

Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión

Ferran Navarro^{a,b} y Elisenda Miró^a

^aServicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

^bDepartamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España.

Históricamente, la difusión de un fenotipo de resistencia característico en un área concreta y en un tiempo limitado se ha asociado a la expansión clonal de una cepa que ha adquirido un determinado mecanismo de resistencia. En el caso de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) esto se cumple en los primeros brotes por *Klebsiella pneumoniae* que se describieron, en los que generalmente estaban implicadas las BLEE tipo TEM o SHV. Sin embargo, tras la aparición de nuevas BLEE de otras familias, se empezó a observar un panorama distinto, donde las cepas implicadas en hipotéticos brotes no presentaban relación clonal a pesar de presentar la misma BLEE y coincidir en el tiempo y en el espacio. En estos casos, la difusión se debe a la movilidad, propia o inducida, de algunos de los elementos genéticos presentes en su entorno, como los plásmidos, las secuencias de inserción, los transposones o los integrones, elementos ampliamente distribuidos, extremadamente diversos y en continua evolución.

El entorno genético de las BLEE no es común en una misma familia ni en un mismo tipo de enzima. Además, pueden coexistir distintos elementos móviles; así, una BLEE puede encontrarse en un integrón, dentro de un transposón y situado, a su vez, en un plásmido. Para más complejidad, estos elementos móviles pueden difundir, a la vez, genes de resistencia a otros antimicrobianos como las sulfamidas, el cloranfenicol, la rifampicina, los aminoglucósidos o las quinolonas.

Palabras clave: BLEE. Secuencias de inserción. Transposones. Integrones. Plásmidos.

The genetic environment of ESBL: implications in transmission

Historically, the diffusion of a characteristic phenotype of resistance in a particular area and specific time period has been associated with clonal expansion of a strain that has

acquired a specific resistance mechanism. In the case of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) this was true for the first described outbreaks of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*, in which TEM- or SHV-type ESBLs were generally implicated. However, after new ESBLs from other families emerged, a different panorama began to be observed, in which the strains implicated in hypothetical outbreaks presented no clonal relationship, although they did present the same ESBL and coincided in time and space. In these cases, diffusion was due to mobility, either intrinsic or induced, of some of the genetic elements present in their environment, such as plasmids, insertion sequences, transposons or integrons. These elements are widely distributed, highly diverse, and continuously evolving. The genetic environment of ESBLs differs, both within the same family and in the same type of enzyme. Moreover, distinct mobile elements may coexist; thus one ESBL can be found in an integron, within a transposon, and situated, in turn, in a plasmid. To add to this complexity, these mobile elements can diffuse resistance genes to other antimicrobial agents such as sulfamides, chloramphenicol, rifampicin, aminoglycosides, or quinolones.

Key words: ESBL. Insertion sequences. Transposons. Integrons. Plasmids.

Introducción

Uno de los aspectos más importantes para el control de las resistencias en el mundo microbiano es conocer los mecanismos de difusión de los genes causantes de la resistencia. La adquisición de diferentes mecanismos de resistencia puede tener su origen en el mismo microorganismo, fruto de errores en su replicación, o en la adquisición de material genético externo que codifique genes de resistencia. Mecanismos como la transformación, la transducción o la conjugación son las principales vías por las que pueden adquirirse genes de resistencia y por las que esta resistencia puede transmitirse de una célula a otra, de la misma especie o no. Es lo que se conoce como difusión horizontal de la resistencia a los antimicrobianos.

La transformación es la habilidad, de algunas especies bacterianas, de absorber, en determinadas circunstancias, moléculas de ADN libre en el entorno, provenientes de una bacteria donadora. Como resultado de los posteriores

Correspondencia: Dr. F. Navarro.
Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Av. Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. España.
Correo electrónico: fnavarro@santpau.es

fenómenos de recombinación, se puede obtener genes cuya secuencia está formada por múltiples fragmentos de diferentes orígenes (genes mosaico). Un ejemplo de gen mosaico es el que confiere resistencia a penicilina y cefalosporinas en *Streptococcus pneumoniae*¹.

La transducción es la incorporación de ADN a una bacteria (célula receptora) mediante bacteriófagos que han infectado otra bacteria (célula donadora). Si existen regiones homólogas, este ADN transducido puede ser incorporado al genoma de la célula receptora. Los fagos desempeñan un papel importante en la evolución génica, pues promueven la transferencia horizontal de genes, tanto entre miembros individuales de la misma especie como entre especies distanciadas². Un ejemplo clásico detectado en la clínica es la transferencia de genes de resistencia a la penicilina en *Staphylococcus aureus*, mediada por plásmidos que son difundidos por bacteriófagos³. Asimismo, se ha evidenciado la existencia de cuadros de lectura abierta (ORF) en el extremo 5' del gen *bla*_{CTX-M-10} relacionados con elementos fágicos⁴ y se ha observado la presencia de genes codificadores de distintas betalactamasas (*bla*_{OXA} o *bla*_{PSE}) en bacteriófagos aislados en aguas residuales, tanto humanas como de animales⁵.

La conjugación es el mecanismo en que la transferencia de genes es posible gracias a la presencia de plásmidos. Su tamaño es variable, pueden llevar tan sólo los genes necesarios para su replicación, autónoma de la del cromosoma, o centenares de genes adicionales⁶.

