



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**ESTUDI DELS MECANISMES DE RESISTÈNCIA
MÚLTIPLE ALS ANTIBIÒTICS EN *Morganella morganii***

LAURA ROJAS REMÓN
Barcelona 2006



UNIVERSITAT DE BARCELONA

TESI DOCTORAL

**ESTUDI DELS MECANISMES DE RESISTÈNCIA
MÚLTIPLE ALS ANTIBIÒTICS EN *Morganella morganii***

Memòria presentada per Laura Rojas Remón
per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

DEPARTAMENT DE PATOLOGIA I TERAPEUTICA
EXPERIMENTAL
Facultat de Medicina
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**ESTUDI DELS MECANISMES DE RESISTÈNCIA MÚLTIPLE
ALS ANTIBIÒTICS EN *Morganella morganii***

A mis padres, a Marc,
a Montse y a Esther

Quisiera dar mi agradecimiento más sincero a todas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis.

En primer lugar y muy especialmente le doy las gracias al Dr. Miquel Viñas Ciòrdia, director de esta tesis, por admitirme en su grupo de investigación, aportarme tantos conocimientos y enseñarme a disfrutar del apasionante mundo de la microbiología.

A mi codirectora de tesis, la Dra. Neus Ruiz, por guiarme y animarme desde el primer día. Gracias por tu paciencia y confianza en este trabajo.

Durante estos años he tenido la suerte de trabajar con gente estupenda con la que he compartido muchas risas y algunos malos momentos, todos ellos inolvidables. Quiero dar las gracias a mis compañeros de laboratorio César, Guillem, Lidia y a la Dra. Vinuesa. Muy especialmente a Anna y Blanca, por su inestimable ayuda dentro y fuera del laboratorio. También a la Sra. Valenzuela quién me condujo a este departamento.

A la Dra. A. Manzano, a quién conozco desde hace años, que me ha ayudado siempre que lo he necesitado, sobretodo en momentos esenciales.

Quisiera agradecer la colaboración del Dr. Benz, así como la de E. Maier por sus aportaciones en el estudio físico-químico y molecular de la proteína Omp36.

Son muchos los amigos que durante estos años se han preocupado de mi estado de ánimo y mis avances, Alicia, Laura, Ana, Eva, Claudia, Joan..... a todos vosotros, muchas gracias.

Quiero dar las gracias a mi familia. A mis padres, por su confianza en mí, por su apoyo incondicional y por alegrarme constantemente. A mis hermanas, Montse y Esther, porque son magníficas y siempre me han dado ánimos.

Finalmente a Marc, por entenderme, por aconsejarme, por su infinita paciencia, por hacerme reír cada momento, sobretodo en esta última etapa más complicada. Gràcies per estar sempre al meu costat.

Aquest treball de doctorat ha estat finançat pel projecte SAF 2002-00698 del qual en va ser l'investigador principal el Prof. Miquel Viñas i dels projectes BE 865/9-5 i *fonds der chemischen industrie* dels que va ser investigador principal el Prof. Roland Benz. La fundació Josep Finestres va facilitar enormement la realització d'aquesta tesi en concedir-me una beca pre-doctoral.

ÍNDEX

ÍNDEX	I
ABREVIATURES	VII
1 INTRODUCCIÓ	1
1.1 <i>Morganella morganii</i>	3
1.1.1 CARACTERÍSTIQUES DEL GÈNERE	3
1.1.2 PATOGENICITAT DE <i>M. morganii</i> .	7
1.1.3 FACTORS DE VIRULENCIA	8
1.2 LA RESISTÈNCIA BACTERIANA ALS ANTIBIÒTICS	10
1.2.1 GENERALITATS	10
1.2.2 AGENTS ANTIMICROBIANS	12
1.2.3 MECANISMES DE RESISTÈNCIA ALS ANTIBIÒTICS	14
1.2.3.1 Inactivació enzimàtica dels antibiòtics	18
1.2.3.2 Modificació de la diana de l'antibiòtic	23
1.2.4 ELS SISTEMES DE REFLUX	25
1.2.4.1 Transportadors secundaris de múltiples antibiòtics (SMT)	27
1.2.4.2 Transportadors ABC de múltiples antibiòtics	30
1.2.5 ELS INTEGRONS	32
1.2.5.1 Estructura i classificació	33
1.2.5.2 Implicació clínica de l'associació integron- <i>cassette</i> genètic de resistència	37
1.3 LA MEMBRANA EXTERNA DE MICROORGANISMES GRAM NEGATIUS	39
1.3.1 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA EXTERNA	39
1.3.2 LES PORINES	42
1.3.2.1 Propietats físico-químiques	43
1.3.2.2 Estructura	44
1.3.2.3 Regulació de l'expressió de les porines	45
1.3.2.4 Evolució de les porines	46
1.3.3 EL PAPER DE LA MEMBRANA EXTERNA DELS BACTERIS GRAM NEGATIUS EN LA RESISTÈNCIA INTRÍNSECA ALS ANTIBIÒTICS	47
2 OBJECTIU	51
3 MATERIAL I MÈTODES	55
3.1 SOQUES BACTERIANES	57
3.2 MEDIS DE CULTIU	57
3.2.1 BROU DE TRIPTONA I SOJA (TSB)	57
3.2.2 AGAR DE TRIPTONA I SOJA (TSA)	57
3.2.3 LURIA BROTH	58
3.2.4 BROU DE MULLER-HINTON	58
3.2.5 AGAR DE MULLER-HINTON	59

3.2.6	BROU DE TRIPTONA SOJA AMB GLICEROL	59
3.3	DETERMINACIÓ DE SUSCEPTIBILITAT MICROBIANA ALS ANTIBIOTICS	60
3.3.1	AGENTS ANTIMICROBIANS	60
3.3.2	ANTIBIOGRAMA	61
3.3.3	CONCENTRACIÓ MÍNIMA INHIBITÒRIA	62
3.4	EXPERIMENTS DE REFLUX	63
3.4.1	ASSAIG DE CREIXEMENT I INHIBICIÓ DE <i>M.morganii</i>	63
3.4.1.1	Corba de creixement	63
3.4.1.2	Assaig d'inhibició del creixement	63
3.4.1.3	Efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement bacterià, en presència i absència de CCCP	64
3.5	EXPERIMENTS DE FLUORIMETRIA	64
3.6	EXTRACCIÓ DE DNA CROMOSÒMIC I PLASMÍDIC	66
3.6.1	AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE DNA CROMOSÒMIC DE <i>M.morganii</i> .	66
3.6.2	AÏLLAMENT DE DNA PLASMÍDIC	68
3.7	TÈCNiques DE MANIPULACIÓ DE DNA	70
3.7.1	DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ	70
3.7.2	PURIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA	70
3.7.3	PRECIPITACIÓ DE DNA	70
3.7.4	TÈCNICA D'ELECTROFORESI EN CAMP POLSANT (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)	71
3.7.4.1	Extracció del DNA	71
3.7.4.2	Digestió del DNA amb enzims de restricció	73
3.7.4.3	Visualització dels fragments	73
3.7.5	ELECTROFORESI DE DNA EN GELS D'AGAROSA	74
3.7.6	RECUPERACIÓ DELS FRAGMENTS DE DNA A PARTIR DE GELS D'AGAROSA	75
3.8	DETERMINACIÓ DE SEQÜÈNCIES DE GENS	77
3.9	COMPARACIÓ I ALINEACIÓ DE SEQÜÈNCIES	78
3.10	HIBRIDACIÓ DE DNA PLASMÍDIC AMB UNA SONDA ESPECÍFIC	79
3.10.1	TRANSFERÈNCIA DEL GEL PER CAPILARITAT A UN FILTRE DE NYLON. TÈCNICA "SOUTHERN".	79
3.10.2	OBTENCIÓ DE LA SONDA DE DNA	79
3.10.3	PREHIBRIDACIÓ I HIBRIDACIÓ DEL FILTRE AMB LA SONDA ESPECÍFICA	80
3.10.4	RENTATS I DETECCIÓ DE LES BANDES ESPECÍFIQUES D'HIBRIDACIÓ	81
3.11	ANÀLISI DE PROTEÏNES DE LA MEMBRANA EXTERNA	83
3.11.1	AÏLLAMENT DE MEMBRANA EXTERNA	83
3.11.2	PURIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA OMP36	84
3.11.3	VISUALITZACIÓ D'OMP PER ELECTROFORESI EN GEL POLIACRILAMIDA	85

3.12 EXPERIMENTS PER MESURAR LA CAPACITAT FORMADORA DE PORUS: <i>BLACK LIPID BILAYER TECHNIQUE</i>.	89
3.12.1 MESURA DE LA CONDUCTÀNCIA DE CANALS SIMPLES	89
3.12.2 ESTUDI DE LA SELECTIVITAT DEL CANAL I AVALUACIÓ DE LA DEPENDÈNCIA DE VOLTATGE	91
4 RESULTATS I DISCUSSIÓ	93
4.1 SUSCEPTIBILITAT ALS ANTIBIÒTICS DE <i>M. morganii</i>	95
4.2 ESTIMACIÓ DE LA IMPLICACIÓ DEL REFLUX EN LA RESISTÈNCIA A DETERMINATS ANTIMICROBIANS	101
4.2.1 ACCIÓ D'INHIBIDORS METABÒLICS SOBRE LA SUSCEPTIBILITAT ALS ANTIMICROBIANS	101
4.2.2 EXPERIMENTS DE FLUORIMETRIA	103
4.2.2.1 Estudi comparatiu d'acumulació de ciprofloxacina en diversos bacteris Gram negatius	103
4.2.2.2 Estudi fluorimètric d'acumulació de ciprofloxacina en <i>M.morganii</i> amb presència i absència de CCCP	104
4.2.3 ASSAIG D'INHIBICIÓ DEL CREIXEMENT	106
4.2.4 EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DE CIPROFLOXACINA EN EL CREIXEMENT BACTERIÀ, EN PRESENCIA I ABSÈNCIA DE CCCP	108
4.3 ESTUDI DE LES PROTEÏNES DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>M. morganii</i>	111
4.3.1 ANÀLISI DE LES OMPs DE <i>M. morganii</i>	111
4.3.2 PURIFICACIÓ D'OMP36	113
4.4 EXPERIMENTS DE “<i>BLACK LIPID BILAYER CONDUCTANCE</i>”	114
4.4.1 ÀNALISI DE CONDUCTÀNCIA DEL CANAL PRODUÏT PER LA PORINA OMP36 DE <i>M. morganii</i>	114
4.4.2 MESURES DE POTENCIAL DE MEMBRANA A CORRENT ZERO	122
4.4.3 AVALUACIÓ DE LA DEPENDÈNCIA DE VOLTATGE	122
4.4.4 ESTIMACIÓ DEL DIÀMETRE DEL CANAL FORMAT PER OMP36.	124
4.5 DETECCIÓ I DETERMINACIÓ DE LES SEQÜÈNCIES DELS INTEGRONS PLASMÍDICS <i>Int1,5</i> i <i>Int 2,0</i> DE <i>M. morganii</i>	125
4.5.1 DETECCIÓ I AÏLLAMENT DEL PLASMIDI pML2003 EN <i>M. morganii</i>	125
4.5.2 DETECCIÓ DELS INTEGRONS	127
4.5.3 DETERMINACIÓ DE LES SEQÜÈNCIES DELS INTEGRONS <i>Int1,5</i> I <i>Int2,0</i> DE <i>M. morganii</i> .	128
4.5.3.1 Determinació de la seqüència de l'integró de 1,5 kb	129
4.5.3.2 Determinació de la seqüència de l'integró de 2,0 kb	132
5 RESUM I CONCLUSIONS	137
6 BIBLIOGRAFIA	141
ANNEX	153

ABREVIATURES

aa	Aminoàcid
aa-dUTP	dUTP aminoacil
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
ATP	Adenosina-5'-trifosfat
CCCP	Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona
Da	Daltons
DIG	Digoxigenina
DiPhPC	Difitanoi Fosfatidilcolina
dNTP	Dideoxinucleòtid
EBR	Bromur d'etidi
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
<i>et al.</i>	i col·laboradors
G	Conductància
KCN	Cianur de potassi
KDa	QuiloDaltons (1 KDa= 1000 Daltons)
LPS	Lipopolisacàrid
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MIC	Concentració Mínima Inhibitòria
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nt	Nucleòtid
OMP	Proteïnes de membrana externa (<i>Outer Membrane Proteins</i>)
P	Coefficient de permeabilitat
PABA	Àcid-p-aminobenzoic
PBS	Solució salina amb fosfat (<i>phosphate buffered saline</i>)
pb	Parell de bases
PCR	Reacció en cadena de la DNA polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Electroforesis de camp polsant (<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>)
QRDR	Regió determinant de la resistència a quinolones (<i>Quinolone resistance determining region</i>)
q.s.p	Quantitat suficient per
RNAsa	Ribonucleasa
RND	<i>Resistance-Nodulation-Cell Divison</i>
rpm	Revolucions per minut

SDS	Dodecilsulfat sòdic (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesi en gel d'acrilamida/bisacrilamida desnaturalitzant
SMT	<i>Secondary Multidrug Transporters</i>
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
spp.	espècie
TAE	Tris-Acetate-EDTA
Taq	Polimerasa termoresistent de <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamina
Tris	Trihidroximetilaminometà
UV	Ultraviolat

1 INTRODUCCIÓ

1.1 *Morganella morganii*

El gènere *Morganella*, membre de la família *Enterobacteriaceae*, està constituït actualment per una sola espècie: *Morganella morganii* amb dues subespècies, *M. morganii morganii* i *M. morganii sibonii*. *M. morganii* és un patogen oportunista causant d'infeccions del tracte urinari i bacterièmies.

1.1.1 CARACTERÍSTIQUES DEL GÈNERE

El gènere *Morganella* està constituït per bacils Gram negatius de petita grandària (de 0,6 a 0,7 µm de diàmetre i de 1,0 a 1,7 µm de llargària), generalment són organismes mòbils per flagel·lació períttrica, quimiorganòtrofs i anaeròbics facultatius [17].

Morganella spp. pot hidrolitzar la urea i produir àcid i gas a partir de glucosa i manosa. La temperatura òptima de creixement es situa al voltant dels 37°C. A més pot reduir els nitrats en nitrits i com tots els integrants de la família *Enterobacteriaceae* és oxidasa negativa. Les soques de *M. morganii* creixen bé en els medis d'aïllament primari com l'agar TSA i l'agar nutritiu i poden créixer en presència de cianur de potassi. La figura 1.1 mostra algunes imatges de *M. morganii* al microscopi òptic i en cultiu en placa.

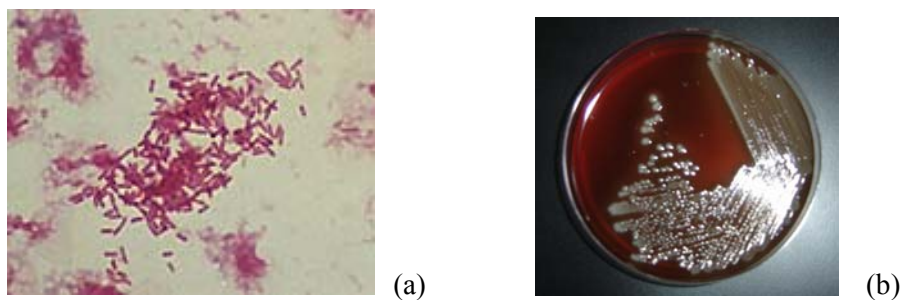


Figura 1.1. (a) Imatge de *M. morganii* després d'un tenyiment Gram. (b) Imatge de colònies de *M. morganii* crescudes en agar sang.

Va ser al 1906, estudiant l'etiologia de la diarrea infantil, quan Harry de Reimer Morgan va descriure un microorganisme negatiu en la fermentació de la lactosa, indol positiu i negatiu en la liquefacció de gelatina, completament diferent de *Bacillus dysenteriae*, fins llavors conegut com el principal patogen causant de malalties pediàtriques a Filipines, Alemanya i Estats Units. Va passar a ser conegut com a "bacil de Morgan" i al 1919 se l'anomenà *Bacillus morganii* [77].

Durant l'any 1905 Castellani va descriure un bacteri que havia aïllat d'un cas de febre humana similar a la febre tifoïda que l'anomenà *Bacillus columbense* i al 1914 el va estudiar juntament amb dues soques idèntiques [28]. Anys més tard, aquestes soques van ser classificades per Fulton dins del gènere *Morganella* [41].

Al 1936, Rauss realitzà més experiments amb aquest grup de bacteris i va pensar que aquestes noves soques formaven part del gènere *Proteus* [105]. Conseqüentment, en la cinquena edició del “*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*”, publicada l'any 1939, es va anomenar a aquest microorganisme *Proteus morganii* [17].

El treball desenvolupat per Fulton l'any 1943 li va permetre formar el gènere *Morganella* englobant a totes les soques negatives en la fermentació de la lactosa o sacarosa però indol positives. Es van descriure dues espècies que van ser *M. morganii* i *M. columbiensis*, però, Ewing, al 1962, va reidentificar a *Bacillus columbense* com *Escherichia coli* i d'aquesta manera el gènere va passar a tenir una única espècie, *M. morganii*, encara que, l'espècie *morganii*, fou relegada 16 anys més al gènere *Proteus* [38].

El gènere *Morganella* fou incorporat a la família de les *Enterobacteriaceae* l'any 1978 quan Brenner i els seus col·laboradors, basant-se en estudis d'hibridació de DNA-DNA, revelaren que només existia una similitud del 13 al 26% entre el DNA d'espècies de *Proteus* i *Providencia* amb el DNA de *M. morganii*. Es confirmava així la cessió de les soques conegudes com *Proteus morganii* a *M. morganii* [23]. El nom *M. morganii* va ser inclòs en les llistes d'aprovació de noms bacterians (de l'anglès, “*Approved Lists of Bacterial Names*”) i va ser acceptat per la comunitat científica [121].

L'any 1980 estudis amb soques clíniques van permetre a Hickman i els seus col·laboradors descriure dos grups dins del gènere *Morganella*, basant-se en reaccions atípiques de lisina i ornitina descarboxilasa. Un grup era lisina positiu i l'altre ornitina negatiu, això va ser confirmat 5 anys més tard per Farmer III i els seus col·laboradors que proposaren als membres del grup lisina positiu no mòbil com a *M. morganii* biogrup 1 [39,51].

Un exhaustiu estudi de tots aquests grups, recolzat per experiments d'hibridació de DNA, va permetre l'any 1992 definir dues subespècies amb 3 i 4 biogrupos: *M. morganii*

subsp. *morganii* que conté 4 biogrups (A, B, C, D) i *M. morganii* subsp. *sibonii* amb 3 biogrups (E, F, G) [59]. Es va dividir l'espècie en dos biogrups, segons la capacitat de les soques de *M. morganii* per fermentar la trehalosa, el biogrup trehalosa-negatiu subdividit en els biogrups A, B, C, D i el biogrup trehalosa-positiu subdividit en els biogrups E, F i G. Les subdivisions es basen en les reaccions lisina descarboxilasa i ornitina descarboxilasa (taula I) [51,59].

Taula I. Característiques fenotípiques diferenciadores dels biogrups de *M. morganii*.

BIOGRUP	Tre	Lis	Orn
A	-	-	+
B	-	+	+
C	-	-	-
D	-	+	-
E	+	+	+
F	+	d+	-
G	+	-	+

Tre, trehalosa; Lis, lisina; Orn, ornitina
d+ = 50 a 89% positiu en 48 hores.

El 90% de les soques de *M. morganii* pertanyen a *M. morganii* subsp. *morganii* i la majoria d'aquestes al biogrup A. Per tant, es considera típica aquella *Morganella* que no fermenta la trehalosa, és lisina descarboxilasa negativa i ornitina descarboxilasa positiva. Les morganeles atípiques pertanyen al biogrup B i, finalment, les rares al biogrup C i biogrup D [57].

M. morganii subsp. *sibonii* es detecta ocasionalment, les soques més típiques pertanyen al biogrup G que curiosament té el mateix fenotip per a la lisina i l'ornitina que el biogrup A, el predominant en *M. morganii* subsp. *morganii*. Generalment, la subespècie *morganii* és més susceptible a tetraciclina que *M. morganii* subsp. *sibonii*, encara que la susceptibilitat a tetraciclina no és un paràmetre diferenciador de subespècies [57].

Algunes característiques útils per diferenciar les dues subespècies de *M.morganii* de les espècies de *Proteus* i *Providencia* es mostren a la taula II.

