de acuerdo a normas internacionales para *V. cholerae*, adoptando los criterios para *Enterobacteriaceae* para otros agentes ß-lactámicos distintos de ampicilina (NCCLS, 2000). El control de calidad se realizó utilizando las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922 y 35218, *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

2.3. Preparación de ß-lactamasas

Los cultivos bacterianos fueron obtenidos en 10 ml de caldo BHI a 35ºC con agitación. Las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en 0,5 ml de buffer fosfato 10 mM, pH 7,0. La suspensión celular se sometió a sonicación a 4ºC (2 pulsos de 45 s a 20 Hz, separados por un intervalo de 30 s, empleando un Vibra Cell Sonifier, Sonics and Materials Inc., Danbury, U. S. A.) con una posterior centrifugación (10 min, 17,000 × g, a 4ºC) para eliminar los detritos celulares. El sobrenadante se empleó en los ensayos de isoelectroenfoque analítico.

2.4. Isoelectroenfoque (IEF) analítico

Los extractos crudos de ß-lactamasas fueron analizados en geles de poliacrilamida de amplio espectro (Ampholine PAGplate, pH 3,5 a 9,5; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) utilizando un aparato Multiphor II (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las bandas de ß-lactamasas fueron visualizadas por el método iodométrico (Labia & Barthélémy, 1979), cubriendo el gel de poliacrilamida, una vez finalizada la corrida, con un sobregel que contiene el sistema yodo-almidón. Para detectar las bandas

producidas por actividades de ß-lactamasas se realizaron revelados suplementando el sobregel con penicilina (0,1 mg/ml) más cefaloridina (1 mg/ml) como substratos. Para los procedimientos de inhibición de ß-lactamasas, el gel fue cubierto con papel de filtro impregnado con 1 mM EDTA, oxacilina, aztreonam, ácido clavulánico o sulbactam, y se incubó por 10 min a temperatura ambiente antes del revelado descripto anteriormente. Como patrones se emplearon ß-lactamasas de punto isoeléctrico (pI) conocido: TEM-12 (pI 5,25), TEM-1 (pI 5,4), TEM-10 (pI 5,57), SHV-2 (pI 7,6), P99 (pI 7,8), CTX-M-2 (pI 7,9) y SHV-5 (pI 8,2).

2.5. Ensayos de conjugación

Las cepas dadora y receptora fueron mezcladas sobre ágar Mueller-Hinton en una relación 5 a 1 e incubadas por 18 h a 25ºC (Barja y col., 1990) o 35ºC (Rice & Bonomo, 1996). Para seleccionar las células transconjugantes se empleó ágar Mueller-Hinton suplementado con ácido nalidíxico (50 µg/ml) y AMP (8 µg/ml).

2.6. Manipulación de ADN

El ADN total y el plasmídico fueron extraídos y purificados empleando equipos comerciales (Wizard Genomic DNA Purification Kit y Wizard Minipreps DNA Purification System, Promega, Madison, U.S.A., respectivamente). Las enzimas de restricción y la ligasa fueron adquiridos de Gibco BRL (Gaithersburg,

MD, USA). El ADN total fue parcialmente digerido con *Sau*3A I y los fragmentos se ligaron con el vector pACYC184, linealizado con *Bam*H I, de acuerdo a protocolos descriptos previamente (Sambrook y col., 1989). Con esta ligación se transformaron, mediante electroporación, células competentes de *E. coli* DH5α (ver más adelante). Para la selección de cepas recombinantes, se utilizaron placas de agar Mueller-Hinton suplementado con AMP (16 μg/ml) y cloranfenicol (CMP, 50 μg/ml).

Electroporación. Las células *E. coli* DH5α competentes utilizadas en este trabajo se prepararon de la siguiente forma: un litro de caldo LB se inoculó con 1 ml de un cultivo de 16 hs y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600} = 0,5-1,0. El cultivo resultante se incubó en hielo durante 15-30 min. y posteriormente las células se aislaron estérilmente por centrifugación a 4000 x g durante 15 min. Se eliminó totalmente el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 l de agua destilada estéril a 4°C. Se centrifugó en igual forma que en el paso anterior y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 500 ml de agua destilada estéril a 4°C, nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 10 ml de glicerol 10% (v/v) estéril a 4°C. Se centrifugó en iguales condiciones que en el paso anterior y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 2-3 ml de glicerol 10% (v/v) estéril a 4°C. La

concentración de células resultantes es de 1-3 x10^{10} cél/ml. Se distribuyeron en alícuotas de 40-80 µl y se congelaron a -70°C hasta su uso.

La cepa *E. coli* DH5α competente se electrotransformó con ADN plasmídico empleando un electroporador (Gene Pulser II Electroporation System, Bio-Rad). La capacitancia, resistencia interna del regulador de pulso y el voltaje aplicado fueron de 25 µF, 200 Ω y 2,5 kV, respectivamente. Las mezclas plásmido-células se colocaron en cubetas de electroporación (separación de electrodos: 0,2 cm) preenfriadas. Inmediatamente después del pulso eléctrico, se le agregó 1 ml de medio SOC y se incubó a 37°C con agitación por 1 hora para permitir la recuperación de las células dañadas. Transcurrido ese tiempo, las células se plaquearon en ágar Mueller-Hinton que contenía ampicilina (16 µg/ml) más cloranfenicol (50 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml), dependiendo el vector de clonado empleado, y se incubaron a 37°C durante 16 hs.

2.7. Hibridación (dot blot)

Para el screening inicial e identificación del determinante de resistencia a AMP presente en los 115 aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139, ADN total de estas cepas en estudio (aprox. 200 ng), obtenido mediante el método "boiling", fue transferido a membranas de nylon e hibridado empleando sondas específicas de

familias de ß-lactamasas. Estas consistieron en productos de PCR de los genes *bla*$_{TEM-}$, *bla*$_{SHV-}$, *bla*$_{CTX-M-}$, y *bla*$_{PER-}$ (ver abajo) purificados empleando el equipo Wizard PCR Preps DNA Purification Systems (Promega, Madison, U.S.A.) y marcadas con digoxigenina, utilizando el equipo Dig DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Las hibridaciones se realizaron a 68ºC en un horno de hibridación (Hibridization Incubator, Lab-Line Instruments) durante 16 hs y el revelado se realizó siguiendo las instrucciones incluidas en el equipo de marcación empleado.

2.8. Amplificación por PCR

Para los ensayos de PCR realizados en la etapa de screening e identificación del determinante de resistencia a AMP, se emplearon primers específicos para las familias de ß-lactamasas *bla*$_{TEM-}$, *bla*$_{SHV-}$, *bla*$_{CARB-}$ (Arlet & Philippon, 1989), *bla*$_{CTX-M-}$ y *bla*$_{PER-}$ (Petroni y col., 2002). También se emplearon los primers específicos para el cluster génico codificante del ARN ribosomal 16S, cuya amplificación funciona como control positivo de extracción de ADN de una cepa dada (Greisen y col., 1994). Las mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 50 µl que contenía 20 pmoles de cada primer (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 25 µM de cada dNTP; 1,5 mM de $MgCl_2$ y 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Promega, Madison, U.S.A.). El ADN molde se preparó mediante el método “boiling”,

empleándose 5 µl por reacción. Las amplificaciones se realizaron en un ciclador térmico Biometra, empleando un programa consistente de un paso inicial de desnaturalización de 10 min a 94°C, 25 ciclos con pasos de desnaturalización (30 s a 94°C), annealing (30 s a 55°C) y extensión (30 s a 72°C), y un paso final de extensión de 5 min a 72°C.

El ADN molde a emplearse en la secuenciación del gen codificante de la ß-lactamasa en estudio se obtuvo mediante ensayos de PCR. Para ello, se emplearon primers universales (M13/pUC Forward and Reverse 23-base Sequencing Primers), que se unen a la región de policlonado del vector pBGS19, en las regiones adyacentes al sitio donde fue ligado el fragmento de ADN en estudio. El programa empleado en el ciclador térmico fue semejante al descripto anteriormente, pero empleando una temperatura de "annealing" de 60°C durante 45 s por ciclo. Una PCR semi-nested fue realizada empleando las mismas condiciones, utilizando los primers forward PD (5'-CTCTGATGCATGCCTTGCTACT-3') y reverse P3+ (5'-GCCTTATCAACGCGACTGTGAT-3') en el primer round de amplificación, y los primers forward PD y reverse P2+ (5'-GGCGTTGTCGTATCCCTCAAAT-3') en el segundo round. Un microlitro del producto de amplificación obtenido en el primer round se empleó como ADN molde para el segundo round. Los productos de amplificación obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa al 1,5% preteñido con bromuro de etidio.