Papel de los plásmidos en la difusión horizontal de los genes *bla*_{BLEE}

Históricamente, se ha asociado la difusión de un fenotipo de resistencia característico en un área determinada a la expansión clonal de una cepa que ha adquirido un determinado mecanismo de resistencia. Esto sigue siendo cierto, especialmente en áreas muy concretas y localizadas, o menos localizadas en el caso de ciertos microorganismos. No obstante, la situación parece ser mucho más compleja en el caso de las enterobacterias resistentes a los betalactámicos por adquisición de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Por ejemplo, son varios los estudios en hospitales en los que, tras observar el incremento de un determinado patrón de resistencia mediado por una BLEE concreta, se ha documentado que la difusión no se debe a la expansión clonal de una cepa sino a la difusión de un plásmido, y se ha evidenciado la microevolución de ese plásmido e incluso la presencia de plásmidos distintos⁷⁻⁹. Ello pone de relieve que los plásmidos y otros elementos móviles tienen una gran relevancia clínicoepidemiológica.

La caracterización de los plásmidos, determinando el grupo de incompatibilidad al que pertenecen, permite hacer un seguimiento de su movilidad, así como establecer una relación evolutiva de los genes de resistencia. Algunos plásmidos pueden presentar un rango de huéspedes muy reducido, mientras que otros son capaces de transferirse y replicarse en un gran número de especies bacterianas. Una bacteria puede contener más de un plásmido, pero no todos los plásmidos pueden coexistir en una misma célula: existe una incompatibilidad plasmídica. Dos plásmidos son incompatibles cuando no pueden coexistir de ma-

nera estable en la misma célula porque comparten el mismo sistema de replicación o segregación de las copias. Existen más de 30 grupos de incompatibilidad descritos (IncA, IncH, IncP10, IncQ-like, etc.)¹⁰. Las betalactamasas de amplio espectro, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, así como sus derivadas, las BLEE tipo TEM o SHV, se han descrito en plásmidos de un tamaño que oscila entre 80 y 300 kb, de un número reducido de grupos de incompatibilidad: IncC, IncFI, IncFII, IncFIB, IncHI2 y IncL/M¹¹⁻¹³. Las BLEE tipo CTX-M se han encontrado en plásmidos del grupo IncN o IncL/M (CTX-M-1), IncA/C₂ (CTX-M-3), IncFII (CTX-M-15), y IncHI2, IncP1-alfa o IncFI (CTX-M-9)^{7,14,15}.

Las BLEE se han descrito en plásmidos de características variables en cuanto a su tamaño como al hecho de que sean o no conjugativos. Así, se ha evidenciado la presencia del gen que codifica una betalactamasa en plásmidos de diferente tamaño, como es el caso de la *bla*_{CTX-M-9} (plásmidos entre 110 y 340 kb)^{8,14,15} o *bla*_{VEB-1} (entre 24 y 200 kb)¹⁶⁻¹⁸.

Conocer de forma más precisa el elemento que vehicula un determinado gen puede ayudar a conocer y explicar su difusión. La caracterización, por ejemplo, del plásmido pC15-1a (véase más adelante) y sus derivados, que transportan los genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1} y *bla*_{TEM-1}, ha permitido conocer que estos plásmidos con sus genes de resistencia se encuentran distribuidos en lugares tan lejanos como Canadá, la India o Europa¹⁹⁻²². Por otro lado, esta caracterización también permite suponer el origen de algunos de los genes. Kim et al²³ demuestran que el origen de *bla*_{SHV-12} está en el gen *bla*_{SHV-2a}, pues encuentran un 100% de homología entre la región anterior del gen *bla*_{SHV-12} y el plásmido pMPA2a portador del gen *bla*_{SHV-2a}. Los genes *bla*_{CTX-M-32} y *bla*_{CTX-M-1} se sitúan en plásmidos idénticos de 40 kb del grupo de incompatibilidad IncN, lo que sugiere que posiblemente uno deriva del otro, o que ambos tienen un ancestro común¹⁴. También ha podido observarse la integración de plásmidos en el cromosoma, como es el caso del gen *bla*_{SHV-2a} de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* cuyo entorno es parecido al descrito en un plásmido proveniente de una cepa de *Klebsiella*²⁴.

Secuencias de inserción y transposones, elementos móviles implicados en la difusión

Cuando se describe un gen de resistencia en diferentes localizaciones génicas cabe sospechar que estén implicados distintos elementos en su difusión. Aparte de los mecanismos de difusión horizontal de la resistencia a los antimicrobianos ya descritos (transformación, transducción o conjugación), existen elementos genéticos como las secuencias de inserción (IS), los transposones (Tn) o los integrones (In), que desempeñan un papel muy importante en la movilización génica intracelular. Son elementos ampliamente distribuidos, extremadamente diversos y en continua evolución.

