



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN
MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“ANÁLISIS DEL ENTORNO GENÉTICO DEL GEN
qnrA EN *Klebsiella pneumoniae* Y *Enterobacter cloacae*”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

VÍCTOR OTHÓN SERNA RADILLA.

DIRECTORA DE TESIS: DRA. NATIVIDAD CASTRO ALARCÓN.

CODIRECTOR DE TESIS: DR. JESÚS SILVA SÁNCHEZ.

CHILPANCINGO, GRO., OCTUBRE 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 1 días del mes de julio de dos mil once, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "**Análisis del entorno genético del gen *qnrA* en *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae***", presentada por el alumno Víctor Othón Serna Radilla, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Natividad Castro Alarcón
Dirección de tesis

Dr. Jesús Silva Sánchez
Codirección de tesis

M en C. Adolfo Román Román

Dra. Amalia Vences Velázquez

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Vo. Bo

Dra. Isela Farra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias
Biomédicas



Vo. Bo

Dra. Berenice Illades Aguiar
Directora de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico Epidemiológico perteneciente al Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), en la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

Bajo la dirección de

Dra. Natividad Castro Alarcón
Dr. Jesús Silva Sánchez

y la asesoría de

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez
M. en C. Adolfo Román Román
Dra. Amalia Vences Velázquez

Con la colaboración de

Laboratorio de Diagnóstico Epidemiológico del CISEI
Dr. Humberto Barrios Camacho
Dr. Jesús Ulises Garza-Ramos Martínez
Dra. Elsa María Tamayo Legorreta
Químico y Biólogo Fernando Luis Reyna Flores
Químico Juan Alejandro Sánchez Pérez
Técnica Teresa Rojas Moreno

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán”
ISSSTESON

Hospital de Altas Especialidades No. 25 del IMSS
Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas
Hospital San José Tecnológico
Clínica Hospital Durango
Instituto Nacional de Cancerología
Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde
Hospital General de Acapulco

Esta investigación se desarrolló con financiamiento del proyecto 87334 del fondo sectorial SALUD-2008-01 del CONACYT.

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Víctor Othón Serna Radilla; recibió beca del CONACYT.

Agradecimientos.

Quisiera agradecer al Doctor Jesús, por haberme acogido en su laboratorio, por su comprensión, su apoyo, su confianza y fe en mí.

Gracias a la Doctora Natividad por creer en mí, por apoyarme y darme las herramientas necesarias para salir adelante con la Maestría.

Quisiera agradecer a Dios, por haberme dado todo el valor y la fuerza necesaria para emprender esta nueva etapa en mi vida y por estar siempre a mi lado con su gran apoyo celestial.

Agradezco a mi madre que siempre me ha apoyado en todas las decisiones que he tomado en mi vida y ha estado incondicionalmente para ayudarme. A mis hermanas con las cuales siempre he contado con su comprensión y ayuda.

A Mercedes, Nora Lidia y Roxana, tres hermanas que me dieron el calor y afecto de familia, que me faltaba al estar lejos de la mía.

Al QBP Juan y los Químicos Ariadna y Carlos Alberto, los mejores amigos que pude haber encontrado en la Maestría, con los cuales me divertí mucho; siempre confiaron y tuvieron fe en mí. Asimismo al C.D. Antonio, un gran amigo que siempre me brindó su amistad y gran ayuda incondicional. Igualmente a todos mis compañeros y colegas Odontólogos que siempre creyeron en mí.

Gracias a Israel, la persona que es el motor en mi vida y lo más grande que tengo.

Agradezco a los QBP Etzel Damaris, José, Soledad y Jonathan por haberme introducido en el interesante mundo de la Microbiología, gracias por su paciencia y apoyo.

A Luz Edith, Perla, Edgar Alejandro, Luis Enrique, Jorge Luis Andrés, Manuel Alejandro y Lorenzo, grandes personas y amigos que conocí en el L2PA del CISEI, gracias por brindarme su amistad, paciencia, comprensión y apoyo.

A todo el personal del Laboratorio 2 Planta Alta del CISEI: Químico y Biólogo Fernando, Químico Alejandro, Sra. Teresa, Sra. Gloria Dr. Humberto, Dra. Elsa y Dr. Ulises. Gracias por apoyarme, soportarme y tenerme paciencia. Un agradecimiento muy especial al Dr. Humberto el cual me apoyo durante toda la etapa experimental de mi tesis.

Gracias a la Bióloga Paola, la mejor y más eficiente secretaria de la MCB.

Gracias a la Doctora Mónica, la mejor tutora que me pudo haber tocado, gracias por escucharme y tener fe en mí.

ÍNDICE.

	Página.
Agradecimientos.	4
Resumen.	6
Abstract.	7
Introducción.	8
Antecedentes.	12
Materiales y Métodos.	15
Resultados.	22
Discusión.	29
Conclusiones.	34
Perspectivas.	35
Anexos.	36
Referencias.	46

RESUMEN.

Antecedentes. Los genes *qnr* (del inglés quinolone resistance) se localizan en plásmidos en un integrón de Clase I complejo asociado con el elemento *ISCR1*; participan en la resistencia a las quinolonas protegiendo a las enzimas ADN Girasa y ADN Topoisomerasa IV que participan en la replicación del ADN siendo estas enzimas blanco de estos antibióticos.

Objetivo. Analizar el entorno genético del gen *qnrA* que participa en la resistencia a las quinolonas, en aislamientos clínicos de enterobacterias multirresistentes causantes de infecciones nosocomiales en hospitales de México.

Materiales y Métodos. Por PCR se determinó la presencia del gen *qnrA*. La extracción de plásmidos fue realizada con la técnica descrita por Kieser. Se realizaron experimentos de conjugación con la técnica descrita por Miller. Para analizar el entorno genético del gen *qnrA*, este se realizó mediante amplificaciones por PCR, secuenciación nucleotídica y análisis bioinformático.

Resultados. Se determinó la presencia del gen *qnrA1* en 9 aislamientos clínicos (*Klebsiella pneumoniae* [5] y *Enterobacter cloacae* [4]). Solamente se obtuvieron 2 transconjugantes que contienen el gen *qnrA1*. Se analizó el entorno genético del gen *qnrA1* en 6 aislamientos clínicos. En 5 de los 6 aislamientos, el gen *qnrA1* fue localizado en un integrón complejo de clase I asociado al elemento *ISCR1* (estructuras ya descritas). Sólo 1 de los 6 aislamientos sugirió contener una estructura diferente pero también asociada al elemento *ISCR1*.

Conclusiones. El gen *qnrA1* se asocia con el elemento *ISCR1* y se encuentra en un integrón complejo de Clase I. Así, al asociarse a estos elementos genéticos móviles se facilita su diseminación de forma horizontal y universal entre especies bacterianas.

ABSTRACT.

Background. The *qnr* genes (quinolone resistance) are localized in plasmids in a complex Class I integron associated with the *ISCR1* element; they participate in the quinolone resistance protecting the enzymes DNA gyrase and the DNA topoisomerase IV that participate in the DNA replication and they are the target of these antibiotics.

Objective. To analyze the genetic context of the *qnrA* gene that participates in the quinolone resistance in multidrug resistance enterobacterial isolates that caused nosocomial infections.

Materials and Methods. The presence of the *qnrA* gene was determined by PCR. The plasmidic DNA was extracted according to the method described by Kieser. The conjugation experiments were performed according to the method described by Miller. To analyze of the genetic context of *qnrA* gene; it was realized by amplification by PCR, nucleotide sequence and bioinformatic analysis.

Results. The presence of the *qnrA1* gene was determined in 9 enterobacterial isolates (*Klebsiella pneumoniae* [5] and *Enterobacter cloacae* [4]). We only got 2 transconjugants that harbored the *qnrA1* gene. The genetic context of the *qnrA1* gene was analyzed in 6 enterobacterial isolates. In 5 out 6 isolates the *qnrA1* gene was localized in a complex class I integron associated with the *ISCR1* element (structure reported). Just 1 isolate suggested to have a different structure, but also associated to the *ISCR1* element.

Conclusions. The *qnrA1* gene is associated with the *ISCR1* element and is found in a complex class I integron. So, the association of *qnrA1* gene with these mobile genetic elements, facilitates its horizontal and universal spreading between bacterial species.

INTRODUCCIÓN.

Las enterobacterias se encuentran entre las diversas bacterias causantes de infecciones nosocomiales, por su perfil de multiresistencia; debido a la producción β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) que confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y aztreonam; así como también por su resistencia a quinolonas por diversos mecanismos (Paterson and Bonomo, 2005; Garza-Ramos *et al*, 2009; Drawz and Bonomo, 2010). Las quinolonas son un grupo de compuestos antimicrobianos sintéticos de acción bactericida, que derivan de una estructura básica idéntica, el ácido 4-quinolín, 3-carboxílico (4-quinolona) (Sánchez-Céspedes, 2008). A esta estructura en común, se le han agregado uno ó más átomos de flúor en su posición 6, denominándose fluoroquinolonas; aumentando así, su espectro de acción (Mella *et al*, 2000). Desde su aparición hasta la actualidad se ha generado 4 generaciones de quinolonas (Sánchez-Céspedes, 2008; Campos-Sepúlveda *et al*, 2008).

Las quinolonas son bactericidas, al inhibir la replicación del ADN. Sus blancos intracelulares son ADN topoisomerasas de tipo II; capaces de cortar el ADN de doble cadena y son dependientes de ATP: ADN girasa (codificada por los genes *gyrA*, *gyrB*) y ADN topoisomerasa IV (codificada por los genes *parC*, *parE*) (Drlica *et al*, 2008; Noble *et al*, 2003; Smith and Maxwell, 2006; Ruiz, 2003; Roca, 2009). La principal función de la ADN girasa es catalizar el superenrollamiento negativo del ADN y en el caso de la ADN topoisomerasa IV es la separación de los genomas bacterianos hijos tras de la replicación del ADN (Ruiz, 2003). La enzima blanco de las quinolonas difiere entre gram positivos y gram negativos. En los gram positivos la enzima blanco primaria es, en muchos casos, la ADN topoisomerasa IV, mientras que en los gram negativos es la ADN girasa (Rodríguez-Martínez, 2005). Las quinolonas se unen rápidamente al complejo ADN-enzima, antes de que la escisión del ADN ocurra. Después de la unión del fármaco, un paso más lento asociado a la escisión del ADN ocurre, resultando en una inhibición de la reunión de los extremos del ADN por las topoisomerasas tipo II, produciéndose una barrera física para el

movimiento de la horquilla de replicación, la ARN polimerasa y la ADN helicasa (Drlica *et al*, 2008).

La mayoría de la literatura publicada sobre los mecanismos de resistencia a las quinolonas, se basa en estudios realizados en enterobacterias, especialmente en *Escherichia coli* (Ruiz, 2003). Los mecanismos de acción de resistencia a las quinolonas se pueden encontrar codificados en el genoma bacteriano (Mutaciones en los genes que codifican para las enzimas blanco [*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*], disminución en la expresión de porinas en la membrana externa [*OmpF*], sobreexpresión de bombas de expulsión [*AcrAB-tolC*]) y en genes plasmídicos (*qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*) (Ruiz, 2003; Rodríguez-Martínez, 2005; Poole, 2000; Piddock, 2006; Strahilevitz *et al*, 2009). El gen *aac(6')-Ib-cr* codifica para una variante de aminoglucósido acetiltransferasa, capaz de reducir la actividad de norfloxacino, ciprofloxacino y aminoglucósidos (Strahilevitz *et al*, 2009; Kim *et al*, 2009). El gen *qepA* codifica para una bomba de expulsión de 511 aminoácidos capaz de excretar fluoroquinolonas (Strahilevitz *et al*, 2009; Yamane *et al*, 2007).

La resistencia a las quinolonas mediada por plásmidos, se describió por primera vez en un aislamiento clínico de *Klebsiella pneumoniae* en 1998 y este tipo de resistencia es cada vez más identificada a nivel mundial en aislamientos clínicos de enterobacterias (Martínez-Martínez *et al*, 1998; Kim *et al*, 2009). Los genes *qnr* (del inglés quinolone resistance) codifican proteínas Qnr que se componen por pentapéptidos repetidos, los cuales se definen por una serie de repeticiones en tándem de sus motivos: [Ser, Thr, Ala ó Val]-[Asp ó Asn]-[Leu ó Phe]-[Ser, Thr ó Arg]-[Gly]. Se han propuesto 5 familias de determinantes *qnr* como son *qnrA*, *qnrS*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*. El primer elemento transmisible horizontalmente reportado fue *qnrA* (Strahilevitz *et al*, 2009). Las proteínas Qnr interfieren en la unión de las quinolonas con la ADN girasa y la ADN topoisomerasa IV (Cesaro *et al*, 2008). Los plásmidos que hospedan *qnrA*, pueden también codificar BLEEs y estudios previos han mostrado que las cepas positivas al gen *qnr* expresan CTX-M-15 y SHV-12 (Yang *et al*, 2008).

