

Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana

Ulises Garza-Ramos, M en C,⁽¹⁾ Jesús Silva-Sánchez, PhD,⁽¹⁾
Esperanza Martínez-Romero, PhD.⁽²⁾

Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E.
Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Publica Mex* 2009;51 suppl 3:S439-S446.

Resumen

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública causante de índices elevados de morbi-mortalidad hospitalaria. En la medida en que se usan los diferentes antibióticos se seleccionan bacterias resistentes a múltiples fármacos. El desarrollo de nuevas herramientas moleculares de la genómica y proteómica, como el PCR en tiempo real, pirosecuenciación de ADN, espectrometría de masas, microarreglos de ADN y bioinformática, permite conocer en forma más estrecha la fisiología y estructura de las bacterias y los mecanismos de resistencia a los antibióticos. Estos estudios hacen posible identificar nuevos blancos farmacológicos y diseñar antibióticos específicos para suministrar tratamientos más certeros que combatan las infecciones producidas por bacterias. Con estas técnicas también es posible la identificación rápida de los genes que confieren la resistencia a los antibióticos y el reconocimiento de las estructuras genéticas complejas como los integrones, que intervienen en la diseminación de los genes que producen la multirresistencia.

Palabras clave: resistencia bacteriana; genética; genómica; proteómica; β -lactamasas; integrones de clase I

Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E.
Genetics and Genomics for the study of bacterial resistance. *Salud Publica Mex* 2009;51 suppl 3:S439-S446.

Abstract

Bacterial resistance is a public health problem causing high rates of morbidity and mortality in hospital settings. To the extent that different antibiotics are used, bacteria resistant to multiple drugs are selected. The development of new molecular genomic and proteomic tools such as real-time PCR, DNA pyrosequencing, mass spectrometry, DNA microarrays, and bioinformatics allow for more in-depth knowledge about the physiology and structure of bacteria and mechanisms involved in antibiotic resistance. These studies identify new targets for drugs and design specific antibiotics to provide more accurate treatments to combat infections caused by bacteria. Using these techniques, it will also be possible to rapidly identify genes that confer resistance to antibiotics, and to identify complex genetic structures, such as integrons that are involved in the spread of genes that confer multidrug-resistance.

Key words: bacterial, resistance; genetics; genomics; proteomics; lactamase; integrons

(1) Departamento de Resistencia Bacteriana, Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México.

(2) Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, México.

Fecha de recibido: 28 de julio de 2008 • Fecha de aceptado: 25 de marzo de 2009
Solicitud de sobretiros: Jesús Silva Sánchez. Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655,
col. Santa María Ahuacatitlán. 62100, Cuernavaca, Morelos, México.
Correo electrónico: jsilva@insp.mx.

Uso y acción de los antibióticos

Los antibióticos son compuestos naturales o sintéticos que sirven para combatir las infecciones producidas por bacterias. El uso excesivo de estos medicamentos favorece la selección de bacterias resistentes a diferentes grupos de antibióticos (multirresistentes). La resistencia bacteriana es la capacidad que tiene la bacteria de sobrevivir en presencia de un antibiótico y representa una ventaja para expandir su nicho ecológico y posibilitar su proliferación,¹ ya sea en nosocomios o el ambiente.² Esto reduce las opciones terapéuticas, lo que repercute directamente en el éxito de la terapia antimicrobiana para combatir las infecciones secundarias producidas por estos patógenos, además de provocar elevados índices de morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios.¹

Los antibióticos intervienen en moléculas de procesos biológicos esenciales de las bacterias, por ejemplo: a) la ADN girasa en la replicación del ADN, b) la ARN polimerasa en la síntesis del ARN, c) los ribosomas en la síntesis de proteínas y d) las transpeptidasas (PBP) en la síntesis del peptidoglucano que conforma la pared celular. Los antibióticos actúan en diferentes niveles, las quinolonas inhiben la replicación del ADN, la rifampicina suprime la síntesis de ARN y los aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol anulan la síntesis de las proteínas. El grupo de los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactam y carbapenémicos) inhibe la síntesis de la pared celular.³