Los elementos móviles más sencillos son las IS, que presentan en cada extremo una secuencia repetida invertida (IR) y pueden contener de una a varias pautas de lectura abierta (ORF) (fig. 1). Los Tn se clasifican en transposones compuestos o de clase 1 o no compuestos o de clase 2. Los Tn no compuestos se caracterizan por tener en sus extremos IR, y entre ellas una serie de genes que codifican las

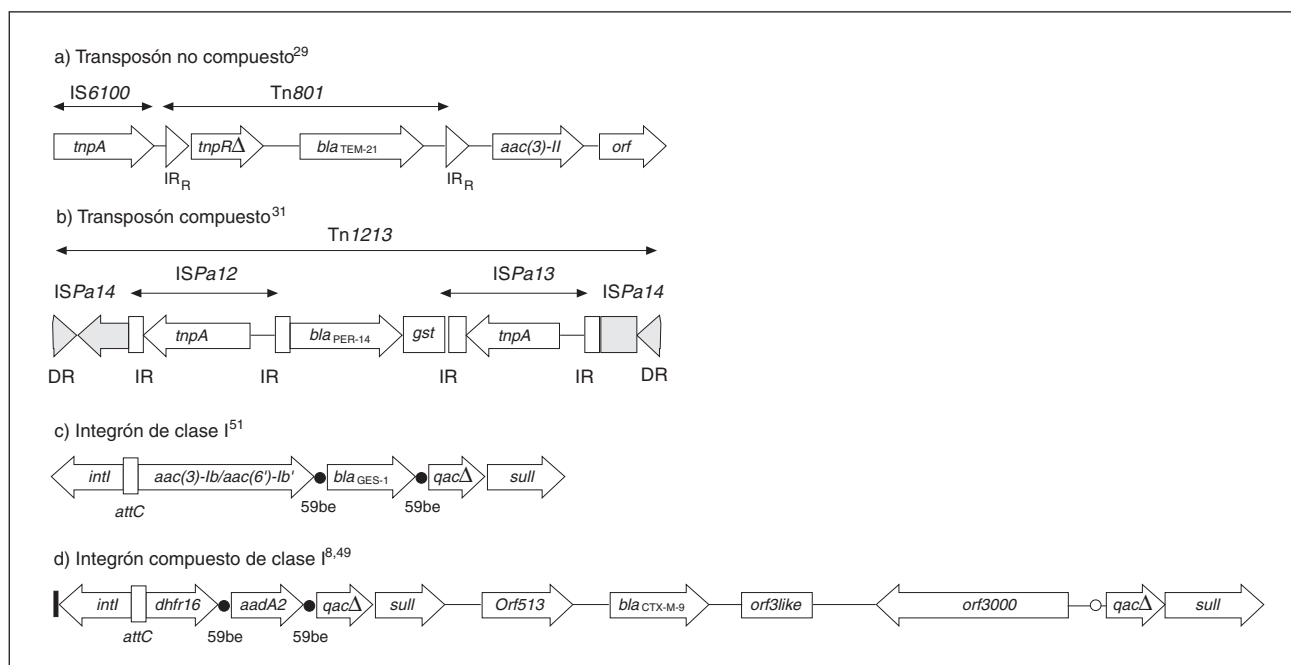


Figura 1. Representación esquemática, a modo de ejemplo, de diferentes elementos móviles: secuencias de inserción (IS), transposones (Tn) e integrones (In). IR: secuencias directas repetidas; tnp: transposasa; int: integrasa.

funciones necesarias para la transposición (*tnp*), así como otros genes adicionales. Los Tn compuestos son segmentos de ADN flanqueados por dos IS iguales o muy similares, orientados en una misma dirección o invertidos, donde una de las IS codifica una transposasa (*TnpA*). Entre las dos IS se encuentran diferentes genes, incluidos los que codifican resistencia a los antimicrobianos o funciones metabólicas. Estos elementos tienen la capacidad de moverse de un replicón a otro mediante una reacción de recombinación de material genético consecuencia de la translocación de un segmento de ADN, llamado elemento transposable o Tn, desde un lugar del genoma a otro. La transposición es una recombinación no homóloga, pero sí especializada, no necesita una homología entre el elemento transponible o el sitio donde se encuentra y el nuevo lugar de inserción, pero se produce en sitios específicos, en dianas reconocidas por unas enzimas, las recombinasas, llamadas transposasas²⁵. Estas transposiciones pueden dar lugar a deleciones o inversiones, por lo que contribuyen sustancialmente a la diversidad genética. Tanto los Tn como las IS desempeñan un papel en la difusión de las BLEE.

Entornos genéticos de los genes *bla_{TEM}*

Al analizar los entornos genéticos de las BLEE tipo TEM se han descrito Tn de la familia TnA, como Tn1, Tn2, Tn2* y Tn3²⁶. Sin embargo, uno puede darse cuenta de que no existe una estructura constante, sino que es característica para cada gen. El gen *bla_{TEM-12b}* de una cepa de *Klebsiella pneumoniae*, por ejemplo, ha sido relacionado con un transposón TnA de 4,8 kb mientras que, en una cepa de *K. oxytoca*, está formando parte del Tn841, de 7 kb, con baja frecuencia de transposición²⁷. Otros genes *bla_{TEM}* asociados a estos elementos móviles son el gen *bla_{TEM-144}*, incorpora-

do dentro del Tn2 de 8.2kb²⁸ o el gen *bla_{TEM-21}*, que se encuentra situado dentro del Tn801, el cual está interrumpido por la IS6100. La incorporación de genes en un Tn de la familia del TnA, generalmente, provoca la inmovilidad de estos elementos de transposición²⁹. También cabe destacar que la inserción de algunas IS en el extremo 5' del gen conlleva que la IS actúe como promotor fuerte del gen, como es el caso del gen *bla_{TEM-6}*, cuya región -35 del promotor presenta la IS1-like; el del gen *bla_{SHV-2a}*, cuya región -35 del promotor está formada por la secuencia invertida inversa de la IS26²⁴, el gen de la *ISEcp1B*, que actúa como promotor del gen *bla_{CTX-M-19}*³⁰, o el del gen *bla_{PER-1}*, en cuyo promotor está en la *ISPa12*³¹.