El gen *qnrA*, se ha identificado en integrones tipo *sul1* complejos de la familia In4, estos integrones contienen la secuencia ISCR1 (Insertion Sequences Common Regions), la cual codifica para una recombinasa involucrada en la movilización de los genes de resistencia a los antibióticos en su proximidad (Cano *et al*, 2008).

Los integrones son una familia de elementos genéticos potencialmente móviles, capaces de integrar y expresar genes de resistencia a los antibióticos, contienen al gen *Int1*, que codifica para la recombinasa específica de sitio, llamada integrasa. Adyacente a este gen, se localiza el sitio de recombinación específica *attI*, en el cual se inserta el casete genético de resistencia, éstos conforman el extremo 5' conservado (5'CS [CS: Conserved Sequence]) de 1.36 Kb. El extremo 3' altamente conservado (3'CS) de 2 Kb, se conforma por los genes *qacEΔ1* (resistencia a compuestos de amonio cuaternario), *sul1* (resistencia a sulfonamidas) y *orf5*. Entre estos extremos se encuentra la zona variable, con presencia ó ausencia de casetes genéticos (Lévesque *et al*, 1995; González *et al*, 2004).

Los casetes genéticos son pequeñas moléculas de ADN circulares de aproximadamente 1 Kb, comprendiendo un solo gen con un sitio de recombinación denominado sitio *attC* ó elemento de 59 pb (59-base element). La integrasa permite la interacción entre el sitio *attI* y el sitio *attC*, uniendo ambos sitios facilitando la integración ó escisión del casete de resistencia en la zona variable del integrón (González *et al*, 2004; Toleman *et al*, 2006).

Los elementos ISCRs se parecen a los elementos IS91, IS801, IS1294, que efectúan transposición por el mecanismo del círculo rodante. Los elementos ISCRs presentan un poderoso sistema de movilización que en teoría puede movilizar cualquier sección de ADN y probablemente sean más importantes que el sistema de integrones, el cual solo moviliza ADN en forma de casetes genéticos (Toleman *et al*, 2006).

El gen *qnrA* se ha localizado inmediatamente río abajo del elemento *ISCR1* como parte de un integrón de Clase I complejo; donde los genes de resistencia a antibióticos no están agrupados en casetes y presentan al extremo 3'CS duplicado (Figura 1). La asociación de *ISCR1* con *qnrA* en aislamientos no relacionados es también sorprendente. Varios genes de β-lactamasas han sido hallados en plásmidos que portan al gen *qnrA*; como *bla_{VEB-1}*, *bla_{FOX-5}*, *bla_{SHV-7}*, *bla_{CTX-M-9}* y *bla_{PSE-1}* (Rodríguez-Martínez *et al*, 2006; Toleman *et al*, 2006).

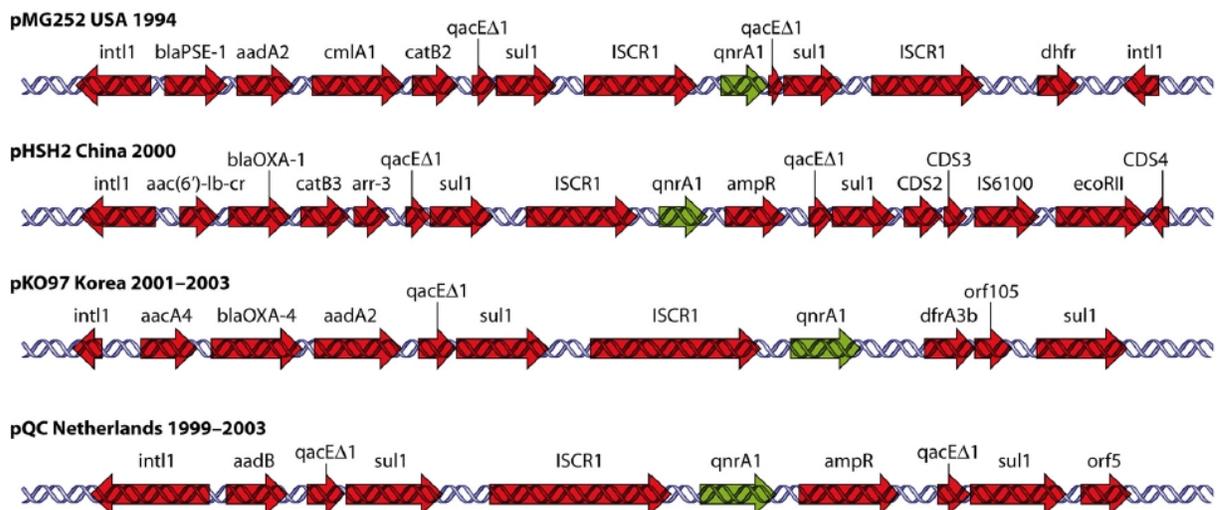


FIGURA 1. Entorno genético del gen *qnrA1* (Strahilevitz *et al*, 2009; Martínez-Martínez *et al*, 1998; Wang *et al*, 2003; Jeong *et al*, 2005; Paauw, Fluit *et al*, 2007).

En la actualidad en México; hay pocos reportes relacionados a la frecuencia de genes *qnr* en aislamientos clínicos de enterobacterias productoras de BLEEs causantes de infecciones nosocomiales (Silva-Sánchez *et al*, 2011). Existen reportes de asociación del gen *qnrA* con integrones de Clase I Complejos, los cuales contienen al elemento *ISCR1* y presentan el extremo 3'CS duplicado (Strahilevitz *et al*, 2009). El objetivo de este trabajo fue analizar el entorno genético del gen *qnrA* que participa en la resistencia a las quinolonas en aislamientos clínicos de enterobacterias causantes de infecciones nosocomiales en hospitales de México. Los resultados obtenidos de esta investigación, se compararon con otros reportes a nivel mundial, lo que permitió contar con información actualizada de los mecanismos de resistencia a las quinolonas en México.

ANTECEDENTES.

Durante el período de Marzo del 2005 a Junio del 2009, se recolectaron 226 aislamientos clínicos de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido, provenientes de 8 hospitales del país (Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, Hospital de Altas Especialidades No. 25 del IMSS, Hospital San José Tecnológico, Instituto Nacional de Cancerología, Clínica Hospital Durango, ISSSTESON, Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde y el Hospital General de Acapulco). 135 (59.7%) correspondieron a *Escherichia coli*, 57 (25.3%) a *Klebsiella pneumoniae* y 34 (15.0%) a *Enterobacter cloacae* (Silva-Sánchez *et al*, 2011).

De los 226 aislamientos clínicos solo 49 (21.6%) fueron positivos para algún tipo de gen *qnr*, y provenían solamente de 5 de los 8 hospitales incluidos en el estudio (Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, Hospital de Altas Especialidades No. 25 del IMSS, Instituto Nacional de Cancerología, Hospital Civil de Guadalajara, Hospital General de Acapulco), *Klebsiella pneumoniae* fue la especie más frecuente en presentar al gen *qnr* (Cuadro 1). Este estudio es el primer reporte de la presencia de los genes *qnr* en México (Silva-Sánchez *et al*, 2011).

CUADRO 1. Enterobacterias productoras de *qnr*.

n=226 (100%)

Especie	Gen <i>qnr</i>						Total n(%)
	A	S	B	AS	AB	BS	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .	2 (0.88)	6 (2.7)	17 (7.52)	3 (1.3)	0 (0)	1 (0.4)	29 (12.8)
<i>Enterobacter cloacae</i> .	1 (0.4)	1 (0.4)	14 (6.2)	0 (0)	3 (1.3)	0 (0)	18 (8.4)
<i>Escherichia coli</i> .	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)
Total n(%)	3 (1.3)	8 (3.6)	31 (13.7)	3 (1.3)	3 (1.3)	1 (0.4)	49 (21.6)

(Silva-Sánchez *et al*, 2011)

Durante el año 2006, se aisló la bacteria *Escherichia coli* (R5509) de un paciente con infección en las vías urinarias, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición “Salvador Zubirán”, este aislamiento clínico presentó un fenotipo de multiresistencia, se identificó como productor de BLEEs, presentó también resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas. Se obtuvieron transconjugantes, que presentaron 2 fenotipos de resistencia, que se denominaron como TA (resistencia a penicilinas, tetraciclina y ácido nalidíxico, el gen *qnrA1* y un plásmido de 50 Kb, que se denominó pSZ50) y TB (resistencia a penicilinas, tetraciclina, ácido nalidíxico, cefotaxima, ceftazidima, cloranfenicol, kanamicina, gentamicina y ciprofloxacino, el gen *qnrA1* y un plásmido de 300 Kb, que se denominó pSZ300). El fenotipo TB es igual al fenotipo del aislamiento clínico R5509 (Garza-Ramos *et al*, 2009; Hernández-Vargas, 2010).

Ambos plásmidos se restringieron con la enzima EcoRI, demostrando que el plásmido pSZ50 comparte un patrón de restricción idéntico con pSZ300. Mediante hibridación tipo Southern Blot se identificó que el gen *qnrA1*, está contenido en el mismo segmento de ADN en ambos plásmidos. Por eso se dedujo que pSZ50 forma parte de pSZ300, así mismo que pSZ50 se escinde de pSZ300 y se transfiere por conjugación, llevando los mismos genes de resistencia a penicilinas, tetraciclina y ácido nalidíxico (Garza-Ramos *et al*, 2009; Hernández-Vargas, 2010).

Se secuenció el plásmido pSZ50 para identificar su entorno genético. Así se encontró que pSZ50 es un plásmido de 45, 952 pb, el cual por homología de secuencia es similar en un 99% con el plásmido pKP96 (Shen *et al*, 2008) de 67, 850 pb de *Klebsiella pneumoniae*, con lo que respecta al operon *tra* de 19.5 Kb (genes involucrados en conjugación bacteriana), genes de resistencia a tetraciclinas (*tetA*, *tetR*) y el origen de replicación *repA* (Garza-Ramos *et al*, 2009; Hernández-Vargas, 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS.

Aislamientos bacterianos

De 49 aislamientos de enterobacterias productoras de BLEEs y portadoras de genes *qnr* recolectadas durante Marzo del 2005 a Junio del 2009 en hospitales de México; se seleccionaron 9 cepas portadoras del gen *qnrA*, de las cuales 5 fueron *Klebsiella pneumoniae* y 4 *Enterobacter cloacae*. De estos aislamientos, 3 presentan solamente al gen *qnrA*; 3 presentan al gen *qnrA* y *qnrS*; 3 presentan el gen *qnrA* y *qnrB*. Así se detectaron 9 aislamientos con el gen *qnrA*, cuyos productos de PCR se purificaron y se secuenciaron, encontrándose que las 9 cepas contenían el gen *qnrA1*.

Detección del gen *qnrA* por PCR (Polymerase Chain Reaction).

Mediante PCR se determinó la presencia del gen *qnrA*. Primeramente se realizó la extracción de ADN por medio de choque térmico que incluye un paso de calentamiento a 100°C de una colonia única en un volumen total de 50µL de agua estéril, después de esto se colocó sobre hielo para su enfriamiento, posteriormente se centrifugó a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) y se tomaron 10µL de sobrenadante que se resuspendieron en 90µL de agua estéril. Para amplificar al gen *qnrA* se utilizaron los siguientes iniciadores, el iniciador sentido *qnrAFm* 5'-AGAGGATTTCTCACGCCAGG-3' y el iniciador antisentido *qnrARm* 5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC-3', para amplificar un fragmento interno de 579 pares de bases (pb) (Cattoir *et al*, 2007). El ADN total (2µL) se sometió a una PCR sencilla; en una mezcla de reacción de 25µL, que contiene 2.5µL de 10X *Taq* buffer con (NH₄)₂ SO₄, 2µL de Cloruro de Magnesio 25mM (MgCl₂), 2.5µL de desoxirribonucleótidos trifosfato 2mM (dNTPs), 2.5µL de cada uno de los iniciadores (5pmol/µL), 0.15µL de *Taq* ADN Polimerasa recombinante (5U/µL) (Fermentas) y 11.0µL de agua estéril. La amplificación se realizó con el siguiente perfil de ciclo termal: 2 minutos a 94°C y 30 ciclos de amplificación que consisten de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 40 segundos a 72°C, y un último ciclo de 4 minutos a 72°C para la extensión final.

Se tomaron 5µL de los productos de PCR y se analizaron en un gel de agarosa al 1%, se hizo un corrimiento electroforético a 100 Voltios por 1 hora en buffer TAE1X (Tris Base, Ácido Acético y EDTA). Se utilizó el marcador de peso molecular ΦX174RF DNA/*Hae* III fragments (Invitrogen).

Electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis).