2.9. Secuenciación de ADN y análisis de secuencias

La secuenciación bidireccional se realizó por el método de Sanger (Sanger y col., 1977), empleando la metodología de los terminadores BigDye (Applied Biosystem/Perkin Elmer, Foster City, California, USA), según las condiciones de reacción especificadas por los fabricantes. Se utilizaron primers universales y basados en la secuencia obtenida, los cuales, además de P2+, P3+, PD mencionados anteriormente, fueron los siguientes: P1, 5'-GGGCAACCCGTATTGAGATCACA-3'; P2-, 5'-GCCTGCATTGGTCAGTTCATAGGT-3'; P3-, 5'-CCGAGGCTTCAATGGCAGAA-3' y P4, 5'-TGCGCGAGGTTAGTGTTGTTG-3'. Las secuencias se analizaron en un ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem/Perkin Elmer, Foster City, California, USA). Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas y proteicas se realizaron mediante el programa CLUSTAL, incluido en el software PCGENE (Intelligenetics, Inc.).

La secuencia nucleotídica del gen *bla*$_{\text{CARB-7}}$ y de sus regiones adyacentes posee el número de acceso AF409092 de GenBank.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Sensibilidad a los antibióticos

Las CIM a diferentes antibióticos β-lactámicos de los 115 aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 AMP^{NS} sugieren una fuerte actividad de estos aislamientos sobre carboxipenicilinas (Tabla 1). No se observaron diferencias significativas entre los perfiles de resistencia entre áreas geográficas o fuentes de aislamiento. Los resultados de las CIMs (μg/ml) de los aislamientos ME11762 y Pesc37 fueron los siguientes: AMP, 256 y 0,5; AMP-sulbactam, 16 y 1; ticarcilina, 512 y 0,25; ticarcilina-ácido clavulánico, 8 y 0,25; cefalotina, 2 y 0,25; piperacilina, 32 y 0,25 y cefoxitina, 8 y 1, respectivamente.

Tabla 1. Sensibilidad de los aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 AMP^{NS} (n=115) mediante el método de dilución en ágar (μg/ml).

	AMS	CTN	PIP	TIC	TIM	CXT
CIM 50	4	0.25	8	128	0.5	1
CIM 90	8	2	16	256	4	8
RANGO	0,5-64	0,12-16	0,12-64	0,12-1024	0,016-16	0,5-32

AMS: ampicilina/sulbactam; PIP: piperacillin; TIC: ticarcillin; TIM: TIC/ácido clavulánico; CXT: cefoxitin

3.2. Identificación del determinante de resistencia

Del total de aislamientos estudiados, 37 cepas (19 provenientes de muestras de agua y 18 de heces), presentaron una única banda activa con un pI 5,2 cuando el gel fue revelado mediante el método iodométrico (líneas 5 y 6, figura 5); otras 77 cepas (53 provenientes de muestras de agua y 24 de heces), mostraron una única banda activa con un pI 5,4 (líneas 2 y 3, figura 5); un solo aislamiento, proveniente de heces, exhibió una única banda activa con un pI 7,8. Estas enzimas con actividad de ß-lactamasas no fueron inhibidas con EDTA, oxacilina o aztreonam, pero mostraron inhibición con sulbactam o ácido clavulánico (datos no mostrados). Sin embargo, las hibridaciones con sondas específicas para las familias génicas *bla*$_{\text{TEM-}}$, *bla*$_{\text{SHV-}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-}}$, y *bla*$_{\text{PER-}}$, y las amplificaciones con primers específicos para las familias génicas *bla*$_{\text{CARB-}}$, *bla*$_{\text{TEM-}}$, *bla*$_{\text{SHV-}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-}}$, y *bla*$_{\text{PER-}}$ fueron negativas. Con el objetivo de caracterizar a nivel nucleotídico el determinante de resistencia a AMP de presencia mayoritaria en el grupo bacteriano en estudio (ß-lactamasa con pI 5,4), se eligió un aislamiento, denominado ME11764, para realizar dicho trabajo.

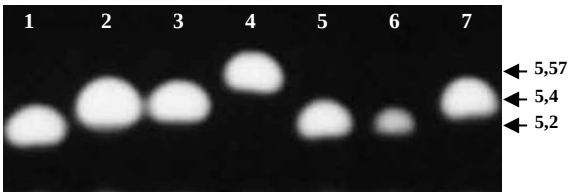


Figura 5. IEF de ß-lactamasas. Líneas 2, 3, 5 y 6, aislamientos de *V. cholerae* no-O1, no-O139 AMP^{NS}; línea 1, TEM-12 (pI 5,25); línea 4, TEM-10 (pI 5,57); línea 7, TEM-1 (pI 5,4);. El gel fue revelado utilizando penicilina más cefaloridina. Los números a la derecha indican los valores de pI de las ß-lactamasas conocidas.

3.3. Transferencia de la resistencia por conjugación

Para analizar si el determinante de resistencia en estudio se hallaba sobre un plásmido conjugativo, se realizaron ensayos entre el aislamiento ME11762 como cepa dadora y *E. coli* ER1793 Nal^R como receptora. A pesar de varios intentos, que incluyeron ensayos a diferentes temperaturas (25ºC o 37ºC), no se obtuvieron cepas transconjugantes.

3.4. Clonado y secuenciación del determinante de resistencia a ampicilina

Se preparó una biblioteca genómica-*Sau*3A I del aislamiento ME11762 como se indica en Materiales y Métodos. Las cepas transformantes de *E. coli* DH5α portadoras de plásmidos recombinantes fueron seleccionadas con AMP más CMP. Los plásmidos de varias colonias resistentes a esta combinación de antibióticos fueron analizadas y el clon que contenía el plásmido recombinante con el inserto

más pequeño (aprox. 2,2 kb), denominado pGMPS1, fue empleado en los ensayos posteriores (Figura 6A). Como estrategia inicial para realizar la secuenciación del gen codificante de la resistencia a AMP, un fragmento *Sal* I – *Eco*R V proveniente del pGMPS1 (aprox. 2,7 kb, que incluyeron 0,5 kb del vector pACYC184 empleado en el clonado inicial) fue subclonado en forma dirigida en los sitios *Sal* I- *Sma* I del vector pBGS19, produciendo el plásmido pGMPS2 (Figura 6B). Desde este plásmido recombinante se obtuvieron 3 fragmentos *Sac* I- *Hin*d III, que fueron subclonados sobre el mismo vector y secuenciados (Figura 6B). Para superponer las secuencias de los extremos internos de estos fragmentos, se secuenciaron ambas cadenas de un producto de PCR obtenido con los primers P2+ y P2-. Además, la secuenciación de este fragmento directamente amplificado del cromosoma de ME11762 permitió descartar rearreglos de los fragmentos *Sau*3A I producidos durante la construcción de la biblioteca genómica. El fragmento de ADN clonado resultó en una secuencia de 2214 nucleótidos que contenía un marco de lectura abierto (ORF1) de 867 nucleótidos (Figuras 6C y 7).