Entornos genéticos de los genes *bla_{SHV}*

Al analizar los entornos genéticos de los genes *bla_{SHV}*, la situación es diferente. Como característica común de su entorno se describe la presencia prácticamente constante de la IS26 y cerca, pero sin haberse establecido ninguna relación, se ha descrito la presencia de Tn o In. La presencia de la IS26 se ha relacionado con los genes *bla_{SHV-2}*³², *bla_{SHV-2a}*²⁴, *bla_{SHV-5}*^{13,33} y *bla_{SHV-12}*³⁴. Sin embargo, a diferencia de los genes *bla_{TEM}*, no hay tantos ejemplos que muestren que la movilidad de los genes *bla_{SHV}* sea por transposición. En una cepa de *K. pneumoniae*, a ambos lados del gen *bla_{SHV-5}*, presente en el plásmido pACM1, se encontró una copia defectuosa de la IS26 como secuencias repetidas directas, reminiscencia del Tn2680³³. La presencia de este Tn, junto con el hecho de describirse en el mismo plásmido una región de 7,9 kb homóloga a una parte del cromosoma de *K. pneumoniae*, sugiere que el origen de los genes *bla_{SHV}* está en el cromosoma de este microorganismo³⁵. En la cepa de *P. aeruginosa* citada anteriormente, cuyas regiones colindantes al gen *bla_{SHV-2a}* son homólogas al plás-

mido pMPA2a, se ha observado que más allá del extremo 3' del gen hay una secuencia homóloga a la parte 5' del Tn1721, un Tn muy frecuente en enterobacterias²⁴.

En el entorno genético de los genes *bla*_{SHV} no sólo se encuentran IS y Tn, sino que también se han situado In (véase más adelante), aunque se desconoce el papel que desempeñan^{32,34}. En el entorno del gen *bla*_{SHV-5} se ha descrito un Inde clase 1 (In-*t3*) que contiene distintos genes que confieren resistencia a aminoglucósidos (*aacA4*, *aacC1*, y *aadA1*). Entre el gen *bla*_{SHV-5} y el In-*t3* se encontró la IS26¹³.

Entorno genético de los genes *bla*_{CTX-M}

Si bien las BLEE tipo TEM o SHV tuvieron una gran expansión en la década de los años ochenta, el incremento de la prevalencia y de la diversidad de las BLEE tipo CTX-M ha sido mucho más rápido. Las betalactamasas de la familia CTX-M se agrupan en 5 subtipos (CTX-M-1t, CTX-M-2t, CTX-M-8t, CTX-M-9t y CTX-M-25t). Las betalactamasas del grupo de la CTX-M-2 están en relación con la betalactamasa cromosómica de *Kluyvera ascorbata*, las de la CTX-M-1 con *K. cryocrescens* y las de la CTX-M-8 y 9 con *K. georgiana*. El entorno genético de las betalactamasas CTX-M se ha relacionado con diferentes secuencias de inserción, exceptuando las enzimas de los subgrupos CTX-M-9t y CTX-M-2t, que están formando parte de In. La *ISEcp1*, *ISEcp1*-derivada (*ISEcp1B*), *IS10* y *IS26* o *IS903*-tipo (*IS903C*, *IS903D*) son secuencias de inserción que se han relacionado con los genes *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-10}, *bla*_{CTX-M-12}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-17} y *bla*_{CTX-M-19}^{19,21,30,36,37}, aunque este último gen también se ha descrito formando parte de un Tn30. La *ISEcp1*, perteneciente a la familia de la *IS1380* (www-is.biotoul.fr)³⁸, desempeña un papel en la movilización de los genes *bla*_{CTX-M}, por un mecanismo transcripcional que reconoce una gran variedad de secuencias de ADN³⁰. La *ISEcp1* es capaz de conseguir la transferencia de la región 3' del ADN en un único paso³⁶. Soge et al³⁸ describen que los genes *bla*_{CTX-M-1} de 17 cepas de *K. pneumoniae* están situados en plásmidos de tamaño variable, entre 58 y 320 kb, con perfiles de restricción con *Pst*I y *Bam*HI distintos. La clonación de un fragmento de 6 kb muestra una secuencia idéntica a la descrita en el plásmido pC15-1a que contiene el gen *bla*_{CTX-M-15}¹⁹, por lo que puede presuponerse un origen común de los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-15}. De hecho, el pC15-1a es un plásmido conjugativo de, aproximadamente, 92 kb que conlleva los genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1} y *bla*_{TEM-1}, y está formado por 2 regiones distintas: una, de unos 64 kb, homóloga al plásmido R100 (plásmido conjugativo de 94 kb del grupo de incompatibilidad FII, también llamado NR1), descrito en enterobacterias de todo el mundo con resistencia a penicilinas; y la segunda, de unos 28 kb, donde se encuentran los genes causantes de la multiresistencia, que está compuesta en un 73% por elementos asociados con la transposición. En esta región pueden encontrarse el Tn5403, un derivado del Tn1721, un derivado del Tn21 y un derivado del Tn3. Además, también se encuentran 5 copias de la *IS26* y los genes *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1}, *aac(6')-Ib* y *aac(3)-II*¹⁹.