Para averiguar si había aislamientos clínicos productores de *qnrA* con el mismo ó diferente origen clonal; fueron analizados para determinar su origen clonal, por medio de un perfil de macrorestricción del ADN genómico obtenido después de la digestión del ADN genómico con la enzima XbaI y la separación de los fragmentos obtenidos a través de la técnica de electroforesis por campos pulsados (Kaufmann, 1998). El origen clonal de los aislamientos clínicos de enterobacterias, se determinó siguiendo los criterios que describen Tenover y colaboradores (Tenover *et al*, 1995).

Extracción de plásmidos.

La extracción de plásmidos se realizó con la técnica de Kieser (Kieser, 1984). Para esto se inocularon 5mL de caldo LB, el cultivo se incubó a 37°C por 16 horas con una agitación a 200 rpm; las células se cosecharon por centrifugación a 14,000 rpm por 2 minutos. Se decantó el caldo LB y se le adicionaron 400µL de Solución I (Sacarosa 0.3M [15mL], Tris-HCl 25mM pH 8 [1.25mL], EDTA 25mM pH8 [2.5mL] y Agua [31.25mL]), se mezcló utilizando un agitador tipo vórtex hasta que se resuspendió la pastilla (pellet), se le adicionaron 100µL de Lisozima (10mg/mL) y se mezcló suavemente por inmersión. Posteriormente se incubó a 4°C por 30 minutos, transcurrido este tiempo se le adicionaron 250 µL de solución II fresca (NaOH 2M [750µL], SDS al 10% [1mL] y Agua [3.25mL]), se mezcló suavemente por inmersión y se incubó a 55°C por 30 minutos. Posteriormente se dejó enfriar en agua, se agregaron 80µL de Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:24:1), se mezcló utilizando un agitador tipo vórtex hasta que tornara en una coloración blanca uniforme, se centrifugó a 14, 000 rpm a 4°C por 20 minutos, del sobrenadante se tomaron 450µL.

De estos 450µL, 70µL se analizaron en un gel de agarosa al 0.7%, se realizó un corrimiento electroforético a 80 Voltios por 6 horas en buffer TBE1X (Tris base, Ácido Bórico, EDTA). Los plásmidos R6K (40 Kb), RP4 (54 Kb) RI (93 Kb), S4 (275 Kb) se utilizaron como marcadores de peso molecular.

Conjugación bacteriana.

Para los experimentos de conjugación se utilizaron como donadoras las cepas que portaron los genes *qnrA* y como receptora a *Escherichia coli* J53 (F^- Pro^- Met^- AZ^r), por el método descrito por Miller, (Miller, 1972) para obtener transconjugantes con el gen *qnrA*. Se inocularon las cepas donadoras en un tubo estéril con 1mL de caldo LB (Lysogeny Broth ó Luria-Bertani) y la cepa receptora en un matraz estéril con 10mL de caldo LB, se incubaron en agitación a 37°C por 3 horas. Transcurrido este tiempo se colocaron en hielo para detener el crecimiento, como control se usaron 100µL de la cepa receptora y se plaqueó en caja con medio LB con Ácido Nalidíxico 8µg/mL, así mismo de las cepas donadoras; de cada una se usaron 100µL y se plaquearon en cajas con medio LB con Azida de Sodio 100µg/mL, las cajas se incubaron a 37°C por 16 horas. Se procedió a hacer la mezcla de los cultivos receptor:donador, en un tubo estéril y nuevo; se le colocó primero 800µL de la cepa receptora y después 200µL de la cepa donadora, los tubos se llevaron a incubar a 37°C por 3 horas sin agitación. Transcurrido este tiempo, se sacaron los tubos de la incubadora, se tomaron 100µL de cada mezcla y se plaquearon en cajas con medio LB con Azida de Sodio 100µg/mL y Ácido Nalidíxico 8µg/mL, se incubaron a 37°C por 16 horas. Transcurrido este tiempo de incubación, se verificó que en los controles no hubiera crecimiento, se verificó que hubieran colonias pequeñas y aisladas de las cajas donde se plaqueó la mezcla receptor:donador, se verificaron 25 transconjugantes candidatas por siembra con palillo en medios mínimos (MM, M9, PRO, MET) para determinar su auxotrofia. Las transconjugantes candidatas por medio de PCR sencilla se les determinó la presencia del gen *qnrA* como se describió anteriormente.

Detección del gen *qnrA* en integrones.

La estructura del integrón Complejo de Clase I, fue determinada en 4 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y 2 aislamientos de *Enterobacter cloacae* (utilizados de aquí en adelante en estudios subsecuentes); por medio de superposición de fragmentos de PCR, que cubrieron las siguientes regiones: para la amplificación de la región que comprende *qacEΔ1* a *qnrA* se utilizaron los iniciadores QACE-F1 (5'-GCCCTACACAAATTGGGAGA-3') y qnrARm (5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC-3'), para la región que comprende de *IntI1* a *qacEΔ1* se utilizaron los iniciadores IntI1 (5'-CGTTCCATACAGAAGCTGG-3') y QACE-R1 (5'-AACACCGTCACCATGGCGTC-3'), la región que comprende de *qnrA* al extremo 3'CS se utilizaron los iniciadores qnrAFm (5'-AGAGGATTTCTCACGCCAGG-3') y 3'CS (AAGCAGACTTGACCTGA), la región que comprende de *ISCR1* a *qnrA* se utilizaron los iniciadores ISCR1F (5'-TCGCCACTCAAACAAACGG-3') y qnrARm (5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC-3'). Se utilizó como control positivo al plásmido pSZ50, en la Figura 3, se puede observar la zona que amplificó cada par de iniciadores utilizados, en el área del integrón complejo de Clase I en este plásmido. El ADN total (2μL) se sometió a una PCR sencilla; en una mezcla de reacción de 25μL, que contiene 2.5μL de 10X *Taq* buffer con (NH₄)₂ SO₄, 2μL de Cloruro de Magnesio 25mM (MgCl₂), 2.5μL de desoxirribonucleótidos trifosfato 2mM, 2.5μL de cada uno de los iniciadores (5pmol/μL), 0.15μL de *Taq* ADN Polimerasa recombinante (5U/μL) (Fermentas) y 11.0 μL de agua estéril. La amplificación se realizó con el siguiente perfil de ciclo termal: 2 minutos a 94°C y 30 ciclos de amplificación que consisten de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 4 minutos a 72°C, y un último ciclo de 4 minutos a 72°C para la extensión final. Se tomaron 5μL de los productos de PCR y se analizaron en un gel de agarosa al 1%, se hizo un corrimiento electroforético a 100 Voltios por 1 hora en buffer TAE1X. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen) (Las referencias de los iniciadores utilizados se encuentran en el Cuadro 5 en Anexo 4).

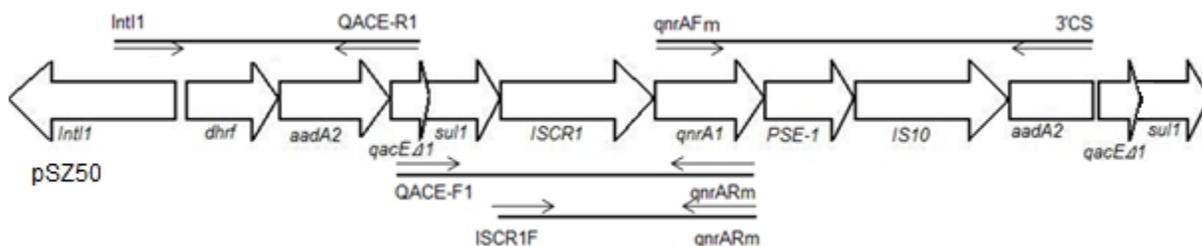


FIGURA 3. Representación esquemática de la amplificación de los iniciadores utilizados, en la zona del Integrón complejo de Clase I en el plásmido pSZ50.

Patrón de restricción teórico de pMG252.

Debido a que el amplicón que se obtuvo de *qacEΔ1* a *qnrA*, tiene un peso molecular (4Kb) similar tanto en el plásmido pSZ50 como en 5 aislamientos clínicos, se procedió a utilizar la secuencia del plásmido pMG252 (Figura 1) de 14,287 pb (Martínez-Martínez *et al*, 1998; Strahilevitz *et al*, 2009; Acceso: DQ831140.1), cuya secuencia de *qacEΔ1* a *qnrA* se encuentra en la región comprendida entre 5,463 pb – 9,578 pb (4115 pb), la cual se analizó con la herramienta bioinformática en línea NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) (New England BioLabs), para detectar los sitios de restricción en dicha secuencia, detectando la endonucleasa de restricción HindIII, la cual cortaba en 3 sitios. Se digirieron los amplicones que se obtuvieron de *qacEΔ1* a *qnrA* con la enzima HindIII de la siguiente forma, 20.0μL de producto de PCR, 2.0μL de 10X RE_{ACT}®2 buffer, 0.2μL de HindIII (Invitrogen) y 2.8μL de agua estéril. La restricción se incubó a 37°C por 1 hora, transcurrido este tiempo se detuvo la restricción a 65°C por 5 minutos. Se tomaron 15μL de cada restricción y se analizaron en un gel de agarosa al 1%, se hizo un corrimiento electroforético a 100 Voltios por 1 hora en buffer TAE1X. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Restricción del producto de PCR de la región *IntI1-qacEΔ1*.

Debido a que en la región que comprende de *IntI1-qacEΔ1*, obtengo un amplicón de 2.8Kb con las cepas 01220, 14204 y la transconjugante TK06268; se procedió a digerir estos amplicones con la endonucleasa de restricción DraIII para observar si se obtenía el mismo patrón de restricción. La restricción se hizo de la siguiente manera, se hizo una mezcla de reacción con 10.0μL de producto de PCR, 2.0μL de 10X NEBuffer 3, 0.2μL de DraIII (New England BioLabs) y 2.8μL de agua estéril.

La restricción se incubó a 37°C por 1 hora, transcurrido este tiempo se detuvo la restricción a 65°C por 20 minutos. Se tomaron 15µL cada restricción y se analizaron en un gel de agarosa al 1%, se hizo un corrimiento electroforético a 100 Voltios por 1 hora en buffer TAE1X. Se utilizó el marcador de peso molecular ΦX174RF DNA/Hae III fragments (Invitrogen).

Duplicidad del gen *qnrA*.

Para resolver la duplicidad del gen *qnrA*, se realizó una PCR con el plásmido pSZ50 y las cepas que al parecer tienen duplicado el gen *qnrA*, utilizando los iniciadores qAsecFcct (5'-CCTTGGGAGTAATAGTGCTG-3') y qAsecRaas (5'AATCCTGGCGTGAGAAATCC-3') (Hernández-Vargas, 2010), los cuales leen por fuera del gen *qnrA* como se puede observar en la figura 4. El ADN total (4µL) se sometió a una PCR sencilla; en una mezcla de reacción de 50µL, que contiene 5µL de 10X Long PCR Buffer con MgCl₂, 5µL de desoxirribonucleótidos trifosfato 2mM, 5µL de cada uno de los iniciadores (5pmol/µL), 0.5µL de Long PCR Enzyme Mix (5U/µL) (Fermentas) y 25.5µL de agua libre de nucleasa. La amplificación se realizó con el siguiente perfil de ciclo termal: 2 minutos a 94°C y 30 ciclos de amplificación que consisten de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 5 minutos a 68°C, y un último ciclo de 4 minutos a 68°C para la extensión final. Se tomaron 5µL de los productos de PCR y se analizaron en un gel de agarosa al 1%, se hizo un corrimiento electroforético a 100 Voltios por 1 hora en buffer TAE1X. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

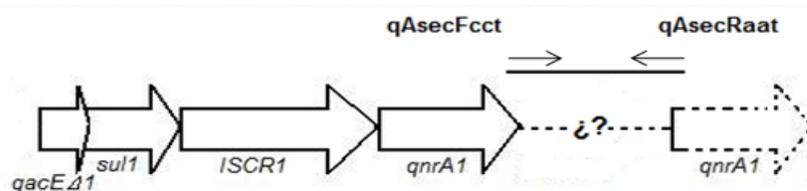


Figura 4. Teoría de duplicidad del gen *qnrA*.

El amplicón purificado que se obtuvo utilizando al ADN de pSZ50 y los iniciadores qAsecFcct y qAsecRaas, se procedió a utilizar como templado para realizar PCRs con la siguiente combinación de iniciadores qAsecFcct + QACE-R1, QACE-F1 + ISCR1 R (5'-ATCTGCTCAATGACCTTCGG-3') e ISCR1 F + qAsecFaas, para resolver que genes hay entre estos dos genes *qnrA* (Figura 5).