Taula II. Característiques comparatives de *Proteus*, *Providencia* i *M.morganii* [59]

Soca	Ur	Lys	Orn	Ind	Cit	kCN	Gel	H ₂ S	Mot	X	Mn	Ma	Tre	Ad	Mt	Er
<i>M.morganii</i> subsp. <i>morganii</i>																
Biogrup A	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Biogrup B	+	+	+	+	-	+	-	d-	-	-	+	-	-	-	-	-
Biogrup C	+	-	-	+	-	+	-	d+	d+	-	+	-	-	-	-	-
Biogrup D	+	+	-	+	-	+	-	d-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>M.morganii</i> subsp. <i>sibonii</i>																
Biogrup E	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Biogrup F	+	d+	-	d+	-	+	-	-	d+	-	+	-	+	-	-	-
Biogrup G	+	-	+	d+	-	d+	-	d-	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+		+	-	d+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	+	d-	+	+	+	+	+	-	+	d-	-	-	-
<i>Proteus penneri</i>	+	-	-	-	-	+	d+	d-	d+	+	-	+	d+	-	-	-
<i>Proteus myxofaciens</i>	+	-	-	-	d+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	d+
<i>Providencia stuartii</i>	d-	-	-	+	+	+	-	-	d+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Providencia alcalifaciens</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>Providencia rustigianii</i>	-	-	-	+	d-	+	-	-	d-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Providencia heimbachae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	d-	-	+	d-	-	+	-	-

Ur, urea; Lys, lisina descarboxilasa; Orn, ornitina descarboxilasa; Ind, indol; Cit, citrat; KCN, creix en presència de KCN; Gel, gelatina; TSI, triple sucre ferro; Mot, mobilitat; X, Xilosa; Mn, manosa; Ma, maltosa; Tre, trehalosa; Ad, adonitol; Mt, manitol; Er, eritritol; +, >90% positiu en 48h; -, >10% positiu en 48h; d+, del 50 al 89% positiu en 48h; d-, 11-49% positiu en 48h.

1.1.2 PATOGENICITAT DE *M. morganii*

M. morganii és un microorganisme ubic que pot trobar-se al terra, en l'aigua i colonitzant el tracte digestiu de l'ésser humà i de nombroses espècies animals. És causa coneguda d'infeccions del tracte urinari i fora d'aquest pot produir diversos tipus d'infeccions. És un invasor oportunista, aïllat normalment en bacterièmies, tracte respiratori, sang i tracte urinari [90].

El seu comportament s'associa al d'un patogen oportunista essent causa d'infeccions nosocomials, és a dir, aquella infecció en la que no hi ha evidència de què el bacteri sigui present o en període d'incubació en el moment de l'admissió del malalt a l'hospital. És important destacar que les infeccions nosocomials són una de les principals causes de morbiditat i mortalitat en malalts hospitalitzats amb complicacions.

Aquest agent poques vegades causa infeccions invasives en persones immunocompetents però, com a patogen oportunista que és, *M. morganii* pot causar infeccions nosocomials en persones immunocompromeses, normalment individus que estan hospitalitzats i pateixen malalties subjacents. La majoria d'aquestes infeccions s'originen principalment a causa de la utilització de catèters. Tot i ser una espècie patògena per a l'home *M. morganii* té una incidència baixa, de menys del 1% de les infeccions nosocomials [75].

Com ja s'ha comentat anteriorment, s'han descrit diverses infeccions causades per *M. morganii*. A finals de la dècada de 1930 es va identificar com a causant d'una infecció del tracte urinari, la més comuna de totes les infeccions causades per aquest microorganisme. Les bacterièmies causades per *Morganella* són, en la seva gran majoria, secundàries a les infeccions del tracte urinari. La manipulació de les vies urinàries en forma de cateterització uretral, resecció transuretral de la pròstata o cistoscòpia, són els factors de risc més relacionats amb l'aparició de bacterièmies [89].

Altres infeccions menys freqüents causades per *M. morganii* són les corioamnionitis. Una infecció de les membranes placentàries i del líquid amniòtic que pot causar bacterièmia en la mare i provocar un part prematur amb una greu infecció en el neonat [26,60]. Associada a aquesta infecció maternal es poden donar casos de sepsis neonatal en nadons prematurs que ocasionalment s'han relacionat amb l'exposició a ampil·lina o amoxicil·lina durant una

teràpia antibiòtica prèvia a l'embaràs que podria ser causa d'una colonització vaginal per aquest inusual microorganisme [21,27,37,103,109,112]. *M. morganii* també ha estat causant de meningitis tant en neonats com en altres situacions [53,54,69,72,115].

La primera vegada que es va descriure a aquest microorganisme com a causant d'artritis va ser l'any 1988 en un pacient d'edat avançada, i des d'aleshores s'ha descrit en varies ocasions [42,116].

A més, *M. morganii* és un inusual però devastador causant d'endofthalmitis, una complicació d'operacions intraoculars poc comuna (0.1%-0.3%) freqüentment desencadenant d'una pèrdua de visió [34,126].

També s'han descrit casos esporàdics de piomiositis, un trastorn inflamatori dels músculs [5], peritonitis, inflamació del peritoneu [55], pericarditis, inflamacions del pericardis [120], abscessos cerebrals i infeccions del sistema nerviós central [58,104].

1.1.3 FACTORS DE VIRULENCIA

El gènere *Morganella* presenta diferents factors de virulència, com són alguns enzims (ureases i hemolisines) que poden causar lesions en l'hoste.

Les ureases bacterianes són metaloenzims que contenen níquel i catalitzen la hidròlisis de la urea, formant entre d'altres compostos, amoníac, sent aquest una font preferencial de nitrogen per molts microorganismes. Degut a la presència d'urea a la natura, la capacitat de sintetitzar ureases està considerablement estesa entre els microorganismes. L'estructuració dels gens de la ureasa, siguin aquests funcionals o no, està conservada entre els membres de la família *Enterobacteriaceae*. Basant-se en l'elevada producció d'ureasa *Morganella morganii* va ser classificada com a *Proteus morganii*. L'enzim de *Morganella* sembla tenir més afinitat per la urea que els enzims de *Proteus* i *Providencia* i s'expressa constitutivament, a més, el gen de la ureasa de *Morganella* no hibrida amb els corresponents gens de les espècies més properes de *Proteus* [52]. Guo i Liu van trobar que la ureasa de *M. morganii* és serològicament diferent de la de *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* i *Providencia rettgeri* [48] La producció d'ureases es relaciona, entre altres efectes a pielonefritis, comes hepàtics, hiperamonèmia i urolitiasis [61].

M. morganii també produeix l'exotoxina hemolisina HlyA que pertany a una gran família d'hemolisines anomenades RTX, totes elles actuen creant porus en les membranes cel·lulars dels eucariotes. Aquesta activitat hemolítica la presenten entre el 56 i el 100% de les soques de *Morganella* que expressen aquest enzim [64].

1.2 LA RESISTÈNCIA BACTERIANA ALS ANTIBIÒTICS

1.2.1 GENERALITATS

El descobriment dels antibiòtics ha estat una de les revolucions més espectaculars en la medicina del segle XX. Tot i que durant el segle XVII ja s'utilitzaren algunes substàncies químiques pel tractament de malalties infeccioses i parasitàries, la quimioteràpia com a ciència va començar a finals del segle XIX amb Paul Ehrlich, pioner en la recerca empírica de productes químics de síntesi i seguí després amb Gerhard Domagk que al 1935 descobrí l'efectivitat terapèutica de les sulfamides. L'any 1940 els britànics H.W. Florey i E.B. Chain demostraren que la penicil·lina, observada per Fleming al 1929, podia convertir-se en una substància quimioteràpica efectiva. Des de llavors, s'han descobert i sintetitzat gran quantitat d'antimicrobians que són efectius en el tractament de la malaltia infecciosa i han permès, des de finals dels anys 40, vèncer infeccions que abans eren considerades incurables (pneumònies, meningitis, tuberculosi, sífilis, etc.).

Però l'home i els microorganismes evolucionen conjuntament de manera que, si l'ésser humà va aprendre a defensar-se de la malaltia infecciosa mitjançant els antibiòtics, cinquanta anys després, la ràpida adaptabilitat de les poblacions bacterianes ha portat a l'aparició de soques resistents a diferents antimicrobians. Les primeres notícies sobre soques resistents daten del segon any de l'aparició del primer antibiòtic, quan es van detectar soques d'estafilococs resistents a la penicil·lina [81]. En els anys setanta, la indústria farmacèutica creia que els antibiòtics de què disposava eren suficients per combatre les malalties infeccioses i fer front als fenòmens de resistència, que aleshores es pensava que estaven confinats en els hospitals. A finals dels anys vuitanta, l'aparició de soques multiresistents i de resistències extrahospitalàries, va fer plantejar a la indústria farmacèutica la necessitat de sintetitzar nous agents antimicrobians capaços d'eludir problemes de resistència.

Els bacteris presenten característiques que poden influir de manera molt important en l'emergència, la persistència i la transmissió dels gens que codifiquen per a la resistència als agents antimicrobians. Entre aquests, cal destacar les propietats intrínseques que els fan resistents als antibiòtics, la facilitat d'intercanvi de material genètic, l'elevada capacitat de supervivència després d'haver modificat les condicions ambientals, la facilitat de colonització i d'infecció bacteriana i, molt especialment, la seva capacitat de créixer seguint

una cinètica exponencial que els permet fixar característiques en les poblacions en un temps molt curt.

Entre els factors que afavoreixen l'expansió de microorganismes resistents, s'ha de destacar, d'una banda, la pressió selectiva exercida per l'ús dels antibiòtics, i d'altra banda, la facilitat amb la que els microorganismes resistents arriben als seus hostes a través de la infecció. L'ús extensiu i en ocasions l'abús d'antibiòtics ha ocasionat un augment en la freqüència d'aïllament de microorganismes resistents. Entre els abusos cal mencionar la utilització d'antibiòtics en situacions que no ho requereixen com l'automedicació per part d'individus mal informats. També cal destacar que la introducció d'agents antimicrobians d'ampli espectre ha generat una pressió selectiva sobre un elevat nombre i varietat de microorganismes. Un altre factor que contribueix de forma notòria a l'evolució de bacteris cap a la multiresistència és l'ús d'antibiòtics en medicina veterinària i en l'alimentació d'animals. A la ramaderia, els antibiòtics són utilitzats amb una finalitat profilàctica, terapèutica o com a promotors del creixement (*Antibiotic Growth Promoters –AGPs-*). Alguns d'aquests AGPs estan relacionats estructuralment amb antibiòtics utilitzats en medicina humana de manera que bacteris resistents trobats en animals poden fàcilment ser resistents a antibiòtics utilitzats per humans. És el que es coneix com a resistència creuada. Aquests bacteris resistents poden constituir per sí mateixos una amenaça per a la salut humana o poden transferir els gens de resistència a bacteris capaços de colonitzar l'home.

La rapidesa amb la que han aparegut els gens de resistència indica que ja havien d'existir anteriorment en les poblacions bacterianes. El problema ha estat que no es va descriure la seva presència fins a l'inici de "l'era antibiòtica". Es creu que els gens de resistència presents en bacteris patògens han sorgit de microorganismes productors d'antibiòtics [113]. Els antibiòtics són metabòlits secundaris, és a dir, es tracta de metabòlits que es produeixen una vegada s'ha acabat la fase activa del creixement i generalment s'excreten a l'exterior. L'expulsió dels antibiòtics podria ser la funció principal, en els organismes productors, d'exportació de restes metabòliques que si s'acumulessin en l'interior dels bacteris resultarien tòxiques. Encara que també hi ha la possibilitat que els gens de resistència a antibiòtics derivin d'alguns gens del metabolisme, per exemple, els enzims implicats en la resistència als aminoglucòsids derivarien d'enzims implicats en el metabolisme dels sucres, mentre que les β -lactamases, que proporcionen resistència als antibiòtics β -lactàmics, provindrien de proteases. En qualsevol cas, el que està clar és que els

bacteris productors ens permeten obtenir antibiòtics mentre que als bacteris els capaciten per resistir a aquests antibiòtics en un comportament que podem definir com neutral en la lluita entre l'home i els microbis.

1.2.2 AGENTS ANTIMICROBIANS

Inicialment, es denominà antibiòtic a qualsevol substància produïda per un microorganisme capaç d'inhibir el desenvolupament d'altres microorganismes. Aquesta definició però podria portar a confusions ja que sota aquesta inclouríem també substàncies elaborades pels microorganismes, com àcids, alcohols o peròxid d'hidrogen, capaces d'inhibir el creixement de determinats microorganismes, però que no poden considerar-se en sentit estricte com antibiòtics. Altrament, aquesta definició no inclouria substàncies d'origen sintètic o semisintètic avui dia considerades antibiòtics. Es denomina antibiòtic a tota substància d'origen natural, sintètic o semisintètic amb efecte antimicrobià, que actuï a nivell molecular, en un procés metabòlic o en una estructura concreta d'un microorganisme [43].

La característica més rellevant d'un antibiòtic és la seva toxicitat selectiva. La toxicitat selectiva ve donada per les diferències intrínseques existents entre l'hoste i l'organisme invasor. Aquest és un dels principals factors que permet crear antibiòtics contra els bacteris, ja que aquests són procariotes i per tant difereixen de manera significativa de les cèl·lules humanes. Aquesta propietat suposa que l'antibiòtic ha de tenir un mecanisme d'acció que afecti estructures o processos bacterians que no existeixin o siguin marcadament diferents en les cèl·lules de l'hoste.

Els agents antimicrobians els podem classificar segons el seu origen, efecte antimicrobià, espectre d'activitat i mecanisme d'acció.

Els antibiòtics poden tenir un **origen natural**, com per exemple les penicil·lines de la floridura *Penicillium* o els antibiòtics que deriven del gènere *Streptomyces* com l'estreptomycina, les tetraciclins, el cloramfenicol o l'eritromycina. També hi ha **agents sintètics**, s'obtenen per síntesis química com les sulfonamides, i finalment, els **agents semisintètics**, obtinguts per modificacions químiques d'antimicrobians naturals amb l'objectiu de millorar-los, com ara les penicil·lines d'ampli espectre o algunes cefalosporines o aminoglucòsids.

L'efecte antimicrobià dels antibiòtics és **bactericida** quan l'acció és letal sobre els microorganismes i per tant, aquests perden irreversiblement la seva viabilitat, i **bacteriostàtic** si s'atura el creixement.

Segons el patró de sensibilitat als microorganismes, els antibiòtics poden classificar-se en agents d'**ampli espectre** i compostos d'**espectre reduït**. Els antibiòtics d'ampli espectre són actius en front microorganismes Gram positius i Gram negatius i per tant el seu ús determina una gran avantatge davant infeccions causades per agents desconeguts. Tot i així aquests antibiòtics d'ampli espectre poden alterar de forma significativa la microbiota humana i això possibilita sobreinfeccions per colonització d'altres microorganismes. Els antibiòtics d'espectre reduït en canvi, son útils només per un grup concret de microorganismes i són la millor opció quan es coneix l'agent causal; actuen de forma preferent sobre els agents causals mentre que són en general inactius sobre gran part de la microbiota autòctona.

Segons el seu mecanisme d'acció els agents antimicrobians es classifiquen en: inhibidors de la síntesis d'àcids nucleics, inhibidors de la síntesi de proteïnes, inhibidors de la síntesi de peptidoglicà i desestabilitzadors de membrana (figura 1.2).

Inhibició de la síntesi de peptidoglicà:

- Inhibidors de la síntesi de precursors en el citoplasma: Fosfomicina
- Inhibidors del transport de precursors: Bacitracina
- Inhibidors de l'ensamblatge: glicopèptides (Vancomicina) i β -lactàmics (Penicil·lins, Cefalosporines, Monobactames i Carbapenems).

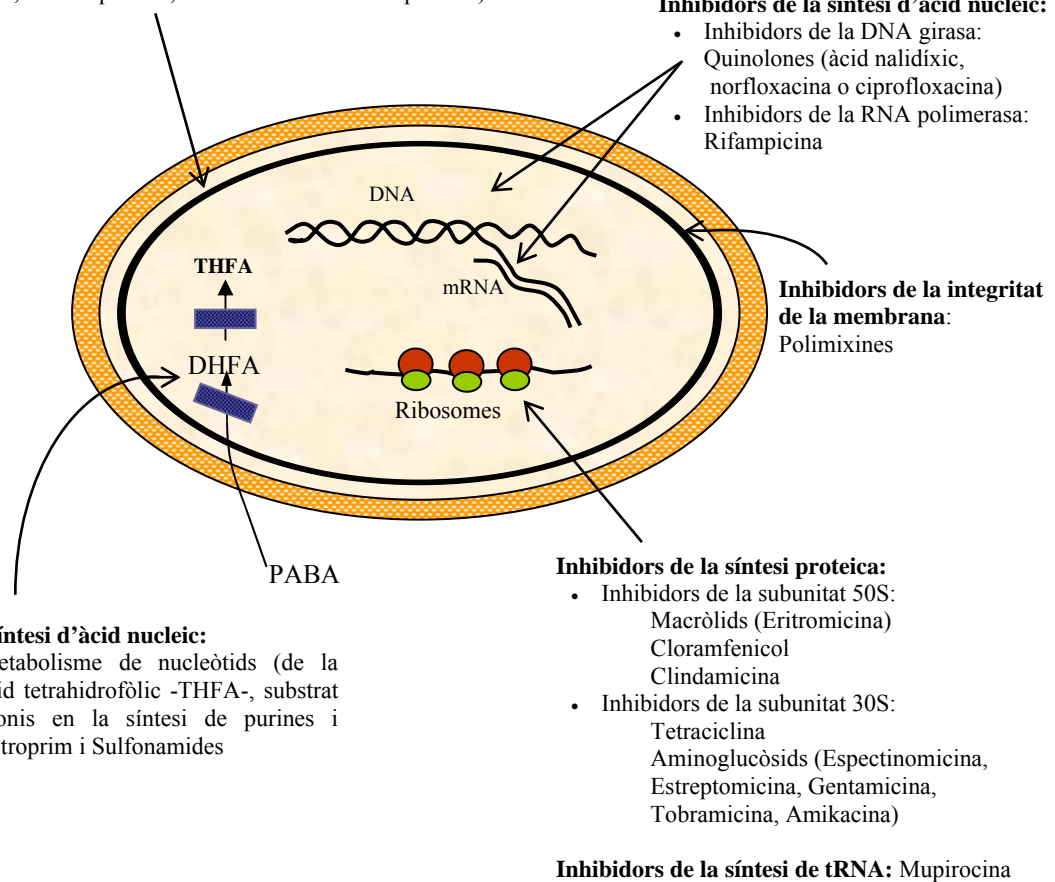


Figura 1.2. Esquema dels llocs d'acció dels diferents agents antimicrobians (PABA= àcid para-aminobenzoic, mRNA=RNA missatger, tRNA=RNA transferència, DHFA=àcid dihidrofòlic, THFA=àcid tetrahidrofòbic, substrat donador de carbonis en la síntesi de purines i pirimidines) [81].

1.2.3 MECANISMES DE RESISTÈNCIA ALS ANTIBIÒTICS

Es denomina resistència a la sensibilitat disminuïda o nul·la d'una soca bacteriana a un agent antimicrobià. La resistència als antibiòtics en els microorganismes pot ser deguda a condicions intrínseques (resistència natural) o bé a l'adquisició de canvis genètics (resistència adquirida). La resistència natural o intrínseca als agents antimicrobians s'associa a diferents factors. En primer lloc, algunes espècies no tenen la diana d'atac de l'agent antimicrobià. Per exemple, la penicil·lina interfereix en la síntesi del peptidoglicà de manera que si un organisme no té aquest compost serà resistent de forma natural, per tant, la penicil·lina no es dona per tractar infeccions causades per virus, fongs, protozous o bacteris que no tinguin paret cel·lular. Altres espècies són resistents de forma natural perquè la substància antimicrobiana

no pot penetrar la cèl·lula i, per exemple, els bacteris Gram negatius estan protegits contra l'acció de molts antibiòtics per la impermeabilitat relativa de la seva membrana externa.

Hi ha soques bacterianes que degut a canvis genètics poden arribar a ser resistents als antibiòtics (resistència adquirida). Aquests canvis genètics no estan causats pels antibiòtics, sinó que es donen de forma espontània, com passa amb totes les mutacions o intercanvis genètics. Encara que, quan existeixen grans concentracions d'antibiòtics en el medi ambient, les soques sensibles a aquests són eliminades, mentre que les soques resistents persisteixen i poden arribar a ser dominants. La resistència als antibiòtics és deguda a la presència de gens que codifiquen proteïnes que protegeixen els microorganismes.

L'adquisició de resistència a antibiòtics pot ser deguda a una mutació cromosòmica, a l'expressió induïda d'un gen cromosòmic que estava latent o per l'adquisició de material genètic nou i exogen a través dels mecanismes de transformació, transducció o conjugació.

En l'adquisició de resistència per mutació normalment es produeix resistència a un únic antibiòtic (o grup d'antibiòtics) i és heretada pels seus descendents. Aquestes mutacions modifiquen les porines, proteïnes que habitualment permeten la permeabilitat de la membrana amb el pas dels antibiòtics i altres molècules hidrofíliques i provoquen la impermeabilitat de la cèl·lula bacteriana. També mutacions en les β -lactamases poden alterar la susceptibilitat del bacteri a antibiòtics β -lactàmics, i finalment, algunes mutacions cromosòmiques poden comportar una sobreexpressió de les bombes de reflux, la qual cosa també pot portar a la multiresistència.

L'adquisició de nous gens de resistència és freqüent a través de gens que es troben localitzats principalment en estructures genètiques mòbils com són plasmidis, transposons i els descrits més recentment integrons. Els transposons són seqüències de DNA amb capacitat de canviar d'ubicació (transposició) en els diferents DNAs. Es caracteritzen per presentar extrems amb seqüències nucleotídiques invertides i complementàries que són reconegudes per l'enzim fonamental per la seva mobilitat: la transposasa. Els integrons no es mobilitzen per si mateixos però tenen gran importància en relació a la resistència ja que són petits sistemes genètics modulars que desenvolupen una funció important en l'adquisició i la disseminació dels gens de resistència, tal i com veurem en l'apartat 2.5 d'aquest capítol. Aquesta resistència adquirida es caracteritza per afectar a la susceptibilitat a més d'un antibiòtic i per poder

intercanviar-se entre diferents espècies i, fins i tot, gèneres bacterians. Aquestes estructures tenen tendència a evolucionar de formar modular, és a dir, adquirir successivament diferents gens de resistència.