Mecanismos de resistencia

Las bacterias son resistentes a los antibióticos debido a la expresión de diferentes mecanismos de resistencia. Según sean el grupo del antibiótico y la especie bacteriana, estos mecanismos se pueden agrupar en cuatro: a) modificación química o hidrólisis del antibiótico mediante la adenilación, acetilación, fosforilación o hidrólisis (esta última por β -lactamasas); b) modificación del sitio blanco de la bacteria debido a mutaciones espontáneas ocurridas en los genes que codifican al blanco de acción del antibiótico, como la ARN polimerasa, el ARN ribosomal 16S, las PBP y la ADN girasa; c) modificación de la permeabilidad de la membrana bacteriana debido a la sustitución de las proteínas de membrana externa (porinas) al modificar su calibre o polaridad interna; y d) expulsión del antibiótico debido a la sobreproducción de bombas de eflujo que impide el acceso del antibiótico al sitio blanco en la bacteria.⁴

β -Lactamasas como principal mecanismo de resistencia a los β -lactámicos

Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos β -lactámicos y dan lugar a su inactivación. Su clasificación se basa en sus propiedades bioquímicas, estructura molecular y secuencia de aminoácidos, que se agrupan en cuatro clases, A, B, C y D.⁵ Dentro de la clase A existen dos familias principales de β -lactamasas denominadas TEM-1 (contracción de Temoniera, el nombre de un paciente de cuya bacteria resistente se aisló) y SHV-1 (sulphydryl variable, una descripción de propiedades bioquímicas de esta β -lactamasa). Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar sólo a penicilinas; empero, en virtud del uso de las cefalosporinas, se han seleccionado bacterias que contienen β -lactamasas mutadas en uno a tres residuos cercanos al sitio activo de la enzima con la capacidad de reconocer e hidrolizar a estos nuevos sustratos. Dichas enzimas se denominan β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).⁶ El número de mutantes ha alcanzado hasta TEM-167 y SHV-114 (<http://www.lahey.org/studies/>).

Por su parte, las β -lactamasas de la clase B poseen la propiedad de que, además de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas, hidrolizan también al grupo de los carbapenémicos.⁷ Estas enzimas requieren zinc para realizar la inactivación del antibiótico, por lo que se conocen como metalo- β -lactamasas (M β L). En esencia, existen cinco familias en este grupo de enzimas: VIM, IMP, GIM, SPM y SIM. Las dos primeras son las descritas de forma más amplia en el mundo e incluyen varios alelos, VIM-1 a VIM-22 e IMP-1 a IMP-24 (<http://www.lahey.org/studies/>). Las otras tres familias, SPM-1 (Brasil), GIM-1 (Alemania) y SIM-1 (Australia), se han reportado exclusivamente en su país de origen en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.⁷ De modo adicional, las familias VIM e IMP se han informado también en enterobacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.⁸

En México existen varios reportes que documentan brotes intrahospitalarios por *K. pneumoniae* productora de SHV-5 y SHV-2,^{9,10} además de la enzima TLA-1 que es una BLEE endémica de México y que se identificó en un aislamiento clínico de *E. coli*.^{11,12} Estas enzimas también se han reconocido en aislamientos clínicos de *Serratia marcescens*, *Klebsiella variicola* y *Enterobacter cloacae*.¹³⁻¹⁵ Con respecto a las M β L, las variantes IMP-15 e IMP-18 se identificaron en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*

de un hospital de la ciudad de Guadalajara.^{16,17} Resulta de interés que el gen que codifica a esta primera enzima (IMP-15) se reconociera en un aislamiento de *P. aeruginosa* aislada de un paciente en un hospital de Kentucky (EUA), que previamente había sido hospitalizado en México.^{16,18}

Estructura molecular de la multirresistencia

Los genes de resistencia a los diferentes antimicrobianos se relacionan con elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones e integrones.¹⁹ Estos últimos son elementos de expresión genética que incorporan genes sin promotor, de tal modo que se convierten en genes funcionales. En consecuencia, el integrón actúa como un casete de expresión para los genes que se inserten y por lo general más de un gen se integra con frecuencia (figura 1). Los integrones de clase 1 son los más estudiados y se los identifica sobre todo en aislamientos clínicos.²⁰⁻²³ La movilización de los casetes se lleva a cabo por la acción de la integrasa, la cual ha generado numerosas reconfiguraciones y combinaciones de casetes y que han seleccionado los diferentes antibióticos, de tal manera que es posible una multirresistencia que se disemina mediante transposones o plásmidos.^{24,25}