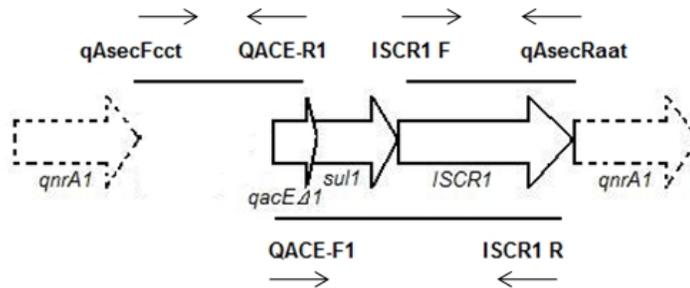


Figura 5. Diagrama de PCRs para resolver duplicidad de *qnrA* en pSZ50.

Los amplicones que se obtuvieron con el ADN de pSZ50 y de las cepas 01220, 14204 y de las transconjugantes TK01200 y TK06268 utilizando los iniciadores qAsecFcct + qAsecRaat, se procedieron a digerir con la enzima HindIII de la siguiente manera, 10.0µL de producto de PCR, 2.0µL de 10X RE_{ACT}®2 buffer, 0.2µL de HindIII (Invitrogen) y 2.8µL de agua estéril. La restricción se incubó a 37°C por 1 hora, transcurrido este tiempo se detuvo la restricción a 65°C por 5 minutos. Se tomaron 15µL cada restricción y se analizaron en un gel de agarosa al 1%, se hizo un corrimiento electroforético a 100 Voltios por 1 hora en buffer TAE1X. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Secuenciación de ADN.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit High Pure PCR Product Purification (Roche). Hecho esto, se secuenciaron dichos productos de PCR utilizando el Kit Big-Dye Terminator (Applied Biosystems; Foster City, California) y analizados través del sistema automatizado ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Mediante BLAST se compararon las secuencias de nucleótidos contra aquellas disponibles en la base de datos de GenBank en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El ensamble de las secuencias obtenidas se realizó con el programa VECTOR NTI versión 10.

RESULTADOS.

Origen clonal, extracción de plásmidos y conjugaciones bacterianas de cepas con el gen *qnrA1*.

De las 9 cepas analizadas portadoras del gen *qnrA*; las 5 cepas de *Klebsiella pneumoniae* no estuvieron genéticamente relacionadas (NR), en el análisis de electroforesis en gel por campos pulsados, ya que procedían de diferentes hospitales. Las 4 cepas de *Enterobacter cloacae* fueron aisladas del Hospital General de Acapulco, las cuales correspondieron a una clona denominada C, con dos subclonas C1 y C2. En todos los aislamientos analizados se extrajeron plásmidos de diferentes tamaños (<40 a 330 Kb), encontrándose los mismos plásmidos en la clona C. Solo se obtuvieron 2 transconjugantes (TK01200 y TK06268) que portaban al gen *qnrA1*. (Cuadro 2).

CUADRO 2. Características de las Enterobacterias con gen *qnrA1* y sus transconjugantes.

No. De Cepa.	Género.	Hospital.	PFGE ^a .	Plásmidos (Kb).	Conjugación.
01200	<i>K. pneumoniae</i>	1 ^b	NR ^c	190, <u>110</u> ^d , 65, 40	+ ^e
01220	<i>K. pneumoniae</i>	1	NR	145, 85, 50	-
04204	<i>K. pneumoniae</i>	2	NR	100	-
06268	<i>K. pneumoniae</i>	3	NR	<u>250</u>	+
14204	<i>K. pneumoniae</i>	4	NR	100	-
14262	<i>E. cloacae</i>	4	C2	330, 130, <40	-
14263	<i>E. cloacae</i>	4	C1	330, 130, <40	-
14269	<i>E. cloacae</i>	4	C	330, 130, <40	-
14270	<i>E. cloacae</i>	4	C	330, 130, <40	-

^a, PFGE: Pulsed-field gel electrophoresis.

^b, 1. Hospital Civil de Guadalajara, 2. Hospital de Altas Especialidades #25 del IMSS, 3. Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, 4. Hospital General de Acapulco.

^c NR: No relacionado.

^d, Los plásmidos subrayados, corresponden a los plásmidos transferidos por conjugación.

^e, + (positivo), -(negativo).

Detección del gen *qnrA1* en integrones.

Para detectar el gen *qnrA1* en integrones, se procedió a trabajar con 4 cepas de *Klebsiella pneumoniae* (01200, 01220, 06268, 14204) y 2 cepas de *Enterobacter cloacae* (14262 y 14269) así como con la transconjugante que contenía el plásmido pSZ50. Para amplificar la región comprendida entre los genes *qacEΔ1-qnrA*, se le realizó una PCR, obteniéndose un amplicón de 4 Kb, a excepción en la cepa 14269. Para la cepa 14269 para amplificar la región comprendida entre *ISCR1-qnrA*; se le realizó una PCR, obteniéndose un amplicón de 2.5Kb (Anexo 5 Figura 13).

La región comprendida entre los genes *qacEΔ1-qnrA* del plásmido pMG252 (Strahilevitz *et al*, 2009; Martínez-Martínez *et al*, 1998), es idéntica a la del plásmido pSZ50, al restringirse con HindIII, corta en 3 sitios dicha región en el plásmido pMG252 (Anexo 6 Figura 20). Así, los amplicones de 4 Kb del plásmido pSZ50 y de las cepas 01200, 01220, 06268, 14204, 14262 se digirieron con la enzima HindIII, observándose el mismo patrón de restricción, lo anterior indica que los genes *qacEΔ1*, *sul1*, *ISCR1* y *qnrA1* tiene el mismo entorno genético en las cepas ensayadas y los plásmidos pSZ50 y pMG252 (Anexo 5 Figura 14).

Para amplificar la región comprendida entre los genes *IntI1-qacEΔ1*, se procedió a realizar una PCR al plásmido pSZ50 y a las cepas 01200, 01220, 06268, 14204, 14262, obteniéndose un amplicón de 2.8 Kb en pSZ50 y en las cepas 01220, 06268 y 14204, un amplicón de 1.8 Kb en la cepa 14262 y en la cepa 01200 se obtuvieron dos amplicones, uno de 2.8 Kb y otro de 2.5 Kb, posiblemente esta cepa posea 2 integrones complejos de clase I (Anexo 5 Figura 15).

Para amplificar la región comprendida entre el gen *qnrA* y el extremo 3'CS, se procedió a realizar una PCR con el plásmido pSZ50 y a las cepas 01200, 01220, 06268, 14204, 14262 y 14269. Con respecto al plásmido pSZ50 y las cepas 01200, 01220, 06268 y 14204, se obtuvieron dos amplicones, uno de 2.8 Kb y otro de 850 pb, lo que sugiere que pudieran tener el gen *qnrA1* duplicado. Con respecto a las cepas 14262 y 14269 solo se obtuvo un amplicón de 850 pb (Anexo 5 Figura 16).

Debido a que se tienen las transconjugantes TK01200 y TK06268, para amplificar las regiones comprendidas entre *IntI1-qacEΔ1*, *qacEΔ1-qnrA* y *qnrA-3'CS*, se procedió a realizar los mismos ensayos de PCRs y compararlos con el plásmido pSZ50; con lo cual se comprobaría si tienen el mismo patrón que sus respectivas cepas parentales.

Así en la región comprendida entre *IntI1-qacEΔ1*, pSZ50 y TK06268 se obtuvo un amplicón de 2.8 Kb, con la cepa TK01200 se obtuvo un amplicón de 2.5 Kb, y no 2 amplicones; como la cepa parental. En la región comprendida entre *qacEΔ1-qnrA* tanto pSZ50, TK01200 y TK06268 se obtuvo un amplicón de 4 Kb. En la región comprendida entre *qnrA-3'CS*, TK01200 y TK06268, se obtuvo un amplicón de 2.8Kb, no dos amplicones como en las cepas parentales, sugiriendo que probablemente no tienen duplicado al gen *qnrA1* en el mismo integrón complejo de clase I (Anexo 5 Figura 17).

Restricción del amplicon obtenido de la región *IntI1-qacEΔ1*.

Debido a que en la región que corresponde a *IntI1-qacEΔ1* obtengo un amplicón de 2.8Kb, en las cepas 01220, 06268, 14204 y la transconjugante TK06268, se digirió este amplicon de las cepas 01220, 14204 y de la transconjugante TK06268, con la enzima DraIII obteniéndose un mismo patrón de restricción lo que indica que comparten los mismos genes en esta región (Anexo 5 Figura 18).

Duplicidad del gen *qnrA1*.

Con el plásmido pSZ50 y las cepas 01200, 01220, 06268, 14204 y las transconjugantes TK01200 y TK06268, se hizo una PCR con los iniciadores qAsecFctt y qAsecRaatt que leen para afuera de *qnrA*, para demostrar la duplicidad del gen *qnrA1*. Como se puede observar en la figura 6, tanto en el plásmido pSZ50 y las cepas 01200, 01220, 06268, 14204 y las transconjugantes TK01200 y TK06268 se obtuvo amplicon de 5 Kb, lo que al parecer indica que tienen duplicado el gen *qnrA1* en el mismo integrón complejo de clase I.



FIGURA 6. PCR utilizando los iniciadores qAsecFcct y qAsecRaat

El amplicón de 5Kb purificado; obtenido con el ADN de pSZ50 utilizando los iniciadores qAsecFcct y qAsecRaat, se utilizó como templado para realizar PCRs con los iniciadores qAsecFcct + QACE-R1, QACE-F1 + ISCR1 R e ISCR1 F + qAsecRaat. Con los iniciadores qAsecFcct y QACE – R1 se obtuvo un amplicón de 2.5 Kb, con los iniciadores QACE-F1 e ISCR1 R un amplicón de 2.8 Kb, con los iniciadores ISCR1 F y qAsecRaat un amplicón de 1.8 Kb (Figura 7). Lo que sugiere que en el plásmido pSZ50 los genes *qacEΔ1* e *ISCR1* están entre los dos genes *qnrA1*.

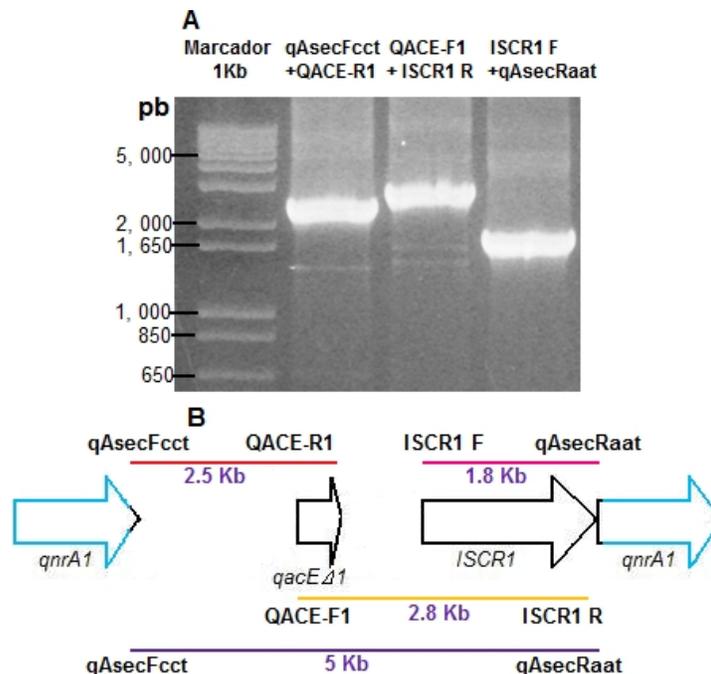


Figura 7. (A) PCRs utilizando como templado al amplicón obtenido de pSZ50 con los iniciadores qAsecFcct y qAsecRaat. (B) Esquema tentativo de la región que une a los genes *qnrA1*.

Los amplicones de 5 Kb, obtenidos con el ADN de pSZ50 y las cepas 01220, 14204 y las transconjugantes TK01200 y TK06268, usando los iniciadores qAsecFctt y qAsecRaatt; se digirieron con la enzima HindIII, observándose un mismo patrón de restricción, lo que sugiere que en estas cepas y el plásmido pSZ50 comparten los mismos genes que unen a estos dos genes *qnrA1* (Anexo 5 Figura 19).

CUADRO 3. Amplicones obtenidos para caracterizar a los integrones.

No. de Cepa.	PCR Realizada.				
	IntI-QACE-R1 (Kb)	QACE-F1-qnrARm (Kb)	ISCR1 F-qnrARm (Kb)	qnrAFm-3'CS (Kb)	qAsecFctt-qAsecRaatt (Kb)
pSZ50	2.8	4.0	NA ^a	2.8, 0.8	5.0
01200	2.8, 2.5	4.0	NA	2.8, 0.8	5.0
TK01200	2.5	4.0	NA	2.8	5.0
01220	2.8	4.0	NA	2.8, 0.8	5.0
06268	2.8	4.0	NA	2.8, 0.8	5.0
TK06268	2.8	4.0	NA	2.8	5.0
14204	2.8	4.0	NA	2.8, 0.8	5.0
14262	1.8	4.0	NA	0.8	NA
14269	NA	NA	2.5Kb	0.8	NA

^a NA: No aplica.