Existeixen tres formes de transferència gènica entre bacteris de manera natural:

1. Transformació

Algunes espècies bacterianes tenen en els seus cromosomes gens que les capaciten per absorbir DNA present en el medi. El DNA cromosòmic que s'endinsa en la cèl·lula per transformació trobarà una part homòloga del cromosoma en el qual s'incorporarà. Existeix un nombre més gran de bacteris patògens que són capaços de realitzar la transformació natural que de bacteris no patògens; alguns exemples de bacteris patògens que es transformen de manera natural són *Streptococcus pneumoniae* i *Bacillus* en Gram positius i en Gram negatius *Neisseria gonorrhoeae* i *Haemophilus influenzae*. A les cèl·lules capaces d'incorporar DNA per aquest mecanisme se les coneix amb el nom de cèl·lules competents, en alguns casos com els gèneres *Neisseria* i *Haemophilus* l'estat de les cèl·lules competents és natural en canvi en altres bacteris, per exemple *E. coli*, només determinades condicions ambientals els permeten trobar-se en estat competent.

2. Transducció

És la transferència de gens cromosòmics mitjançant bacteriòfags que contenen DNA bacterià. Segons la seva manera de multiplicar-se existeixen dos tipus de bacteriòfags que permeten diferenciar dos tipus de transducció. En la transducció generalitzada els bacteriòfags virulents infecten bacteris unint-se a la superfície de la cèl·lula i injectant el seu DNA a l'hoste, quan aquests deixen la cèl·lula, algunes partícules víriques encapsiden DNA de l'hoste enlloc del genoma víric (cicle lític), i quan aquest DNA s'introdueix en un nou bacteri, s'haurà transferit DNA d'un bacteri a un altre. Aquest fragment transferit pot incloure gens de resistència o fins i tot ser un plasmidi de resistència sencer o un fragment d'un plasmidi. A vegades, l'àcid nucleic del virus s'incorpora al genoma bacterià de manera que únicament s'expressen alguns gens vírics (cicle lisogènic). En aquest cas, quan l'estat de lisogènia es trenca i el genoma víric recupera l'autonomia, pot emportar-se alguns gens que flanquegen el punt d'inserció del DNA víric en el genoma bacterià, aleshores, quan aquesta partícula vírica

infecti un altre bacteri, s'hauran transferit també aquests gens bacterians, és la transducció especialitzada. Tant el cicle lític com el lisogènic permeten incorporar gens bacterians que en un cicle posterior seran introduïts en altres microorganismes.

La transducció, tot i ser un mecanisme de transferència molt eficaç, està limitada a l'intercanvi entre microorganismes filogenèticament molt propers. Degut a l'alta especificitat entre el virus i el bacteri no sembla ser el mecanisme d'intercanvi genètic més important pel que fa a la transferència horitzontal de factors de resistència als antibiòtics.

3. Conjugació

Consisteix en la transferència d'informació genètica entre dos bacteris que estableixen un contacte cel·lular mitjançant uns ponts intercel·lulars anomenats pili. La conjugació es realitza mitjançant plasmidis conjugatius que poden codificar la capacitat de transferir-se a una altra cèl·lula. A través de la conjugació s'han transmès molts gens entre bacteris Gram negatius com enterobacteris, *Pseudomonas* i també entre espècies anaeròbies Gram positives. És comuna també la transferència de Gram positius a Gram negatius, però no al revés.

Els principals mecanismes moleculars i bioquímics que porten a la resistència als antibiòtics poden ser atribuïts a: l'alteració o destrucció de l'antibiòtic, modificació de la diana de l'antibiòtic per mutacions estructurals o reguladores dels gens, alteracions en la membrana externa que produeixen una disminució en la permeabilitat i extrusió dels antibiòtics mitjançant bombes de reflux que expulsen l'agent antimicrobià fora del bacteri (figura 1.3). Tots aquests mecanismes no són excloents, ja que en un sol microorganisme poden ser presents alguns d'ells i actuar de forma cooperativa, de manera que s'arribi a nivells tan significatius de resistència com els que desenvolupen els bacteris [35].

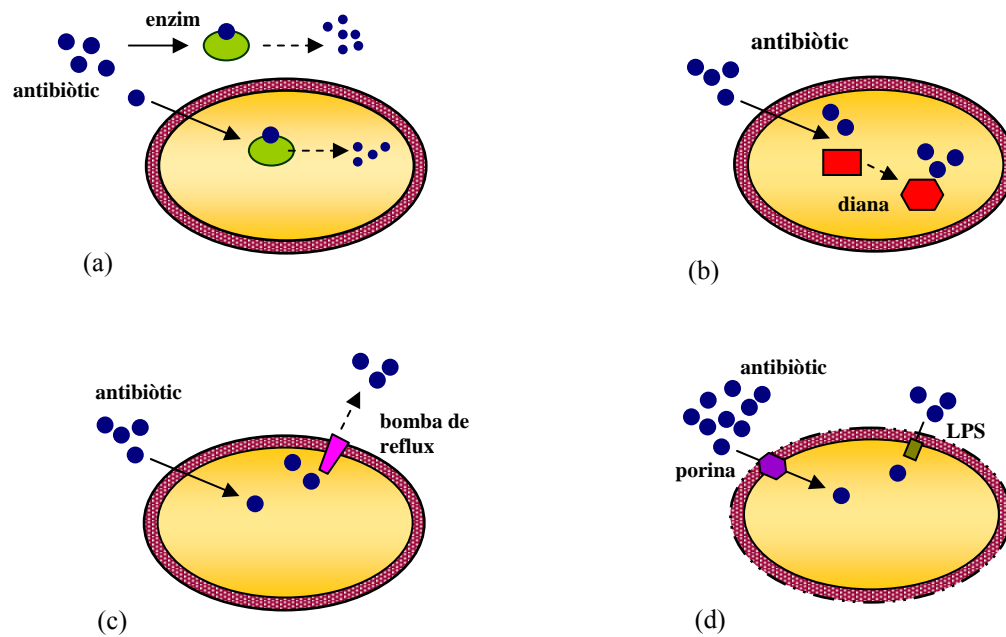


Figura 1.3. Mecanismes de resistència als antibiòtics. (a) Inactivació de l'antibiòtic per un enzim. (b) Modificació de la diana de l'antibiòtic. (c) Extrusió de l'antibiòtic per acció d'una bomba de reflux.

1.2.3.1 Inactivació enzimàtica dels antibiòtics

Es tracta d'un mecanisme de interferència àmpliament estès en la natura. El bacteri sintetitza un enzim que modifica l'antibiòtic i l'inactiva. La inactivació pot tenir lloc a nivell intracel·lular o, en ocasions, extracel·lular.

Un exemple són les **β -lactamases**, enzims específics d'origen cromosòmic i/o plasmídic que actuen davant compostos β -lactàmics hidrolitzant l'enllaç amida de l'anell β -lactàmic i l'inactiven. Les β -lactamases dels bacteris Gram negatius són diferents en molts aspectes, sobretot en la localització, als enzims de les espècies Gram positives. La gran quantitat de β -lactamases que les espècies Gram positives alliberen al medi extracel·lular tenen un efecte en la població, mentre que la secreció de l'enzim a l'espai periplasmàtic en bacteris Gram negatius, restringeix l'acció de la β -lactamasa fins que l'antibiòtic β -lactàmic ha penetrat en l'espai periplasmàtic. En conseqüència, el nivell de resistència és una propietat individual de cada cèl·lula i depèn de la competència que s'estableix entre les velocitats de penetració de l'antibiòtic i de la inactivació [87].

En l'actualitat es coneixen més de tres-centes β -lactamases diferents, tant en bacteris Gram positius com Gram negatius. Es troben en diferents soques d'*Escherichia coli* i en generes com *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Enterobacter* i altres bacteris Gram negatius aeròbics causants d'infeccions nosocomials i que presenten una múltiple resistència adquirida als antibiòtics [76].

Les β -lactamases han estat descrites des dels anys 50 fins a l'actualitat. La seva nomenclatura és molt complexa, en un principi el nom de la β -lactamasa era assignat pel nom de la soca o del plasmidi que la produïa. Amb els anys aquests enzims han estat anomenats per les característiques bioquímiques, peculiaritats de la seqüència, lloc on van ser descoberts, localització del gen en el cromosoma, soques bacterianes, el malalt d'on prové la mostra, o inclús, l'investigador que descriu l'enzim. Alguns enzims tenen més d'un nom, altres han tingut un nom provisional fins que la seva seqüència ha demostrat que provenien de β -lactamases tipus TEM o SHV. Alguns noms han perdut la seva coherència però es continuen fent servir; així, per exemple, PSE-1 (de l'anglès, "*Pseudomonas-specific enzim*") ha estat trobat en *E.coli* i altres *Enterobacteriaceae* i alguns enzims CTX-M hidrolitzen l'antibiòtic ceftazidime amb més eficàcia que cefotaxime [56].

Les primeres classificacions es basaren en el perfil del substrat, el punt isoelèctric, el pes molecular, en la capacitat de l'enzim de ser induïble o no i en la localització del gen productor de l'enzim ja sigui en el cromosoma o en el plasmidi. Més recentment, al poder conèixer la seqüència aminoacídica d'algunes β -lactamases, s'ha utilitzat la classificació d'Ambler de l'any 1980 que classificà els enzims en quatre classes segons la seva estructura molecular: A, B, C i D. Aquesta classificació va ser revisada l'any 1995 per Bush, Jacoby i Medeiros, basant-se en la relativa activitat de les β -lactamases en front diferents antibiòtics. Van reconèixer quatre classes de β -lactamases, encara que el grup 2, el més nombrós i heterogeni, s'ha subdividit en 8 subgrups tal i com es mostra en la taula III [3,25].

Taula III. Classificació esquemàtica de les β -lactamases.

Grup ^a	Substrat preferent	Gens ^b	Enzims representatius
1 (C)	Cefalosporines	Crom	Enzims cromosòmics de bacteris Gram negatius
		Plasm	MIR-1, MOX-1, FOX-1, CMY-2
2a (A)	Penicil·lines	Crom/ Plasm	Penicil·linases de bacteris Gram positius
2b (A)	Cefalosporines de 1a generació, penicil·lines	Plasm	TEM-1, TEM-2, SHV-1, OHIO-1, ROB-1
		Croms	SHV-1
2be (A)	Cefalosporines 1a-3a generació, penicil·lines i monobactàmics	Plasm	TEM-3 a TEM-29, TEM-42, TEM-43, TEM-46 a TEM-50, TEM-52 a TEM-58, TEM-60 a TEM-63, TEM-66 a TEM-72, TEM-75, TEM-80 a TEM-90, SHV-2, SHV-2a, SHV-30, TOHO-1, TOHO-2, CTX- M-1 a CTS-M-9, PER-1, PER-2
		Crom	K1
2br (A)	Penicil·lines, inhibidors de β -lactamases	Plasm	TEM-30 a TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, TEM-76 a TEM-79
2c (A)	Cefalosporines 1 ^o -3 ^o generació, penicil·lines, carbenicil·lina	Plasm	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d (D)	Penicil·lines, cloxacilina	Plasm	OXA-1 a OXA-19
		Crom	<i>Aeromonas</i>
2e (A)	Cefalosporines	Crom	<i>Proteus vulgaris</i>
2f (A)	Cefalosporines 1 ^o -3 ^o generació, penicil·lines, carbapenems	Crom	<i>Enterobacter cloacae</i> NMC-A, IMI-1 <i>Serratia marcescens</i> Sme-1
3 (B)	Cefalosporines 1 ^o -3 ^o generació, penicil·lines, carbapenems	Crom	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> L1, <i>Bacteroides fragilis</i> Ccr-A,
		Plasm	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IMP-1
4	Penicil·lines	Crom/ Plasm	<i>Burkholderia cepacia</i>

^a La lletra en parèntesis correspon a la classificació de Ambler.

^b Crom: cromosòmics; Plasm: plasmídics

La majoria dels enterobacteris, com molts altres bacteris d'altres grups, tenen en el seu cromosoma un gen que codifica per a una β -lactamasa. Aquesta resistència natural dels enterobacteris als antibiòtics β -lactàmics depèn tant de la classe de l'enzim com de la quantitat produïda.

A *M. morganii* s'han descrit fins al moment tant β -lactamases cromosòmiques com plasmídiques. Les β -lactamases cromosòmiques són de classe C, aquestes β -lactamases, que no són sensibles a l'àcid clavulàmic i són induïbles particularment per cefoxitina i imipenem, s'expressen en nivells moderats. Inactiven ràpidament a cefalosporines de primera generació, algunes de segona i les carboxipenicil·lines, però no a l'ampicil·lina, ni a cefazolina ni a moltes penicil·lines. Quan estan desreprimides, aquestes β -lactamases, originen un descens en la susceptibilitat a les cefalosporines de tercera generació (ceftazidima, cefotaxima i ceftriaxona) i als monobactàmics (aztreonam). Les mutacions en els gens reguladors poden implicar una elevada i contínua producció de l'enzim que inactiva a tots els β -lactàmics, excepte als carbapenems, encara que, en presència d'alteracions en les porines, els carbapenems també poden inactivar-se [68]. Aquesta β -lactamasa també està present en els gèneres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Yersinia* i *Pseudomonas*. Tant la inducció com la desrepressió de l'enzim requereixen de cinc gens: *ampC*, *ampR*, *ampD*, *ampG* i *ampE*. Fins al moment a *M. morganii* s'han clonat i seqüenciat els gens *ampC* i *ampR*. [6,96].

Recentment s'han descrit i caracteritzat tres noves variants de la β -lactamasa AmpC de *M. morganii* que presenten algunes diferències amb les AmpC descrites fins al moment: l'ampicil·lina s'hidrolitza amb més eficàcia que la penicil·lina, s'ha detectat una eficiència notable en la hidròlisis de l'imipenem i els antibiòtics aztreonam, carbenicil·lina i tazobactam són inactivadors transitoris eficaços d'aquestes variants. A més aquests estudis han predit un model en 3D de la β -lactamasa AmpC basant-se en la estructura amb raigs X de l'enzim AmpC d'*E. coli* que presenta una similitud d'un 65,7% amb el de *M.morganii* (Figura 1.4) [100].

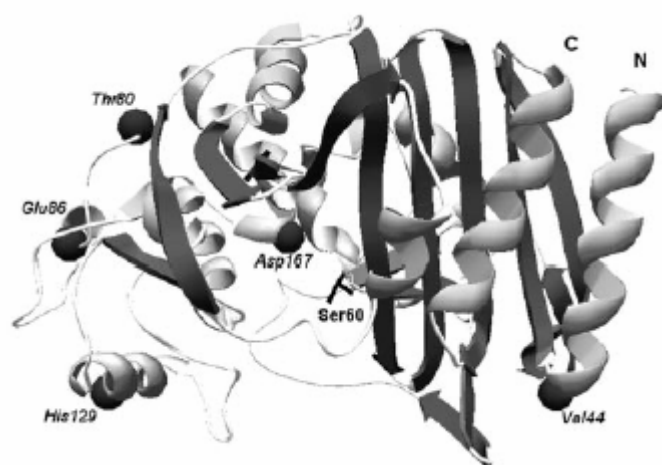


Figura 1.4. Predicció del model en 3D de la β -lactamasa AmpC de *M.morganii* de Power *et al* [100].

Les β -lactamases plasmídiques són generalment constitutives i el seu nivell d'expressió és variable, podent incrementar la seva producció basal degut a variacions en la localització del gen i l'existència de multicòpies del plasmidi o dels gens. Per tant, pot haver-hi tant nivells baixos com hiperproducció d'aquests enzims. La majoria de les β -lactamases plasmídiques descrites a *M. morgani* són β -lactamases d'espectre estès tipus TEM, concretament, fins al moment, s'han descrit TEM-10, TEM-21 i TEM-72 [8,94,125].

Un nou grup de β -lactamases plasmídiques que s'ha incorporat a la classe A (subgrup 2be) són les β -lactamases d'espectre estès de la família CTX-M, tenen una afinitat de substrat molt preferent per la cefotaxima i són susceptibles a la inhibició per inhibidors de β -lactamases, aquests enzims s'han aïllat en àrees geogràficament distants com Alemanya, Itàlia, Espanya i Argentina, la qual cosa suggereix una àmplia difusió. Concretament a Buenos Aires, s'ha descrit per primera vegada en *M. morgani* una β -lactamasa d'aquesta família, CTX-M-2, que confereix resistència a oximino-cefalosporines i està associada en alguns casos a l'íntegró de classe 1 In 116 [99].

Entre els bacteris aerobis, la resistència a aminoglucòsids com la kanamicina, la gentamicina, la tobramicina, l'amikacina o l'estreptomycin, ve donada principalment per la hidròlisi enzimàtica codificada en plasmidis o en el cromosoma bacterià. Molts d'aquests enzims estan codificats en transposons. Es diferencien tres tipus segons la modificació que introdueixen en la molècula aminoglucosídica: **enzims acetilants**, **fosforilants** i **nucleotidants**. Aquests enzims normalment actuen de forma associada i més d'un pot ser produït per una mateixa soca bacteriana resistent a aminoglucòsids. El lloc d'acció dels aminoglucòsids és intracel·lular, es fixa a la subunitat 30S i indueix modificacions en el lloc de fixació del tRNA. La inactivació enzimàtica de l'aminoglucòsid es produeix en el procés de transport cap a l'interior de la cèl·lula per arribar al ribosoma. La resistència, per tant, a un aminoglucòsid és el resultat del balanç entre la captació intracel·lular d'aquest i la seva inactivació enzimàtica. També s'han descrit però sistemes de reflux i mutacions al rRNA com a causants de la resistència a aquest antimicrobià.

En el cas de la resistència a cloramfenicol, la producció de l'enzim **cloramfenicol acetiltransferasa** és el mecanisme més comú que tenen Gram positius i Gram negatius. Aquest enzim converteix a l'antibiòtic en monoacetat o diacetat, derivats incapaçs d'adherir-se a la subunitat 50S ribosomal del bacteri inhibint la funció del cloramfenicol. Hi han diferents tipus de

cloramfenicol acetiltransferasa produïts per diferents espècies bacterianes. Un segon mecanisme més general de resistència a cloramfenicol és la disminució de la permeabilitat de la membrana i/o un sistema de reflux de l'antibiòtic.

1.2.3.2 Modificació de la diana de l'antibiòtic

Les dianes cel·lulars poden alterar-se per mutacions o modificació enzimàtica, de manera que es redueix l'afinitat de l'antibiòtic per la diana. Hi ha nombrosos exemples que són deguts tant a mutacions cromosòmiques com a la presència de plasmidis que alteren la diana de l'antibiòtic. Pel que fa a mecanismes d'origen plasmídic s'ha descrit la resistència a antibiòtics com l'eritromicina en soques d'estafilococs i estreptococs. En el cas de les mutacions, s'originen resistències a antibiòtics com macròlids, quinolones, β -lactàmics i els antagonistes de la síntesi de folat.

La penicil·lina, al igual que altres membres de la família dels antibiòtics β -lactàmics, inhibeix la síntesi de la paret cel·lular ja que actua bloquejant la síntesi del peptidoglicà mitjançant la inhibició de transpeptidació en la cara externa de la membrana bacteriana i inactivant l'inhibidor d'enzims autolítics de la paret bacteriana (autolisines) que porten a la lisis cel·lular. Aquestes autolisines són enzims que en condicions normals de creixement participen en la renovació de la paret cel·lular. Els receptors enzimàtics reben el nom de Proteïnes Fixadores de Penicil·lines (PBPs) i són un conjunt de transpeptidases, carboxipeptidases i endopeptidases responsables de les últimes etapes de la síntesi del peptidoglicà. Les proteïnes PBPs també tenen la funció de reorganitzar la paret durant el creixement i la divisió cel·lular. La unió de les PBPs a l'antibiòtic determina la inactivació enzimàtica. Les diferents espècies bacterianes varien àmpliament en tipus, nombre, estructura i funcionalitat de les PBPs i la importància d'una PBP concreta en la síntesi de la paret cel·lular. Les PBPs d'elevat pes moleculars, entre 65 i 120 KDa, semblen essencials pel bacteri i el seu nombre varia entre dos i quatre, en canvi, les de baix pes molecular, no són essencials i es sap que actuen com D-alanina carboxipeptidases.

La resistència a β -lactàmics deguda a una afinitat disminuïda de les PBPs per l'antibiòtic és més comú en Gram positius que en Gram negatius. Així, dintre del primer grup, trobem una resistència deguda a una menor afinitat de les PBPs en les espècies *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* i *Staphylococcus epidermidis* i en el cas dels Gram negatius destaquen espècies com *H. influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Neisseria meningitidis*. El desenvolupament de resistències

degudes a afinitats disminuïdes de PBPs es creu que és un procés gradual, implicant la introducció de múltiples substitucions d'aminoàcids en múltiples PBPs d'elevada massa molecular [122].

Els mecanismes principals de resistència bacteriana a quinolones són tres: resistències de tipus cromosòmic que donen lloc a mutacions en els gens *gyrA* i *parC* que codifiquen la subunitat A de la DNA-girasa i l'enzim Topoisomerasa IV respectivament, i produeixen resistències d'ampli espectre a tots els membres del grup de les quinolones. En segon lloc, les resistències per alteracions en la membrana externa dels bacteris Gram negatius que disminueixen l'entrada de l'antibiòtic i finalment, resistències degudes a l'expulsió de l'antibacterià des del medi intracel·lular a l'extracel·lular per acció de transportadors [130].