Por último, debemos señalar la existencia del doble origen de la betalactamasa CTX-M-14. Este enzima está codificada por el gen *bla*_{CTX-M-14} (AF252622, se ha sugerido llamarlo *bla*_{CTX-M-14a}), en cuyos entornos se han descrito la *ISEcp1* en el extremo 5' y la *IS903* en el extremo 3', y por

el gen *bla*_{CTX-M-14b} (DQ359215), cuyos entornos se corresponden con el In60 que contiene el gen *bla*_{CTX-M-9}. Ello ha permitido describir la convergencia de dos genes diferentes, situados en entornos genéticos diferentes e incluso en plásmidos de diferente grupo de incompatibilidad, hacia una misma betalactamasa (datos no publicados).

Una situación algo diferente de las mencionadas hasta ahora es la de la CTX-M-10, en cuyo extremo 5', como se ha citado anteriormente, existen ORF relacionados con elementos fágicos, mientras que el extremo 3' presenta homología con el cromosoma de *K. cryocrescens*⁴.

Entorno genético de los genes *bla*_{PER}

Por último, el entorno genético de las BLEE tipo PER también se relaciona con IS o Tn. El entorno genético de *bla*_{PER-1} en cepas de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Providencia stuartii* se sitúa en el cromosoma como parte del Tn1213, en cuyos extremos están la *ISPa12* y la *ISPa13*, pertenecientes a la familia de la *IS4*. En cambio, en cepas de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y *A. baumannii* sólo se ha encontrado la *ISPa12* en el extremo 5'. De hecho, en ambos casos esta secuencia de inserción actúa como promotor del gen *bla*_{PER-1}³¹.

Integrones en el entorno genético de los genes

*bla*_{BLEE}

Hasta ahora hemos podido observar que la diseminación de los genes de las BLEE está relacionada con las IS o Tn y que en éstos se pueden encontrar en plásmidos, facilitando todo ello su difusión. Sin embargo, existen otros elementos genéticos, los In, que ayudan a incrementar la diversidad, pues a pesar de que no pueden transponerse tienen la capacidad de integrar genes.

Los In están formados por un gen que codifica una integrasa (*intI*), un lugar de recombinación específica (*attI*) y un promotor (*P_{attI}*) para la expresión de los genes que se vayan incorporando, llamados genes casete. La clasificación de los In se basa en la secuencia codificadora de la integrasa^{39,40}. Los In de clase 1, los más frecuentes en clínica, se caracterizan por tener una secuencia 5' conservada (5'-CS), que contiene el gen codificador de la integrasa, y una secuencia 3' conservada (3'-CS), donde se sitúan los genes que confieren resistencia al amonio cuaternario y a las sulfamidas. Entre ambas regiones es donde se sitúan los genes casete. Sin embargo, algunos de estos In presentan una segunda región 3'-CS. A estos In se los conoce con el nombre de In compuestos de clase 1 o In de clase 1 inusuales, o más recientemente In de clase 1 asociados a *ISCR1*⁴¹ (fig. 1). En la mayoría de estos In, entre ambas regiones 3'-CS se encuentra el ORF513. Esta región constante hace sospechar que pueda tratarse de un elemento transponible, por lo que ha pasado a denominarse *ISCR1* (anteriormente se denominaba CR1 o ORF513). Existen 5 clases de *ISCR*. La *ISCR1*, asociada al fragmento orf513, y que lleva asociados distintos genes de resistencia, al cloranfenicol (*catAII*), trimetoprim (*dfrA10*, *dfrA23*, *dfrA3b*, *dfrA19*), aminoglucósidos (*armA*), BLEE (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-20}, *bla*_{PER-3}, *bla*_{VEB-157}, *bla*_{VEB-3}) o cefalosporinas plasmídicas tipo AmpC (*bla*_{DHA-1}, *bla*_{CMY-1}, *bla*_{CMY-8}, *bla*_{CMY-9}, *bla*_{CMY-10}, *bla*_{MOX-1}). La *ISCR2* contiene los genes de resistencia a cloranfenicol (*floR*), trimetoprim (*dfrA18*, *dfrAIX*, *dfrA20*), tetraciclina (*tetR*) y sulfamidas (*sulII*). La *ISCR3* contiene *qac*, *dfrA10*, *ereB*, *yieE* y *yieF*. Finalmen-

te, la *ISCR4* contiene el gen *bla*_{SPM-1} y la *ISCR5*, los genes *bla*_{OXA-45} y *ant4-Iib*⁴¹.