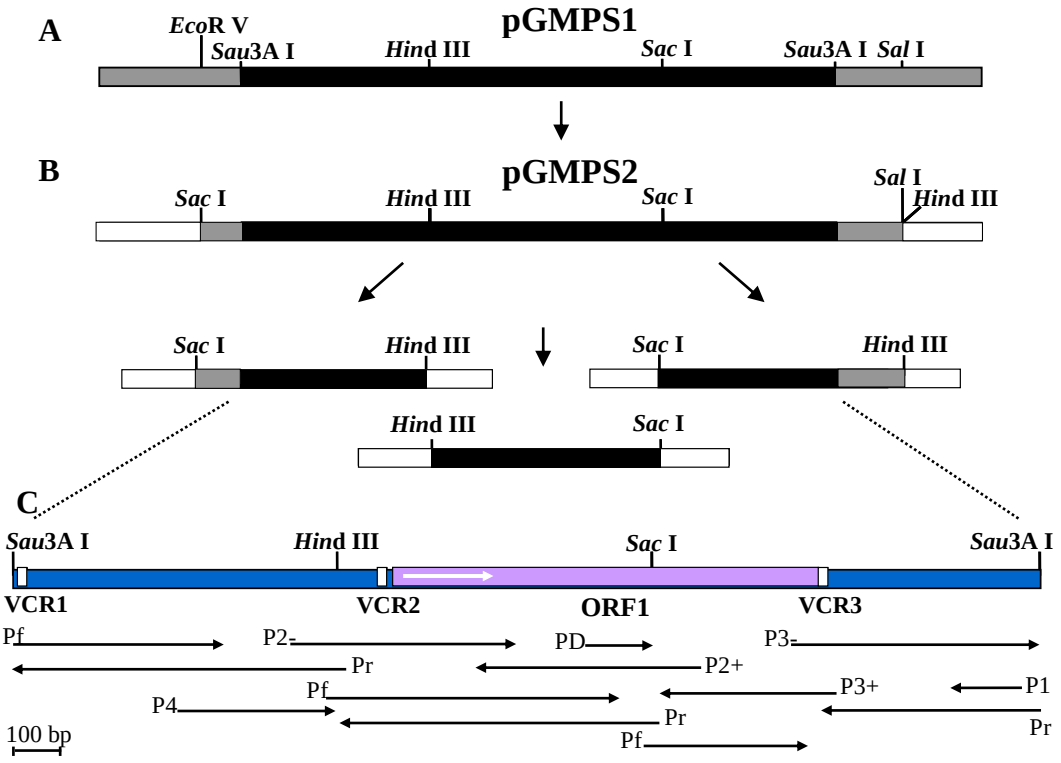


Figura 6. Estrategia empleada para secuenciar el determinante de resistencia a ampicilina (ORF1) y las regiones flanqueantes. (A) Mapa de restricción del fragmento *Sau*3A I de la cepa ME11762 (rectángulo negro); solo se indican los sitios *Sau*3A I de los extremos. Los rectángulos grises indican ADN correspondiente al vector pACYC184. (B) El inserto del plásmido recombinante pGMPS1 se liberó por digestión con *Sal* I-*Eco*R V y fue subclonado en los sitios *Sma* I-*Sal* I del vector pBGS19 (rectángulos blancos), generándose el plásmido recombinante pGMPS2; los rectángulos grises representan aprox. 500 pb pertenecientes al vector pACYC184. Los insertos de los plásmidos derivados de pGMPS2 fueron secuenciados. (C) El gen en estudio y las regiones de ADN flanqueantes. El sentido, longitud y los primers empleados para cada reacción de secuenciación están indicados por flechas negras. Pf y Pr, primers universales forward y reverse. El rectángulo lila representa al ORF1; la flecha blanca, su orientación traduccional; los rectángulos azules representan los fragmentos flanqueantes y los blancos, las secuencias VCR. Se indican los sitios de restricción utilizados para el subclonado en el vector pBGS19.

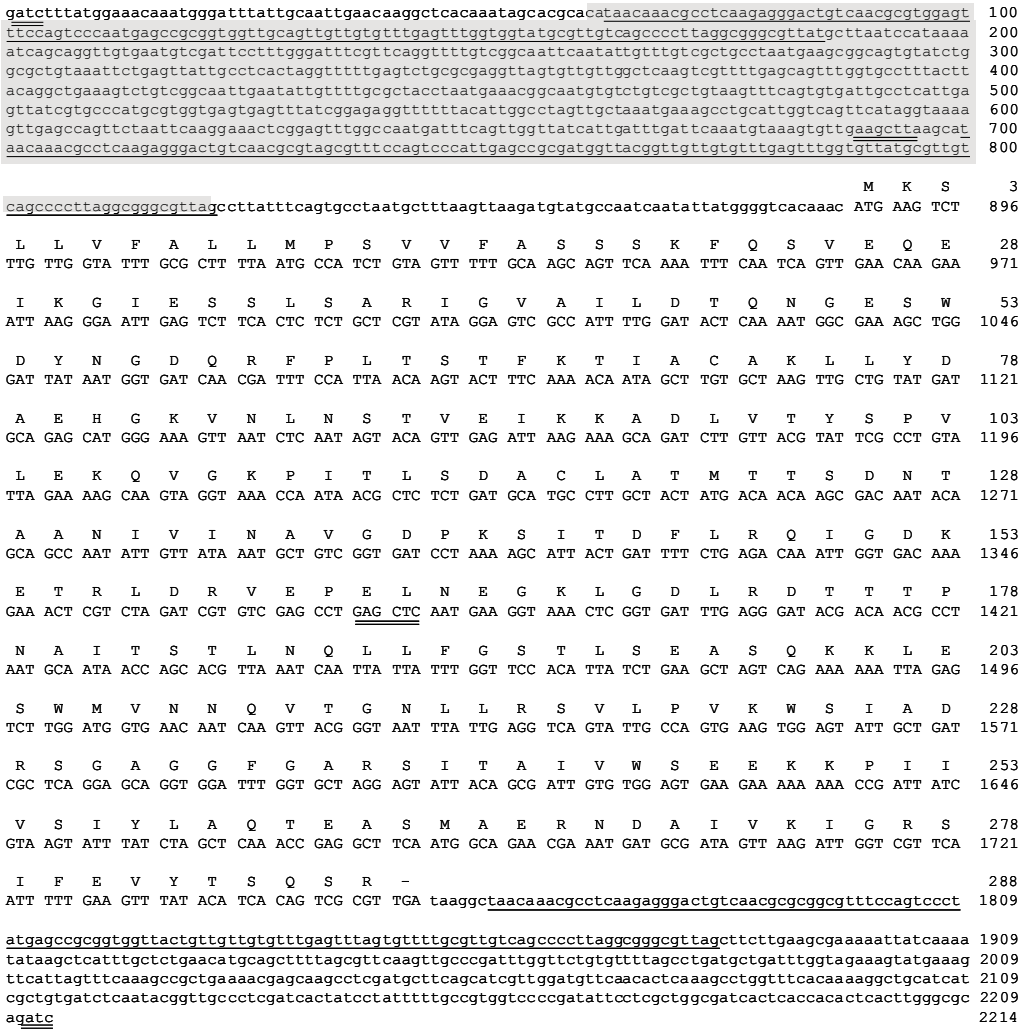


Figura 7. Secuencia nucleotídica del fragmento de 2214 pb clonado en pGMPS2, que contiene a la región codificante de la ß-lactamasa en estudio. Se muestra la secuencia aminoacídica deducida del ORF1. Los VCRs sobre las secuencias flanqueantes del gen en estudio están subrayados. En el rectángulo gris se indica el fragmento del inserto caracterizado que posee alta homología con un fragmento del cromosoma de *V. cholerae* (GenBank AE004376, nucleótidos 7944 a 8706). Los sitios de restricción empleados en el subclonado del gen en estudio están doblemente subrayados.

No se encontraron regiones promotoras ni sitios de unión al ribosoma en el fragmento ubicado upstream respecto al codón de iniciación del ORF1. Su comparación con secuencias presentes en el GenBank mostró una alta identidad nucleotídica (88,8 %) con el gen codificante de la ß-lactamasa CARB-6 y una identidad promedio del 82,5 % con otros genes pertenecientes a la familia CARB-.

La secuencia proteica deducida a partir del ORF1 (288 aminoácidos), mostró un 88,5 % de identidad con CARB-6 (31 aminoácidos de diferencia) y un promedio del 82,4 % con otras enzimas de la familia CARB- (Tabla 2 y Figura 8). Por lo tanto, la nueva proteína identificada en *V. cholerae* no-O1, no-O139 se denominó CARB-7.

Tabla 2. Identidad aminoacídica de CARB-7 con varias ß-lactamasas de clase A relacionadas, pertenecientes a la familia CARB-.

ß-lactamasa	% Identidad					
	CARB-1	CARB-2	CARB-3	N29	CARB-6	CARB-4
CARB-1	----					
CARB-2	99,7	----				
CARB-3	99,3	99,7	----			
N29	97,9	98,2	97,9	----		
CARB-6	93,8	94,1	94,4	93,1	----	
CARB-4	85,1	85,1	85,4	84,7	85,1	----
CARB-7	**83,0**	**83,3**	**83,7**	**83,0**	**88,5**	**78,8**

(Los nros. de acceso a GenBank o a SwissProt de las proteínas alineadas son los siguientes: CARB-1, BLP4_PSEAE; CARB-2, BLP1_PSEAE; CARB-3, BLP3_PSEAE; CARB-4, PAU14749; N29, D86225; CARB-6, AF030945).

La secuencia de CARB-7 contiene los motivos conservados encontrados en las serín-ß-lactamasas: su sitio activo posee una tétrada Ser-Thr-Phe-Lys en posición 70 a 73 de acuerdo al esquema de numeración de Ambler (Ambler y col., 1991), posee las siete regiones conservadas de aminoácidos (Joris y col., 1988) y los residuos conservados específicos (Figura 8).

El alineamiento de secuencias aminoacídicas de 16 enzimas de clase A pertenecientes a diferentes grupos de ß-lactamasas (TEM-, SHV-, CARB-, PER- y CTX-M) mostró un residuo Gly conservado en la posición 139 (Figura 9 y 10). Sin embargo, en la secuencia aminoacídica de CARB-7, se encontró un residuo Asp en dicha posición. Para confirmar este cambio, se diseñó el primer PD, el cual se utilizó junto a P2+ en el segundo round de amplificación en un ensayo de PCR semi nested. La secuencia de ambas cadenas (191 pb) del fragmento PD-P2+ confirmó la presencia de un codón GAT, que codifica para un residuo Asp en posición 139 de la enzima CARB-7. Del dendrograma surgido del alineamiento múltiple se observa que la enzima CARB-7 presenta una mayor homología con la familia CARB- que con otras familias de ß-lactamasas (Figura 10).