Un altre cas de modificació de la diana és l'alteració de llocs d'unió del ribosoma. Aquesta és deguda a la producció d'enzims, metilases d'origen plasmídic, que metilen els residus d'adenina en el 23S rRNA provocant una reducció en la unió a nivell ribosomal de macròlids i lincosamides al induir un canvi conformacional en el ribosoma. Aquest és el tipus de resistència que apareix en bacteris Gram positius als macròlids com l'eritromicina.

Una altra forma d'alteració del lloc d'acció és la utilització de rutes metabòliques alternatives com succeeix en la resistència a les sulfonamides i al trimetoprim. La resistència a les sulfonamides entre aïllaments d'enterobacteris es dona per la utilització de l'enzim dehidroteropto sintetasa que és resistent a la unió de sulfonamides i per tant s'inhibeix la seva acció. Aquesta resistència és transmesa per un plasmidi que, amb una freqüència del 45%, s'associa amb la resistència a ampil·lina.

En la resistència al trimetoprim la pèrdua de l'enzim timidino sintetasa (inhibit pel trimetoprim) crea la necessitat al bacteri d'una font exògena de timidina per a la síntesi de PABA i per tant l'efecte inhibitori del trimetoprim no és efectiu.

1.2.4 ELS SISTEMES DE REFLUX

Totes les cèl·lules, tant procariotes com eucariotes, tenen sistemes de transport de membranes involucrades en la captació de nutrients essencials, l'excreció de productes tòxics i el manteniment de l'homeòstasi general, un gran nombre dels quals s'han identificat en els últims anys degut al desenvolupament de les tècniques de clonació i seqüenciació. Això ha permès identificar diferents famílies de transportadors i s'ha demostrat que molts d'aquestes sistemes juguen un paper important conferint resistència a compostos tòxics. Entre aquests agents transportadors destaquen les bombes de reflux, que són sistemes proteics que bombegen l'antibiòtic fora del citoplasma amb una gran eficàcia, disminuint la concentració intracel·lular d'algunes substàncies a nivells per sota la toxicitat.

Les bombes de resistència a múltiples antibiòtics (MDRs), que es troben àmpliament distribuïdes en el món bacterià, són translocases de membrana que tenen la sorprenent habilitat d'extreure fora de la cèl·lula una gran varietat de substàncies no relacionades. Un gran nombre d'estudis ha demostrat que es pot adquirir resistència a un gran nombre d'antimicrobians a través de l'activitat de les bombes de reflux, per tant l'evolució ha dotat als bacteris amb moltes possibilitats de sobreviure en un ambient tòxic [131]. En el cas de les cèl·lules eucariotes, un dels sistemes de reflux més coneguts és el de la glicoproteïna P, codificada per el gen *mdr1* humà i de rosegador, que confereix resistència a un ampli rang d'agents citotòxics via exportació dependent d'ATP. La glicoproteïna P és membre d'una superfamília de transportadors *ATP-binding cassette* (ABC), present també en el món bacterià.

L'organització d'aquest tipus de sistemes és diferent en bacteris Gram negatius i bacteris Gram positius, degut principalment a les diferències estructurals d'aquests dos grans grups. En bacteris Gram negatius els transportadors estan organitzats en sistemes de multicomponents, les bombes de reflux més freqüents són del tipus RND com AcrB de *E. coli* o MexB en *Pseudomonas aeruginosa*. En bacteris Gram positius, les bombes de reflux són més simples d'organització i tenen un únic component situat en la membrana citoplasmàtica com és el cas de les bombes MFS en NorA o QacA en *Staphylococcus aureus* i PmrA de *Streptococcus pneumoniae*.

Segons criteris estructurals i bioenergètics, els transportadors de resistència a múltiples antibiòtics es poden dividir en dos grups principalment [101Putman]: els transportadors secundaris de múltiples antibiòtics (SMT, de l'anglès, *Secondary Multidrug Transporters*) i els transportadors ABC de múltiples antibiòtics (ABC, de l'anglès, *ABC, Multidrug Transporters*). En les figures 1.5 i 1.6 es mostra un esquema del mecanisme d'acció d'aquestes dos classes majoritàries de transportadors.

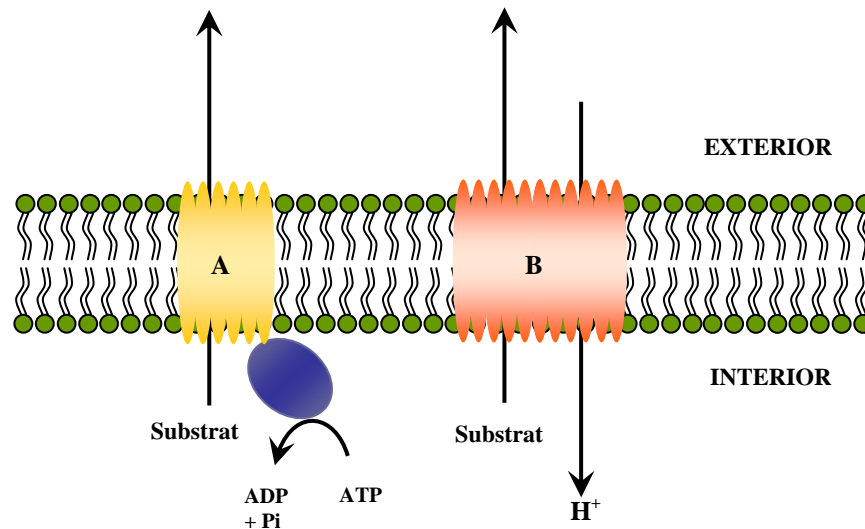


Figura 1.5. Representació esquemàtica de les dues classes majoritàries de transportadors de múltiples antibiòtics. A. Els transportadors ABC utilitzen l'energia lliure de la hidròlisis del ATP per bombejar antibiòtics fora de la cèl·lula. B. Els transportadors secundaris de múltiples antibiòtics actuen extrusionant compostos estructuralment no relacionats en un intercanvi amb protons o ions de sodi.

Recentment, s'ha descrit, en bacteris Gram negatius, l'existència d'una nova família de transportadors denominada família d'extrusió de múltiples antibiòtics i de compostos tòxics (MATE, de l'anglès *Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family*) que tenen una topologia membranal semblant als transportadors MFS i utilitzen un gradient electroquímic d'ions de Na^+ per obtenir l'energia [22].

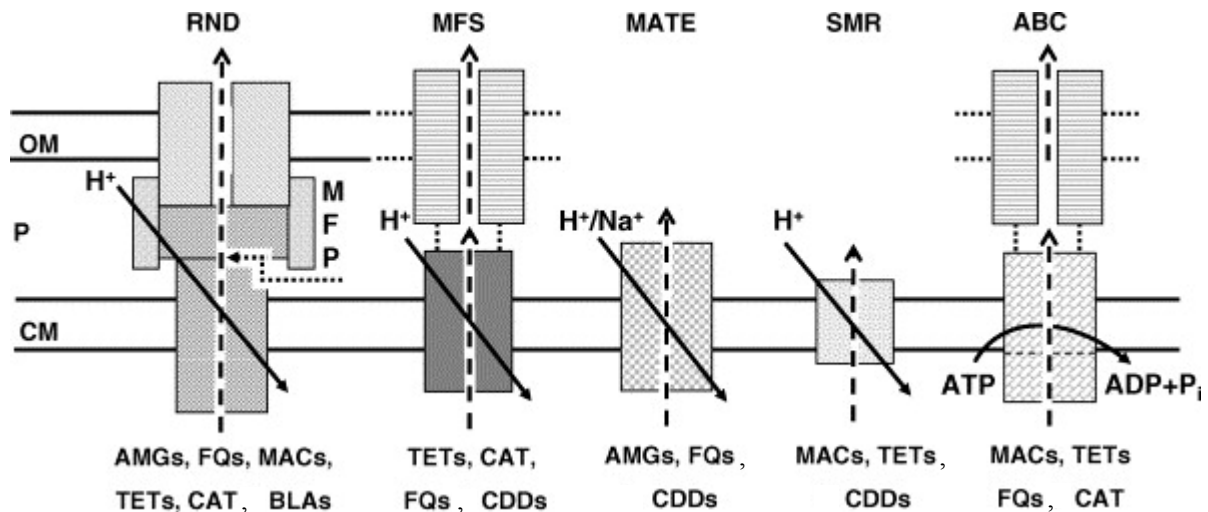


Figura 1.6. Diagrama esquemàtic dels sistemes transportadors d'antibiòtics en bacteris. OM: membrana externa; P: espai periplasmàtic; CM: membrana citoplasmàtica; MFP: proteïna de fusió periplasmàtica; TETs: tetraciclines; CAT: cloramfenicol; FQs: fluoroquinolones; CDDs: substàncies catióniques i detergents; AMGs: aminoglucòsids; MACs: macròlids; BLAs: β -lactamases [70].

1.2.4.1 Transportadors secundaris de múltiples antibiòtics (SMT)

L'extrusió d'antibiòtics i altres compostos citotòxics en els organismes procarïotes normalment és deguda a l'acció de bombes en les que el procés de reflux té lloc per l'influx d'un protó. Aquests transportadors estan involucrats en el transport de sucres, anions i antibiòtics i són conduïts pel gradient electroquímic, normalment per la força protó-motriu. Aquestes bombes s'anomenen amb freqüència antiportadors de protons i poden subdividir-se en diferents famílies de proteïnes, agrupades segons la mida i les similituds de les seves estructures primària i secundària: MFS (*major facilitator superfamily*), SMR (*small multidrug resistance family*), RND (*resistance-nodulation-cell division family*) i DME (*drug/metabolite efflux family*), poc descrita fins al moment [22]. La taula IV mostra les característiques d'aquestes tres famílies.

Taula IV. Transportadors secundaris de múltiples antibiòtics SMT.

Família	Característiques	Transportador		Organisme
MFS	Transporten sucres, intermediaris del cicle de Krebs, ésters fosfatats, oligosacàrids, antibiòtics (quinolones, cloramfenicol, aminoglucòsids, tetraciclina), acriflavina, bromur d'etidi.	12 segments transmembrana (12-TMS)	NorA Bmr y Blt LmrP Bcr, MdfA i EmrD PmrA Tap	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium fortuitum</i>
		14 segments transmembrana (14-TMS)	Bmr3 ErmB LfrA QacA i QacB VceB	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Vibrio cholerae</i>
SMR	Són les proteïnes de reflux més petites dins d'aquest tipus. Transporten antibiòtics (quinolones, eritromicina), compostos d'amoni quaternaris, bromur d'etidi, telurit potàsic, acriflavina.	EbrA, EbrB, YkkC y YkkD EmrE (MvrC) Mmr QacE QacEA1 QacG QacH Smr (Ebr/QacC/QacD)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Bacteris Gram - Bacteris Gram - i Gram + <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
RND	Interaccionen amb una proteïna de fusió (MFP) i una proteïna de membrana externa per permetre el transport a través de la membrana interna i externa de bacteris Gram negatius. Transporten antibiòtics (quinolones, eritromicina, aminoglucòsids, macròlids, β -lactàmics), detergents, colorants bàsics.	AmrB AcrB, AcrF (EnvD) i YhiV HI0895 MexB, MexD, MexF i MexY MtrD	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	

És important destacar que dins de la família MFS hi ha dos tipus de proteïnes que exhibeixen 12 ó 14 segments transmembranals. Dins de tots dos tipus hi ha indistintament transportadores d'un únic antimicrobià o de múltiples antibiòtics, per tant no existeix una distinció fonamental entre aquests dos tipus de bomba [102].

A la figura 1.7 es mostra la topologia dels principals sistemes transportadors secundaris d'antibiòtics amb un esquema del seu mecanisme d'acció i el tipus d'antibiòtic que transporten.


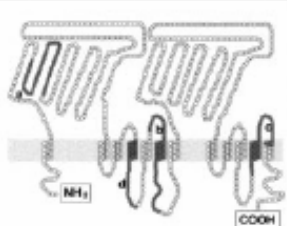
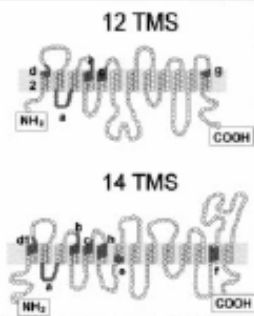
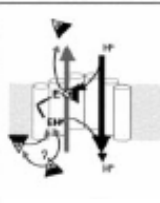
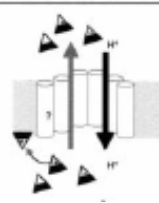

	SMR	RND	MFS
Topologia			
Mecanismes	 Substrats lipofílics multicatiònics	 Substrats anfílics	 Substrats anfílics, mono- o dicatiònics
Antibiòtics	▲ tetraciclina eritromina sulfamiacina	▲ tetraciclina fluoroquinolones eritromicina rifampicina β-lactàmics fluoroquinolones àcid fusínic cloramfenicol aminoglucòsids	▲ tetraciclina fluoroquinolones eritromicina rifampicina licosamides cloramfenicol aminoglucòsids

Figura 1.7. Topologia, mecanismes d'acció i antibiòtics transportats per les principals famílies de transportadors secundaris de múltiples antibiòtics [127].

Els transportadors més comuns en bacteris Gram negatius són els de la família RND, tenen una estructura típica en la que comparteixen tres elements organitzatius: el transportador localitzat en la membrana interna, el canal de la membrana externa (OMF, de l'anglès, *outer membrane factor*) i la proteïna de fusió periplasmàtica (MFP, de l'anglès, *membrane fusion protein*). La bomba de reflux RND-MFS-OMP està representada per la bomba AcrRAB-TolC àmpliament caracteritzada en *E.coli* i en molts altres membres de la família *Enterobacteriaceae*. És un sistema molt semblant al dels transportadors MFS (per

exemple, EmrAB-TolC) i ABC (per exemple, MacAB-TolC) encara que els membres d'aquest últim hidrolitzen ATP per obtenir energia [98].

L'única bomba de reflux descrita i caracteritzada fins al moment a *M. morganii* és AcrAB que pertany a la família RND (*resistance nodulation-cell division family*) freqüentment associada amb bombes de resistència a múltiples antibiòtics (MDRs). Seqüenciada l'any 2005 en *Morganella*, aquesta bomba de reflux, juga un paper molt important en la reducció dels nivells de susceptibilitat a tigeciclina, una nova tetraciclina semisintètica d'espectre estès capaç d'eludir els mecanismes clàssics de resistència de la tetraciclina com són la protecció ribosomal o les bombes de reflux específiques per tetraciclina. Algunes espècies de Gram negatius són intrínsecament més susceptibles a tigeciclina, entre elles es troben *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Providencia* spp. i *M. morganii*. Algunes soques de *Klebsiella pneumoniae*, en canvi, s'han aïllat amb una disminució de susceptibilitat a tigeciclina adquirida. Aquesta disminució de susceptibilitat a tigeciclina ja s'havia associat anteriorment a sistemes de reflux d'altres microorganismes, per exemple, la bomba de reflux MexXY de *Pseudomonas aeruginosa* i AcrAB de *Proteus mirabilis* i *Klebsiella pneumoniae* [111].

1.2.4.2 Transportadors ABC de múltiples antibiòtics

La família de transportadors de membrana ABC constitueix el principal mecanisme de reflux en els organismes eucariotes i, a diferència del que passa en els organismes procariotes, és un mecanisme on les proteïnes obtenen la seva energia del transport de la hidròlisi de l'ATP [22]. La bomba glicoproteïna P, que confereix resistència a substàncies anticancerígenes, forma part d'aquesta família. S'han identificat algunes proteïnes homòlogues a aquesta bomba en bacteris, com el transportador LmrA de *Lactococcus lactis* i el transportador de *E. coli* MacB, involucrat en el reflux de macròlids. Encara que la majoria de transportadors ABC es van descobrir com a transportadors de drogues, freqüentment transporten un ampli rang de substrats, incloent colorants, lípids, alguns pèptids i esteroides. A la figura 1.8 es mostra l'organització topològica dels transportadors ABC amb un esquema del seu mecanisme d'acció i el tipus d'antibiòtic que transporten.

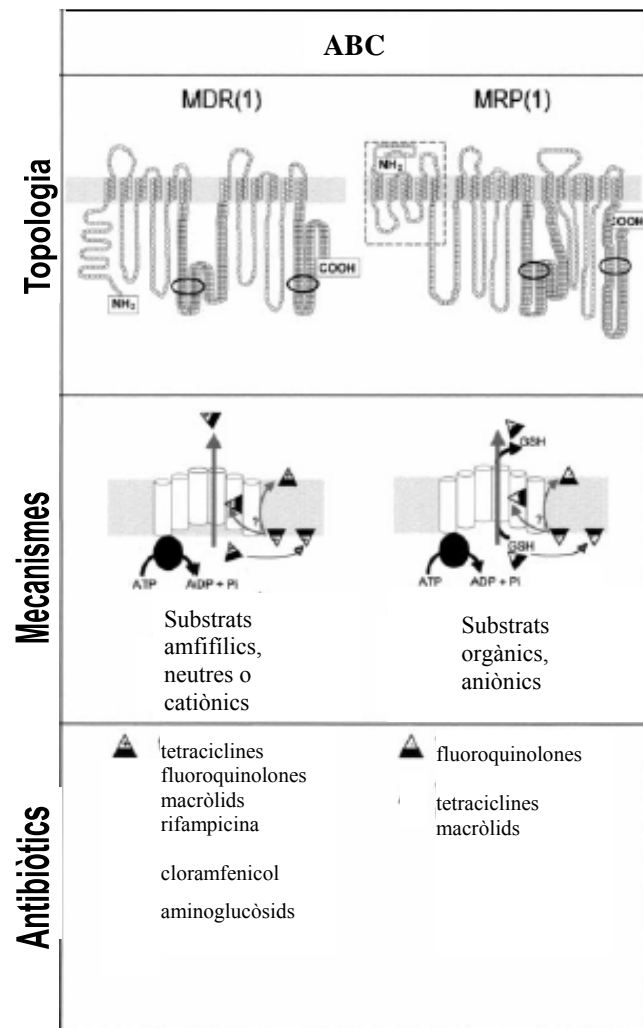


Figura 1.8. Topologia, mecanismes d'acció i antibiòtics transportats per la família ABC [127].

1.2.5 ELS INTEGRONS

El terme integró va ser proposat per Stokes i Hall en 1989 [122] encara que l'actual definició va ser introduïda l'any 1995 per Hall i Collis [49]. Els integrons són una família d'elements gènics potencialment mòbils amb la capacitat d'integrar i expressar majoritàriament, però no exclusivament, gens de resistència als antibiòtics. Els estudis inicials es van efectuar amb plasmidis del grup d'incompatibilitat Inc-W i amb transposons relacionats amb Tn21 que tenien gens de resistència a antibiòtics en un mateix lloc delimitat per seqüències de nucleòtids altament conservades [63]. Estudis posteriors, amb enzims de restricció i seqüenciació nucleotídica, van establir que les regions de DNA que delimiten aquests gens són molt similars entre diferents plasmidis i transposons. A finals de la dècada dels 80 Stokes i Hall van demostrar que aquestes seqüències de DNA que delimiten les regions de gens de resistència són zones conservades, amb un extrem 5' conservat (5'-CS) i un extrem 3' conservat (3'-CS), i la zona amb els gens de resistència presenta una longitud variable i és dependent del nombre de gens inserits en l'integró.

El dinamisme dels integrons és degut a la capacitat dels *cassettes* per escindir-se en forma de cercles autònoms (no replicatius) i a la capacitat d'aquests cercles autònoms per integrar-se en un integró diferent (figura 1.9).

Els integrons s'han descrit principalment en DNA plasmídic i DNA cromosòmic de bacteris Gram negatius fermentadors, principalment en membres de les famílies *Enterobacteriaceae* i *Vibrionaceae* [62,74], i també en alguns microorganismes no fermentadors, com *Pseudomonas aeruginosa* [20] i *Acinetobacter baumannii* [46]. En bacteris Gram positius, en canvi, s'han descrit pocs integrons, es va trobar un integró en el cromosoma d'una soca de *Mycobacterium fortuitum* i s'ha descrit un integró funcional en una soca de *Corynebacterium glutamicum* [80].

1.2.5.1 Estructura i classificació

Els components essencials d'un integró, situats tots ells en la **regió constant 5'**, inclouen el gen integrasa (*intI*), el lloc d'unió (*attI*) i els promotors, encarregats de promoure l'expressió de qualsevol *cassette* de gen integrat (figura 1.9).