La presencia de In como elemento de difusión de las BLEE está documentada en enzimas del tipo OXA, CTX-M, GES, IBC y VEB. Los genes *bla*_{OXA} son, en su mayoría, genes casete localizados en In de clase 1⁴²⁻⁴⁴. Existen pocos trabajos sobre la descripción de las oxacilinasas de espectro extendido y en la mayor parte de ellos se describen en cepas de *P. aeruginosa*⁴³. El gen *bla*_{OXA-31} de la cepa de *P. aeruginosa* SOF-1 se ha descrito en un In situado en un plásmido no conjugativo, In que contiene también los genes *aadA2* y *cmlA6*⁴⁴. El gen *bla*_{OXA-28} se encuentra en la región variable del In³⁷, en un plásmido conjugativo de la cepa de *P. aeruginosa* ED-1, seguido inmediatamente por el gen *aac(6')-Ib*. Esa estructura es similar a la descrita para las BLEE OXA-13, OXA-19 y OXA-32^{42,43}.

En cambio, por su rápida expansión, hay una descripción extensa sobre la localización de las betalactamasas CTX-M-9 y CTX-M-2, cuyos genes *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-2} forman parte de distintos In, a diferencia del resto de CTX-M^{7,37,45-48}. La betalactamasa CTX-M-2 es la BLEE más prevalente en Argentina y presenta un 99% de homología con la betalactamasa cromosómica de clase A de *K. ascorbata*. El entorno del gen *bla*_{CTX-M-2} se ha descrito en un plásmido conjugativo (pMAR-12) de una cepa de *Proteus mirabilis*, formando parte del In de clase 1 In35 asociado a *ISCR1*. En este In se encuentran también los genes *acc(6')-Ib*, *bla*_{OXA-2} y *orfD* dentro de la región 5CS a 3CS, y los genes *orf513*, *bla*_{CTX-M-2} y *orf3* entre los dos 3CS⁴⁵. Este In también se ha observado en una cepa de *K. pneumoniae* pero con los genes *ant(2'')-Ia-ant(3'')*-Ia como causantes de la resistencia a aminoglucósidos. Además, presentaba el Tn1331 con los genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-9}, *aac(6')-Ib* y *ant(3'')-Ia*⁴⁸. Otros dos In en los cuales se ha descrito el gen *bla*_{CTX-M-2} son el InS21⁴⁶, en una cepa de *S. enterica* serotipo Infantis, y el In117⁴⁷, en una cepa de *Escherichia coli* aislada de un portador fecal. En ambos casos, el gen *bla*_{CTX-M-2} se encuentra situado en la región CR1. En el caso del In117, la región entre los dos 3CS es idéntica a In35; sin embargo, cabe añadir que en el In117 se describe además en su extremo 3' el complejo mer-Tn21, prueba de la presencia de un Tn defectuoso. El entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-9} se sitúa dentro del In60⁴⁹. El In60 es un In de clase 1 asociado a *ISCR1* donde el gen *bla*_{CTX-M-9} está en la región CR1 junto con un entorno derivado del cromosoma de *K. ascorbata*⁴⁹. Esta estructura, sin embargo, no es constante y en ella se ha descrito inserciones (p. ej., de la *ISEc8* o de la *IS26*) y deleciones^{7,8,15,49}, e incluso se ha ubicado en el cromosoma de una cepa de *E. coli*⁴⁹. Esta estructura se ha relacionado con diferentes derivados del Tn40², a menudo el Tn21⁷. Por último, está el gen *bla*_{CTX-M-20}, que también parece estar relacionado con la *ISCR1*⁵⁰.

Así, diferentes tipos de In han sido capaces de incorporar genes codificadores de distintas clases de BLEE, con diferentes orígenes y asociados a otros genes, como los que confieren resistencia a aminoglucósidos, sulfamidas o cotrimoxazol.

Existen otras BLEE cuya frecuencia y diseminación es menor, pero que también se han asociado a In. La BLEE GES-1, de la cual deriva la carbapenemasa GES-2, es una enzima infrecuente. Se ha descrito principalmente en zonas de América del Sur, Francia y Portugal, en cepas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. El gen *bla*_{GES-1} se sitúa en In

de clase 1^{51,52}, como el In52. Sin embargo, también se ha descrito en un In de clase 3⁵³, una clase de In poco frecuente en clínica, junto a otro gen casete correspondiente a la fusión de los genes *bla*_{OXA-10} y *aac(6')-Ib*. El entorno del gen *bla*_{IBC-1} se ha descrito en una cepa de *Enterobacter cloacae*⁵⁴ y otra cepa de *E. coli*⁵⁵ en In de clase 1 situados en plásmidos conjugativos. En el primer caso, sólo se ha descrito la parte 5' del In; se ha encontrado el gen *aac(6')-Ib* tras la integrasa y delante del gen de la betalactamasa. En cambio, en la cepa de *E. coli* se ha descrito todo el In, el In111, donde antes del extremo 5'CS se encuentra la IS26 y el gen *aphA1*⁵⁵. Por último, se debe mencionar el gen *bla*_{IBC-2}, situado probablemente en el cromosoma como único gen casete de un In de clase 1⁵⁶.