Impacto de la genómica en la resistencia bacteriana

La genómica surge con el desarrollo de técnicas de biología molecular que permiten la secuenciación de genomas completos, lo que supone el análisis del contenido de genes de un microorganismo como el caso de

las bacterias. En la actualidad se han secuenciado 770 genomas microbianos y 1 287 se encuentran en proceso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>). El análisis de los genomas bacterianos indica que un gran número de genes se ha adquirido por transferencia horizontal. Los genes de un genoma bacteriano son muy similares respecto de su composición de bases y patrón en el uso de codones. Algunas de las secuencias que son nuevas en un genoma bacteriano, y que se introdujeron a través de transferencia horizontal, presentan variación en su contenido total de G+C y pueden en ciertos casos diferenciarse de las secuencias propias debido a que mantienen las características del genoma donador. Por consiguiente, la oportunidad de identificar secuencias conservadas vinculadas con elementos genéticos móviles no descritos se ha incrementado, como es el caso de los integrones y su relación con los transposones. Estos estudios han generado nuevos conocimientos sobre la transferencia horizontal de genes y sugieren una amplia distribución en el ambiente natural.^{19,20} A partir del análisis de la secuencia de genomas bacterianos se pueden identificar genes y proteínas esenciales para la sobrevivencia de la bacteria (véase un ejemplo más adelante) y, a partir de esta información, “diseñar” nuevos antibióticos que inhiban el crecimiento bacteriano.²⁶

La genómica y la identificación de nuevos blancos a fármacos

Debido a la creciente necesidad de desarrollar nuevas clases de antibióticos para combatir bacterias resistentes a los antibióticos, se ha propuesto la identificación de nuevos blancos bacterianos mediante la secuenciación y

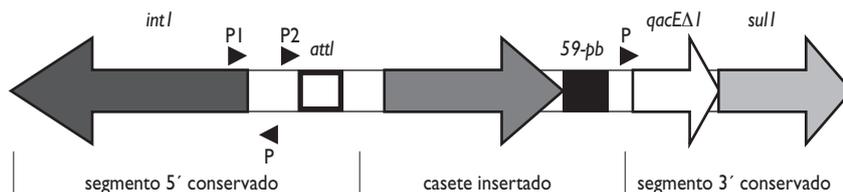


FIGURA 1. ESTRUCTURA GENERAL DE LOS INTEGRONES DE CLASE I. ESTÁN CONSTITUIDOS POR UNA REGIÓN VARIABLE (CASETE) FLANQUEADA POR REGIONES CONSERVADAS, DENOMINADAS 5'CS Y 3'SC. EN LA REGIÓN 5'CS SE LOCALIZA EL GEN DE LA INTEGRASA, *INTI*, LA REGIÓN DE RECOMBINACIÓN *ATTI* Y LOS PROMOTORES (P), INDICADOS POR LAS FLECHAS MENORES. P1 Y P2 PERMITEN LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES QUE INGRESAN EN LA REGIÓN VARIABLE. EN LA REGIÓN 3'CS SE HALLAN LOS GENES DE RESISTENCIA A ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES *QAC Δ I*, UN GEN DE RESISTENCIA A SULFONAMIDAS *SULI*. EL CASETE DEL GEN INTEGRADO SE MUESTRA EN RELACIÓN CON EL ELEMENTO DE RECOMBINACIÓN DENOMINADO 59-PB, QUE SE RECOMBINA CON EL ELEMENTO *ATTI* PARA LA INCORPORACIÓN DEL CASETE (GEN DE RESISTENCIA)

análisis de los genomas que incluyen la genómica comparativa y la genética molecular. Por su parte, la química y biología estructural están encaminadas a comprender las interacciones entre las sustancias y sus blancos biológicos. Varias estrategias se han intentado para identificar nuevos antibióticos que incluyan otras estructuras además de las ya estudiadas y otras clases funcionales que actúen en patógenos bacterianos multirresistentes, además de ampliar y extender la vida media útil del antibiótico para obtener un mejor éxito durante la terapia antimicrobiana. Por lo regular se han utilizado tres blancos bacterianos: las PBP, los ribosomas y la ADN girasa. Sin embargo, los antibióticos que actúan sobre estos blancos han disminuido su efectividad debido a la multirresistencia. Hoy en día, los avances de la genómica han permitido identificar cientos de nuevos posibles candidatos como blancos bacterianos para inhibir el crecimiento bacteriano. Un blanco preferido ha sido la membrana bacteriana, con el objetivo de afectar la síntesis de los ácidos grasos que la componen.²⁷ Otra alternativa propuesta es la limitación de la capacidad mutagénica en la bacteria que interfiere con los genes activados en los mecanismos de reparación del ADN.²⁸