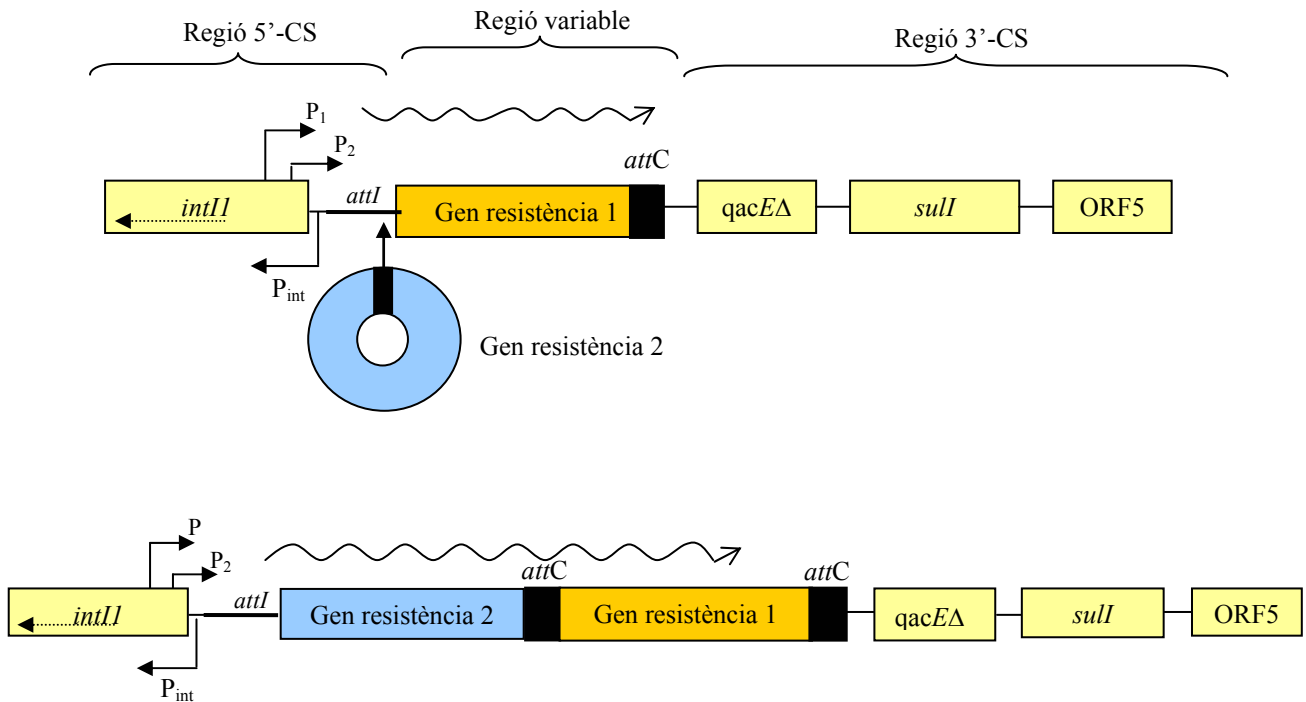


Figura 1.9. Representació esquemàtica d'un integró de classe 1 i un model d'adquisició d'un gen de resistència. El procés mitjançant el qual un gen *cassette* recircularitzat (gen resistència 2) s'inserta en el lloc *attI* en un integró de classe 1 que ja conté un *cassette* de resistència (gen resistència 1) està marcat a la figura. Els gens i els llocs de lectura oberts (*open reading frames*) a les regions 5'-CS i 3'-CS d'un integró de classe 1 esquemàtic s'indiquen en requadres grocs. Els *cassettes* de resistència inserits dins de l'integron s'indiquen en requadres taronja i blau. P_1 i P_2 són promotors associats a l'integron, P_{int} és el promotor del gen integrasa (*intI*). Els gens *qacEΔ* i *sulI* en la regió 3'-CS confereixen resistència a components d'amoní quaternari i sulfonamides, respectivament.

El gen *intI* codifica per a una proteïna amb activitat recombinasa específica de lloc (IntI), la **integrassa**, que forma part d'una família d'enzims que tenen com a prototip la integrassa del bacteriòfag λ , denominada tirosina-recombinasa. A aquesta família pertanyen la majoria de les integrases de bacteriòfags i proteïnes de resolució de genomes circulars, tant en bacteris com en plasmidis (XerC i XerD d'*Escherichia coli*, Cre del plasmidi P1) [128]. S'han descrit 4 famílies d'integrans segons l'homologia de la integrassa. Les tres primeres estan directament relacionades amb l'expressió de gens de resistència i les seves integrases

presenten entre un 43 i un 58% d'identitat d'aminoàcids, suggerint una divergència evolutiva per un període superior a 50 anys, el que correspon, aproximadament a l'era antibiòtica [10]. En canvi, la quarta família, descrita en el petit cromosoma de *Vibrio cholerae*, està relacionada amb gens anteriors a l'era antibiòtica. En els integrons de classe 1, per exemple, la integrasa és una proteïna de 337 aminoàcids amb una mida de 38 KDa.

Adjacent al gen *intI* està el **lloc de recombinació específic, *attI***, en el que s'integra el *cassette* genètic de resistència. El lloc d'unió *attI* és pràcticament igual en tots els integrons, tot i aquesta constància no hi ha consens sobre els límits d'*attI*, una de les propostes, per analogia amb *attC*, és un palíndrom imperfecte de 45pb GCAAC...(35pb)...GTTAG [44,92].

Entre *intI* i *attI* es situen dos **promotors** divergents, un és el promotor P_{int} que s'encarrega de l'expressió del gen *intI*, i el segon, el promotor P_c , localitzat en l'extrem 5'-CS de l'integron és l'encarregat de l'expressió dels gens estructurals inserits, donat que la majoria, per sí sols, no tenen promotor [107]. En el cas concret dels integrons de classe 1, hi ha dos promotors P_c potencials, són els promotors P_1 i P_2 , situats en l'extrem conservat 5'-CS. Una aparent polarització d'expressió existeix entre aquest dos promotors ja que el nivell més alt de polarització s'obté pel primer *cassette* localitzat directament riu avall del promotor, en canvi, *cassettes* de gens distanciats del promotor s'expressen dèbilment degut a una prematura terminació de la transcripció que té lloc en l'element de 59pb o lloc *attC*. Per tant, el nivell de resistència a un determinat antibiòtic, codificat per un *cassette* genètic de resistència, depèn de la seva posició a l'integró. Així quan els gens de resistència es situen en el primer *cassette*, el més proper al promotor, els bacteris manifesten nivells de resistència més elevats i aquests nivells baixen a mida que el gens es situen en *cassettes* més allunyats del promotor [33].

A continuació d'aquest tres components essencials per un integró hi ha la **regió central variable**, en aquesta regió es localitzen els gens estructurals de l'integró en número variable, normalment oscil·la entre 1 i 4 gens, i són habitualment gens de resistència a antibiòtics. Es coneixen però integrons descarregats, anomenats Int0, que es caracteritzen perquè no tenen cap gen de resistència en la seva regió central i, per tant, la regió constant 5'-CS i la regió central variable estan només separades pel lloc de recombinació específica, *attI* (figura 1.10) [32].

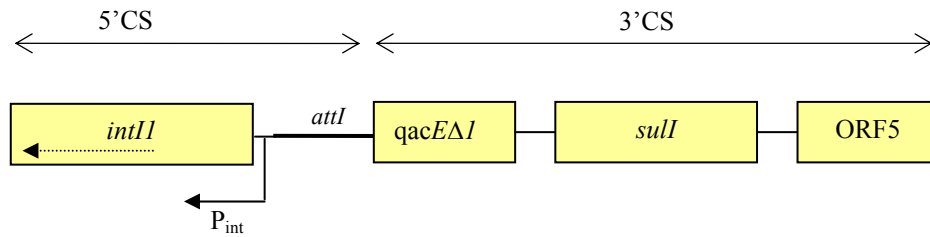


Figura 1.10. Estructura d'un integró descarregat, In0.

Els *cassettes* genètics constitueixen un grup divers de petits elements mòbils que normalment tenen una sola regió de lectura oberta completa (*orf*) i una regió codificant (*gen*) [106]. A més, formant part de la seva estructura, a continuació de la regió *orf*, existeix un lloc de recombinació específica per la integrasa denominat element de 59 parells de base (59-pb) o lloc *attC*, amb una mida de 60 a 110 parells de bases [30]. A més de tenir una mida variable, els *cassettes* genètics també són molt variables en la seva seqüència i només presenten alguna analogia en els extrems, existeix una similitud en les seqüències dels llocs *attC* i això permet la formació d'un palíndrom imperfecte que els dóna la capacitat de formar estructures tipus bucle quan estan com DNA de cadena senzilla o de formar figures cruciformes quan es localitzen com DNA superenrotllat. La seqüència més freqüent en els extrems dels llocs *attC* és CTAAC---(60-110pb)...GTTAG [44]. Tot i que els *cassettes* genètics es consideren elements mòbils, no codifiquen per productes involucrats en la seva pròpia mobilitat.

La inserció específica dels *cassettes* genètics a l'interior de la regió variable dels integrons ha estat només detectada en les cèl·lules que expressen l'activitat de l'enzim integrasa, això indica que aquesta recombinasa és necessària per la integració dels *cassettes*. A més, aquesta integració es dóna normalment en el lloc *attI* de l'integró, encara que també és possible la recombinació entre dos llocs *attC*. La integrasa, per tant, pot interactuar amb els dos llocs primaris de recombinació, el lloc *attI* dels integrons i el lloc *attC* de cada *cassette* genètic, tot i que la unió és més forta amb *attI* que amb *attC*. Els *cassettes* poden trobar-se lliurement com a molècules circulars covalentment tancades, al escindir-se d'un integró per l'acció d'una recombinasa [30].

En la majoria dels integrons de classe 1 existeix, després de la regió conservada, la **regió constant 3'** altament conservada (3'CS) amb els gens *qacEΔ1*, *sulI* i *orf5* que donen resistència, respectivament, a components d'amoni quaternari, sulfonamides i a una proteïna

amb funció desconeguda. Les altres classes d'integrans relacionades amb la resistència a antibiòtics no tenen l'extrem 3'-CS tant conservat, ja que les seves seqüències a l'extrem poden variar per inserció o delecció d'alguns gens [123].

Integrans de classe 1

Representen l'estructura més comuna i molts dels elements que pertanyen a aquesta classe s'han caracteritzat per la presència de dos zones conservades, l'extrem 5' (5'-CS) i l'extrem 3' (3'-CS). Fins al moment s'han descrit més de 60 *cassettes* de gens de resistència i més d'un integró de classe 1 s'ha observat en la mateixa cèl·lula bacteriana [73]

Integrans de classe 2

S'inclouen dins de la família de transposons Tn7 [129]. El transposó Tn7 conté 3 *cassettes* genètics integrats (*dhfrA1-sat-aadA1*) adjacents a la integrasa *intI2*, localitzada en 5'-CS. El lloc *attI* del Tn7 està situat entre el gen *intI2* i el primer gen de resistència inserit, al igual que els integrans de classe 1. Els integrans de classe 2 no contenen el gen *sulI* però inclouen gens que promouen la transposició de Tn7. S'han trobat integrans de classe 1 i 2 tant en plasmidis com en transposons [124].

Integrans de classe 3

Fins al moment, només s'ha descrit un integró de classe 3 aïllat en una soca de *Serratia marcescens* resistent a carbapenem, que inclou el gen *cassette bla_{IMP}* i, al igual que les metallo- β -lactamases, confereix resistència a carbapenems. La seqüència de l'integró també inclou el gen *cassette aacA4*, aquest confereix resistència a aminoglucòsids. El gen integrasa (*intI3*) presenta un 59% de identitat (72% de similitud) amb el gen *intI1* dels integrans de classe 1 [4,31].

Tot i les diferències en les seqüències de la integrasa i el lloc *attI*, els mateixos gens de resistència són adquirits per totes tres classes d'integrans, s'han trobat *cassettes* genètics idèntics en integrans de classe 1 i classe 2 i entre els de classe 1 i classe 3 [49].

Integrans de classe 4

S'ha descrit el gen *intI4* en el petit cromosoma de *Vibrio cholerae*. Aquest gen codifica per una integrasa, associada amb el “gen-VCR”, les VCRs (de l'anglès “*Vibrio cholerae* repeated sequences”) són seqüències repetides (de 60 a 100 còpies), situades en un fragment que correspon al 10% del genoma de *Vibrio cholerae* i molt similars a les seqüències que caracteritzen els gens de resistència als antibiòtics dels integrans. Els *cassettes* VCR es troben en algunes espècies del gènere *Vibrio*, incloent la soca *V. metschnikovii* aïllada a l'any 1888, suggerint que aquest mecanisme d'adquisició de gens és anterior a l'era antibiòtica [74].

1.2.5.2 Implicació clínica de l'associació integron-*cassette* genètic de resistència

La disseminació de gens de resistència augmenta considerablement quan formen part de *cassettes* mòbils ja que es facilita la seva transferència horitzontal, i alguns d'aquests gens de resistència, mitjançant la integrasa, tenen la capacitat de mobilitzar els *cassettes* entre integrans. Si aquests integrans formen part d'un transposó poden transposar-se des del cromosoma cap al plasmidi o viceversa. A més a més, si aquests plasmidis són conjugatius poden transferir-se d'un bacteri a un altre tant de la mateixa espècie com entre espècies diferents, essent un fenomen genètic important degut a la pressió selectiva existent a nivell nosocomial [2,129].

Els *cassettes* de gens dels integrans confereixen resistència a una ampla gamma de compostos antibacterians, que inclouen antibiòtics com aminoglucòsids, cefalosporines, cloramfenicol, penicil·lines, rifampicina, tetraciclina, sulfonamides, quinolones. S'han descrit diversos *cassettes* de gens per cada una d'aquestes classes d'antibiòtics, per exemple, *cassettes* de gens que codifiquen per β -lactamases d'espectre estès o carbapenemases (*bla*_{IMP}, *bla*_{VEB-1}, *bla*_{VIM}) o 15 gens diferents que codifiquen per aminoglucòsid-adeniltransferases (*aad*) o aminoglucòsid-acetiltransferases (*aac*) i donen resistència a aminoglucòsids que junt amb diferents gens dihidrofolat-reductases (*dhfr*) donen resistència a trimetoprim [4,65,97].

La resistència a cloramfenicol ve donada normalment per gens tipus B cloramfenicol-acetiltransferasa (*catB*) o per gens que codifiquen per bombes de reflux (*cml*). També s'han

descriu gens de resistència a la rifampicina (*arr-2*) i a l'eritromicina (*ereA*), gens que confereixen resistència a estreptomina i espectinomicina (*aadA*) [24].

Els integrons es troben amb freqüència en soques d'origen nosocomial, però també s'han identificat en bacteris aïllats d'ambients aquàtics [108] i en animals domèstics [45], això ens indica l'àmplia disseminació en la naturalesa d'aquests elements gènics. Algunes classes d'integrons s'han detectat exclusivament en soques ambientals com *Treponema denticola*, *Geobacter sulfurreducens* i *Shewanella putrefaciens*.

1.3 LA MEMBRANA EXTERNA DE MICROORGANISMES GRAM NEGATIUS

Tots els bacteris, a excepció dels micoplasmes, produeixen una paret cel·lular que té com a component comú el peptidoglicà o mureïna, que contribueix a conferir al bacteri certa rigidesa mecànica, dóna forma a la cèl·lula i protegeix davant la lisi osmòtica [12]. Els bacteris Gram negatius contenen una capa addicional, coneguda com a membrana externa, situada per sobre de l'anterior.

1.3.1 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA EXTERNA

La membrana externa és una interfície activa que governa interaccions amb el medi extern en bacteris Gram negatius i mostra una estructura trilaminar característica en micrografies electròniques de seccions d'aquests bacteris. De manera similar a la membrana citoplasmàtica, la membrana externa està formada per una doble capa lipídica que conté fosfolípids i proteïnes, però que a més conté grans quantitats d'un lípid únic, el lipopolisacàrid (figura 1.11).

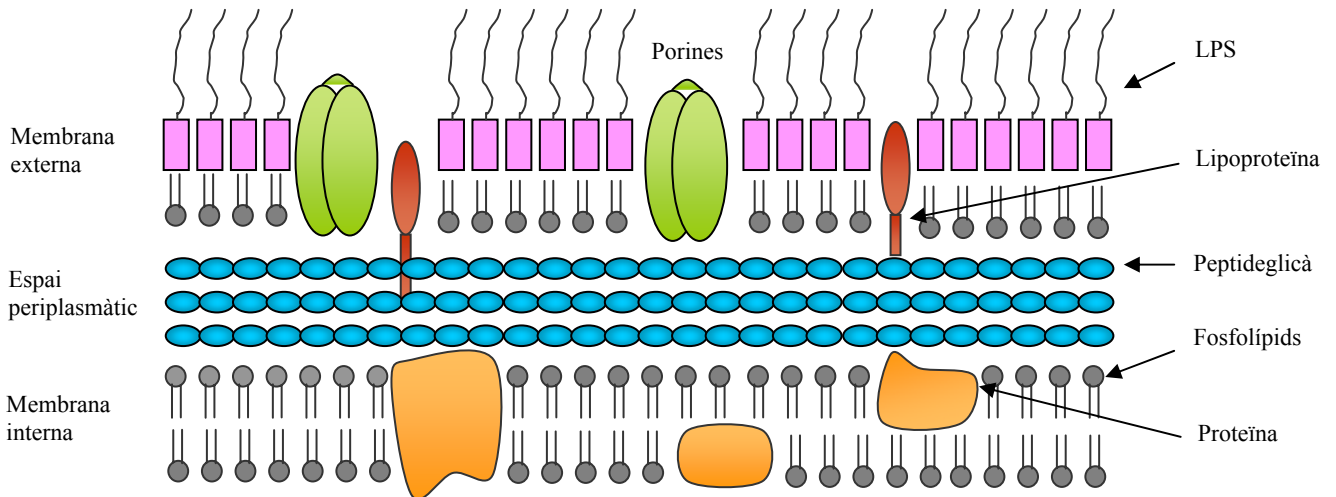


Figura 1.11. Esquema de la paret dels bacteris Gram negatius.

La membrana externa dels bacteris Gram negatius és un bicapa asimètrica. La cara interna conté aproximadament un 50% de fosfolípids mentre la resta són proteïnes. Aquests fosfolípids són similars als de la membrana interna, amb un lleuger augment de

fosfatidiletanolamina. La cara externa dels enterobacteris, en canvi, està formada exclusivament per LPS.

El LPS és una molècula complexa amb un pes molecular de mitjana d'uns 10 KDa. Químicament, està formada per un heteropolisacàrid fosforilat complex, unit a un lípid d'estructura única, el lípid A. La fracció polisacàrida es divideix a la vegada en dues parts, una regió interna, denominada nucli o *core* i una més externa denominada cadena lateral O o antigen O. La seva composició química varia entre els diferents grups bacterians Gram negatius. La molècula de LPS més estudiada i que pot considerar-se com a exemple és la present a *Salmonella typhimurium*, amb una estructura molt similar a la que es troba a *E.coli* i altres enterobacteris.

Les soques salvatges de *Salmonella*, *Escherichia* i altres Gram negatius que són capaces de sintetitzar molècules completes de LPS s'anomenen soques S (de l'anglès, *smooth*) per la seva capacitat per formar colònies llises en medi sòlid. D'altra banda, les soques incapaces de sintetitzar molècules completes que presentin cadena lateral O, són anomenades R (de l'anglès, *rough*) ja que freqüentment presenten una morfologia rugosa.

Associats a la paret dels Gram negatius hi ha altres tipus de polisacàrids com l'antigen comú dels enterobacteris (ECA) i els polisacàrids capsulars. L'antigen comú dels enterobacteris és un polisacàrid àcid que conté N-acetil-D-glucosamina, àcid N-acetil-D-manosaminurònic i 4-acetamida-4,6-dideoxi-D-galactosa. Pot representar fins al 0.2% del pes sec d'*E.coli* i està unit a la membrana externa a través d'un enllaç de tipus covalent amb fosfolípids en aquelles soques que contenen l'ECA en la forma "no immunogènica". A les anomenades soques ECA immunogèniques, l'antigen està unit covalenment al nucli del LPS [88].

Hi ha dos tipus de polisacàrids capsulars als enterobacteris. El primer, l'antigen M o àcid colànic, es troba àmpliament distribuït dintre de la família i està format per glucosa, galactosa, fucosa i àcid glucurònic. Aquest tipus de polisacàrid només es produeix sota determinades condicions fisiològiques, com ara elevada osmolaritat del medi, una baixa temperatura o una baixa humitat. Un segon tipus de polisacàrid inclou l'antigen K, són els polisacàrids capsulars clàssics.

La composició proteica de la membrana externa és característica i totalment diferent de la de la membrana citoplasmàtica. Les proteïnes majoritàries que formen part són: la lipoproteïna i proteïnes formadores de canal. Aquestes últimes poden ser agrupades a la vegada en: porines, proteïnes canal específiques de substrat i altres proteïnes transportadores. També hi ha proteïnes menys abundants a la membrana implicades en el reflux de toxines i colicines, com la proteïna TolC a *E.coli*, que es creu que interacciona amb bombes de reflux per al transport d'antibiòtics fora de la cèl·lula.

La proteïna més abundant en bacteris entèrics és la lipoproteïna de la mureïna o lipoproteïna de Braun, una petita lipoproteïna d'uns 7200Da que es troba en un gran nombre de còpies per cèl·lula (7×10^5 còpies/cèl.). Un terç de la producció s'uneix al peptidoglicà covalentment a través del grup amino de la lisina del C-terminal, mentre que la resta és proteïna lliure [91]. S'ha determinat la seqüència de la lipoproteïna i s'ha vist que la cadena polipeptídica presenta una forma α -helicoidal i que presenta una elevada composició d'aminoàcids hidrofílics. Sembla ser que només la seva porció lipídica penetra dins la membrana externa i que la part proteica no és essencial pel creixement. És possible la unió oligomèrica, és a dir, la unió entre diferents lipoproteïnes i es creu que la seva funció és la d'estabilitzar l'estructura del complex membrana externa-peptidoglicà.