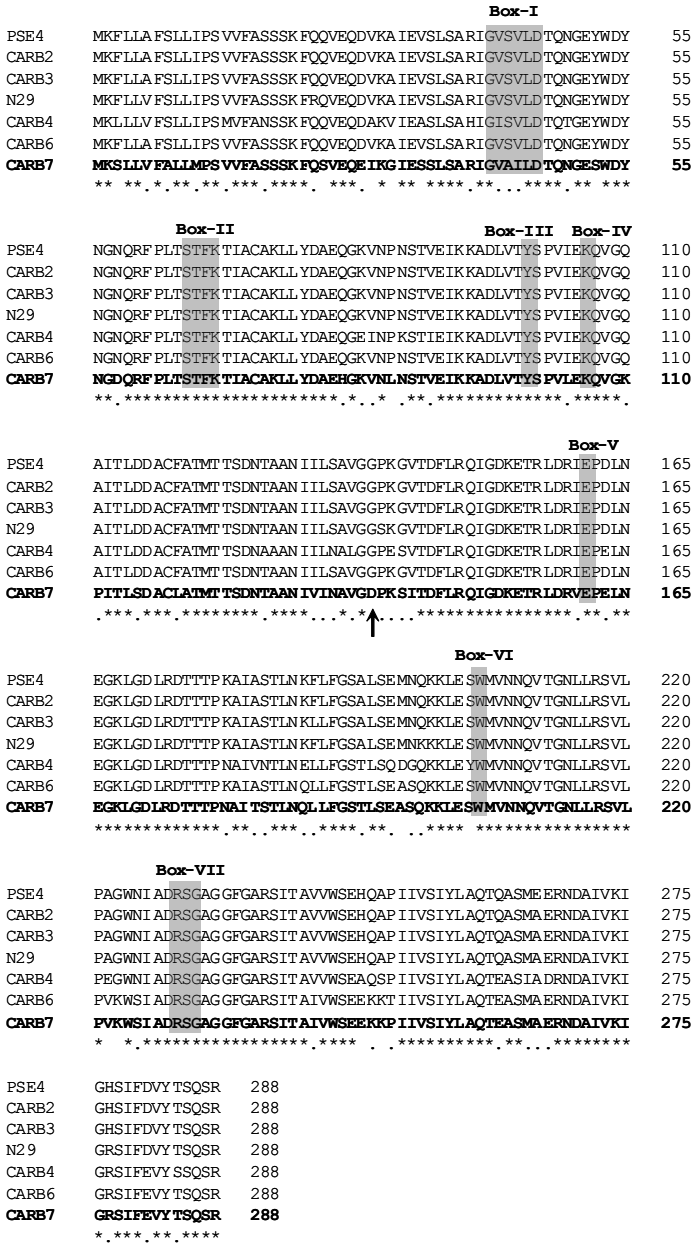


Figura 8. Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de CARB-7 con las de ß-lactamasas de clase A estrechamente relacionadas: CARB-1 (PSE-4), CARB-2, CARB-3, CARB-4, *P. mirabilis* N29 y CARB-6. Los rectángulos grises (I a VII) corresponden a regiones conservadas en todas las enzimas que reconocen penicilina (Joris y col., 1988). La flecha indica el residuo 139, con el cambio G→D. Los asteriscos y los puntos indican residuos idénticos y conservados, respectivamente.

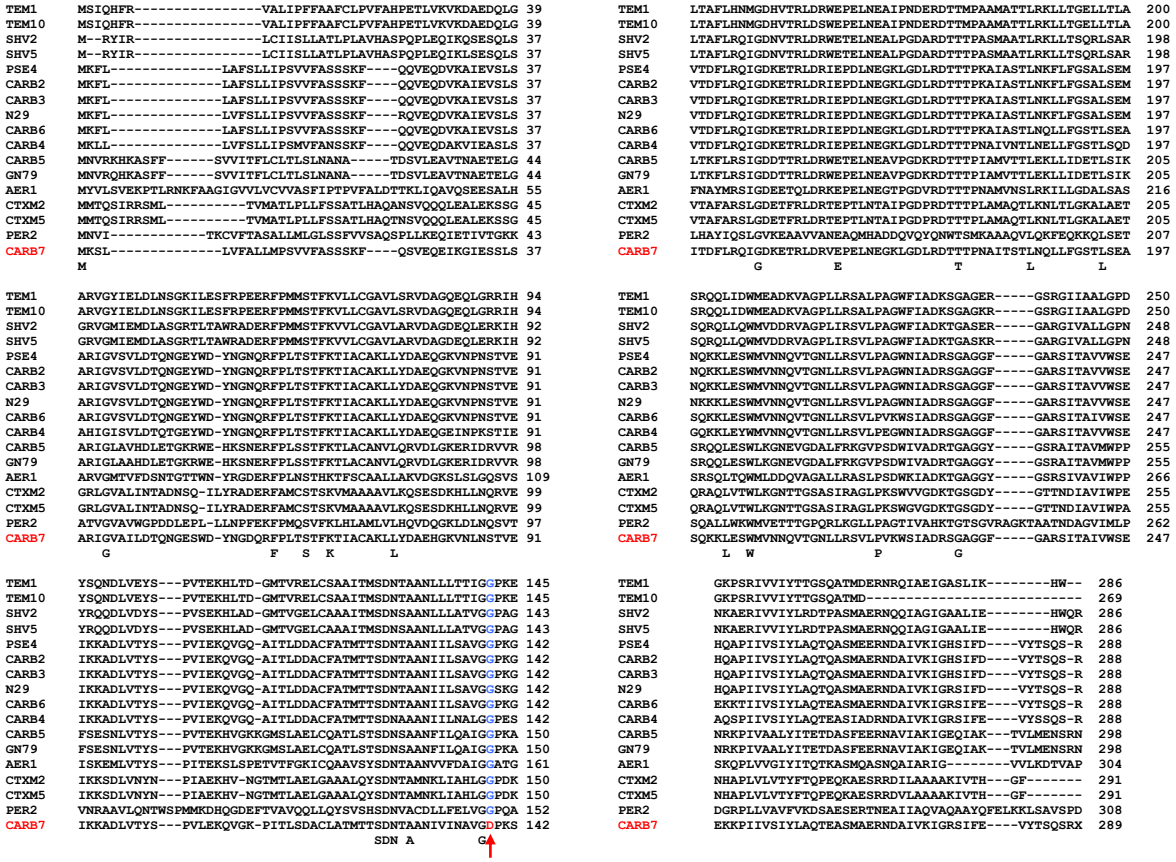


Figura 9. Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de CARB-7 con las secuencias de enzimas de clase A pertenecientes a diferentes familias de ß-lactamasas. Los residuos idénticos están indicados como una secuencia consenso.