A pesar de que las BLEE tipo VEB no son frecuentes en nuestro entorno, sí han adquirido importancia en países asiáticos^{17,57}. El gen *bla*_{VEB-1} se ha situado en In de clase 1 con una estructura variable, como el In50, In53, el In55, con distintos genes casete que confieren resistencia a antibióticos no betalactámicos^{16,18}. El In50, descrito en la cepa de *P. aeruginosa* JES, contiene dos genes casete, el *bla*_{VEB-1} y el *aadB*, pero es peculiar porque la región attL1 se ve interrumpida por la IS1999 y la IS2000. Una estructura parecida se ha encontrado también en *P. aeruginosa* Path2¹⁶. En el plásmido conjugativo pNLT-1, de aproximadamente 160 kb, de la cepa de *E. coli* MG-1 se ha descrito el In53, situado dentro del Tn2000. El In53 está flanqueado por dos IS26, la integrasa no es funcional y contiene 10 genes casetes, la mayoría de los cuales confiere resistencia a betalactámicos (*bla*_{VEB-1} y *bla*_{OXA-10}), aminoglucósidos (*aadA1*, *aadB*, y la fusión de los genes *aacA1-orfG*), sulfamidas (*sul1*), y rifampicina (*arr-2*)¹⁸. El In55, descrito en la cepa de *P. mirabilis* Lil-1, se caracteriza por presentar una estructura similar al In5317. Recientemente, se han descrito distintas estructuras que describen la presencia de *bla*_{VEB-1} en In de clase 1 asociados a *ISCR1* o en estructuras derivadas de ellos⁵⁸. En la cepa de *P. aeruginosa* TL-1 se ha descrito el In121, de clase 1, asociado a *ISCR1*. La región 5'CS de este In está reemplazada por un fragmento de una región 3'CS junto a un elemento repetido de 135pb. En el extremo 3' del gen *bla*_{VEB-1} está la ISPa31, interrumpida por la ISPa30, seguida por el gen *aphA-6* y la región conservada CR1⁵⁷. En las cepas de *P. aeruginosa* 10.2 y *P. stuartii* BI, se ha descrito el elemento repetido de 135 pb situado entre la región 3'CS y el gen *bla*_{VEB-1}, que se repite otras 2 veces hasta llegar a una segunda copia de la región 3'CS. En todos los casos se ha encontrado en el extremo 3' del gen *bla*_{VEB-1} la región de 59-bp característica de los genes casete⁵⁷. También se ha relacionado con In de clase 1 el entorno del gen *bla*_{VEB-3}, descrito en el cromosoma de una cepa de *E. cloacae*⁵⁹. Por último, citaremos el primer gen *bla*_{PER} descrito en una cepa de *Aeromonas punctata* situado en el In39, un integrón asociado a *ISCR1* (AY740681).

Conclusiones

Cada vez son más los conocimientos sobre los elementos genéticos que pueden estar implicados en la difusión de las BLEE. Este conocimiento permitirá, sin duda, conocer con más precisión la epidemiología no sólo de estos genes, sino también de todos aquellos que van asociados a esos

elementos móviles, como los que confieren resistencia a aminoglucósidos, sulfamidas, tetraciclinas, cloranfenicol, rifampicina y, más recientemente, quinolonas. La epidemia de una determinada resistencia no tiene por qué deberse a la expansión de un clon bacteriano, sino que puede tratarse de la diseminación de un determinado elemento genético (plásmido, Tn, In) que, al parecer, puede evolucionar fácil y rápidamente. Clásicamente, uno de los factores implicados en la evolución de estos elementos ha sido la presión que ejerce el uso de antibióticos, tanto en humanos como animales; sin embargo, la descripción de estructuras idénticas o similares en hábitats salvajes, donde esa presión es prácticamente nula, o no existe⁶⁰, podría hacernos suponer un origen anterior a la antibioticoterapia; estos vectores serían estructuras naturales en los diferentes ecosistemas, de las cuales sólo tenemos conocimiento de aquellas que se seleccionan en el ámbito clínicoepidemiológico.