A més de les porines, hi ha altres proteïnes de la membrana externa que també faciliten el transport de soluts. En aquest cas, però, es tracta d'un procés de difusió facilitada. Les proteïnes implicades contenen punts d'unió esteroespecífics pels seus substrats i la difusió dels soluts segueix una cinètica de saturació molt similar a la cinètica enzimàtica de Michaelis-Menten [83] i molt diferent a la de les porines no específiques on es segueix la primera llei de difusió de Fick.

Hi ha un tercer tipus de molècules transportadores implicades en el procés de transport actiu de grans molècules, com és el cas de complexos de quelat de ferro (Fe^{3+}) i la vitamina B₁₂. Aquestes substàncies entren a l'interior de la cèl·lula gràcies a un sistema format per receptors proteics d'alta afinitat situats a la membrana externa i la proteïna TonB de la membrana interna, que actua com un translocador associat a una sortida d'energia. Totes les proteïnes que participen en el transport de quelats de ferro sembla ser que s'indueixen en condicions de limitació de ferro i, a vegades, en aquestes condicions es converteixen en proteïnes majoritàries de la membrana externa.

1.3.2 LES PORINES

Va ser l'any 1976 quan Nakae, treballant en el laboratori de Nikaido, va proposar per primera vegada el nom de "porina" per aquelles proteïnes formadores de canal no específiques. La permeabilitat de la membrana externa a diferents nutrients és deguda, en gran part, a aquestes proteïnes conegudes com porines que constitueixen canals o porus relativament inespecífics i permeten la difusió passiva d'ions i petites molècules hidrofíliques [83]. Des de llavors, tal i com es va predir, s'han descrit i caracteritzat en cada espècie de bacteri Gram negatiu estudiat, fins i tot s'han trobat en un grup de bacteris Gram positius, el grup *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium*, que produeix una paret rica en lípids. En Gram negatius, estan presents en bacteris molt diferents com *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. mirabilis*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* i *M. morganii* [86].

La funció de les porines no és únicament la d'actuar com a canal i permetre el pas de substàncies hidrofíliques a través de la membrana externa, sinó que també intervenen en altres funcions. Les porines juguen un paper molt important en la resistència als antibiòtics, modulant la variació en la grandària de porus, variant l'expressió de porines o fins i tot, canviant de càrrega i pertorbant la difusió normal de l'antibiòtic. Les porines són també receptors de bacteriòfags o bacteriocines, dianes d'anticossos del sistema immunitari o punts d'unió de components de la cascada del complement. Finalment, poden actuar com a efectors en la patogènesi o estimular la resposta immunològica [1].

Les porines pertanyen al grup de proteïnes transportadores formadores de canal segons la descripció realitzada a l'any 2000 per M.H. Saier, que va establir quatre grups de proteïnes transportadores: canals, *carriers*, transportadors actius primaris i transportadors secundaris. Aquest primer grup, al que pertanyen les porines, es subdivideix a la vegada en cinc subclasses segons la seva estructura, funció i origen filogenètic: **canals tipus α** , són els més coneguts, presents a totes les membranes d'organismes tant procariotes com eucariotes, travessen les membranes formant estructures en α -hèlix. **Porines β -barril**, riques en fulles β antiparal·leles que adopten una configuració en cilindre o barril. Estan presents a la membrana externa dels bacteris Gram negatius, a la membrana dels mitocondris i dels cloroplast i a les membranes externes d'àcids grassos de bacteris Gram positius com *Mycobacterium*, *Nocardia* i *Corynebacterium*. **Toxines proteïques i peptídiques** formadores de porus que són sintetitzades per una cèl·lula i inserides a la membrana d'una altra cèl·lula on formarà un

porus transmembranal. Tenen un efecte tòxic perquè permeten el flux lliure d'electrolits i altres petites molècules. **Holines**, presents tant a bacteris Gram positius com Gram negatius i finalment, **canals no sintetitzats ribosòmicament** formadors de porus.

1.3.2.1 Propietats físico-químiques

Les porines formen canals plens d'aigua amb un diàmetre de porus que oscil·la entre 0,6 nm i 2,3 nm, limiten l'entrada d'algunes substàncies i permeten l'influx de petites molècules hidrofòbiques indispensables per la vida bacteriana com sucres, aminoàcids, petits pèptids, ions inorgànics i alguns antibiòtics com β -lactàmics, tetraciclins, aminoglucòsids, cloramfenicol i algunes quinolones [82] i el reflux de productes tòxics com ara drogues o solvents orgànics. Aquest flux de soluts és independent d'energia i segueix, per tant, la primera llei de difusió de Fick.

Les porines són proteïnes inespecífiques tot i que poden presentar certa selectivitat iònica, majoritàriament catiònica com les porines OmpF i OmpC d'*E.coli* i en algunes ocasions aniònica, com és el cas de la proteïna PhoE d'*E.coli*. No és una selectivitat iònica absoluta, donat que a l'interior del canal hi ha presents tant aminoàcids carregats positivament com negativament. Les porines també presenten petites preferències per la mida dels soluts, OmpF, per exemple, permet la permeabilitat de soluts lleugerament més grans que la porina OmpC [86].

Algunes porines presenten canals dependents de voltatge en *lipid bilayer membranes*. Probablement això representi un artefacte de reconstitució d'aquestes porines en liposomes perquè en cèl·lules intactes l'únic potencial possible a través de la membrana externa és el potencial Donnan que s'ha demostrat que no genera canvis en la conformació de les porines [84]. Aquest és un fet diferenciador amb les porines dels mitocondris (VDAC, de l'anglès, *voltage dependent anion channels*) que requereixen de potencials de entre 20-40 mV per produir el tancament del canal, mentre en el cas de porines bacterianes es requereixen potencials de 100mV, com a mínim, per tancar [12]. Altres estudis demostren que les porines tenen un comportament força complex i dinàmic i que poden adoptar conformacions d'obertura i tancament o, fins i tot, poden romandre en un estat inactiu en funció de diversos paràmetres físics i químics com ara el pH, el voltatge i poliamides naturals com cadaverina, putrescina i espermidina que inhibeixen l'acció de les porines [36].

Les porines són generalment associacions trimèriques. Aquests homotrímers són resistents a detergents iònics desnaturalitzats com el SDS i a l'atac proteolític. El pes molecular dels monòmers oscil·la entre 28 i 48 KDa [117].

El contingut total de porines és relativament constant i abundant, de fet s'ha estimat de l'ordre de $10^4 - 10^5$ còpies per cèl·lula i estan associades fortament, però no covalentment, al peptidoglicà i al LPS. En el cas de la unió de les porines al peptidoglicà, s'ha demostrat que aquesta unió pot ser trencada amb 0.5-1 M de NaCl. El LPS sembla que intervé en el procés de trimerització de les porines així com també afecta a les funcions del trímer de porina ensamblat. S'ha vist que propietats d'obertura del canal són alterades en presència del LPS o, fins i tot, s'ha observat que bacteriòfags que s'uneixen al receptor de porines en *E.coli*, només ho fan en presència de LPS [119].

1.3.2.2 Estructura

Les porines presenten dues característiques molt diferents de la resta de proteïnes de membrana. En primer lloc, tenen una composició d'aminoàcids més polar que la present a les proteïnes solubles en aigua. I en segon lloc, són riques en estructures en fulla β , a diferència de la majoria de proteïnes de membrana, amb dominis transmembranals hidrofòbics i estructures en hèlix- α (Nikaido i Milton). Aquesta estructura β està present únicament a la membrana externa de bacteris, cloroplasts i mitocondris.

La topologia de les proteïnes de membrana a nivell de resolució atòmica es coneix gràcies a l'aplicació de diverses tècniques com ara estudis espectroscòpics, microscopia electrònica o difracció de raigs X a partir de cristalls en 2D o 3D, encara que la estructura cristal·lina només s'ha aconseguit en algunes porines, és indubtablement el progrés més important en l'estudi de les porines ja que permet la visió de les estructures tri-dimensionals de les porines trimèriques (figura 1.12) [110]. La primera porina trimèrica estudiada amb aquesta tècnica fou *Rhodobacter capsulatus*, seguida immediatament per les porines OmpF i PhoE d'*E.coli* i OmpK36 de *Klebsiella pneumoniae*.

Totes aquestes porines formen tres canals plens d'aigua per trímer. Cada monòmer conté de 250 a 450 aminoàcids i està constituït per 16 làmines β antiparal·leles que formen un cilindre amb girs curts a la cara periplasmàtica i *loops* llargs a la cara externa de la cèl·lula. El

tercer *loop*, L3, no està exposat a la superfície cel·lular sinó que es doblega cap a l'interior, formant una zona de constricció a la meitat d'aquest canal que contribueix a determinar el límit d'exclusió d'aquest porus. Les porines d'enterobacteris contenen la seqüència característica PEFGGD en el *loop* 3 [86].

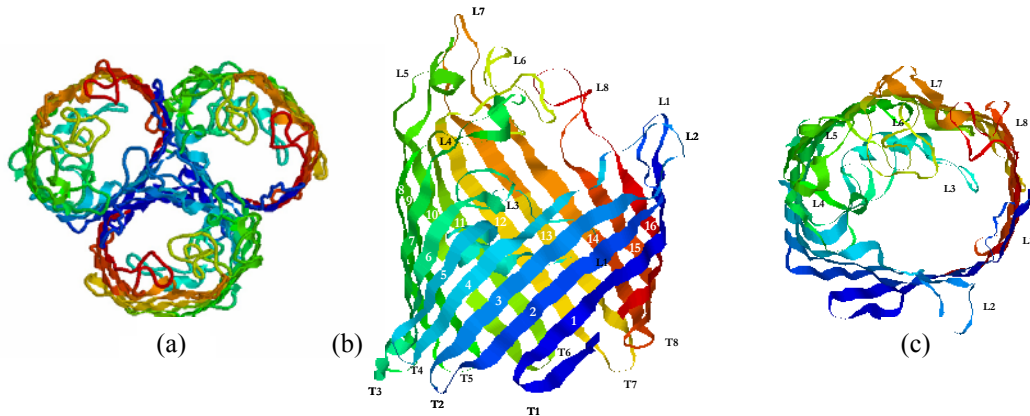


Figura 1.12. Estructura de la porina Omp1 de *Serratia marcescens*. (a) Associació trimèrica del canal d'Omp1. (b) Topologia del monòmer en visió lateral, es mostren les 16 estructures en fulla β , enrotllades en configuració de barril. (c) Topologia del monòmer en visió frontal, es pot observar que el *loop* 3 (L3) és l'únic que es projecta cap a l'interior del canal [110].

1.3.2.3 Regulació de l'expressió de les porines

Les porines OmpF i OmpC del bacteri Gram negatiu *E.coli* foren les primeres identificades. La regulació de l'expressió d'aquestes porines no específiques d'*E.coli* està àmpliament estudiada. El propòsit d'aquesta regulació es va veure clar quan es va descobrir que OmpF produeix un canal lleugerament més gran que OmpC, d'aquesta manera productes com antibiòtics i àcids biliars difonen millor a través del canal d'OmpF.

Les condicions d'elevada osmolaritat i elevada temperatura del tracte intestinal (hàbitat normal d'*E.coli*) afavoreixen la producció d'OmpC i reprimeixen la producció d'OmpF. En canvi, sota condicions de baixa osmolaritat i temperatura, per exemple, en l'aigua d'un llac, s'incrementa la producció d'OmpF beneficiant a *E.coli* perquè li facilita l'influx de nutrients.

L'activitat osmòtica mediambiental és captada per la proteïna osmosensora EnvZ, de 450 aminoàcids i 50,4 KDa, localitzada a la membrana interna del bacteri. A baixa osmolaritat EnvZ utilitza ATP per fosforilar-se i fosforila alhora a una altra proteïna reguladora, OmpR.

El gen *ompF*, que té una alta afinitat pels llocs d'unió d'OmpR, es transcriu inclús quan OmpR està poc fosforilada, per exemple, sota condicions de baixa osmolaritat. Tot i això, quan la concentració d'OmpR activada incrementa, també incrementa la transcripció d'*ompC* i la repressió d'*ompF*. D'altra banda, les altes temperatures incrementen la transcripció de *micF*, un gen que codifica per un mRNA de 174 bases complementari a una regió de 74 bases del mRNA d'*ompF* inhibint la seva traducció. Finalment, l'estrès oxidatiu i la presència de salicilat també incrementen la transcripció del gen *micF* i prevenen la producció de porines OmpF postranscripcionals.

Sota condicions d'anaerobiosis la proteïna OmpC s'expressa altament, fins i tot amb nivells d'osmolaritat no gaire alts, i la repressió d'OmpF amb activitat osmòtica es veu afavorida amb condicions aeròbies. Un altre factor ambiental que actua algunes vegades en el sistema EnvZ-OmpR és el pH. A pH àcid, com 5.2, es reprimeix la producció de la porina OmpF i s'incrementa l'expressió d'OmpC.

La regulació de l'expressió de les porines també es dona com a resposta als components químics de l'ambient. A l'any 1991 es va trobar que el salicilat a l'ambient minimitzava la síntesis d'OmpF. Ara sabem que forma part d'una regulació global de porines, donada per tres proteïnes reguladores MarA, SoxS i Rob [86]

1.3.2.4 Evolució de les porines

Les poblacions bacterianes evolucionen, entre altres factors, per mutacions en els *loops* exposats a l'exterior de les porines al interaccionar amb anticossos, bacteriòfags i colicines, un exemple és OmpF que junt amb el LPS és el receptor del bacteriòfag K20 i de les colicines A i N. Un altre exemple és el canal LamB específic de maltodextrines, els *loops* d'aquest canal evolucionen ràpidament a les alteracions de l'estructura com ho demostra clarament la comparació de les seqüències de la mateixa porina en diferents soques de la mateixa espècie o en soques d'espècies properes.

En experiments “d’evolució” a nivell de laboratori s’ha observat amb regularitat que quan es fa créixer *E.coli* durant uns quants centenars de generacions en condicions de glucosa limitants hi ha una sobreproducció del canal específic LamB, el qual facilita la difusió de la glucosa. En canvi, quan la única font de carboni és el disacàrid lactosa en un medi mínim, les soques evolucionen sobreproduint la porina OmpF enfront OmpC, a més es produeixen mutacions en el gen *ompF* que modifiquen els residus en la regió de constricció o provoquen una petita delecció en el *loop* L3 o canal de constricció [86].

1.3.3 EL PAPER DE LA MEMBRANA EXTERNA DELS BACTERIS GRAM NEGATIUS EN LA RESISTÈNCIA INTRÍNSECA ALS ANTIBIÒTICS

La membrana externa en bacteris Gram negatius és important perquè confereix resistència davant factors de defensa de l’hoste, evita l’atac immune específic i finalment, actua com a barrera selectiva, evitant l’entrada de moltes molècules nocives presents en el medi i afavorint el reflux de productes tòxics [84]. Els bacteris Gram negatius, presenten, de forma natural, resistència a alguns antibiòtics que no poden entrar al bacteri per causes naturals. En canvi, antibiòtics de petita grandària (tetraciclina, cloramfenicol, fluoroquinolones) utilitzen els canals formats per porines per entrar dins el bacteri. En el cas d’antibiòtics grans i lipofílics (macròlids, rifampicina, novobiocina, àcid fusídic) tenen dificultat per passar a través de les porines.

Els bacteris Gram negatius presenten resistència intrínseca davant l’acció de molts antibiòtics que són efectius en altres bacteris, com els macròlids, novobiocina i rifampicina, degut a la baixa permeabilitat que confereix la membrana externa a molècules hidrofòbiques, especialment en bacteris entèrics. Aquesta impermeabilitat també la presenten en front detergents, com SDS o sals biliars i als colorants hidrofòbics (eosina, blau de metil, verd brillant).

La principal barrera de permeabilitat és l’estructura que presenten en la membrana externa en forma de bicapa lipídica. En canvi, en bacteris Gram positius, la gruixuda estructura del peptideglicà no sembla oferir gran resistència a la difusió de petites molècules com els antibiòtics. Tot el contrari, els bacteris Gram negatius presenten una resistència intrínseca als antibiòtics que podria ser deguda a la barrera de permeabilitat que suposa la membrana externa [85].

La part externa de la membrana contribueix a la baixa permeabilitat amb la presència del LPS, un lípid inusual format per cadenes d'àcids grassos saturats. La membrana interna, al contrari, està formada per àcids grassos insaturats fent que sigui una estructura més fluïda. A més, el LPS conté 6 o 7 cadenes d'àcids grassos unides covalentment evitant el pas d'antibiòtics més hidrofòbics que si passarien a través de la membrana citoplasmàtica. La presència del LPS contribueix, per tant, a conferir resistència al pas d'antibiòtics lipofílics.

Paral·lelament, els bacteris Gram negatius presenten un elevat nombre de canals hidrofílics en la membrana externa que permeten tant l'entrada com la sortida d'antibiòtics. Un dels principals impediments de l'entrada d'antibiòtics és el diàmetre i la càrrega dels porus, essencials en la determinació del pas d'antibiòtics. La majoria d'aquests canals a *E.coli*, per exemple, tenen un diàmetre de porus de $7 \times 10 \text{ \AA}$, que permet l'entrada de nutrients però no l'entrada de molts antibiòtics. A més, la zona de constricció del porus presenta un nombre d'aminoàcids carregats electrostàticament de manera que poden restringir el pas d'algunes molècules a través de la membrana. Les molècules d'aigua a dins del porus dificulten l'entrada de molècules lipofíliques.

Hi ha diversos factors que poden fer incrementar la resistència intrínseca davant agents antimicrobians. S'ha observat que la pèrdua de porines incrementa les MICs d'alguns antibiòtics hidrofílics en molts patògens clínics com *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.marcescens*, *Enterobacter* spp. i *P.aeruginosa*. Per exemple, la pèrdua de la porina OprD en aïllaments clínics de *P.aeruginosa* es suficient per conferir resistència als antibiòtics imipinem i meropenem. La pèrdua de la porina OmpF d'*E.coli*, per on difonen molt antibiòtics, provoca una resistència a múltiples antibiòtics. En bacteris com *Klebsiella* spp. i *Enterobacter* spp., s'han descrit mutacions que produeixen una disminució del nombre de porines en la membrana externa fent augmentar la resistència a antibiòtics β -lactàmics i en menor grau a tetraciclines, cloramfenicol i aminoglucòsids. En aquelles soques que presenten una deficiència en porines ha estat difícil demostrar la contribució específica de l'alteració en l'expressió de porines en la resistència als antibiòtics perquè es troben altres mecanismes de resistència [47].

El nostre grup de recerca ha estudiat el paper de la membrana externa en l'acumulació de quinolones a *S. marcescens*. S'ha constatat que les quinolones menys hidrofòbiques poden penetrar dins el bacteri a través de la porina Omp3 de *S. marcescens* i que mutants deficients

en aquesta porina disminueixen significativament els nivells d'acumulació d'aquests agents antimicrobians [18]. La síntesi d'Omp3 queda reprimida amb l'addició de salicilat a concentracions iguals o superiors a 3 mM, fent que el bacteri esdevingui resistent a diferents antibiòtics, incloses les quinolones menys hidrofòbiques, l'ampicil·lina i diverses cefalosporines [101]. Així mateix, s'han estudiat les porines Omp1 i Omp2 de *S. marcescens* [110], en aquests cas, l'entrada d'antibiòtics a l'interior cel·lular es realitza preferentment per la proteïna formadora de canal Omp1, possiblement degut a una major grandària d'aquesta porina.

L'aïllament d'una soca clínica de *M. morganii* multiresistent és un fet irregular i poc freqüent. Aquest va determinar que ens centréssim en esbrinar els mecanismes de resistència que presenta aquest microbi.

L'objectiu general es va subdividir en els següents objectius experimentals:

1. Investigar la susceptibilitat antimicrobiana de la soca HUB198351 de *Morganella morganii* d'origen clínic.
2. Investigar la importància de la permeabilitat de les envoltas cel·lulars bacterianes de *M. morganii* a diferents antibiòtics.
3. Estudiar la possible funcionalitat de bombes de reflux que poguessin expulsar els antibiòtics fora de la cèl·lula.
4. Obtenir la porina de *M. morganii* purificada i realitzar estudis físico-químics seguint la tècnica de *lipid planar bilayer*.
5. Investigar sobre l'existència d'integrans en la soca de *M. morganii* i obtenir les seqüències dels gens de resistència inserits en aquests integrans.

3 MATERIAL I MÈTODES

3.1 SOQUES BACTERIANES

Les soques bacterianes utilitzades en aquest treball i les seves característiques més rellevants s'exposen a les taules I i II.

Taula I. Relació de soques de *Morganella morganii*.

SOQUES	FONT
HUB 198351	Orina
CECT 173	Soca de la col·lecció espanyola de cultius tipus

Taula II. Relació de soques de *Serratia marcescens* i d'*Escherichia coli*.

SOQUES	CARACTERISTIQUES
<i>S.marcescens</i> 2170	Soca proporcionada per Prof. Ackerman (Universit� Laval, Canad�)
<i>E.coli</i> UH302	Soca mancada de les proteines de membrana Cole <i>et al.</i> ,1982 externa: OmpA, OmpC i OmpF.

3.2 MEDIS DE CULTIU

3.2.1 BROU DE TRIPTONA I SOJA (TSB)

Medi líquid altament nutritiu utilitzat pel creixement d'una gran varietat de microorganismes. Fou utilitzat com a medi d'ús general en el creixement de les soques bacterianes.