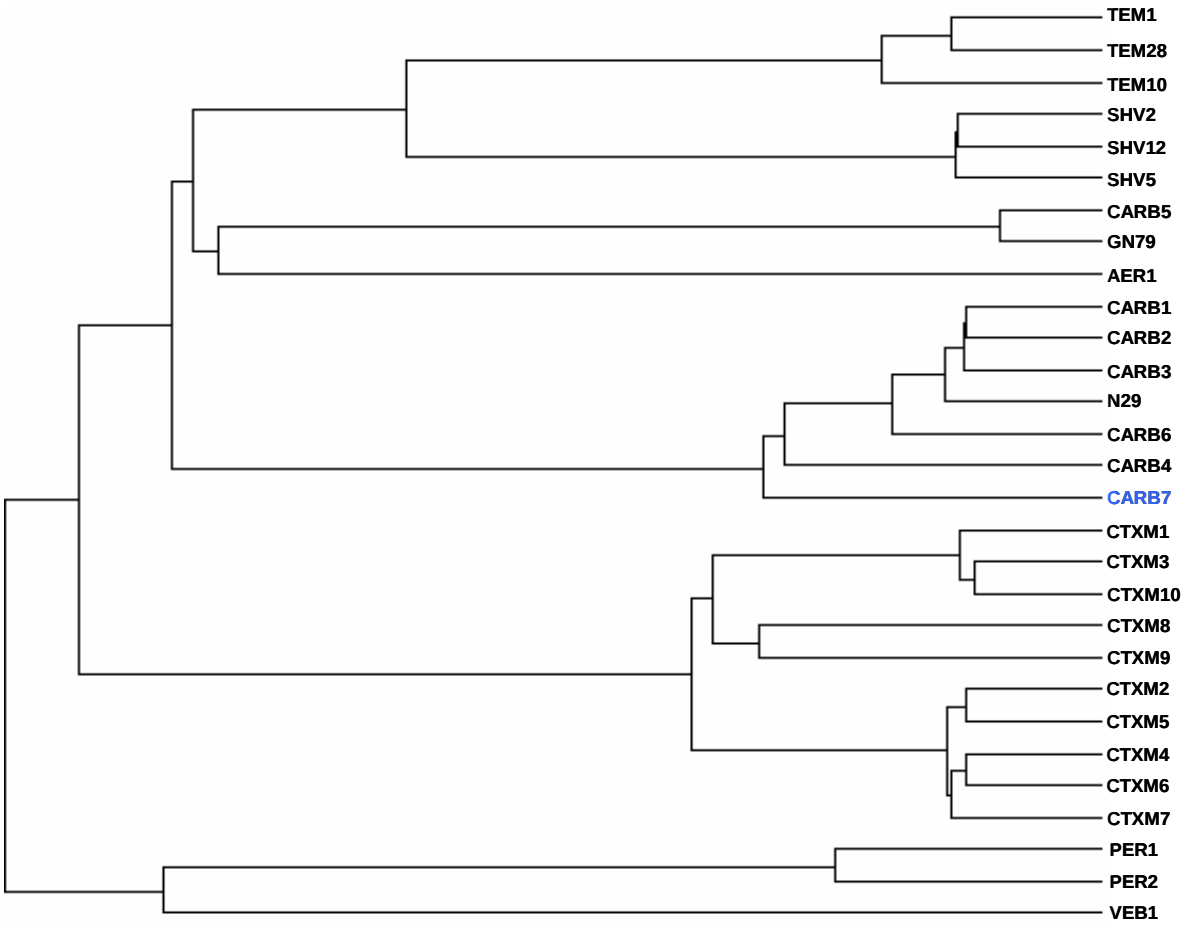


Figura 10. Dendrograma obtenido del alineamiento múltiple de 29 ß-lactamasas de clase A, realizado con el programa CLUSTAL.

3.5. Análisis de las regiones contiguas al gen *bla*$_{\text{CARB-7}}$

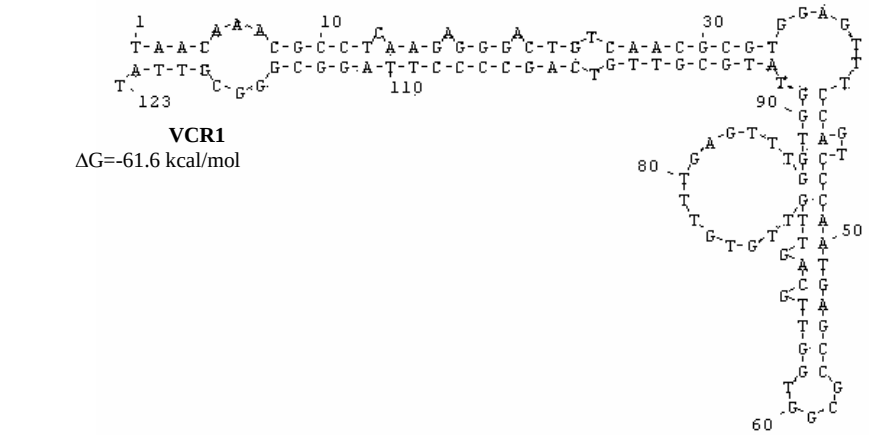
El análisis de las regiones contiguas al gen *bla*$_{\text{CARB-7}}$ (887 nucleótidos upstream y 460 nucleótidos downstream) mostró la presencia de 3 secuencias repetidas de 123 pb, 2 de ellas localizadas sobre el fragmento upstream y la restante

sobre el downstream (Figuras 6C y 7). Las tres secuencias repetidas mostraron una identidad promedio del 97% con la secuencia consenso reportada para los VCRs de *V. cholerae* (Figura 11). Como era de esperar por tan alto grado de identidad, la estructura secundaria predicha de estas 3 secuencias repetidas mostró una conformación de stem-loop con valores de estabilidad de energía libre en un rango de -57,8 y -62,6 kcal/mol, que recuerda claramente el de la secuencia consenso publicada (-58,6 kcal/mol) (Barker y col., 1994) (Figura 12). Los 3 VCRs están en la misma orientación relativa y todos se encontraron por fuera del ORF1.

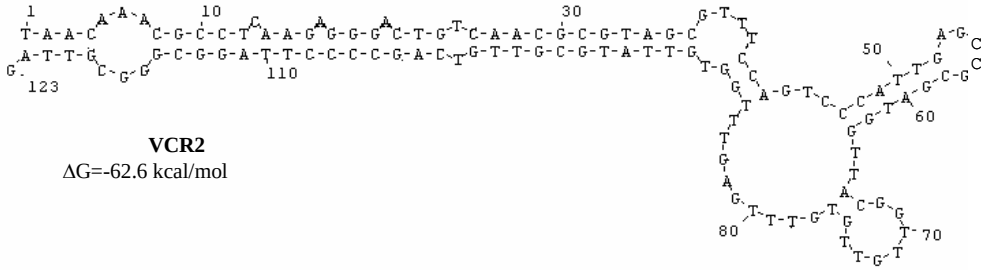
```
VCR1        TAACAAACGCCTCAAGAGGGACTGTCAACGCGTGGAGTTTCCAGTCCCAATGAGCCGCGGTGGTT  65
VCR2        TAACAAACGCCTCAAGAGGGACTGTCAACGCGTAGCGTTTCCAGTCCCATTGAGCCGCGATGGTT  65
VCR3        TAACAAACGCCTCAAGAGGGACTGTCAACGCGCGGCGTTTCCAGTCCCTATGAGCCGCGGTGGTT  65
Consensus   TAACAAACGCCTCAAGAGGGACTGTCAACGCGTGGCGTTTCCAGTCCCATTGAGCCGCGGTGGTT  65
            ********************************  * ************  ********* *****

VCR1        GCAGTTGTTGTGTTTGAGTTTGGTGGTA-TGCGTTGTCAGCCCCTTAGGCGGGCGTTAT  123
VCR2        ACGGTTGTTGTGTTTGAGTTTGGTGTTA-TGCGTTGTCAGCCCCTTAGGCGGGCGTTAG  123
VCR3        ACTGTTGTTGTGTTTGAGTTTAGTGTTT-TGCGTTGTCAGCCCCTTAGGCGGGCGTTAG  123
Consensus   TCGGTTGTTGTGTTTGAGTTTAGTGGTAATGCGTTGCCAGCCCCTTAGGCGGGCGTTAG  124
             * ****************** *** *  ******* ********************
```

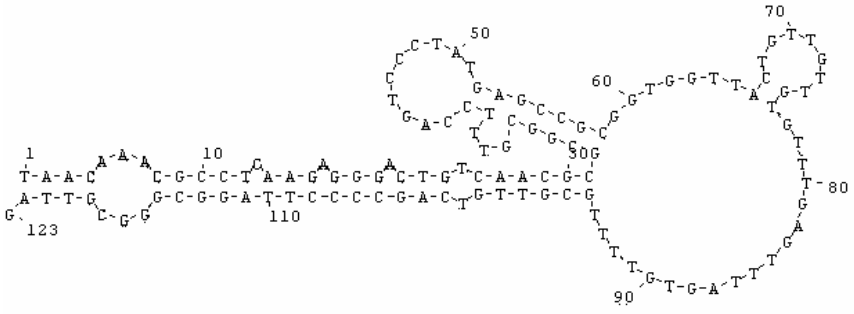
Figura 11. Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica de los 3 VCR encontrados en las regiones flanqueantes del gen $bla_{\text{CARB-7}}$ con la secuencia VCR consenso propuesta (Barker y col., 1994). Las bases idénticas se indican con un asterisco. El alineamiento fue generado con el programa CLUSTAL.



VCR1
ΔG=-61.6 kcal/mol



VCR2
ΔG=-62.6 kcal/mol



VCR3
ΔG=-57.8 kcal/mol

Figura 12. Secuencia nucleotídica de los elementos de 123 pb. Estructuras secundarias propuestas para cada secuencia VCR, determinadas con el software DNASIS v2.5.