El análisis bioinformático de más de tres docenas de genomas microbianos ha permitido identificar algunos blancos exclusivos en bacterias patógenas en las que actúan los antibióticos. Un ejemplo es la bacteria *E. coli* cuyo genoma contiene 4 289 genes; éstos se compararon con siete genomas de bacterias patógenas que causan enfermedades respiratorias, incluidos los genomas de *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. El resultado de este estudio identificó 246 genes conservados entre siete especies bacterianas, de los cuales 68 no se encontraron en el genoma humano; de éstos, cerca de 50% (34/68) correspondió a funciones desconocidas y 16 de ellos a funciones no esenciales; otros 18 desempeñaban funciones esenciales, incluidos los blancos para las quinolonas y los macrólidos. De estos últimos, sólo tres se seleccionaron como posibles candidatos blanco para nuevos fármacos antibacterianos que podrían utilizarse para combatir las infecciones producidas por estos patógenos. De esta forma, el propósito del análisis computacional de los genomas microbianos es vincular los genes que tengan una función desconocida y clasificarlos de acuerdo con las estructuras previamente conocidas para establecer su estructura, inferir su función y la posible acción que desempeñan en el desarrollo de la bacteria. De forma paralela a estos estudios ha proseguido la búsqueda de otros blancos bacterianos tradicionales incluidos en la síntesis de la pared celular, síntesis de proteínas, replicación y reparación del ADN; la intención es diseñar nuevos antibióticos que actúen de manera más eficaz sobre estos blancos.³

Herramientas de la genómica y la proteómica para el estudio de la resistencia bacteriana

Una detección oportuna de la resistencia a los antibióticos en las bacterias causantes de infecciones nosocomiales aporta información relevante para instituir un tratamiento adecuado y exitoso. En el campo de la microbiología se han desarrollado diferentes pruebas de laboratorio, como las tiras E-test, discos impregnados con antibiótico, medios cromogénicos, etc., para identificar de manera convencional el patrón de resistencia a los antibióticos, y los posibles mecanismos de resistencia, como la producción de BLEE en enterobacterias o M β L en bacilos gramnegativos no fermentadores.^{6,29} En relación con el empleo de métodos moleculares para detectar los mecanismos de resistencia, éstos se desarrollan mediante diferentes estrategias: a) hibridación ADN-ADN con una sonda de ADN marcada con fluorescencia; la metodología consiste en la identificación de una secuencia específica de ADN (gen que codifica a una resistencia) mediante el reconocimiento de la secuencia homóloga en el ADN en varias muestras clínicas o bacterianas; b) amplificación por PCR de un gen específico; esta técnica amplía en forma exponencial un gen específico de interés (p. ej., β -lactamasas); c) polimorfismo de fragmentos largos de restricción (RFLP), que se basa en el análisis del patrón de restricción de los fragmentos de ADN generados por una enzima de restricción que previamente se amplificaron por PCR; esta prueba puede detectar mutaciones puntuales en el ADN que alteren el número de sitios de restricción de la enzima empleada; d) secuenciación nucleotídica de ADN, que consiste en la identificación de la secuencia de las cuatro bases que componen el ADN mediante una síntesis de ADN *in vitro* (técnica de Sanger); esta secuencia puede utilizarse para inferir la secuencia de aminoácidos que componen a la proteína que codifica este ADN e identificar las posibles alteraciones (mutaciones) al compararse con el gen silvestre.^{30,31} En la actualidad se utilizan nucleótidos marcados con fluorescencia que permite una secuenciación de ADN automatizada y de alto rendimiento.³²