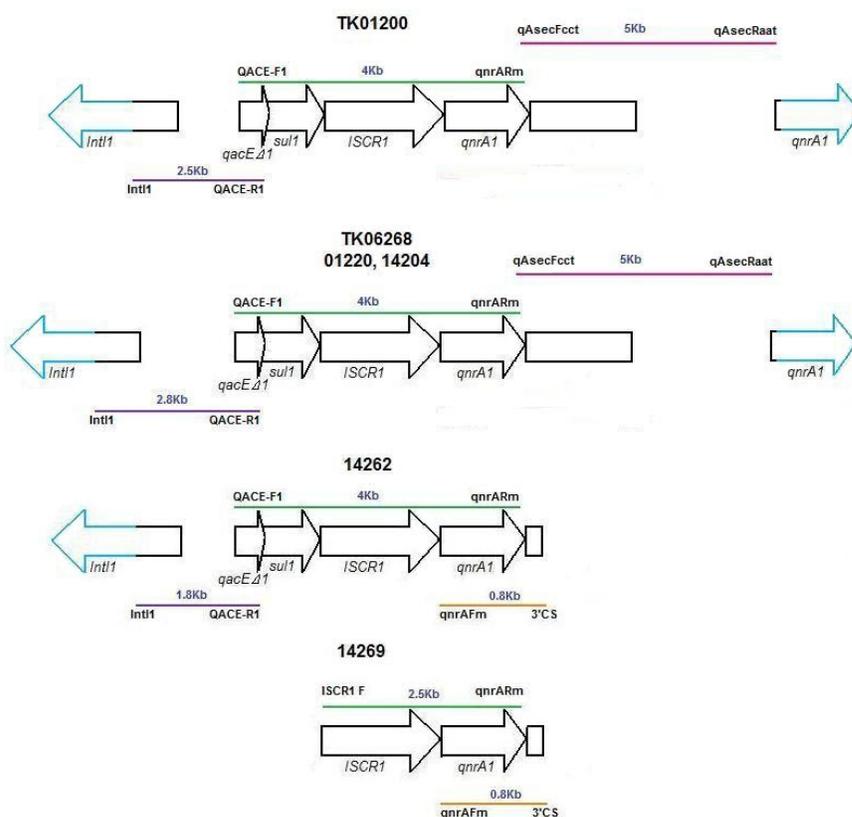


FIGURA 8. Superposición de amplicones para armar los integrones que hospedan al gen *qnrA1* en las cepas analizadas.

Los amplicones se purificaron y se secuenciaron, para poder analizarse por medio del BLAST y comparar las secuencias con los datos ya existentes en el GenBank. Se completó la estructura de los integrones por medio del programa Vector NTI.

En el plásmido pSZ50, los genes que se encuentran entre *IntI1* y *qacEΔ1* son *dfrA12* (gen de resistencia a trimetoprim) y *aadA2* (gen de resistencia a aminoglucósidos), los cuales son los mismos en las cepas 06268, 01220 y 14204. En la cepa 01200, los genes que se encuentran entre *IntI1* y *qacEΔ1* son *dfrA1* (gen de resistencia a trimetoprim) y *aadA1* (gen de resistencia a aminoglucósidos). Con respecto a la cepa 14262, en esta región tiene al gen *aadA2a* (gen de resistencia a aminoglucósidos) (Figura 9).

Con lo que respecta a la región *qacEΔ1-qnrA1*, tanto el plásmido pSZ50, como en las cepas 01200, 01220, 06268, 14204 y 14262, comparten los mismos genes: *qacEΔ1* (gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario), *sul1* (gen de resistencia a sulfonamidas), *ISCR1* (gen de transposasa) y *qnrA1* (gen de resistencia a quinolonas). Solamente la cepa 14269 presenta el gen *ISCR1* río arriba de *qnrA1*, probablemente tiene un entorno genético distinto y al parecer se encuentra en un integrón de clase I normal (Figura 9).

Con respecto a la región comprendida entre el gen *qnrA1* y el extremo 3'CS, tanto en el plásmido pSZ50 y las cepas 01200, 01220, 06268 y 14204 tienen duplicado al gen *qnrA1* en el mismo integrón, siendo los mismos genes que unen a estos dos genes *qnrA1*; tanto en el plásmido pSZ50 y estas en estas 4 cepas: *bla_{PSE-1}* (gen de resistencia a penicilinas), *aadA2*, *qacEΔ1*, *sul1*, *ISCR1*, siendo este el primer reporte de una duplicidad del gen *qnrA1* en un mismo integrón complejo de Clase I (Figura 9).

En la cepa 14262 y 14269, solo se pudo ver relación del gen *qnrA1* con el extremo 3'CS, pero no se pudo obtener más información de que genes se encuentran más allá de este extremo 3'CS (Figura 9).

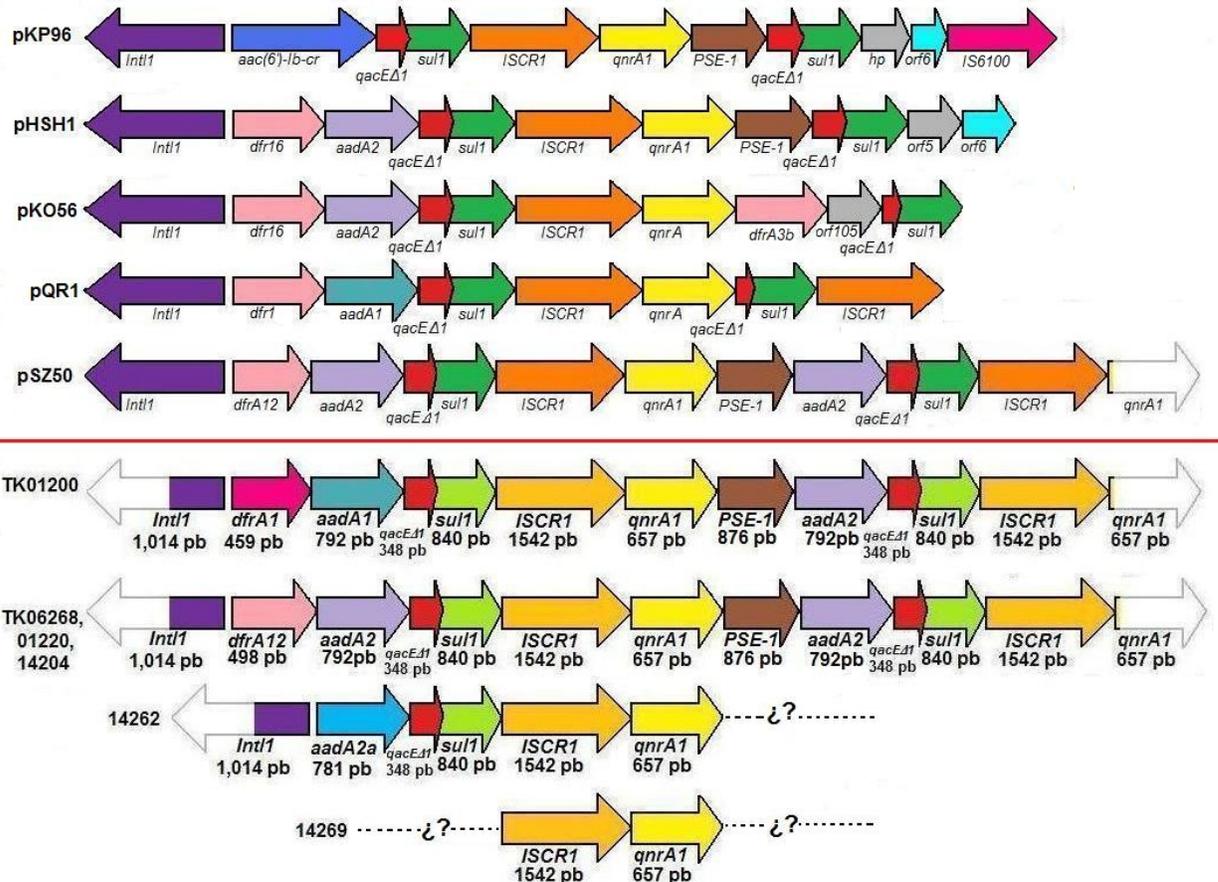


Figura 9. Integrones complejos de Clase I que contienen al gen *qnrA*; pKP96 (Shen *et al*, 2008), pSHH1 (Wang *et al*, 2003), pKO56 (Jeong *et al*, 2005), pQR1 (Mammeri *et al*, 2005), pSZ50 (Garza-Ramos *et al*, 2009; Hernández-Vargas, 2010) en comparación con las cepas analizadas en este estudio.

DISCUSIÓN.

La Resistencia a Quinolonas Mediada por Plásmidos (RQMP); principalmente se debe a 3 genes: *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* y *qepA*. Estos genes se localizan en plásmidos y participan en la resistencia a las quinolonas (Strahilevitz *et al*, 2009; Sánchez-Céspedes, 2008). El descubrimiento del primer determinante de RQMP en 1998 fue realizado por Martínez-Martínez *et al*, al estudiar al plásmido pMG252, proveniente de una cepa multirresistente de *Klebsiella pneumoniae* procedente de un cultivo de orina de un paciente con infección del tracto urinario en la Universidad de Alabama en Birmingham en 1994 y se denominó *qnr*. Se demostró que este gen incrementa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a las quinolonas, pero; para que exista una elevada CMI contra quinolonas; la cual represente una resistencia franca es requisito que exista ó un cambio en la permeabilidad de la bacteria ó la sobreproducción de bombas de eflujo ó mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*. Los determinantes de la RQMP y la exposición a este tipo de antibióticos pueden aumentar la posibilidad de que la bacteria obtenga altos niveles de resistencia debido a la presencia de una mutación en algún mecanismo de resistencia ya mencionado anteriormente (Strahilevitz *et al*, 2009).

El hecho de que los determinantes de RQMP se encuentren en elementos genéticos móviles permite una diseminación en forma horizontal y una posibilidad de seleccionar alguna mutación cromosómica que brinde una resistencia franca a la bacteria. De aquí la importancia de estudiar los elementos genéticos móviles como los IS ó ISCR, que le permitan a los genes *qnr* su movilización dentro del genoma. Los elementos ISCR se parecen a los elementos atípicos IS91, IS801, IS1294, los cuales efectúan transposición por el mecanismo del círculo rodante. Los elementos ISCR poseen un poderoso sistema de movilización que en teoría puede movilizar cualquier sección de ADN y principalmente el elemento ISCR1 se asocia con el gen *qnrA1* en un integrón Complejo de Clase I (Toleman *et al*, 2006; Rodríguez-Martínez *et al*, 2006).

A nivel mundial, las investigaciones realizadas acerca del contexto genético concerniente al gen *qnrA*, corresponden a reportes de E.U.A., Europa y Asia (Strahilevitz *et al*, 2009; Martínez-Martínez *et al*, 1998; Wang *et al*, 2003; Shen *et al*, 2008; Jeong *et al*, 2005; Paauw *et al*, 2007; Mammeri *et al*, 2005). En México, solo existe el reporte del contexto genético del gen *qnrA1*, en el plásmido pSZ50 proveniente de una transconjugante (Garza-Ramos *et al*, 2009; Hernández-Vargas, 2010).

En estos contextos genéticos el gen *qnrA* se localiza en un integrón complejo de Clase I y se asocia al elemento genético móvil *ISCR1* el cual codifica para una transposasa involucrada en la movilización de genes de resistencia a antibióticos. Se ha observado una asociación de *ISCR1* con *qnrA* en aislamientos clínicos no relacionados; lo cual es también sorprendente. También varios genes de β -lactamasas han sido encontrados en plásmidos que portan al gen *qnrA*; como *bla*_{VEB-1}, *bla*_{FOX-5}, *bla*_{SHV-7}, *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{PSE-1}. Así la al encontrarse el gen *qnrA1* en plásmidos, en un integrón complejo de Clase I asociado a *ISCR1*, se puede deducir que se ha facilitado su diseminación entre especies bacterianas; alrededor del mundo entero, como se ha propuesto por otros autores (Toleman *et al*, 2006; Strahilevitz *et al*, 2009).

Para determinar el entorno genético del gen *qnrA*, se estudiaron 4 aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (01200, 01220, 06268, 14204) provenientes de 3 hospitales diferentes y no estaban relacionados clonalmente, asimismo con 2 aislamientos clínicos de *Enterobacter cloacae* provenientes del mismo hospital, perteneciendo un aislamiento a la clona C (14269) y otro aislamiento a la subclona C2 (14262). El plásmido pZS50 fue empleado como un control; para poder comparar el entorno genético del *qnrA1* en este plásmido con las cepas analizadas.