Ambas regiones contiguas del gen *bla*$_{\text{CARB-7}}$ fueron comparadas con secuencias del GeneBank. Del fragmento upstream, 762 nucleótidos mostraron una identidad del 93 % con el locus TIGR VCA0424, el cual está incluido dentro de la sección 33 del cromosoma 2 de *V. cholerae* (GenBank AE004376, nucleótidos 7944 a 8706). El fragmento downstream mostró alta homología principalmente con otras secuencias VCR.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Tanto *V. cholerae* O1 como no-O1 son naturalmente sensibles *in vitro* a penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro. Sin embargo, desde 1971, se han descripto aislamientos de *V. cholerae* provenientes de Africa, Asia, Europa y Latinoamérica resistentes a ampicilina (Rahal y col., 1973; Towner y col., 1979; Threlfall y col., 1980; Dupont y col., 1985; Reid & Amyes, 1986; Threlfall y col., 1993; Kruse y col., 1995; Choury y col., 1999). Hasta la fecha han sido identificadas solo tres ß-lactamasas: TEM-1, una ß-lactamasa de amplio espectro, detectada en aislamientos de Asia y Africa (Dupont y col., 1985; Reid & Amyes, 1986); SAR-1, una carbenicilinasa con actividad hidrolítica menor que TEM-1, descripta en dos aislamientos de Tanzania (Reid & Amyes, 1986) y más recientemente, una ß-lactamasa no conjugativa perteneciente al grupo CARB-, denominada CARB-6, que fue caracterizada a partir de una cepa clínica de *V. cholerae* no-O1, no-O139 aislada en Francia (Choury y col., 1999). Además, tambien han sido reportadas cepas de *V. cholerae* productoras de ß-lactamasas de espectro extendido (Rossi y col., 1993; Rossi y col., 1995; Petroni y col., 2002).

En este trabajo se describe la secuencia nucleotídica de una nueva ß-lactamasa aislada de una cepa de *V. cholerae* no-O1, no-O139, la cual posee una identidad promedio del 85,5 % respecto de los genes que codifican para varias

enzimas del tipo CARB-. Además, de todas las secuencias incluidas en el GenBank, solo los genes CARB- mostraron una homología relevante con la secuencia descripta aquí. El perfil de sensibilidad conferido por la nueva ß-lactamasa sugiere una fuerte actividad sobre carboxi-penicilinas, comparable con el fenotipo conferido por las enzimas PSE-1 (CARB-2) o PSE-4 (CARB-1) en *P. aeruginosa* (Livermore, 1995). Por tanto, se propone a la nueva enzima como un miembro de la familia de ß-lactamasas CARB-, y de acuerdo a la nomenclatura empleada para este grupo se la denominó CARB-7.

Aunque inicialmente se creyó que las enzimas de la familia CARB- se encontraban confinadas a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Hedges & Matthew, 1979), algunas de estas ß-lactamasas fueron aisladas de enterobacterias (Medeiros y col., 1982), *Alcaligenes xylosoxidan*s (CARB-2) (Labia y col., 1981) y de un aislamiento de *V. cholerae* no-O1, no-O139 (CARB-6) (Choury y col., 1999). En este estudio, CARB-7 fue aislada de una cepa de *V. cholerae* no-O1, no-O139 perteneciente a un subconjunto de 77 aislamientos resistentes a AMP productores de una ß-lactamasa con un pI=5,4. Por lo tanto, considerando el total de aislamientos en estudio (115), la enzima CARB-7 sería la responsable de la resistencia a AMP en el 67% de los casos. El gen $bla_{\text{CARB-7}}$ no pudo ser transferido por conjugación a la cepa *E. coli* ER1793, a pesar de que se hicieron varios intentos a diferentes temperaturas. Esta característica fue reportada previamente para otras enzimas CARB- (Choury y col., 1999) y podría interpretarse como la localización

del gen *bla*$_{CARB-7}$ sobre un plásmido no conjugativo o sobre el cromosoma. Dos hechos experimentales sugieren fuertemente la localización cromosómica de CARB-7: por un lado, fueron detectadas tres repeticiones de 123-pb sobre la secuencia contigua del gen *bla*$_{CARB-7}$, que mostraron en promedio un 97 % de similitud con la secuencia consenso para VCRs (Barker y col., 1994), los cuales están restringidos a una región de alrededor de un 10 % del cromosoma 2 de *V. cholerae* (Heidelberg y col., 2000). En segundo término, el fragmento upstream del gen *bla*$_{CARB-7}$ mostró un 93 % de identidad con el locus TIGR VCA0424, situado dentro de la sección 33 del cromosoma 2 de *V. cholerae*. La presunción de la localización cromosómica del gen *bla*$_{CARB-7}$ está apoyada por la idea de que la isla VCR funciona como un "mega-integrón". A la fecha, solo trabajos *in vitro* demostraron que la integrasa Intl4 de *V. cholerae* es activa para la recombinación sitio-específica de cassettes (Rowe-Magnus y col., 2001), sin pruebas *in vivo* de este hecho. Así, esta sería la primer evidencia *in vivo* de la captura de un gen por este sistema.

Comparando la secuencia aminoacídica deducida de CARB-7 con las de las ß-lactamasas de las principales familias pertenecientes a la clase A de ß-lactamasas, tales como TEM-, SHV-, CARB-, CTX-M- y PER-, se observó un cambio, Gly a Asp, en posición 139 de la enzima CARB-7 y 144 del esquema de clasificación de Ambler (Figura 9). Este es el primer reporte de esta variante aminoacídica. Como puede inferirse de la estructura cristalográfica reportada de la ß-lactamasa TEM-1, este

cambio estaría localizado lejos del sitio activo de la enzima (Strynadka y col, 1992). La fuerte actividad sobre amino- y carboxi-penicilinas desplegada por CARB-7 apoyaría la hipótesis de que el residuo Asp144 no está involucrado en su actividad enzimática. Sin embargo, los dos residuos Gly en posición 143 y 144 están altamente conservados entre las enzimas de clase A de la clasificación de Ambler. De este modo, este cambio no conservativo de un residuo no polar por uno acídico en la posición 144 de CARB-7 podría implicar un cambio conformacional en la estructura secundaria de la enzima, que adicionalmente podría tener algún significado evolutivo.

A pesar de la alta similitud mostrada por la enzima CARB-7 tanto a nivel nucleotídico como de la secuencia aminoacídica deducida respecto del resto de las ß-lactamasas de la familia CARB-, se observó una baja homología entre *bla*$_{\text{CARB-7}}$ y el primer específico OC-2, descripto por Arlet y Philippon (1989) para la identificación de la familia génica *bla*$_{\text{CARB-}}$. Este hecho explica la carencia de amplificación en los ensayos de PCR realizados en nuestro trabajo preliminar (Mange y col., 2000) y señala la necesidad de diseñar nuevos primers que puedan detectar a este nuevo miembro de la familia CARB-.

Todos los VCR asociados a genes descriptos hasta la fecha son transcriptos desde secuencias promotoras localizadas inmediatamente upstream del marco de lectura al que precede (Clark y col., 1997). En el caso del gen *bla*$_{\text{CARB-7}}$ no se encontraron sitios de unión al ribosoma o regiones promotoras (similares a las

secuencias consenso de *E. coli*). Estos hechos sugieren que la transcripción de este gen sería a través de un promotor localizado más distantemente.

La mayoría de los 216 ORF situados sobre la isla VCR no tienen homología con otras secuencias, encontrándose solo tres productos génicos involucrados en la resistencia a otras drogas diferentes de los antibióticos ß-lactámicos (Heidelberg y col., 2000). De esta manera, este es el primer reporte de una ß-lactamasa dentro de esta región.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Albert, M. J., A. K. Siddique, M. S. Islam, A. S. G. Faruque, M. Ansaruzzaman, S. M. Faruque, and R. B. Sack.** 1993. A large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. Lancet **341:**704.

2. **Amábile-Cuevas, C., and M. Chicurel.** 1992. Bacterial plasmids and gene flux. Cell **70:**189-199.

3. **Ambler, R. P.** 1980. The structure of ß-lactamases. Philos. Trans. R. Soc. London Biol. **289:**321–331.

4. **Ambler, R. P., A. F. W. Coulson, J. M. Frere, J. M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tirabi, and S. G. Waley.** 1991. A standard numbering scheme for the Class A ß-lactamases. Biochem. J. **276:**269–272.

5. **Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato, and M. Ohta.** 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-lactamase gene *bla*$_{IMP}$. Antimicrob. Agents Chemother. **39:**1612–1615.

6. **Argos P., A. Landy, K. Abremski, J. Egan, E. Haggard-Ljungquist, R. Hoess, M. Kahn, B. Kalionis, S. Narayana, L. Pierson III, N. Sternberg, and J. Leong.** 1986. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. EMBO J. **5:**433-440.

7. **Arlet, G., and A. Philippon.** 1989. Construction by polymerase chain reaction and intragenic DNA probes for three main types of transferable ß-lactamases (TEM, SHV, CARB). FEMS Microbiol. Lett. **82:**19-26.

8. **Avery, O., C. MacLeod, and M. MacCarty.** 1944. Studies in the chemical nature of the substance induce transformation in pneumococcal types. J. Exp. Med. **79:**137-159.

9. **Barja, J. L., Y. Santos, I. Huq, R. Colwell, and A. E. Toranzo.** 1990. Plasmids and factors associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. J. Med. Microbiol. **33:**107-114.