Estas metodologías son muy útiles y se emplean en forma regular en laboratorios de biología molecular. Sin embargo, en fecha reciente se han desarrollado otras metodologías novedosas que aportan conocimientos nuevos al campo de la genómica y la proteómica. En el caso de la primera se han desarrollado metodologías que permiten determinar el número de copias de un gen en un genoma bacteriano, basado en PCR en tiempo real, "pirosecuenciación" (denominada así por la liberación de pirofosfato durante la reacción) y microarreglos del

ADN empleado para obtener una pronta genotipificación de expresión de proteínas (p. ej., β -lactamasas). Con respecto a la proteómica, se ha utilizado la espectrometría de masas para identificar polimorfismos y genotipificación de diferentes proteínas en una sola muestra. En cuanto al área de la bioinformática, se ha desarrollado una gran cantidad de bases de datos con información biomédica y asimismo se han realizado programas computacionales empleados para establecer las vías de evolución de los genes que codifican a las β -lactamasas de distribución mundial.^{31,33} A continuación se describen algunas de estas metodologías empleadas en el estudio de la resistencia bacteriana.

PCR en tiempo real

Esta metodología permite la amplificación y detección simultáneas de fragmentos de ADN (gen de interés) gracias a la emisión de fluorescencia, que se relaciona de manera directa con la cantidad de ADN amplificado en cada ciclo, lo cual permite establecer y registrar continuamente la cinética de la reacción.³³ Con esta técnica es posible determinar la coexistencia de diferentes alelos de β -lactamasas tipo SHV (BLEE y no BLEE) en un mismo aislamiento clínico. La coexistencia de ambos alelos favorece por una parte la resistencia a grandes concentraciones de penicilina debido a la expresión de la enzima TEM-1 (no BLEE) y cefalosporinas de tercera generación por parte de la enzima SHV-5 (BLEE). Esto se refleja en un tratamiento fallido con este tipo de antibióticos.³⁴ Por otra parte, Hammond y colaboradores³⁵ cuantificaron el número de copias del gen que codifica a la β -lactamasa SHV en un mismo aislamiento clínico. La identificación de más de un alelo en aislamientos clínicos individuales es una norma (más que la excepción) y existe una relación estrecha entre los niveles de resistencia a las cefalosporinas y el número de copias de BLEE, como se ha determinado para el alelo SHV-12. Estos resultados son recientes e indican que el aumento de las concentraciones mínimas inhibitorias para combatir a las bacterias aumenta simplemente al duplicar el número de copias de una BLEE. Como ya se comentó, la familia SHV incluye mutaciones puntuales que les permiten hidrolizar a las cefalosporinas de tercera generación; las dos mutaciones más identificadas son gli238ser y glu240lis, que suelen ser dominantes sobre las mutaciones que no confieren la actividad contra las cefalosporinas. El diseño de oligonucleótidos específicos para la detección de estas mutaciones se ha desarrollado y empleado en la técnica de PCR en tiempo real mediante SYBR-Green como reactivo de detección.³⁵ De modo adicional, esta metodología se ha empleado con éxito para reconocer

a las dos familias principales de M β L (VIM e IMP) en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*.

Pirosecuenciación de ADN

Esta metodología se basa en la detección de la señal quimioluminiscente emitida por el pirofosfato (PPi) liberado por la incorporación del nucleótido en la síntesis del ADN. Una cámara de detección de fotones capta la señal y se traduce como la adición de un nucleótido, lo que genera una secuencia individual. Esta técnica se usa en la secuencia de genomas bacterianos, con una capacidad de descifrar 100 millones (10 megabases) de fragmentos de aproximadamente 250 bases en un tiempo de cuatro horas.³⁶ Dicha técnica también es una herramienta rápida y confiable en la identificación de diferentes alelos, como es el caso del reconocimiento de genes de β -lactamasas tipo CTX-M y OXA en *A. baumannii*.³⁷ En este trabajo se diferenciaron tres variantes de β -lactamasas tipo OXA, incluidos 51 aislamientos en un ensayo de 20 minutos.³⁸ Este grupo de genes ha cobrado importancia porque confiere resistencia a los carbapenémicos, los antibióticos de última elección terapéutica. Más aún, este método se ha empleado para la identificación de mutaciones en el gen *gyrA* en relación con la resistencia a la ciprofloxacina en aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*,³⁹ así como en el reconocimiento de la resistencia a macrólidos mediante la detección de mutaciones en el gen RNAr 23S en cinco diferentes especies bacterianas.⁴⁰ La combinación de las técnicas de PCR en tiempo real y la pirosecuenciación es una herramienta molecular muy útil en estudios epidemiológicos para la identificación rápida de genes o mezcla de alelos de enzimas que confieren la resistencia a los β -lactámicos en aislamientos clínicos productores de BLEE o M β L y la inclusión de genes que confieren resistencia a diferentes grupos de antibióticos.

Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Ésta es una tecnología analítica esencial de la proteómica, cuenta con una alta capacidad de análisis, sensibilidad y precisión en la determinación de las masas moleculares de péptidos y proteínas y proporciona información sobre la composición molecular obtenida de la masa molecular. El instrumento que emplea esta técnica es el espectrómetro de masas, MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, MALDI), que se basa en la generación de iones por desorción e ionización mediante la inducción por láser. Estos iones se aceleran en un campo eléctrico y penetran en un tubo de vuelo libre sin campo eléctrico alguno, lo cual lleva a un ion a alcanzar al detector. Sus aplicaciones incluyen la elucidación

estructural de moléculas orgánicas e inorgánicas, identificación, detección y cuantificación de trazas, metabolismo de los fármacos, análisis de péptidos, proteínas y nucleótidos, entre otros. Una reciente aplicación de esta metodología ha sido la identificación de variaciones en las proteínas que indican diferencias en la secuencia nucleotídica del gen, por ejemplo sustituciones de una simple base, inserciones y deleciones que se reflejan en diferencias en las proteínas.⁴¹ En cuanto al estudio de la resistencia bacteriana, existen pocos reportes, si bien esta técnica se ha empleado en la detección de mutantes de β -lactamasas y las mezclas de diferentes enzimas de la misma familia TEM o SHV, en un mismo aislamiento clínico con resultados ampliamente reproducibles. Este estudio identificó mutaciones puntuales nuevas y otras ya descritas antes en las publicaciones en 21 diferentes aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*. La MALDI-TOF parece ser una herramienta ideal para el análisis de polimorfismos de secuencias en genes relacionados con resistencia bacteriana.³¹

Microarreglos de ADN

El principio de esta técnica se basa en una hibridación de ácidos nucleicos. El microarreglo de ADN de alta densidad incluye la inmovilización de hasta 400 000 secuencias de ADN conocidas incluidas en oligonucleótidos que se sintetizan *in situ* sobre una superficie de vidrio en un área no mayor de una pulgada cuadrada; en esta superficie se puede explorar la expresión hasta de 13 000 genes de forma simultánea mediante la hibridación de cDNA obtenido de cultivos bacterianos crecidos en condiciones diferentes o productos de PCR marcados en forma diferencial. La lectura de la información obtenida se realiza por medio de sistemas de software específicamente diseñados para analizar este número de datos que se obtienen de los microarreglos.⁴² Los estudios de genotipificación de la resistencia a los antibióticos mediante microarreglos de ADN son escasos, aunque esta técnica se ha utilizado en aislamientos clínicos de micobacterias con resistencia a múltiples fármacos,⁴³ *N. gonorrhoeae*⁴⁴ y en la genotipificación de β -lactamasas tipo TEM.⁴⁵ En este último caso se desarrolló un microarreglo con oligonucleótidos inmovilizados para la identificación de polimorfismos de genes con un solo nucleótido de diferencia (SNP); dicho ensayo incluyó 96% de los genes que codifican a las β -lactamasas tipo TEM descritas en la actualidad, incluidos los fenotipos BLEE y TRI (TEM resistente a inhibidores, como el ácido clavulánico). El ensayo incluyó el ADN de aislamientos clínicos de *E. coli*, *E. cloacae* y *K. pneumoniae* productores de BLEE. Este ADN se amplificó mediante PCR con oligonucleótidos

de consenso en presencia de nucleótidos marcados con fluorescencia. La genotipificación discriminó 102 de las 106 variantes incluidas notificadas en fecha reciente. Este ensayo ofrece una opción atractiva para la identificación y vigilancia epidemiológica de las β -lactamasas tipo TEM, así como la detección de la diseminación de los genes de resistencia en el ambiente hospitalario.⁴⁵