La seva composició en g/l  s la següent:

Peptona de caseina.....	17.0
Peptona de soja.....	3.0
NaCl.....	5.0
KH ₂ PO ₄	2.5
Glucosa.....	2.5

Preparació: Dissoldre 30g en 1l d'aigua destil lada, ajustant el pH a 7.3 ± 0.2 a 25 C. Esterilitzar a l'autoclau a 121 C durant un període de 20 minuts.

3.2.2 AGAR DE TRIPTONA I SOJA (TSA)

Medi sòlid equivalent al TSB però sense glucosa ni fosfat, utilitzat pel creixement en medi sòlid i la conservació a curt termini de les soques bacterianes.

La seva composició en g/l és la següent:

Peptona de caseïna.....	15.0
Peptona de soja.....	5.0
NaCl.....	5.0
Agar.....	15.0

Preparació: Dissoldre 40g del producte en 1l d'aigua destil·lada, ajustant el pH a 7.3 ± 0.2 a 25°C. Bullir durant 1 minut per dissoldre completament l'agar. Esterilitzar a l'autoclau a 121°C durant un període de 20 minuts, deixar refredar a 50°C i distribuir en plaques de Petri a raó de 20 ml per placa.

3.2.3 LURIA BROTH

Medi de cultiu líquid utilitzat per experiments de genètica molecular amb *M.morganii*.

La seva composició en g/l és la següent:

Peptona tríptica de caseïna.....	10.0
Extracte de llevat.....	5.0

Preparació: Dissoldre 15g del producte en 1 l d'aigua destil·lada, ajustant el pH a 7.2 ± 0.2 a 25°C. Esterilitzar a l'autoclau a 121°C durant un període de 20 minuts.

3.2.4 BROU DE MULLER-HINTON

Medi nutritiu utilitzat en els experiments de sensibilitat a agents antimicrobians pel mètode de microdilució en brou de M.H.

La seva composició en g/l és la següent:

Hidrolizat de caseïna.....	17.5
Extracte de carn.....	4.0
Midó.....	1.5

Preparació: Dissoldre 21 g del producte en 1 litre d'aigua destil·lada, ajustant el pH a 7.4 ± 0.2 a 25°C. Esterilitzar en l'autoclau a 121 °C durant 20 minuts.

3.2.5 AGAR DE MULLER-HINTON

Medi nutritiu utilitzat en els experiments de sensibilitat a agents antimicrobians.

La seva composició en g/l és la següent:

Hidrolizat de caseïna.....	17.5
Extracte de carn.....	4.0
Midó.....	1.5
Agar.....	15

Preparació: Dissoldre 38 g del producte en 1 litre d'aigua destil·lada, ajustant el pH a 7.3 ± 0.2 a 25°C. Bullir per dissoldre el medi completament. Esterilitzar en l'autoclau a 121 °C durant 20 minuts.

3.2.6 BROU DE TRIPTONA SOJA AMB GLICEROL

Medi de conservació utilitzat per congelar a llarg termini les soques bacterianes estudiades.

La seva composició és TSB i glicerol al 20%. Per preparar el medi resuspendre 3g de TSB en 80 ml d'aigua destil·lada i afegir 20 ml de glicerol. Esterilitzar la barreja a l'autoclau durant 20 minuts a 121°C.

Per conservar els bacteris a llarg termini seguir el següent procediment:

- ❑ Es va cultivar el bacteri en 5 ml de TSB durant 18 hores a 37°C.
- ❑ Seguidament fou centrifugat 1 ml a 8000 x g durant 5 minuts a temperatura ambient.
- ❑ El sediment es va resuspendre en 1 ml de medi de conservació i es va guardar en tubs a -20°C fins la seva utilització.

Tots els medis van ser subministrats per Scharlau (Barcelona, España).

3.3 DETERMINACIÓ DE SUSCEPTIBILITAT MICROBIANA ALS ANTIBIÒTICS

3.3.1 AGENTS ANTIMICROBIANS

Per a l'estudi de susceptibilitat bacteriana es van utilitzar antibiòtics comercials en pols, discs d'antibiòtics comercials, dos colorants i quatre inhibidors metabòlics.

Els diluents, les concentracions de cada *stock* i les condicions de conservació per a cadascun dels agents antimicrobians són els següents:

- **ANTIBIÒTICS:**

- La ciprofloxacina i l'àcid nalidíxic es van preparar a una concentració *stock* de 1 mg/ml en NaOH 0.5 N. Es va conservar en solució a temperatura ambient i protegida de la llum.
- La tetraciclina es va preparar a una concentració *stock* de 5 mg/ml en 50% (v/v) d'aigua i etanol. Es va conservar a -20 °C i protegida de la llum.
- El cloramfenicol, l'eritromicina i la rifampicina es van preparar a una concentració *stock* de 10 mg/ml en etanol. Es van conservar a -20°C.
- Els antibiòtics β -lactàmics utilitzats foren preparats a una concentració *stock* de 10 mg/ml en aigua destil·lada estèril. Conservats a -20°C.
- L'estreptomicina, la gentamicina, la novobiocina i la kanamicina es van preparar a una concentració *stock* de 10 mg/ml en aigua destil·lada estèril. Conservats a -20°C.

La ciprofloxacina va ser subministrada amablement pels laboratoris Cenavisa (Reus, España) i la resta d'antibiòtics van ser subministrats per Sigma (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA).

- **COLORANTS:**

- Cristall violeta: es prepara en solució aquosa i es conserva a temperatura ambient.
- Acriflavina: es prepara en solució aquosa i es conserva a temperatura ambient.

Es van fer *stocks* de 10mg.ml⁻¹ de tots dos colorants. Van ser subministrats per Sigma (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA).

- **INHIBIDORS METABÒLICS:**

- Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP): es prepara en solució alcohòlica en metanol i es va conservar a -20°C, protegit de la llum.
- Cianur de potassi (KCN): es prepara en solució aquosa i es conserva a temperatura ambient.
- Reserpina: es prepara en una solució al 1% d'àcid acètic en metanol:aigua a una proporció 50:50. Es conserva a temperatura ambient.

Tots els inhibidors metabòlics van ser subministrats per Sigma (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA).

3.3.2 ANTIBIOGRAMA

La sensibilitat dels bacteris als agents antimicrobians pot ser valorada *in vitro* utilitzant el mètode de difusió en medi sòlid.

- Es van resuspendre varies colònies d'un cultiu en placa del microorganisme en 2 ml de MH.
- Seguidament es va mullar extensament un escobilló estèril en el tub i es va sembrar l'inòcul en plaques de MHA sense inhibidor i amb cadascun dels quatre inhibidors metabòlics. La sembra es va fer lliscant l'escobilló per tota la placa, en tres direccions, tenint la certesa que quedava tota ella ben sembrada.
- Passats 10 minuts, es dipositaren els discs d'antibiòtics a la superfície de l'agar amb unes pinces estèrils. Les plaques foren incubades a 37°C durant 18 hores.

La lectura es va realitzar mesurant els diàmetres dels halo d'inhibició complets de creixement que es van produir al voltant dels discs, expressant els resultats en mil·límetres. Segons el diàmetre d'aquest halo i utilitzant unes taules de referència el microorganisme es va classificar com a resistent o sensible a l'antibiòtic estudiat.

Els antibiòtics utilitzats en aquest estudi foren els següents: imipenem 10 μ g (IMI), ceftazidima 30 μ g (CAZ), ticarcil·lina 75 μ g (TC), kanamicina 30 μ g (K), ofloxacina 5 μ g (OFX), amikacina 30 μ g (AK), tobramicina 10 μ g (TN), cloramfenicol 30 μ g (C), gentamicina 10 μ g (GM), piperacil·lina 100 μ g (PRL), eritromicina 15 μ g (E), novobiocina 30 μ g (NO), optoquina 5 μ g (OP).

Els inhibidors metabòlics es van preparar a diferent concentracions *stock*: el CCCP a una concentració de 1 mg.ml⁻¹, la reserpina a 1mg.ml⁻¹, el cianur de potassi a 10mg.ml⁻¹

3.3.3 CONCENTRACIÓ MÍNIMA INHIBITÒRIA

La determinació de la MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) es realitzà pel test de microdilució en brou. El mètode seguit fou el següent:

- Es van incubar durant 18 hores a 37°C cultius cel·lulars en brou MH. Passat aquest temps es van diluir aquests cultius 1000 vegades en brou fresc.
- Seguidament es van inocular 10 μ l de la dilució del cultiu a cadascun dels pouets de la placa de *microtiter* que contenen dilucions seriades dels antibiòtics i en alguns casos dilucions dels inhibidors metabòlics. Es van incubar les plaques durant 18 hores a 37°C.
- Es va realitzar la lectura i es va determinar la MIC que és la mínima concentració d'antibiòtic que inhibeix el creixement bacterià.

3.4 EXPERIMENTS DE REFLUX

3.4.1 ASSAIG DE CREIXEMENT I INHIBICIÓ DE *M.morganii*

3.4.1.1 Corba de creixement

Es va determinar la corba de creixement per totes les soques de *M.morganii*. Es va seguir el següent procediment:

- A partir de cultius de 24 hores en plaques de agar TSA, es van realitzar suspensions bacterianes en 100 ml de medi TSB, fins una densitat òptica a 550 nm al voltant de 0.2-0.3.
- Els cultius es van incubar a 37 °C i es van anar realitzant mesures de densitat òptica a 550 nm, en intervals de temps d'una hora. Les mesures de densitat òptica obtingudes es van representar en front el temps.
- Paral·lelament, es van sembrar plaques de TSA de les mostres preses a cada instant, prèvia dilució de les mateixes. Aquestes es van incubar tota la nit a 37 °C, amb un 5 % de CO₂.
- El recompte del nombre de colònies crescudes en las plaques va permetre establir una correlació entre els valors de densitat òptica obtinguts i la concentració.

3.4.1.2 Assaig d'inhibició del creixement

Per realitzar aquest assaig es va seguir el protocol descrit per Beyer *et al* [19].

- A partir d'un cultiu de 24 hores en TSA, es va realitzar una suspensió bacteriana en 100 ml de medi TSB fins una densitat òptica a 550 nm d'aproximadament 0.2-0.3.
- A aquesta suspensió s'hi va afegir una concentració de ciprofloxacina de ¼ la concentració mínima inhibitoria.
- El cultiu es va dividir en dos volums iguals, a un s'hi va afegir CCCP a una concentració final de 10 µg/ml.
- Ambdós cultius es van incubar a 37°C i es van anar realitzant mesures paral·leles d'absorbència a 550 nm, a intervals de temps d'una hora.
- Les diferents mesures de densitat òptica es van representar en front el temps.

3.4.1.3 Efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement bacterià, en presència i absència de CCCP

Per realitzar aquest assaig es va seguir el protocol descrit per Beyer *et al* [19].

- A partir d'un cultiu en TSA, es va realitzar una suspensió bacteriana en 100 ml de medi TSB fins una densitat òptica a 550 nm d'aproximadament 0.2-0.3.
- Aquesta suspensió es va repartir en deu tubs amb volums iguals, als quals se'ls hi va afegir concentracions creixents de ciprofloxacina. Es va prendre com a valor més elevat el corresponent a la MIC de la soca i es van realitzar dilucions a la meitat. De cada un d'aquests tubs es van traspasar 5 ml a altres tubs i se'ls hi va afegir CCCP a una concentració final de 10 µg/ml.
- Tots els tubs es van incubar a 37°C durant 7 hores, passades aquestes hores es van realitzar les corresponents mesures de densitat òptica a 550 nm.
- Els valors obtinguts es van representar gràficament.

3.5 EXPERIMENTS DE FLUORIMETRIA

Es va utilitzar el mètode fluorimètric descrit per Mortimer i Pidcock (1991) lleugerament modificat [95]. El procediment seguit fou el següent:

- La soca bacteriana a assajar es va cultivar en medi TSB a 37°C fins que va arribar a una absorbència a 600 nm de 0.5-0.7.
- Es van sedimentar les cèl·lules per centrifugació a 8.000 x g durant 15 minuts a temperatura ambient.
- El sediment fou resuspès en PBS (de l'anglès, *Phosphate pH Saline*) a pH 7,5 i es va tornar a centrifugar en les mateixes condicions. Aquesta vegada però, es va resuspendre el sediment concentrant-lo 10 vegades en PBS pH 7.5.
- A partir d'aquesta mostra, es van preparar alíquotes de 1 ml i foren mantingudes a 37°C.
- Es va afegir a cada tub la dissolució de ciprofloxacina necessària per arribar a una concentració final de 10 µg/ml. Fou incubat amb l'antibiòtic a temps de 0, 0,25, 0.50, 1.5, 3, 5 i 7 minuts i en altres casos a 0, 0.50, 1, 1.5, 6, 8, 10 i 12 minuts.
- Es va centrifugar immediatament a 11.000 x g a 4°C i durant 1 minut.

- El sediment fou rentat amb 1 ml de PBS pH 7.5 fred (d'aquesta manera s'aconsegueix un augment de retenció cel·lular de la quinolona) i es va resuspendre en 1 ml de 0.1 M HCl-Glicina pH 3. La solució es va incubar un temps mínim de 2 hores a temperatura ambient i protegida de la llum.
- Transcorregut aquest temps, la suspensió fou centrifugada a 11.000 x g durant 10 minuts per tal d'eliminar restes cel·lulars.
- Finalment, es va determinar la concentració en el sobrenedant per fluorimetria (Fluorímetre Hitachi model f-2000) a partir d'una corba de calibratge prèviament establerta per a les condicions de treball experimental. Les longituds màximes d'excitació (λ_{ex}) i emissió (λ_{em}) determinades en 0.1 M HCl-Glicina pH 3 per a la ciprofloxacina foren de 279 i 447 nm, respectivament.

Tots els experiments es van realitzar per duplicat mínim en tres ocasions diferents.

Solució PBS (*Phosphate pH Saline*)

Utilitzada com a solució amortidora de pH en el rentat i manteniment de cèl·lules bacterianes. Es prepara com a solució *stock* a una concentració deu vegades la d'utilització.

La seva composició en g /l és:

NaCl	80.0
KH ₂ PO ₄	2.0
Na ₂ HPO ₄	11.44
KCl	11.0
Aigua destil·lada q.s.p.	1 l

Preparació: dissoldre en 1 l d'aigua destil·lada i ajustant el pH a $7,5 \pm 0,2$. Esterilitzar a l'autoclau a 121°C durant 20 minuts i deixar refredar.

Solució Glicina-HCl pH 3

Solució A: glicina 0.2 M

Solució B: HCl 0.2 M

Als assaigs fluorimètrics s'utilitza la solució 0.1 M HCl-Glicina pH 3 prenent 50 ml de la solució A, 12 ml de la solució B i aigua destil·lada fins a un volum final de 100 ml.

3.6 EXTRACCIÓ DE DNA CROMOSÒMIC I PLASMÍDIC

3.6.1 AÏLLAMENT I PURIFICACIÓ DE DNA CROMOSÒMIC DE *M.morganii*

El mètode utilitzat fou una modificació del mètode de Marmur (1961) [66].

- Es va inocular *M. morganii* en 5 ml de LB i fou incubada 18 h a 37°C.
- A partir del cultiu, s'inoculà 1 ml del creixement bacterià en 500 ml de LB i s'incubà durant 18 h a 37°C en agitació.
- Es recolliren les cèl·lules per centrifugació a 10.000 x g durant 10 minuts a 4°C i es van resuspendre en 50 ml d'una solució de 0.15 M NaCl i 0.01 M EDTA pH 8.0. Posteriorment, s'afegí a aquesta solució 1 ml de lisozim al 1% en 0.25 M Tris-HCl pH 8.0 i es deixà la mescla en gel durant 10 minuts.
- Es van afegir 10 µl d'una solució de proteinasa K preparada a una concentració de 10 mg/ml i s'agità suaument la mescla.
- Les cèl·lules van ser lisades afegint 2.63 ml de 20% SDS (fins arribar a una concentració final del 1%) en un bany a 78-85°C (l'interval de temperatura està dintre del marge del 10% a la T_m de *M.morganii*) durant 10-15 minuts. Un canvi brusca en la viscositat és indicatiu de la lisi cel·lular.
- Es va deixar refredar la suspensió a temperatura ambient. S'afegiren 13.16 ml de 5 M NaClO₄, de manera que la concentració final del perclorat sòdic va ser de 1 M, i s'agità. Una elevada concentració de sals ajuda a dissociar les proteïnes dels àcids nucleics.
- S'afegí 32.9 ml (0.5 volums) d'una mescla de cloroform:isopentanol, en proporció 24:1, a la solució i es va agitar vigorosament durant 30 minuts en un agitador orbital fins aconseguir una emulsió lletosa.
- L'emulsió es va centrifugar a 17.000 x g durant 10 minuts a 4°C i amb l'ajut d'una pipeta de vidre estèril de 10 ml invertida es va recollir la fase superior aquosa procurant no prendre res de interfase blanca. Aquesta matèria blanca, clarament visible, està composta de restes cel·lulars.
- Es repeteix l'extracció amb cloroform:isopentanol i es van recollir totes les fases aquoses així resultants en un vas de precipitats de vidre estèril.
- El DNA cromosòmic es va precipitar per addició de dos volums d'etanol al 95% fred i es recollí simultàniament enrotllant-lo amb una vareta de vidre estèril.

- Seguidament, es va dissoldre el DNA en 15 ml de solució amortidora de pH SSC x 0.1. Un cop resuspès, fou ajustada la concentració de SSC fins a x 1 afegint 0.85 ml de SSC x 20.
- Es va eliminar el RNA present a la suspensió amb un tractament de RNAsa a una concentració final de $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ i incubar durant 30 min a 37°C .
- Després del tractament amb RNAsa, es va transferir la solució a tubs de polipropilè i es va afegir el mateix volum d'una solució de fenol:cloroform. Es va mesclar i centrifugar a $10.000 \times g$ durant 10 minuts.
- Fou recollir la fase aquosa i es tornà a repetir l'extracció amb fenol:cloroform fins que hi va haver una total absència d'interfase de proteïnes cel·lulars.
- Finalment, s'afegí a la mostra igual volum de cloroform:isoamílic. S'agità i centrifugà. Aquesta extracció permet eliminar restes de fenol que poguessin haver quedat en la fase aquosa.
- Es va precipitar el DNA solubilitzat en la fase aquosa mitjançant l'addició de 0.125 volums de 3 M acetat sòdic i 0.625 volums d'isopropanol. Es deixà la solució a -20°C durant 2 hores i el DNA fou sedimentat per centrifugació a $10.000 \times g$ a 4°C durant 10 minuts.
- El sediment es va rentar un cop amb etanol al 70% fred (sense resuspendre'l) i es va repetir la centrifugació decantant el sobrenedant i assecant els restes d'etanol al buit.
- El DNA cromosòmic fou resuspès, un cop sec, en 2 ml de solució TE.
- Es va determinar espectrofotomètricament la seva concentració, mesurant l'absorbència a 260 nm i calculant la concentració a través de la fórmula:

$$[\text{DNA}]_{(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})} = A_{260} / 0,020$$

Solució de fenol:

Fenol bidestil·lat equilibrat a pH 7.8. Afegir a 250 ml de fenol 0.25 g de 8-hidroxiquinoleïna que actua com antioxidant i proporciona una coloració groguenca que permet distingir la fase fenòlica de l'aquosa. Barrejar amb un excés de solució amortidora de pH, 0.5 M Tris-HCl pH 8.0 i deixar que les dues fases es separin. Eliminar periòdicament el tampó, reemplaçant-lo per un aport nou. Controlar el pH de la fase aquosa i quan aquest es situï per sobre de 7.8 pot donar-se per finalitzat l'equilibri. Conservar el fenol a 4°C protegit de la llum.

Solució de fenol:cloroform:

Barreja de 50% de solució de fenol i solució de cloroform:isoamílic.

Solució de cloroform:isoamílic:

24 volums de cloroform i 1 volum d'alcohol isoamílic.

Solució SSC x 20:

0.015 M Citrat trisòdic, pH 7.0

0.15 M NaCl

Solució TE:

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

0.5 M EDTA, pH 8.0

3.6.2 AÏLLAMENT DE DNA PLASMÍDIC

Per a l'aïllament de DNA plasmídic es va seguir una modificació del mètode descrit per Feliciello i Chinali (1993) [40].

- ❑ Es va fer créixer durant 18 h. la soca desitjada a 37°C en medi LB amb l'antibiòtic o antibiòtics adient/s.
- ❑ Seguidament, es va sedimentar el cultiu bacterià per centrifugació a 8.000 x g durant 10 min a temperatura ambient i fou decantat el sobrenedant.
- ❑ Per tal de rentar les cèl·lules, el sediment es va resuspendre en 0.5 ml de solució amortidora STE fred i fou centrifugat de nou a 4°C durant 5 min.
- ❑ Es va aspirar el sobrenedant i es van resuspendre les cèl·lules en 125 µl de solució I freda (és molt important que aquesta resuspensió sigui completa).
- ❑ S'afegí a la mescla 250 µl de solució II i s'homogeneïtzà la mostra per inversió del tub uns sis cops.
- ❑ Posteriorment, es va incubar en gel uns cinc minuts per tal de permetre la lisi cel·lular i es va afegir, transcorregut aquest temps, 375 µl de solució III. S'agità la mescla vigorosament i s'incubà en gel durant 10 min.
- ❑ El lisat cel·lular es va centrifugar a 10.000 x g a 4°C durant 10 min i fou transferit el sobrenedant resultant a un tub estèril procurant no prendre gens de sediment.