10. **Barker, A., C. Clark, and P. Manning.** 1994. Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. J. Bacteriol. **176:**5450-5458.

11. **Beltrán, P., G. Delgado, A. Navarro, F. Trujillo, R. Selander, and A. Cravioto.** 1999. Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. J. Clin. Microbiol. **37:**581-590.

12. **Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, P. Mangold, S. Amann, E. Akalin, Ö. Ang, C. Bal, and J. M. Casellas.** 1996. Characterization of ß-lactamase gene bla_{PER-2} which encodes an extended-spectrum class A ß-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. **40:**616-620.

13. **Bennet, P. M.** 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. J. Antimicrob. Chemother. **43:**1-4.

14. **Bissonette, L., and P. Roy.** 1992. Characterization of Ino of *Pseudomona aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **174:**1248-1257.

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

16. **Cameron, F. H., D. Groot Obbink, V. Ackerman, and R. Hall.** 1986. Nucleotide sequence of the AAD(2") aminoglycoside adenyltransferase determinant *aadB*.

Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388. Nucleic Acid Res. **14:**8625-8635.

17. **Campbell A., D. Berg, D. Botstein, R. Novick, and P. Starlinger.** 1979. Nomenclature of transposable elements in prokaryotes. Gene, **5:**197-206.

18. **Choury, D., G. Aubert, M. Szajnert, K. Azibi, M. Delpech, and G. Paul.** 1999. Characterization and nucleotide sequence of CARB-6, a new carbenicillin-hydrolyzing ß-lactamase from *Vibrio cholerae*. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**297-301.

19. **Clark, C., L. Purins, P. Kaewrakon, and P. Manning**. 1997. Letter, Mol. Microbiol. **26:**1137-1138.

20. **Cole, S.** 1994. *Mycobacterium tuberculosis*: drug-resistance mechanisms. Trends Microbiol. **2:**411-415.

21. **Christina M. Collis, Mi-Jurng Kim, Sally R. Partridge, H. W. Stokes, and Ruth M. Hall.** 2002. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. J. Bacteriol. **184:**3017–3026.

22. **Dalsgaard, A., A. Forslund, O. Serichantalergs, and D. Sandvang.** 2000. Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand. Antimicrob. Agents Chemother. **44:**1315-1321.

23. **Dupont, M., M. Jouvenot, G. Couetdic, and Y. Michel-Briand.** 1985. Development of plasmid-mediated resistance in *Vibrio cholerae* during treatment with trimethoprim-sulfamethoxazole. Antimicrob. Agents Chemoter. **27:**280–281.

24. **Falbo, V., A. Carattoli, F. Tosini, C. Pezzella, A. Dionisi, and I. Luzzi.** 1999. Antibiotic resistance conferred by a conjugative plasmid and a class I integron in *Vibrio*

cholerae O1 El Tor strains isolated in Albania and Italy. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**693-696.

25. **Galas, M. F., F. G. Pasterán, R. G. Melano, A. E. Petroni, G. Lopez, A. C. Corso, M. A. Rossi, and WHONET Collaborative Group.** 1998. 38th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. E109.

26. **Galas, M. F., M. J. Rapoport, F. G. Pasterán, R. G. Melano, A. E. Petroni, P. G. Ceriana, WHONET-Argentina Collaborative Group**, **and M. A. Rossi**. 1999. 39th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1474.

27. **Glass, R. J., M. I. Huq, J. V. Lee, E. J. Threlfall, M. R. Khan, A. Alim, B. Rowe, and R. J. Gross.** 1983. Plasmid-borne multiple drug resistance in *Vibrio cholerae* serogroup O1, biotype El Tor: evidence for a point-source outbreak in Bangladesh. J. Infect. Dis. **147:**204-209.

28. **Greisen, K., M. Loeffelholz, A. Purohit, and D. Leong.** PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. **32:**335-351.

29. **Griffith, F.** 1928. The significance of pneumococcal types. J. Hyg. **27:** 113-159.

30. **Hall, R. M., D. Brookes, and H. Stokes.** 1991. Site-specific insertion of genes into integrons: role of 59-base element and determination of the recombination cross-over point. Mol. Microbiol. **5:**1941-1959.

31. **Hedges, R., J. Vialard, N. Pearson, and F. O'Grady.** 1977. R plasmids from Asian strains of *Vibrio cholerae*. Antimicrob. Agents Chemoter. **11:**585–588.

32. **Hedges, R., and M. Matthew.** 1979. Acquisition by *Escherichia coli* of plasmid-borne ß-lactamases normally confined to *Pseudomonas* spp. Plasmid. **2:**269–278.

33. **Heidelberg, J., J. Eisen, W. Nelson, R. Clayton, M. Gwinn, R. Dodson, D. Haft, E. Hickey, J. Peterson, L. Umayam, S. Gill, K. Nelson, T. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. Fleishmann, W. Nierman, O. White, S. Salzberg, H. Smith, R. Colwell, J. Mekalanos, J. Venter, and C. Fraser.** 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature. **406:**77-483.

34. **Heisig, P., and R. Tschorny.** 1994. Characterization of fluoroquinolone resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. **38:**1284-1291.

35. **Janda, J. M., C. Powers, R. G. Bryant, and S. L. Abbott.** 1988. Current perspective on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. Clin. Microbiol. Rev. **1:**245-267.

36. **Jin, D., and C. Gross.** 1988. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that leads to rifampicin resistance. J. Mol. Biol. **202:**45-58.

37. **Jacobs, C., B. Joris, M. Jamin, K. Klarsov, J. van Beeumen, D. Mengin-Lecreulx, J. van Heijenoort, J. Park, S. Normark, J. Frere, and M. Joris.** 1995. AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. Mol. Microbiol. **15:**553-559.

38. **Joris, B., J. Ghuysen, G. Dive, A. Renard, O. Dideberg, P. Charlier, J. Frère, J. Kelly, J. Boyington, P. Moews, and J. Knox.** 1988. The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase family. Biochem. J. **250:**313-324.

39. **Kaper, J., J. Morris, and M. Levine.** 1995. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. **8:** 48-86.

40. **Kokjohn, M.** 1989. Transduction: mechanism and potential for gene transfer in the environment, p. 73-97. *In* McGraw-Hill (ed.), Gene transfer in the environment, New York**.**

41. **Kruse, H., H. Sørum, F. Tenover, and Ø. Olsvik.** 1995. A transferable multiple drug resistance plasmid from *Vibrio cholerae* O1. Microb. Drug Resist. **1:**203-210.

42. **Labia, R., and M. Barthélémy.** 1979. L'enzymogramme des beta-lactamases: adaptation en cel de la methode iodometrique. Ann. Microbiol., Paris. **130B:**295-304.

43. **Labia, R., M. Guionie, M. Barthélémy, and A. Philippon**. 1981. Properties of three carbenicillin-hydrolyzing ß-lactamases (CARB) from *Pseudomonas aeruginosa*: identification of a new enzyme. J. Antimicrob. Chemother. **7:**49–56.

44. **Levesque, R. C., and G. Jacoby.** 1988. Molecular structure and interrelationships of multiresistance ß-lactamase transposons. Plasmid, **19:**21-29.

45. **Livermore, D. M.** 1995. ß-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. **8:**557-584.

46. **Mahillon, J., and M. Chandler.** 1998. Insertion sequences. Microbiol. Molec. Biol. Rev. **62:**725-774.

47. **Mange, L.; Saka, H.; Garutti, A; Galas, M.; Melano, R.; Rapoport, M.; Caffer, M.; Rossi, A.** 9th International Congress on Infection Diseases, abst. 95.048, 2000

48. **Mandel, M, and A. Higa.** 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. **53:**159-162.

49. **Martinez, E., and F. de la Cruz.** 1990. Genetics elements involved in Tn*21* site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance gene. EMBO J. **9:**1275-1281.

50. **Mazel, D., B. Dychinco, V. Webb, and J. Davies.** 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. Science. **280:**605-608.

51. **Mazel, D., and J. Davies. 1999.** Gene capture en *Vibrio cholerae*: response. Trends Microbiol. **7:**95.

52. **Medeiros, A., R. Hedges, and G. Jacoby.** 1982. Spread of a *"Pseudomonas*-specific" ß-lactamase to plasmids of enterobacteria. J. Bacteriol. **149:**700–707.

53. **Mhalu, F., P. Mmari, and J. Ijumba.** 1979. Rapid emergence of El Tor *Vibrio cholerae* resistant to antimicrobial agents during first six months of fourth cholera epidemic in Tanzania. Lancet **ii:**345-347.

54. **Mossakowska, D., N. Ali, and J. Dale.** 1989. Oxacillin-hydrolysing ß-lactamases. A comparative analysis at nucleotide and amino acid sequence levels. Eur. J. Biochem. **180:**309-318.