Al utilizar el plásmido pSZ50 y compararse con las cepas analizadas en este estudio, se observó que en tres cepas analizadas, el entorno genético del gen *qnrA1* era muy similar en estas cepas con respecto al plásmido pSZ50, y que en el mismo integrón se localizaba el gen *qnrA1* duplicado, aspecto que no había podido resolverse en el caso del plásmido pSZ50. Asimismo; no se pudo encontrar el gen *IS10*, gen que ya había sido reportado en la estructura del plásmido pSZ50 y que era al parecer la secuencia responsable de la escisión de plásmido pSZ50; a partir del plásmido pSZ300 (Hernández-Vargas, 2010).

Con esta información recabada; se observó, que en los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* 01220, 06268 y 14204 provenientes de 3 hospitales diferentes, el entorno genético del gen *qnrA1* es similar entre estas cepas con respecto al plásmido pSZ50 el cual proviene de una transconjugante, obtenida de un aislamiento clínico de *Escherichia coli* proveniente de otro hospital distinto a estos aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*. Así mismo presentan al gen *qnrA1* duplicado en el mismo integrón de Clase I. Así se puede destacar que el gen *qnrA1* al encontrarse en un plásmido y asociarse al elemento genético móvil *ISCR1*, se le facilitó su transmisión de forma horizontal en enterobacterias entre ambientes hospitalarios de distintas áreas geográficas del país (Distrito Federal, Jalisco, Nuevo León y Guerrero), conservando el mismo entorno genético en todos los casos.

Con lo que respecta a los plásmidos pSH1 (Wang *et al*, 2003), pKO56 (Jeong *et al* 2005), pQR1 (Mammeri *et al*, 2005), y pSZ50 (Hernández-Vargas, 2010), entre los genes *Int11* y *qacEΔ1* presentan genes de dihidrofolato reductasas y aminoglucósido adenil transferasas, aunque de distintos tipos, pero presentan este patrón característico. Pero hacia el extremo 3'CS existen diferencias entre sí. Igualmente tanto en el plásmido pSZ50 y estas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, las cuales también presentaron genes de dihidrofolato reductasas y aminoglucósido adenil transferasas.

Con lo que respecta al entorno genético del gen *qnrA1*, hallado en la cepa 01200, entre los genes *Int1* y *qacEΔ1* presenta al gen *dfrA1* y *aadA1*, aspecto que es muy parecido en el caso del plásmido pQR1(Mammeri *et al*, 2005), el cual en esta región presenta a los genes *dfr1* y *aadA1*. Pero hacia el extremo 3'CS, el entorno genético encontrado en 01200 es similar al encontrado en pSZ50; también presenta una duplicidad en el gen *qnrA1*. Igualmente después del primer gen *qnrA1*, presenta los genes *bla_{PSE-1}*, *aadA2*, *sul1*, *qacEΔ1*, *ISCR1* y *qnrA1*. Por lo que en el caso del pSZ50 y en estas 4 cepas (01200, 01220, 06260, 14204), es el primer reporte del gen *qnrA1* duplicado en un mismo integrón.

En estos casos de la duplicidad del gen *qnrA1*, en un mismo integrón pudiera deberse a su asociación con el elemento móvil *ISCR1*, el cual probablemente en un intento de movilizar al gen *qnrA1* a otro plásmido lo pudiera haber movilizó en el mismo integrón complejo de Clase I.

Asimismo, como se había reportado anteriormente que los plásmidos que hospedan genes *qnrA* se asociaban con β-lactamasas (Toleman *et al*, 2006), en este caso se encontró la asociación del gen *qnrA1* con el gen *bla_{PSE-1}* en el mismo plásmido e integrón, como en el caso de los plásmidos pSH1 (Wang *et al*, 2003) y pKP96 (Shen *et al*, 2008), en donde el gen *bla_{PSE-1}* se encuentra inmediatamente río abajo del gen *qnrA1*.

Con lo que respecta a las cepas de *Enterobacter cloacae*, la cepa 14269, que corresponde a la Clona C, solo se pudo identificar que el gen *qnrA1*, presenta río arriba al gen *ISCR1*, no se pudo identificar los genes que se localizaban río arriba de la secuencia *ISCR1* ni río abajo del gen *qnrA1*, pero se pudo demostrar la asociación de estos 2 genes.

Se identificaron los genes que se localizan hacia el extremo 5'CS del gen *qnrA1* (*Int11*, *aadA2a*, *sul1*, *qacEΔ1*, *ISCR1*) en la cepa 14262, la cual corresponde a la subclona C2. Con lo cual se encontró asociación con el primer extremo 3'CS y con el gen *aadA2a* entre *Int11* y *qacEΔ1*. En este caso no se pudo averiguar qué genes se localizaban río abajo del gen *qnrA1*. Así se pudo observar la variabilidad genética que hay la clona C y la subclona C2, lo cual vuelve a demostrar la movilidad que existe entre los genes de resistencia a antibióticos en un mismo hospital y dentro de un mismo grupo clonal.

Es notable destacar que el integrón complejo de Clase I donde se localizó el gen *qnrA1* en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, alberga varios tipos de genes de resistencia a antibióticos, como a trimetopim, aminoglucósidos, sulfonamidas, quinolonas y β-lactámicos, genes que pudieran ser causantes de este perfil fenotípico de multirresistencia.

Estas 6 cepas analizadas presentaron una elevada CMI hacia quinolonas, β-lactámicos, aminoglucósidos y Trimetoprim/Sulfametoxazol (Anexo 3 Cuadro 4). Con lo que respecta a las cepas de *Klebsiella pneumoniae* (01200, 01220 y 14204) exhibieron una elevada CMI para quinolonas, β-lactámicos y aminoglucósidos. No obstante la cepa 06268 exhibió solo una CMI elevada hacia Cefotaxima y Ceftazidima. Con lo que respecta a las cepas de *Enterobacter cloacae* (14262 y 14269), presentaron una CMI elevada para quinolonas, β-lactámicos y aminoglucósidos.

Por medio del análisis de estos entornos genéticos del gen *qnrA1* se pudo comprobar la plasticidad genética que existe entre las enterobacterias para la adquisición de genes de resistencia a antibióticos que se encuentran en plásmidos (Strahilevitz *et al*, 2009; Toleman *et al*, 2006; Rodriguez-Martinez *et al*, 2006) observándose patrones similares en aislamientos clínicos de diferentes partes geográficas de México y del mundo, por lo cual se obtuvo una información actualizada acerca del gen *qnrA1* en México.

CONCLUSIONES.

- Se identificaron nueve aislamientos productores de *qnrA1*.
- Se identificaron dos cepas (01200, 06268) capaces de transferir la resistencia a ácido nalidíxico, obteniéndose dos transconjugantes con el gen *qnrA1*.
- Se determinó el entorno genético en 6 de los 9 aislamientos clínicos productores de *qnrA1*.
- En 5 de los 6 aislamientos que se les determinó el entorno genético, el gen *qnrA1* está localizado en un integrón complejo de clase I asociado a la elemento *ISCR1* (estructuras ya descritas). Sólo uno de los 6 aislamientos sugiere contener una estructura diferente pero también asociada al elemento *ISCR1*.
- Se observó que tanto en el plásmido pSZ50 como en otras 4 cepas (01200, 01220, 06268, 14204) el gen *qnrA1* se encuentra duplicado en el mismo integrón.

PERSPECTIVAS.

- Continuar con el análisis del entorno genético para tratar de encontrar que genes se localizan más allá del extremo 3'CS en los aislamientos 14262 y 14269, asimismo en el caso del aislamiento 14269, tratar de encontrar que genes se localizan hacia el extremo 5'CS.
- Encontrar que genes se encuentran hacia río abajo del segundo gen *qnrA1*, tanto en el plásmido pSZ50 como en los aislamientos 01220, 01220, 06268, 14204.
- Utilizar la misma estrategia para seguir determinando el contexto genético del gen *qnrA* en México y observar las variaciones ó similitudes que se pudiesen detectar en aislamientos de enterobacterias recolectados posteriormente, que tengan el gen *qnrA*.

ANEXOS.

ANEXO 1.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS.

Solución I.

Sacarosa 0.3M	15 mL
Tris-HCl 25 mM pH8	1.25mL
EDTA 25 mM pH 8	2.5mL
Agua	31.25mL
TOTAL.	50mL

Solución II.

NaOH 2M	750µL
SDS al 10%	1mL
Agua	3.25mL
TOTAL.	5mL

ANEXO 2.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS MINIMOS PARA LA CONJUGACIÓN BACTERIANA.

Preparar 4 matraces con 200 mL de agua y adicionar 3.75 a 4 gramos de agar noble ó agar bacteriológico y esterilizar por autoclave. Colocarlos en baño maría a 50°C hasta su uso.

SALES 5X.

Pesar las siguientes sales y disolver una a una en un matraz con 200mL de agua. Se esteriliza por autoclave.

Na ₂ HPO ₄ (Fosfato Dibásico de Sodio).....	6.0g
KH ₂ PO ₄ (Fosfato Monobásico de Sodio).....	3.0g
NaCl (Cloruro de Sodio).....	0.5g
NH ₄ Cl (Cloruro de Amonio).....	1.0g

Cloruro de Calcio (CaCl₂).

Pesar 1.47 g de CaCl₂ y disolver en 10 mL de agua. Esto es un stock 1M. Esterilizar en autoclave y realizar las siguientes diluciones.

Dilución 10⁻¹ ó 100mM: 1mL del stock + 9mL de agua estéril.

Dilución 10⁻² ó 10mM: 1mL de dilución 10⁻¹ + 9mL de agua estéril.

De la dilución 10⁻² ó 10mM tomar 1 mL por cada 100mL de sales 5X, en este caso tomar 2mL para los 200mL de sales 5X preparadas, debe de agregarse cuando las sales se hayan enfriado.

Sulfato de Magnesio (MgSO₄).

Pesar 2.46 g de MgSO₄ y disolver en 10 mL de agua. Esterilizar en autoclave.

Aminoácidos.

Pesar:

Prolina	200mg (0.2g) por 5mL de agua	40mg/mL
Metionina	200mg (0.2g) por 5mL de agua	40mg/mL
Tiamina	0.05g por 5mL de agua	(1%)
Glucosa	10g por 5 mL de agua	(20%)

Los aminoácidos y la glucosa se esterilizan por filtración. Utilizar los matraces que previamente se habían preparado, agregando las siguientes cantidades de soluciones:

	M9	MM	PRO	MET
Sales 5X + CaCl₂	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Glucosa	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
MgSO₄	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
Tiamina	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Prolina	250 µL	-----	250 µL	-----
Metionina	250 µL	-----	-----	250 µL

ANEXO 3.
CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS DE LAS CEPAS ANALIZADAS.

Cuadro 4. CMI de las cepas analizadas.

Cepa.	CMI ($\mu\text{g/mL}$)						
	NAL	CPO	LEV	CTX	CAZ	GM	TRIM/SULF
01200	>512 (R)	>64 (R)	>64 (R)	16 (R)	512 (R)	2 (S)	>2/38 (R)
01220	>512 (R)	>64 (R)	>64 (R)	512 (R)	512 (R)	0.5 (S)	>2/38 (R)
06268	16 (S)	1 (S)	0.5 (S)	512 (R)	512 (R)	1 (S)	>2/38 (R)
14204	>512 (R)	32 (R)	32 (R)	256 (R)	128 (R)	>64 (R)	>2/38 (R)
14262	>512 (R)	>64 (R)	64 (R)	>512 (R)	512 (R)	>64 (R)	>2/38 (R)
14269	>512 (R)	>64 (R)	32 (R)	>512 (R)	64 (R)	>64 (R)	>2/38 (R)

NAL: Ácido Nalidíxico, CPO: Ciprofloxacino, LEV: Levofloxacino, CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, GM: Gentamicina, TRIM/SULF: Trimetoprim/Sulfametoxazol, S: Sensible, R: Resistente.

(Silva-Sánchez *et al*, 2011).

ANEXO 4.
CUADRO DE INICIADORES PARA PCR.

CUADRO 5. Inciadores utilizados.

Gen.	Iniciador.	Secuencia dirección 5'-3'.	Referencias.
<i>qnrA</i> .	QnrAFm	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	Cattoir <i>et al</i> , 2007.
	QnrARm	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC	
<i>IntI1</i> .	IntI1	CGT TCC ATA CAG AAG CTG G	Garza-Ramos <i>et al</i> , 2008.
<i>qacEΔ1</i> .	QACE-F1	GCC CTA CAC AAA TTG GGA GA	Kazama <i>et al</i> , 1998.
	QACE-R1	AAC ACC GTC ACC ATG GCG TC	
ISCR1	ISCR1 F	TCG CCC ACT CAA ACA AAC GG	Hernández-Vargas, 2010.
	ISCR1 R	ATC TGC TCA ATG ACC TTC GG	
Zona variable de Integrónes de Clase I.	5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	Lévesque <i>et al</i> , 1995.
	3'CS	AAG CAG ACT TGA CCT GA	
Zona externa de <i>qnrA</i> .	QasecFctt	CCT TGG GAG TAA TAG TGC TG	Hernández-Vargas, 2010.
	QasecRaata	AAT CCT GGC GTG AGA AAT CC	
Zona externa de ISCR1.	ISCR1Fsec	GGG AAG ACT TAC TCG TGG C	Hernández-Vargas, 2010.
	ISCR1Rsec	GGG GCA GAA TTG GTA AAG AG	
Zona externa de PSE-1.	PSE-1Fsec	AAC ACA GGC TTC AAT GGC AG	Hernández-Vargas, 2010.
	PSE-1Rsec	GCT GAA ACT TTG AAC TAC TTG	
<i>sul1</i> .	SulI-3'out	ACG CCA GAG ACC GAG GGT	Este estudio.
	SulI-R	ACC CTC GGT CTC TGG CGT	

ANEXO 5.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE PRODUCTOS DE PCR.