Bibliografía

- Hakenbeck R, Coyette J. Resistant penicillin binding proteins. *Cell Mol Life Sci*. 1998;54:332-40.
- Snyder L, Champness W. Molecular genetics of bacteria. Washington: ASM Press; 1997.
- Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev*. 1987;51:88-134.
- Oliver A, Coque TM, Alonso D, Valverde A, Baquero F, Cantón R. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1567-71.
- Muniesa M, García A, Miró E, Mirelis B, Prats G, Jofre J, et al. Bacteriophages and diffusion of beta-lactamases genes. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1134-7.
- Cole S, Saint- Girons I. Bacterial genomes: all shapes and sizes. En: Charlebois LR, editor. Organization of the procaryotic genome. Washington: ASM Press; 1999. p. 35-62.
- Novais A, Cantón R, Valverde A, Machado E, Galán JC, Peixe L, et al. Dissemination and persistence of *bla*_{CTX-M-9} are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-x, and IncFI groups. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:2741-50.
- García A, Navarro F, Miró E, Mirelis B, Campoy S, Coll P. Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*_{CTX-M-9} gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56: 819-26.
- Bou G, Cartelle M, Tomas M, Canle D, Molina F, Moure R, et al. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the Northwest area of Spain. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4030-6.
- Novick RP. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev*. 1987;51:381-95.
- Jacoby G, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35: 164-9.
- Zienkiewicz M, Kern-Zdanowicz I, Golebiewski M, Zylinska J, Mieczkowski P, Gniadkowski M, et al. Mosaic structure of 1658/97, a 125-kilobase plasmid harbouring an active amplicon with the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla*_{SHV-5}. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;10.1128/AAC.00772-06.
- Villa L, Pezzella C, Tosini F, Visca P, Petrucca A, Carattoli A. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum beta-lactamase gene and a class 1 integron. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2911-4.
- Novais A, Cantón R, Moreira R, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:796-9.
- García A, Navarro F, Miró E, Villa L, Mirelis B, Coll P, et al. Acquisition and diffusion of *bla*_{CTX-M-9} gene by R478-IncHI2 derivative plasmids. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;doi 10.1111/j.157-6968.
- Naas T, Benaoudia F, Massuad S, Nordmann P. Integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46:703-11.
- Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol*. 2001;39:175-82.
- Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol*. 2001;183: 235-49.
- Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey B, 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;48:3758-64.
- Karisek E, Ellington MJ, Pike R, Warren RE, Livermore DM, Woodford N. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 beta-lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:665-8.
- Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;201:237-41.
- Machado E, Coque TM, Sousa JC, Peixe L. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1- and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')*-Ib-cr gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50: 3220-1.
- Kim J, Shin HS, Seol SY, Cho DT. Relationship between *bla*_{SHV-12} and *bla*_{SHV-2a} in Korea. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49:261-7.
- Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordmann P. An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1281-4.
- Craig NL. Target site selection in transposition. *Annu Rev Biochem*. 1997; 66:437-74.
- Partridge SR, Hall RM. Evolution of transposons containing *bla*_{TEM} genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1267-8.
- Heritage J, Hawkey PM, Todd N, Lewis LJ. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:1981-6.
- Vignoli R, Cordeiro NF, García V, Mota MI, Betancor L, Power P, et al. New TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase and its genomic context in plasmids from *Salmonella enterica* serovar Derby isolates from Uruguay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:781-4.
- Dubois V, Arpin C, Noury P, Quentin C. Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a *bla*_{TEM-21} gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3624-6.
- Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2938-45.
- Poirel L, Cabanne L, Vahaboglu H, Nordmann P. Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase *bla*_{PER-1} gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1708-13.
- Chen YT, Shu HY, Li LH, Liao TL, Wu KM, Shiau YR, et al. Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum beta-lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3861-6.
- Preston KE, Venezia RA, Stelrecht K. The SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase gene of pACM1 is located on the remnant of a compound transposon. *Plasmid*. 2004;51:48-53.
- Jones LA, McIver CJ, Kim MJ, Rawlinson WD, White P. The *aadB* gene cassette is associated with *bla*_{SHV} genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:794-7.
- Sirod D, De Champs C, Chanal C, Labia R, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, et al. Translocation of antibiotic resistance determinants including an extended-spectrum beta-lactamase between conjugative plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991; 35:1576-81.
- Bae IK, Lee YN, Hwang HY, Jeong SH, Lee SJ, Kwak H-S, et al. Emergence of CTX-M-12 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Korea. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:1257-9.
- Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;234:201-7.
- Soge OO, Adeniyi BA, Roberts MC. New antibiotic resistance genes associated with CTX-M plasmids from uropathogenic Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:1048-53.
- Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM, et al. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2838-43.
- Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and superintegrons. *CMI*. 2004; 10:272-88.

41. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. Common regions e.g. *orf513* and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:1-6.
42. Poirel L, Gerome P, De Champs C, Stephanazzi J, Naas T, Nordmann P. Integron-located *oxa-32* gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:566-9.
43. Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:447-53.
44. Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM, Nordmann P. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1615-20.
45. Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA, Orman BE, Pineiro SA, Centron D. *bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes *Orf513*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2303-6.
46. Di Couza J, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G. Novel class1 integron (InS21) carrying *bla*_{CTX-M-2} in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2257-61.
47. Valverde A, Cantón R, Galán JC, Nordmann P, Baquero F, Coque MT. In117, an unusual In0-like class 1 integron containing CR1 and *bla*_{CTX-M-2} and associated with Tn21-like element. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:799-802.
48. Melano R, Corso A, Petroni A, Centrón D, Orman B, Pereyre A, et al. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:36-42.
49. Sabaté M, Navarro F, Miró E, Campoy S, Mirelis B, Barbé J et al. Novel complex *sul1*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2656-61.
50. Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;209:161-8.
51. Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing *bla*_{GES-1} and a fused product of *aac(3)-Ib/aac(6')-Ib* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;638:645.
52. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:622-32.
53. Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ, Lito LM, Cristino JM, et al. Molecular characterisation of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2838-43.
54. Giakkoupi P, Tzouveleakis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum proprieties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2247-53.
55. Vourli S, Tzouveleakis LS, Tzelepi E, Lebessi E, Legakis NJ, Miriagou V. Characterization of In111, a class 1 integron that carries the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla*_{IBC-1}. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;225:149-53.
56. Mavroidi A, Tzelepi E, Tsakris A, Miriagou V, Sofianou D, Tzouveleakis LS. An integron-associated beta-lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:627-30.
57. Aubert D, Naas T, Lartigue MF, Nordmann P. Novel genetic structure associated with an extended-spectrum beta-lactamase *bla*_{VEB} gene in a *Providencia stuartii* clinical isolate from Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:3590-2.
58. Naas T, Aubert D, Lambert T, Nordmann P. Complex genetic structures with repeated elements, a *sul*-type class1 integron, and the *bla*_{VEB} extended-spectrum beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:1745-52.
59. Jiang X, Ni Y, Jiang Y, Yuan F, Han L, Li M, et al. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. *J Clin Microbiol.* 2005;43:826-31.
60. Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Gamboa H, et al. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1179-84.