Bioinformática

La bioinformática es un campo de la ciencia en el cual confluyen varias disciplinas: biología, computación y tecnología de la información. Esta definición procede del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica de EUA) y tiene como objetivo crear bases de datos públicas de libre acceso, crear investigación en biología computacional, desarrollar programas para análisis de secuencias y difundir la información biomédica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Hoy día se dispone de varias bases de datos (ENTREZ, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery>) con información biológica; los investigadores pueden acceder a los datos existentes y suministrar o revisar datos, así como utilizar la información para realizar análisis comparativos entre secuencias de nucleótidos y aminoácidos. En el campo de la resistencia bacteriana, la bioinformática se emplea para la asignación funcional de genes por medio de comparaciones con secuencias (ADN o proteínas) previamente existentes en el GenBank. La base de datos de genomas completos provee una gran variedad de cromosomas, mapas físicos y genéticos de los genomas. Esta base está organizada en los siguientes grupos de organismos: *Archaea*, bacteria, eucaria, virus, viroides y plásmidos. Por otro parte, diferentes grupos de investigación han desarrollado programas bioinformáticos para resolver diferentes interrogantes, como es el caso del programa EvolConnEval, el cual tiene como finalidad establecer vías de evolución en diferentes familias de moléculas, por ejemplo las BLEE derivadas de la familia SHV, y conocer los mecanismos de movilización de estas variantes. Gracias a este programa se han establecido dos principales vías de evolución de los alelos SHV, ambas vías evolucionadas a partir del alelo silvestre SHV-1 del cromosoma de *K. pneumoniae*. Las mutaciones encargadas del fenotipo de espectro extendido se seleccionaron en forma independiente y su diseminación ocurrió mediante movilización genética. Asimismo, el desarrollo de este tipo de programas bioinformáticos permite elucidar la evolución y movilización de los genes que codifican a las β -lactamasas; en un futuro será posible predecir la generación de nuevas variaciones de la familia SHV con la capacidad de hidrolizar nuevos sustratos.⁴⁶

Conclusiones

Gracias al desarrollo tecnológico disponible en la actualidad pueden conocerse en forma más precisa y estrecha la fisiología y la estructura molecular de los agentes causantes de infecciones producidas por las bacterias. Esto facilitará el diseño de nuevos y mejores fármacos dirigidos a blancos previos y otros que inhiban de manera específica el crecimiento bacteriano. Por otra parte, aunque no todas las herramientas moleculares novedosas se han usado ampliamente en el campo de la resistencia bacteriana, los estudios realizados hasta el momento proporcionan datos epidemiológicos para la detección rápida y oportuna de genes contenidos en bacterias multirresistentes, de tal modo que sean posibles un diagnóstico y un tratamiento más efectivos. En el caso de la secuenciación masiva de genomas bacterianos se generará información relevante que permite identificar nuevos blancos a fármacos en las bacterias. Con estas herramientas se podrán realizar estudios epidemiológicos que hagan posible identificar poblaciones de bacterias resistentes a antibióticos y la diseminación de los genes que confieren la resistencia en diferentes nichos ecológicos. Sin embargo, un hecho importante que debe considerarse es la prevención del surgimiento de bacterias resistentes a los antibióticos mediante el uso prudente de antibióticos y prolongar la efectividad de los medicamentos disponibles en la actualidad.