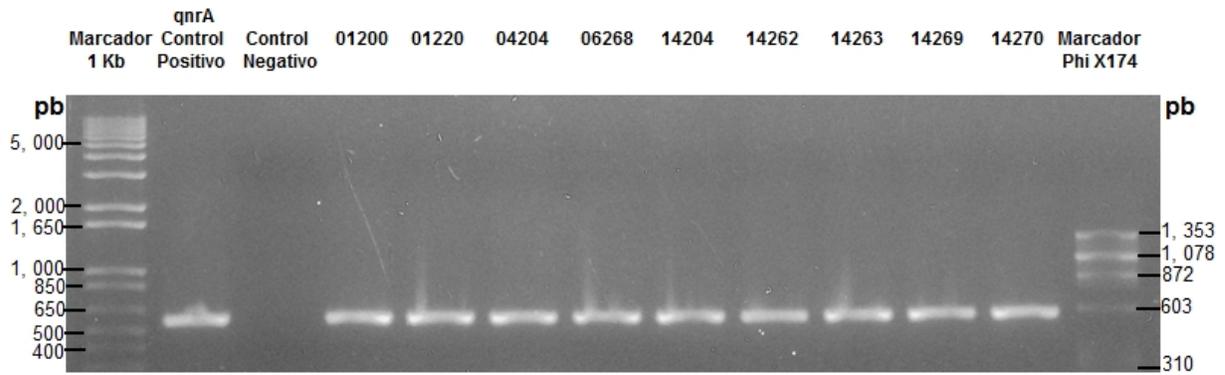


FIGURA 10. PCR sencilla para *qnrA* en los 9 aislamientos clínicos.

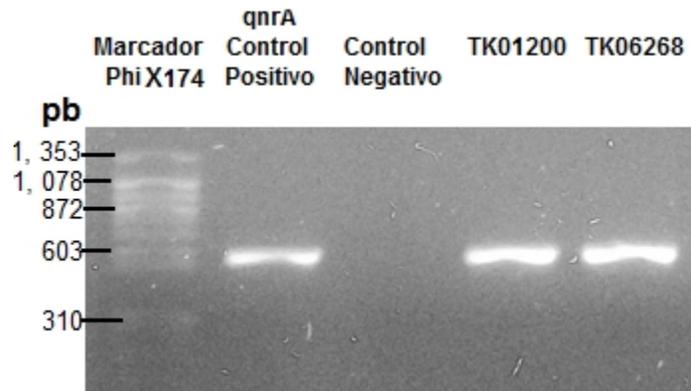


FIGURA 11. PCR sencilla para *qnrA* en transconjugantes.

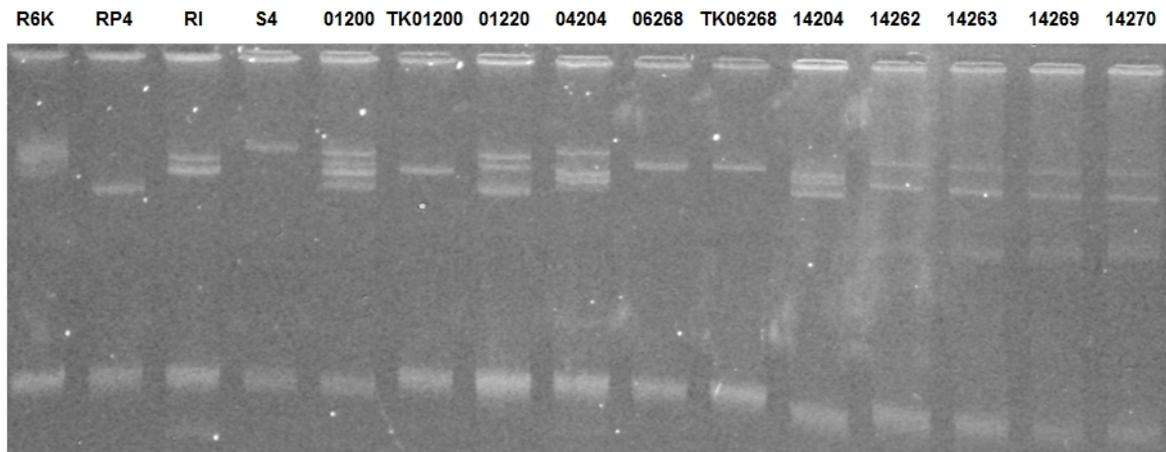


FIGURA 12. Extracción de plásmidos por la técnica de Kieser.

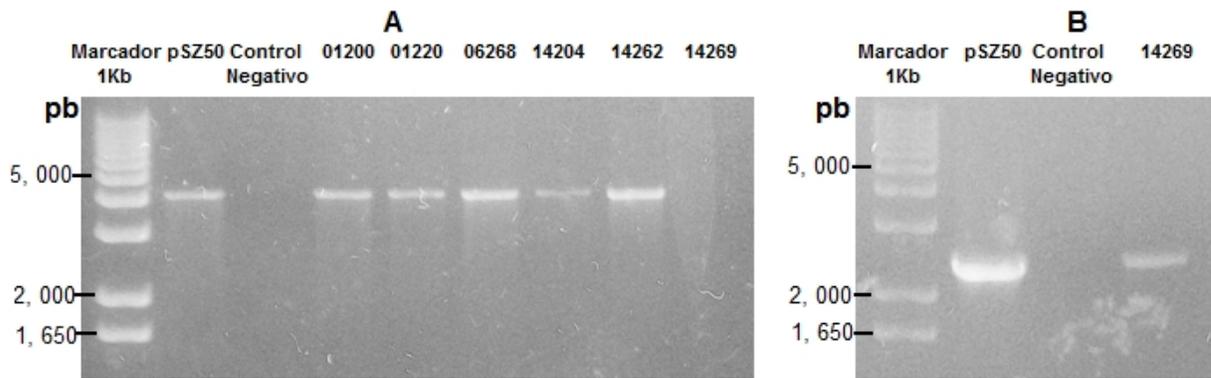


FIGURA 13. (A) PCR de *qacEΔ1-qnrA* (4Kb). (B) PCR de *ISCR1-qnrA* en cepa 14269 (2.5Kb).

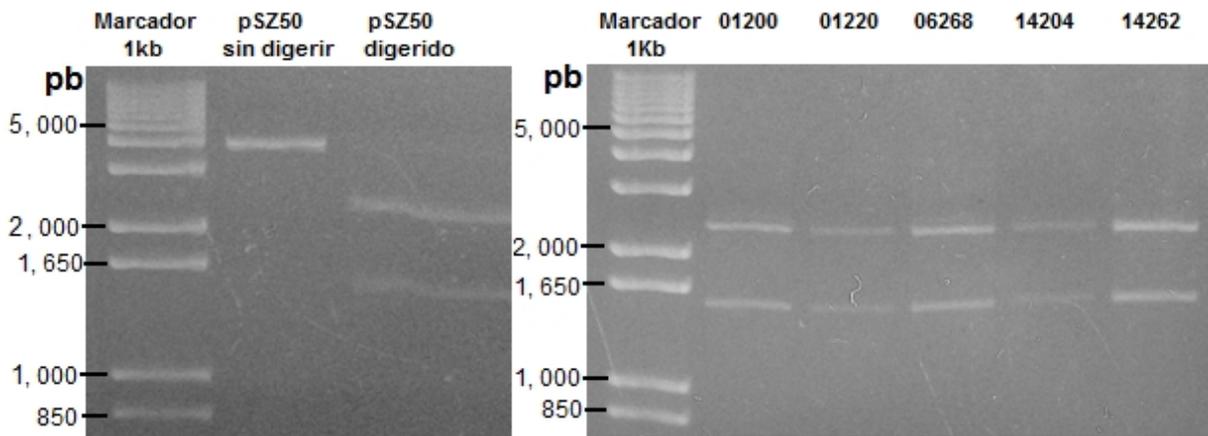


FIGURA 14. Amplicon de *qacEΔ1-qnrA* (4Kb) digerido con la enzima de restricción HindIII.

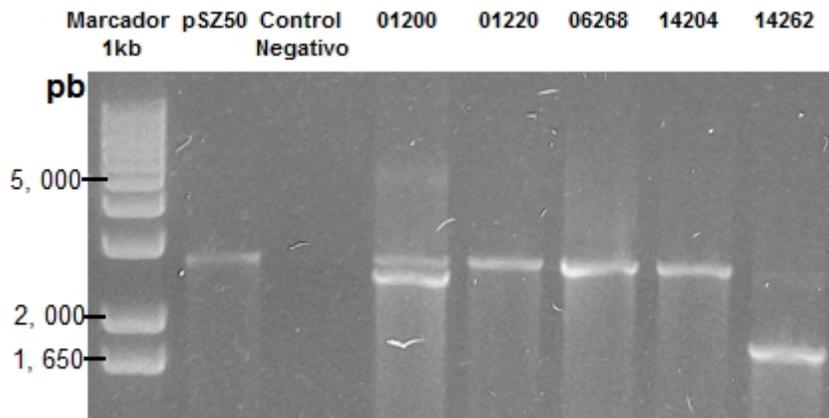


FIGURA 15. PCR de *IntI1-qacEΔ1*.

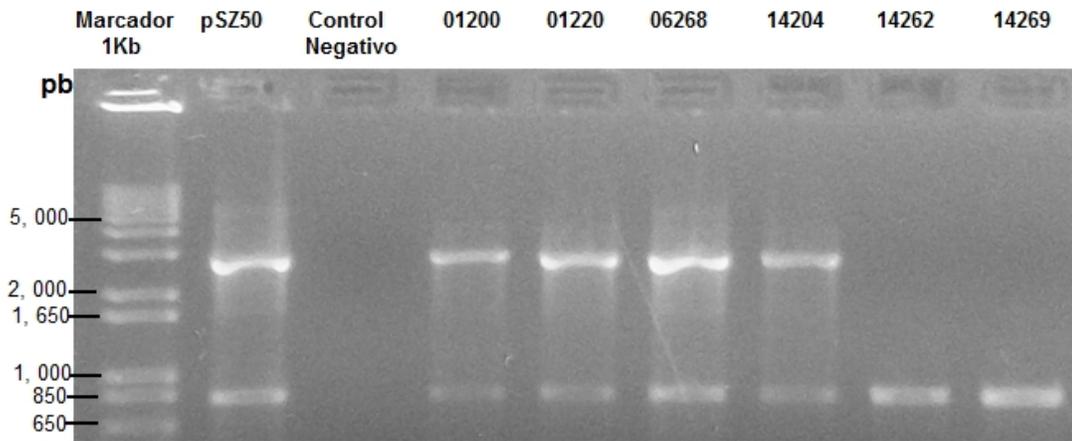


FIGURA 16. PCR de *qnrA* al extremo 3'CS.

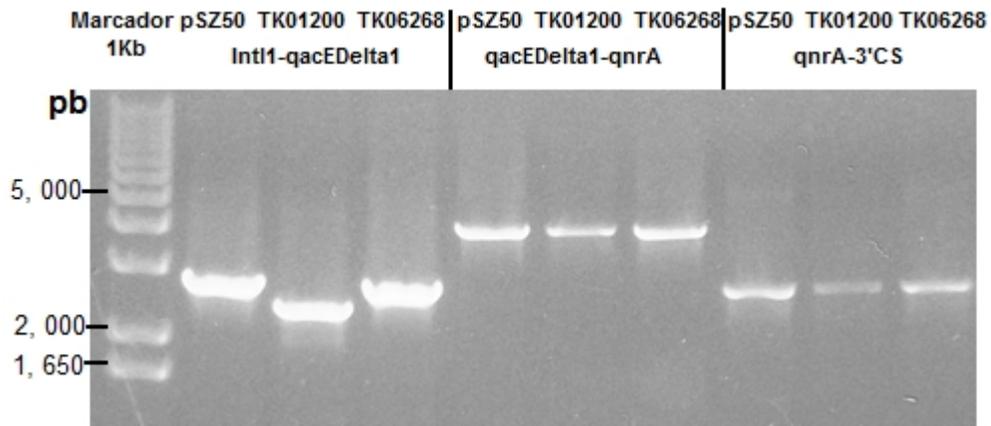


FIGURA 17. PCR a transconjugantes TK01200, TK06268 y plásmido pSZ50.