55. **Mukhopadhyay, A. K., A. Basu, P. Garg, P. K. Bag, A. Ghosh, S. K. Bhattacharya, Y. Takeda, and G. B. Nair.** 1998. Molecular epidemiology of reemergent *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. J. Clin. Microbiol. **36:**2149-2152.

56. **Murray, B. E.** 1994. Can antibiotic resistance be controlled? N. Engl. J. Med. **330:** 1229-1230.

57. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed., vol.

20, no. 2. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

58. **Nordmann, P., E. Ronco, T. Naas, C. Duport, Y. Michel-Briand, and R. Labia.** 1993. Characterization of a novel extended-spectrum ß-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **37:**962-969.

59. **Oullette, M., L. Bissonette, and P. Roy.** 1987. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn*21*-like transposons: nucleotide sequence of OXA-1 ß-lactamase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84:**7378-7382.

60. **Ouellette, M., G. Gerbaud, and P. Courvalin.** 1988. Genetic, biochemical and molecular characterization of strains of *Vibrio cholerae* multiresistant to antibiotics. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. **139:**105-113.

61. **Pasterán, F. G., R. G. Melano, M. F. Galas, M. M. Rodriguez, WHONET-Argentina Collaborative Group, and M. A. Rossi.** 1999. 39th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. 1475.

62. **Pato, M.** 1989. Bacteriophage Mu, p. 23-52. *In* D. E. Berg and M. M. Howe (ed.), Mobile DNA. American Society of Microbiology, Washington, D. C.

63. **Paulsen, I. T., T. Littlejohn, P. Rådström, L. Sundström, O. Sköld, G. Swedberg, and R. Skurray.** 1993. The 3'conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. Antimicrob. Agents Chemother. **37:**761-768.

64. **Petroni, A., A. Corso, R. Melano, M. L. Cacace, A. M. Bru, A. Rossi, and M. Galas.** 2002. Plasmidic extended-spectrum ß-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor in

Argentina. Antimicrob. Agents Chemother. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**1462–1468**.**

65. **Power, P., M. Radice, C. Barberis, C. de Mier, M. Mollerach, M. Maltagliatti, C. Vay, A. Famiglietti, and G. Gutkind.** 1999. Cefotaxime-hydrolysing beta-lactamases in *Morganella morganii*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **18:**743-747.

66. **Rahal, K., G. Gerbaud, and Y. Chabbert.** 1973. Charactérisation d'un facteur de résistance transférable chez *Vibrio cholerae* biotype El Tor. Ann. Inst. Pasteur (Paris) **124B:**283-294.

67. **Ramamurthy, T., M. J. Albert, A. Huq, R. R. Colwell, Y. Takeda, T. Takeda, T. Shimada, B. K. Mandal, and G. B. Nair.** 1994. *Vibrio mimicus* with multiple toxin types isolated from human and environmental sources. J. Med. Microbiol. **40:**194-196.

68. **Recchia, G., and R. Hall.** 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiol. **141:**3015-3027.

69. **Reid, A., and S. Amyes.** 1986. Plasmid penicillin resistance in *Vibrio cholerae*: identification of new ß-lactamase SAR-1. Antimicrob. Agents Chemother. **30:**245–247.

70. **Rice, L. B., and R. A. Bonomo.** 1996. Genetic and Biochemical Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents, p. 453-501. *In* Lorian, M., M. D. (ed.), Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed. Williams & Wilkins, Maryland.

71. **Rivas, M., C. Toma, E. Milliwebsky, M. Caffer, M. Galas, P. Varela, M. Tous, A. Bru, and N. Binztein.** 1993. Letter, Lancet **342:**926-927.

72. **Rossi, A., M. Galas, N. Binztein, M. Rivas, M. Caffer, A. Corso, M. Radice, and G. Gutkind.** 1993. Unusual multiresistant *Vibrio cholerae* O1 El Tor in Argentina. Lancet **342:** 1172-1173.

73. **Rossi, A., H. Lopardo, M. Woloj, A. Picandet, M. Mariño, M. Galas, M. Radice, and G. Gutkind.** 1995. Non-typhoid *Salmonella* spp. resistant to cefotaxime. J. Antimicrob. Chemother. **36:** 697-702.

74. **Rowe-Magnus, D., and D. Mazel.** 1999. Resistance gene capture. Curr. Op. Microbiol. **2:**483-488.

75. **Rowe-Magnus, D., A. Guerout, P. Ploncard, B. Dychinco, J. Davies, and D. Mazel.** 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98:**652–657.

76. **Sakajaki, R.** 1970. Classification and characteristics of vibrios. Public health papers no. 40. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

77. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edition. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

78. **Sanger, S., S. Micklen, and A. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74:**5463-5467.

79. **Schmieger, H., and P. Schicklmaier.** 1999. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. **170:** 251-256.

80. **Shimada, T., G. B. Nair, B. C. Deb, M. J. Albert, R. B. Sack, and Y. Takeda.** 1993. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. Lancet **341:**1347.

81. **Spratt, B. G., P. J. Hedge, S. te Heesen, A. Edelman, and J. K. Broome-Smith.** 1986. Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. Gene **41:**337–341.

82. **Stokes, H. W., and R. M. Hall.** 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol. Microbiol. **3:**1669-1683.

83. **Strynadka, N. C. J., H. Adachi, S. E. Jensen, K. Johns, A. Sielecki, C. Betzel, K. Sutoh, and M. N. G. James.** 1992. Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in ß-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. Nature (London), **359:**700-705.

84. **Sundström, L., P. Rådström, G. Swedberg, and O. Sköld.** 1988. Site specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide-resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *sulI* and a recombination active locus in Tn*21*. Mol. Gen. Genet. **213:**191-201.

85. **Sundström, L., P. H. Roy, and O. Sköld.** 1991. Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon T*n*7. J. Bacteriol. **173:**3025–3028.

86. **Swartz, M. N.** 1994. Hospital-acquired infections: diseases with increasingly limited therapies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91:** 2420-2427.

87. **Swift, C., B. McCarthy, and F. Heffron.** 1981. DNA sequence of a plasmid-encoded dehydrofolate reductase. Mol. Gen. Genet. **181:**441-447.

88. **Tauxe, R., P. Blake, O. Olsvik, and K. Wachsmuth.** 1994. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. American Society for Microbiology, Washington.

89. **Threlfall, E. J., B. Rowe, and I. Huq.** 1980. Plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor from Bangladesh. Lancet **i:**1247-1248.

90. **Threlfall, E. J., B. Said, B. Rowe, and A. Dávalos-Pérez.** 1993. Emergence of multiple drug resistance in *Vibrio cholerae* O1 El Tor from Ecuador. Lancet **342:**1173.

91. **Tison, D. L.** 1999. Vibrio, p. 497-506. *In* P. Murray (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 7th Edition. ASM Press, Washington, D.C.

92. **Tolmasky, M. E., and J. Crosa.** 1993. Genetic organization of antibiotic resistance genes (*aac*(6')-*Ib*, *aadA* and *oxa9*) in the multiresistance transposon Tn*1331*. Plasmid **29:**31-40.

93. **Towner, K. J., N. J. Pearson, and F. O'Grady.** 1979. Resistant *Vibrio cholerae* El Tor in Tanzania. Lancet **ii:**147-148.

94. **Tzouvelekis, L. S., E. Tzelepi, P. T. Tassios, and N. J. Legakis.** 2000. CTX-M-type ß-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. Int. J. Antimicrob. Agents **14:**137-142.

95. **Vahaboglu, H., L. M. C. Hall, L. Mulazimoglu, S. Dodanli, I. Yildirim, and D. M. Livermore.** 1995. Resistance to extended-spectrum cephalosporins caused by PER-1 ß-lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. J. Med. Microbiol. **43:**294-299.

96. **Vahaboglu, H., R. Öztürk, G. Aygün, F. Coskunkan, A. Yaman, A. Kaygusuz, H. Leblebicioglu, I. Balik, K. Aydin, and M. Otkun.** 1997. Widespread detection of PER-1 type extended-spectrum ß-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob. Agents Chemother. **41:**2265-2269.

97. **West, P. A.** 1989. The human pathogenic vibrios: a public health update with environmental perspectives. Epidemiol. Infect. **103:**1-34.

98. **Wiedemann, B., J. Meyer, and M. Zühlsdorf.** 1986. Insertions of resistance genes into Tn*21*-like transposon. J. Antimicrob. Chemother. **18** (Suppl. C)**:**85-92.

99. **World Health Organization.** 1992. Document CDD/SER/91.15 REV. 1. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

100. **Yamamoto, T., G. B. Nair, M. J. Albert, C. Carrillo Parodi, and Y. Takeda.** 1995. Survey of in vitro susceptibilities of *Vibrio cholerae* O1 and 0139 to antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. **39:**241-244.