Referencias

- Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 2003;36:S11-S23.
- Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:175-188.
- Walsh C. Antibiotics: action, origin, resistance. EUA: American Society of Microbiology Press, 2003.
- Silva J. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Current Threat Research* 1996;57:30-35.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-1233.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657-686.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440-458.
- Tortola MT, Lavilla S, Miro E, Gonzalez JJ, Larrosa N, Sabate M, et al. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two enterobacteriaceae isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3492-3494.
- Silva J, Gatica R, Aguilar C, Becerra Z, Garza-Ramos U, Velazquez M, et al. Outbreak of infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J Clin Microbiol* 2001;39:3193-3196.
- Miranda G, Castro N, Leanos B, Valenzuela A, Garza-Ramos U, Rojas T, et al. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J Clin Microbiol* 2004;42:30-35.
- Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, et al. TLA-I: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:997-1003.
- Alcantar-Curiel D, Tinoco JC, Gayosso C, Carlos A, Daza C, Perez-Prado MC, et al. Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-I genes. *Clin Infect Dis* 2004;38:1067-1074.
- Garza-Ramos U, Martínez-Romero E, Silva-Sánchez J. SHV-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. *Salud Pública Mex* 2007;49:415-421.
- Mosqueda-Gomez JL, Montano-Loza A, Rolon AL, Cervantes C, Bobadilla-Del-Valle JM, Silva-Sánchez J, et al. Molecular epidemiology and risk factors of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* A case-control study. *Int J Infect Dis* 2008;12:653-659.
- Espinosa de los Monteros LE S-SJJVRTG-RUA VV. Outbreak of Infection by Extended-Spectrum B-Lactamase SHV-5 Producing *Serratia Marcescens* in a Mexican Hospital. 2008;20:586-592.
- Garza-Ramos U, Morfin-Otero R, Sader HS, Jones RN, Hernandez E, Rodriguez-Noriega E, et al. Metallo-beta-lactamase gene bla(IMP-15) in a class I integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2943-2946.
- Garza-Ramos U, Tinoco P, Silva-Sánchez J, Morfin-Otero R, Rodriguez-Noriega E, Leon-Garnica G, et al. Metallo-beta-lactamase IMP-18 is located in a class I integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:78-80.
- Martin CA, Morita K, Ribes JA, Deshpande LM, Sader HS, Castanheira M. IMP-15-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated in a U.S. medical center: a recent arrival from Mexico. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2289-2290.
- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 2000;405:299-304.
- Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 1994;264:375-382.
- Hall RM, Brookes DE, Stokes HW. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol* 1991;5:1941-1959.
- Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 1995;141(Pt 12):3015-3027.
- Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol* 1997;26:731-745.
- Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2684-2688.
- Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist* 1995;1:195-202.
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science* 2006;311:374-377.
- Wang J, Soisson SM, Young K, Shoop W, Kodali S, Galgocsi A, et al. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* 2006;441:358-361.
- Cirz RT, Chin JK, Andes DR, Crecy-Lagard V, Craig WA, Romesberg FE. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol* 2005;3:e176.

29. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-951.
30. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-5467.
31. Sturenburg E, Storm N, Sobottka I, Horstkotte MA, Scherpe S, Aepfelbacher M, et al. Detection and genotyping of SHV beta-lactamase variants by mass spectrometry after base-specific cleavage of in vitro-generated RNA transcripts. *J Clin Microbiol* 2006;44:909-915.
32. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986;321:674-679.
33. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 1993;11:1026-1030.
34. Perilli M, Dell'Amico E, Segatore B, de Massis MR, Bianchi C, Luzzaro F, et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from an Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol* 2002;40:611-614.
35. Hammond DS, Schooneveldt JM, Nimmo GR, Huygens F, Giffard PM. bla(SHV) Genes in *Klebsiella pneumoniae*: different allele distributions are associated with different promoters within individual isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:256-263.
36. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 1998;281:363-365.
37. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Pyrosequencing for rapid identification of carbapenem-hydrolysing OXA-type beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:1236-1240.
38. Naas T, Oxacelay C, Nordmann P. Identification of CTX-M-type extended-spectrum-beta-lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:223-230.
39. Gharizadeh B, Akhras M, Unemo M, Wretling B, Nyren P, Pourmand N. Detection of gyrA mutations associated with ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* by rapid and reliable pre-programmed short DNA sequencing. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26:486-490.
40. Haanpera M, Huovinen P, Jalava J. Detection and quantification of macrolide resistance mutations at positions 2058 and 2059 of the 23S rRNA gene by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:457-460.
41. Hardouin J. Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2007;26:672-682.
42. Liu ET, Karuturi KR. Microarrays and clinical investigations. *N Engl J Med* 2004;350:1595-1597.
43. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, et al. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* 1999;37:49-55.
44. Booth SA, Drebot MA, Martin IE, Ng LK. Design of oligonucleotide arrays to detect point mutations: molecular typing of antibiotic resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* and hantavirus infected deer mice. *Mol Cell Probes* 2003;17:77-84.
45. Grimm V, Ezaki S, Susa M, Knabbe C, Schmid RD, Bachmann TT. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J Clin Microbiol* 2004;42:3766-3774.
46. Ford PJ, Avison MB. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:69-75.