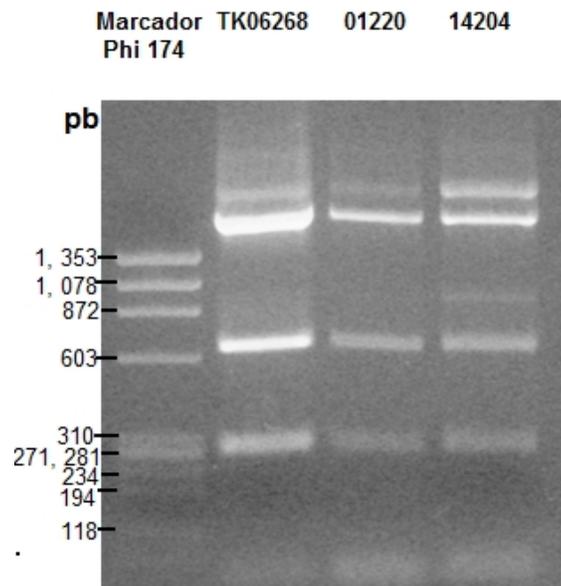


Figura 18. Digestión con DraIII de los amplicones obtenidos de la región *Int1-qacED1*, en TK06268, 01220 y 14204.

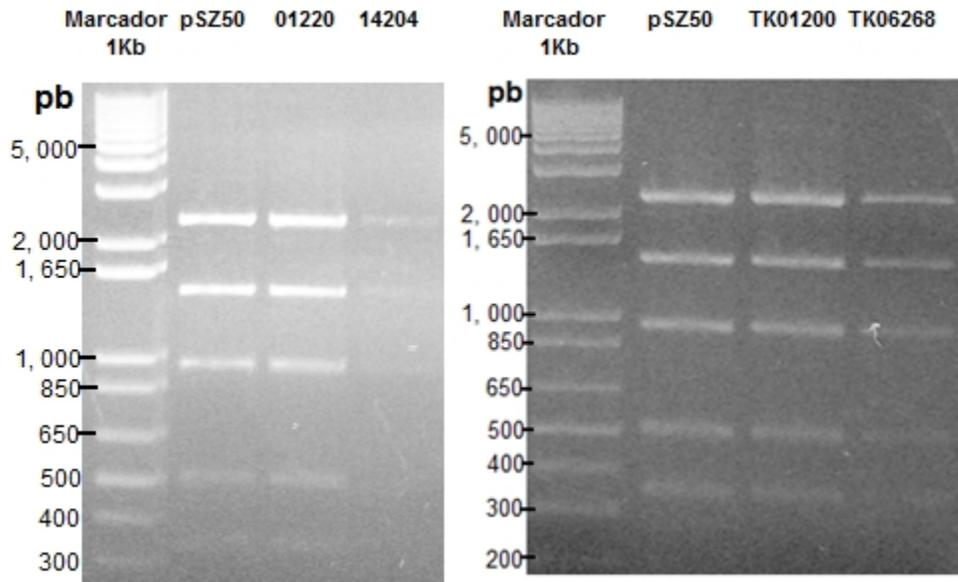


Figura 19. Digestión con HindIII de los amplicones obtenidos con los iniciadores qAsecFcct-qAsecRaat, en pSZ50, 01220, 14204, TK01200 y TK06268.

ANEXO 6.

PATRÓN DE RESTRICCIÓN TEÓRICO DE LA REGIÓN *qacEΔ1-qnrA1* DEL PLÁSMIDO pMG252.

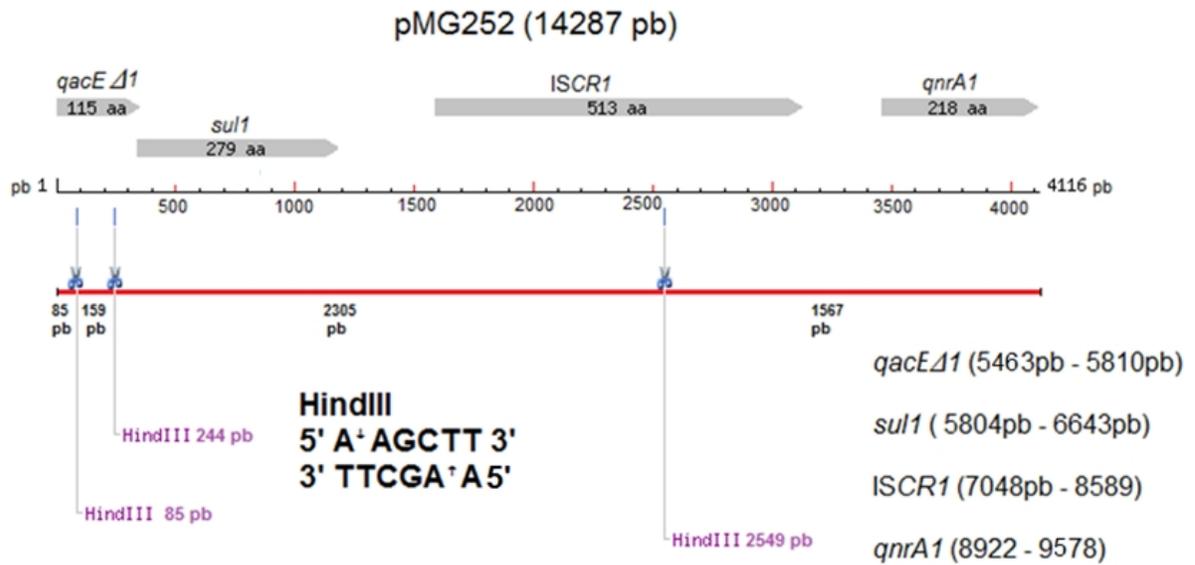


FIGURA 20. Patrón de restricción teórico con HindIII de la región *qacEΔ1-qnrA* en el plásmido pMG252.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- * **Campos-Sepúlveda A. E., Martínez-Enríquez M. E., Mendoza-Patiño N.** (2008). Quinolonas. *Rev Fac Med UNAM*, **51**, 173-177.
- * **Cano M. E., Rodríguez-Martínez J. M., Agüero J., Pascual A., Calvo J., García-Lobo J. M., Velasco C., Francia M. V., Martínez-Martínez L.** (2009). Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *J Clin Microbiol*, **47**, 2033-2039.
- * **Cattoir V., Poirel L., Rotimi V., Soussy C.-J., Nordmann P.** (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J of Antimicrob Chemother*, **60**, 394-397.
- * **Cesaro A., Bettoni R. R. D., Lascols C., Mérens A., Soussy C.-J., Cambau E.** (2008). Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne *qnr* genes. *J of Antimicrob Chemother*, **61**, 1007-1015.
- * **Drawz S. M., Bonomo R. A.** (2010). Three decades of β -lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev*, **23**, 160-201.
- * **Drlica K., Malik M., Kerns R. J., Zhao X.** (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**, 385-392.
- * **Garza-Ramos U., Hernández-Vargas M. J., Rojas-Moreno T., Ruiz-Palacios G., Silva-Sánchez J.** Complete Nucleotide Sequence of pSZ50, a 50 kb-Plasmid Conferring Quinolone Resistance in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. 49th International Congress on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, CA. September 12-15, 2009 (Oral presentation).
- * **Garza-Ramos U., Morfin-Otero R., Sader H. S., Jones R. N., Hernández E., Rodríguez-Noriega E., Sánchez A., Carrillo B., Esparza-Ahumada S., Silva-Sánchez J.** (2008). Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{IMP-15} in a class I integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**, 2943-2946.
- * **Garza-Ramos U., Silva-Sánchez J., Martínez-Romero E.** (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Sal Púb Méx*, **51** supl3, S439-S446.
- * **González G., Mella S., Zemelman R., Bello H., Domínguez M.** (2004). Integrones y *cassettes* genéticos de resistencia: Estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev Méd Chile*, **132**, 619-626.
- * **Hernández-Vargas María José.** Caracterización molecular del plásmido pSZ50 de *Escherichia coli* que confiere resistencia a las quinolonas (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2010.

- * **Jeong J.-Y., Yoon H. J., Kim E. S., Lee Y., Choi S.-H., Kim N. J., Woo J. H., Kim Y. S.** (2005). Detection of *qnr* in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 2522-2524.
- * **Kazama H., Hamashima H., Sasatsu M., Arai T.** (1998). Distribution of the antiseptic resistance genes *qacE* and *qacEΔ1* in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, **159**, 173-178.
- * **Kaufmann, M. E.** (1998). Pulsed-field gel electrophoresis. En N. W. Woodford y A. Johnson (Eds.), *Methods in Molecular Medicine* (Vol. 15). Molecular Bacteriology. Human Press, Totowa N. J.
- * **Kieser T.** (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, **12**, 19-36.
- * **Kim H. B., Park C. H., Kim C. J., Kim E.-C., Jacoby G. A., Hooper D. C.** (2009). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**, 639-645.
- * **Lévesque C., Piché L., Larose C., Roy P. H.** (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**, 185-191.
- * **Mammeri H., Van De Loo M., Poirel L., Martinez-Martinez L., Nordmann P.** (2005). Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 71-76.
- * **Martínez-Martínez L., Pascual A., Jacoby G. A.** (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, **351**, 797-799.
- * **Mella S., Acuña G., Muñoz M., Pérez C., Labarca J., González G., Bello H., Domínguez M., Zemelman R.** (2000). Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev Chil Infect*, **17**, 53-66.
- * **Miller J. H.** (Ed.) (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- * **Noble C. G., Barnard F. M., Maxwell A.** (2003). Quinolone-DNA Interaction: Sequence-dependent binding to single-stranded DNA reflects the interaction within the Gyrase-DNA complex. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 854-862.
- * **Paterson D. L., Bonomo R. A.** (2005). Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev*, **18**, 657-686.

- * **Paauw A., Fluit A. C., Verhoef J., Leverstein-van Hall M. A.** (2007). *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Ducth hospital. *Emerg Infect Dis*, **12**, 807-812.
- * **Piddock L. J. V.** (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*, **19**, 382-402.
- * **Poole K.** (2000). Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 2233-2241.
- * **Roca J.** (2009). Topoisomerase II: A Fitted mechanism for the chromatin landscape. *Nucl Acid Res*, **37**, 721-730.
- * **Rodríguez-Martínez J. M.** (2005). Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enferm Infec Microbiol Clín*, **23**, 25-31.
- * **Rodríguez-Martínez J. M., Poirel L., Canton R., Nordmann P.** (2006). Common region CR1 for expression of antibiotic resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 2544-2546.
- * **Ruiz J.** (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother*, **51**, 1109-1117.
- * **Sánchez-Céspedes Javier.** Implicación de diversos mecanismos de resistencia a quinolonas en Bacilos Gram-Negativos: Diseño de una nueva fluoroquinolona (tesis doctoral). Universidad de Barcelona, 2008.
- * **Silva-Sánchez J., Barrios-Camacho H., Bello-Díaz M., Reyna-Flores F., Sánchez-Pérez A., Rojas-Moreno T., Garza-Ramos U.** (2011). Prevalencia de determinantes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* y *qepA* que confieren resistencia a quinolonas en aislamientos clínicos productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). *Enferm Infec Microbiol*, **31** S2011, S57.
- * **Smith A. B., Maxwell A.** (2006). A strand-passage conformation of DNA gyrase is required to allow the bacterial toxin, CcdB, to access its binding site. *Nucl Acid Res*, **34**, 4667–4676.
- * **Strahilevitz J., Jacoby G. A., Hooper D. C., Robicsek A.** (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*, **22**, 664-689.
- * **Shen P., Jiang Y., Zhou Z., Zhang J., Yu Y., Li L.** (2008). Complete nucleotide sequence of pKP96, a 67 850 bp multiresistance plasmid encoding *qnrA1*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla_{CTX-M-24}* from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, **62**, 1252-1256.

* **Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., Swaminathan B.** (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, **33**, 2233-2239.

* **Toleman M. A., Bennett P. M., Walsh T. R.** (2006). ISCR elements: Novel gene-capturing systems of the 21st century?. *Microbiol Molec Biol Rev*, **70**, 296-316.

* **Wang M., Tran J. H., Jacoby G. A., Zhang Y., Wang F., Hooper D. C.** (2003). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 2242-2248.

* **Yamane K., Wachino J.-I., Suzuki S., Kimura K., Shibata N., Kato H., Shibayama K., Konda T., Arakawa Y.** (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, qepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**, 3354–3360.

* **Yang H., Chen H., Yang Q., Chen M., Wang H.** (2008). High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in clinical isolates on *Enterobacteriaceae* from nine teaching hospitals in China. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**, 4268-4273.

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

* <http://tools.neb.com/NEBcutter2>