- Es precipità el DNA plasmídic afegint 350 µl de 2-propanol i sedimentant-lo per centrifugació a temperatura ambient durant 5 min. Un cop sedimentat, es va assecar el DNA al buit.
- Per tal d'eliminar el RNA de la mostra, s'incubà la mescla en presència de 125 µl de 10 mg/ml de RNAsa en solució amortidora TE i es va incubar 15 min a 37°C.
- Seguidament, es tornà a precipitar el DNA plasmídic afegint 150 µl de 88% 2-propanol i 0.2 M d'acetat potàssic i incubant-lo 10 minuts a temperatura ambient. Es va centrifugar a 10.000 x g a temperatura ambient durant 5 min, es va assecar el sediment i fou resuspès en 40 µl d'aigua destil·lada estèril.
- Opcionalment, i segons el grau de puresa desitjat, en aquest punt es va afegir fenol al DNA plasmídic obtingut.

STE:

NaCl	0.1 M
Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
EDTA, pH 8.0	1 mM

Solució I:

Glucosa	0.9 g
Tris-HCl, pH 8.0	25 mM
EDTA, pH 8.0	10 mM

Solució II:

NaOH	0.2 M
SDS	1%

Solució III:

Acetat potàssic	4 M
Àcid acètic	2M

3.7 TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DE DNA

3.7.1 DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ

Els enzims de restricció utilitzats van ser subministrats per *New England Biolabs* i Fermentas (Lituània) i es van utilitzar segons les indicacions del fabricant.

- El contingut total de cada digestió va ser de 50µl que incloïen:
 - 1 µl d'enzim (aproximadament 10 unitats)
 - 5 µl de tampó recomanat pel fabricant
 - 25 µl de producte de DNA
 - Aigua de MilliQ estèril fins a 50 µl
- Les digestions es van incubar tota la nit a 37°C.
- Finalment, els enzims es van inactivar a 65°C durant 10 minuts.

3.7.2 PURIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA

Els fragments de DNA digerits amb enzims de restricció, es van purificar abans de ser utilitzats en posteriors reaccions enzimàtiques. Es va utilitzar el *kit* de la casa comercial Qiagen, *MinElute Reaction Cleanup* (Ref. 28204).

3.7.3 PRECIPITACIÓ DE DNA

Es va seguir el protocol descrit per Sambrook *et al.* (1989) [114] amb alguna modificació:

- S'afegiren 0.1 volums de 3 M acetat sòdic pH 4.8 i 2 volums d'etanol absolut fred.
- Es va incubar en un bany de gel sec/etanol durant 30 min o a -20°C durant 2 h.
- Posteriorment, fou centrifugat a 4°C a 10.000 x g durant 30 min.
- Es va rentar amb etanol al 70% fred.
- S'assecà al buit i es va resuspendre en un volum adient d'aigua destil·lada o solució amortidora TE, segons els casos.

3.7.4 TÈCNICA D'ELECTROFORESI EN CAMP POLSANT (*PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS*)

Per a la realització de l'electroforesi de camp polsant, s'utilitzà el mètode descrit per Maslow *et al.* [71] i Schwartz *et al.* [118], modificats lleugerament, tal i com es descriu a continuació. Totes les electroforesis es van dur a terme en una unitat CHEF-DRIII (*BioRad, Hercules, CA, USA*).

La tècnica d'electroforesi en camp polsant s'utilitza per analitzar fragments de gran mida que no poden separar-se per tècniques electroforètiques convencionals en les que s'aplica un camp constant o estàtic. La tècnica d'electroforesi en camp polsant es caracteritza per tenir la orientació del camp elèctric variable periòdicament.

Aquesta tècnica s'ha aplicat amb freqüència en estudis epidemiològics en bacteriologia, per tal d'obtenir patrons de restricció senzills que representen DNA cromosòmic bacterià distribuït en unes poques bandes amb mobilitat electroforètica diferent.

En el nostre estudi vam utilitzar aquesta tècnica per detectar la presència de plàsmidis en la soca multiresistent HUB 198351.

3.7.4.1 Extracció del DNA

- ❑ Es va fer créixer *M.morganii* en un medi ric a 37°C durant 24 hores.
- ❑ Es va resuspendre una colònia en 500µl de tampó PIV i a continuació es centrifugà durant 3 min a 13.000 rpm.
- ❑ S'eliminà el sobrenedant i es va resuspendre el sediment en 200µl de PIV.
- ❑ Es van barrejar 100µl de la solució anterior amb 100µl d'agarosa fosa al 1'5% (es va deixar refredar fins a 42°C aproximadament).
- ❑ Es van distribuir gotes de 20µl de la barreja anterior sobre vidres rentats amb alcohol 70%.
- ❑ A continuació es van cobrir les gotes amb portaobjectes coberts de parafilm i rentats amb alcohol 70% (prèviament s'havien col·locat separadors laterals per impedir que les gotes s'aixafessin massa).
- ❑ Es deixà solidificar l'agarosa durant 10 min aproximadament, i es van obtenir discos d'agarosa que contenien la soca de *M.morganii* HUB198351.

- ❑ Per tal que es produís la lisi cel·lular, es van introduir els discos en 1ml de tampó de lisi (ST) i s'incuben a 37°C durant 5 hores.
- ❑ Posteriorment es decantà la solució ST i es va substituir per una solució (ES) de proteinasa-K recent preparada.
- ❑ S'incubà tot durant 18h a 50°C.
- ❑ Es decantà la solució de proteinasa-K i s'afegí tampó TE.
- ❑ A continuació es disposaren els tubs en un agitador orbital i s'agitaren suaument durant 30-45 min.
- ❑ Finalitzats els rentats, es van mantenir els discos a 4°C en tampó TE, fins a la seva utilització.

Tampó PIV:

Tris-HCl 1 M, pH 8	10 ml
NaCl 5M	200 ml
Aigua destil·lada, q.s.p.	1l.
Autoclavar durant 15min a 121°C.	

Solució d'agarosa al 1'5% :

Agarosa	1.5 g
Tampó TBE x 1	100 ml

Escalfar la barreja en un bany a 100°C o en un microones fins que es dissolgui l'agarosa.

Solució bàsica de Lisi (ST):

Tris-HCl 1 M, pH 8	0.6ml
NaCl 5M	20 ml
EDTA 0.5M pH 8	20 ml
Desoxicolat Sòdic 10% (w/v)	2 ml
Sarcosil 10% (w/v)	5ml

Autoclavar durant 15min a 121°C.

Abans de la seva utilització s'ha d'afegir:

5µl/ml d'una solució de RNAsa 10mg/ml

2µl/ml d'una solució de Lisozim 50mg/ml.

Solució ES per a incubació amb proteïnasa-K:

EDTA 0.5M pH 8	90 ml
Sarkosyl 10% (w/v)	10ml

Autoclavar aquesta solució durant 15min a 121°C i afegir proteïnasa-K a raó de 1 mg/ml just abans de la seva utilització.

Tampó TE:

Tris-HCl 1 M, pH 7.5	10 ml
EDTA 0.5M pH 8	2 ml
Aigua bidestil·lada, q.s.p.	1l

Autoclavar durant 15min a 121°C.

3.7.4.2 Digestió del DNA amb enzims de restricció

La digestió del DNA es realitzà amb l'enzim de restricció SpeI, que és un enzim de baixa freqüència de tall. La solució de restricció ha de ser recent pel seu ús.

- En 40 µl de solució SR s'afegí el disc d'agarosa corresponent.
- A continuació s'incubà durant 18h a 37°C.

Solució de restricció (SR):

2.5U per reacció de l'enzim SpeI

Tampó SpeI x1

0.4µl BSA (*Bovin Seric Albumin*)

3.7.4.3 Visualització dels fragments

- Es va preparar un gel d'agarosa al 1% en 0'5x TBE en la cubeta de PFGE de *BioRad*.
- A continuació es va introduir a cada pou del gel el disc corresponent. També es van incloure controls de pes molecular (figura 3.1.) que determinaren l'efectivitat de l'electroforesi.
- Finalment es van separar els fragments de restricció durant 20h a 14°C i 6 v/cm amb polsos de temps d'entre 0.5 i 15 s. Es va tenyir el gel tal i com es descriu en l'apartat 3.10.3

Solució d'agarosa al 1% (100ml):

Agarosa	1g
TBE x 1	100ml

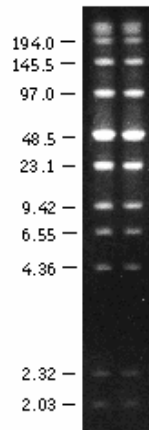


Figura 3.1. Marcador *Low Range PFG*

3.7.5 ELECTROFORESI DE DNA EN GELS D'AGAROSA

Per separar i identificar fragments de DNA s'utilitzà com a mètode rutinari l'electroforesi en gels d'agarosa ,segons el procediment descrit per Sambrook *et al.* (1989) [114].

Els fragments de DNA es van separar bullint 1% agarosa (DNA cromosòmic) o 0.7% agarosa (DNA plasmídic) en una solució de Tris-acetat (TAE). Les mostres s'acondicionaren per a la seva càrrega en el gel mitjançant l'addició de solució blau de bromofenol a una proporció 1:5 del volum total de les mateixes. Es va realitzar l'electroforesis a un voltatge constant de 85 volts en solució TAE. La mida aproximada dels fragments de DNA fou determinada per comparació amb la dels marcadors moleculars *Gene Ruler 100bp DNA ladder Plus* (Fermentas, Lituània) (Figura 3.2a) o DNA del bacteriòfag λ digerit amb l'enzim HindIII (Figura 3.2b). Per visualitzar els fragments de DNA es va tenyir el gel d'agarosa amb bromur d'etidi a una concentració final de 0.5 mg/ml i es va observar amb llum UV de 360 nm de longitud d'ona.

Solució TAE x 50

Tris	242 g
0.5 M EDTA, pH 8.0	100 ml
Àcid acètic glacial	57.1 ml
Aigua destil·lada, q.s.p.	1 l

Solució blau de bromofenol x 6

Blau de bromofenol	0.25%
Xylen-cyanol	0.25%
Glicerol	30%

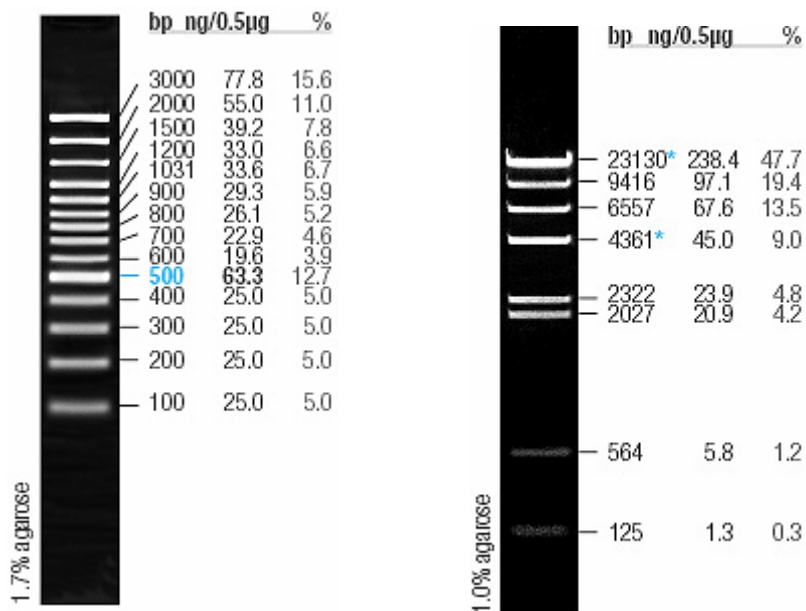


Figura 3.2. (a) Marcador *Gene Ruler 100bp DNA ladder Plus*. (b) Marcador λ -HindIII.

3.7.6 RECUPERACIÓ DELS FRAGMENTES DE DNA A PARTIR DE GELS D'AGAROSA

Es va utilitzar el mètode de *Gene-Clean* seguint la metodologia que s'exposa a continuació:

- ❑ Es va preparar el gel d'agarosa tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.6.5 en solució TAE x 1.
- ❑ Es va retallar la banda de DNA desitjada del gel d'agarosa, intentant prendre la menor quantitat d'agarosa que no contingues DNA i fou posat en un tub. S'afegí 3 volums

de solució 6 M NaI i s'incubà a 55°C durant 5 min. Aquesta incubació permet extreure el fragment de DNA de l'agarosa. Si en acabar l'agarosa no s'ha dissolt, deixar el tub a temperatura ambient durant uns minuts (el fet d'excedir el temps d'incubació a 55°C pot afectar el DNA).

- Seguidament, es va afegir el *glassmilk* (una matriu de sílica que s'utilitza per recuperar fragments de DNA a partir de gels d'agarosa), uns 5 µl per cada 5 µg de DNA (en el cas que la quantitat del fragment de DNA sigui major, afegir 1 µl més de *glassmilk* per cada 0.5 µg de DNA) i es va incubar la solució en gel durant 10 min.
- La solució fou centrifugada a 8.000 x g durant 1 min i es descartà el sobrenedant.
- Es va tornar a centrifugar i s'aspirà el sobrenedant que restava per les parets del tub. Posteriorment, es va rentar tres cops el sediment amb 1 ml de solució de rentat freda. Es va centrifugar a 8.000 x g durant 1 min a 4°C. L'últim cop és important que no quedi res de sobrenedant.
- El sediment s'assecà al buit i va ser resuspès en un volum adequat d'aigua destil·lada estèril.
- La solució fou incubada a 55°C durant 3 min, per tal d'extreure els fragment de DNA de la matriu de sílica i es va centrifugar per separar el sobrenedant.
- Es va repetir l'operació anterior amb el sediment, tornant a resuspendre'l en aigua destil·lada.
- Es van ajustar els sobrenedants obtinguts.

Glassmilk:

Preparar 10 g de sílica en 100 ml de solució PBS. Deixar sedimentar durant 2 h i treure el sobrenedant. Repetir l'operació i, finalment, centrifugar a 2000 x g durant 2 min i resuspendre el sediment en 3 M NaI a una concentració de 100 mg de sílica/ml.

Solució PBS (*Phosphate Buffer Saline*):

NaCl	80
KH ₂ PO ₄	2.0 g
Na ₂ HPO ₄	11.44 g
KCl	2.0 g
Aigua destil·lada, q.s.p.	1 l

Solució de rentat:

NaCl	50mM
Tris-HCl pH 7.5	10 mM
EDTA pH 8.0	2.5 mM
Etanol	50% (v/v)

3.8 DETERMINACIÓ DE SEQÜÈNCIES DE GENS

Es van realitzar extraccions de DNA cromosòmic i plasmídic de ambdues soques en estudi de *M.morganii* i es van amplificar per PCR regions que contenien integrons en el DNA plasmídic, segons el mètode descrit per Levesque *et al.* [67]. En la taula III es presenten els oligonucleòtids utilitzats. Posteriorment a la purificació i preparació dels fragments amplificats obtinguts mitjançant la PCR, es van portar al Servei de Seqüenciació dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona. La determinació de les seqüències d'aquestes regions es va dur a terme automàticament amb deoxinucleòtids fluorescents, amb el *ABI PRIMS Big Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit*.

- Els oligonucleòtids 3'CS i 5'CS utilitzats per amplificar els integrons foren els dissenyats per Levesque *et al.* [67]. A més es van utilitzar els oligonucleòtids INT21 I INT22 com a primers interns de l'integró Int2,0.

Taula III. Relació dels oligonucleòtids emprats en l'amplificació dels integrons Int1,5 i In2,0.

<i>Primer</i>	<i>Seqüència de nucleòtids</i>
3'CS	5'AAGCAGACTTGACCGAT3'
5'CS	5'GGCATCCAAGCAGCAAGC 3'
INT21	5'GAGTCTTGAATGGTGAAC3'
INT22	5'ACTGCGGAGCCGTACAAATG3'

- El contingut total de cada reacció de PCR va ser de 50µl que incloïen:
 - 2 µl de DNA plasmídic o cromosòmic
 - 0.25 µl de Taq polimerasa 5 u/µl (1.25 u/reacció), (Fermentas, Lituania).
 - 5 µl de tampó10 × (concentració final 1 ×)
 - 5 µl de dNTPs 2000 µM (concentració final 200 µM)
 - 5 µl de MgCl₂ 25 mM (concentració final 2.5 mM)

- 0.5 µl de cada oligonucleòtid 100 µM (concentració final 1 µM)
 - Aigua de MilliQ estèril fins 50 µl
- Les condicions dels cicles de la PCR utilitzades en tots els casos foren les següents:

Temperatura	Temps	Nombre de cicles
94°C	5'	1
94°C	1'	35*
55°C	1'	
72°C	5'	
72°C	10'	1

*S'afegiren 5 segons a cada cicle de la fase d'hibridació.

Els productes de PCR es van visualitzar amb bromur d'etidi després de fer una electroforesis en gel d'agarosa.

3.9 COMPARACIÓ I ALINEACIÓ DE SEQÜÈNCIES

En la actualitat hi ha diversos mètodes per comparar i alinear seqüències, es poden diferenciar dos grups fonamentals: els mètodes formals i els mètodes aproximatiu. Els mètodes formals possibiliten la realització de cerques complexes que permeten determinar coincidències exactes, multiplicitats, insercions i delecions, però comporten més temps per la seva realització. Per altre banda, els mètodes aproximatiu també possibiliten el mateix tipus de determinacions, però no garanteixen trobar les millors comparacions i poden perdre algunes similituds significatives. Els més utilitzats són FASTA i BLAST, ambdós basats en la realització d'anàlisis comparatiu entre seqüències.

En aquest treball s'ha utilitzat l'algoritme BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) en la comparació i cerca de seqüències homòlogues. La principal característica de BLAST és la seva velocitat, facilitant en pocs minuts qualsevol cerca en totes les bases de dades.

3.10 HIBRIDACIÓ DE DNA PLASMIDIC AMB UNA SONDA ESPECÍFIC

3.10.1 TRANSFERÈNCIA DEL GEL PER CAPILARITAT A UN FILTRE DE NYLON. TÈCNICA “SOUTHERN”.

En el nostre treball la tècnica de “Southern” es va fer servir per detectar la presència dels fragments de DNA dels integrons en el plasmidi mitjançant una sonda específica.

Abans de procedir a la transferència per capilaritat es van dur a terme els següents passos:

- ❑ Es va realitzar un gel d'agarosa tal i com es descriu en l'apartat 3.6.4. amb el plasmidi digerit amb l'enzim de restricció BamHI.
- ❑ Es va desnaturalitzar el gel afegint NaOH 0,5M i NaCl 1,5M durant 45 minuts.
- ❑ La neutralització del gel es va realitzar afegint Tris-HCl (pH8.0) 1M i NaCl 1,5M durant 20 minuts.

El procés de transferència per capilaritat va ser el següent:

- ❑ Es va omplir una cubeta amb NaOH de manera que el tampó de transferència passés de la cubeta al gel i d'aquest a la membrana de nylon (*BioRad*)
- ❑ El muntatge es realitzà tal i com s'esquematitza a la figura 3.
- ❑ La transferència es desenvolupà durant tota la nit.
- ❑ Passades 24 hores, es va fixar el DNA a la membrana irreversiblement a través de raigs UV durant uns minuts. Aquesta unió irreversible es produeix per la formació de enllaços covalents entre les molècules de la membrana i el DNA.
- ❑ Seguidament es va rentar la membrana de nylon amb aigua destil·lada estèril i es va assecar a 37°C durant 24 hores.

3.10.2 OBTENCIÓ DE LA SONDA DE DNA

Es va realitzar una PCR amb els *primers* 3'CS i 5'CS, tal i com es descriu en l'apartat 3.7., per generar els fragments de DNA dels integrons que es farien servir com a sonda.

Un cop purificat aquest DNA lineal es va seguir el procediment descrit en el *DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Applied Science, Alemanya, ref. 11093657910)* per tal d'obtenir les sondes de DNA marcades amb digoxigenina-11-dUTP (figura 3.3), aquesta molècula s'incorpora cada 20-25 nucleòtids en la nova cadena complementària de DNA que es sintetitza a través de l'enzim Klenow. D'aquesta manera es van obtenir unes sondes específiques marcades amb digoxigenina.

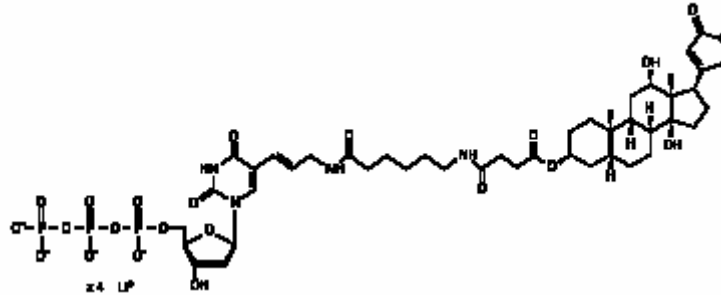


Figura 3.3. Molècula DIG-11-dUTP

3.10.3 PREHIBRIDACIÓ I HIBRIDACIÓ DEL FILTRE AMB LA SONDA ESPECÍFICA

L'objectiu de la prehibridació és evitar la unió inespecífica de la sonda que més tard incubarem amb el filtre i bloquejar els grups + de la membrana de nylon que no estan ocupats per el DNA transferit. El procés que es va seguir a la prehibridació i hibridació va ser el següent:

- ❑ Es van afegir 20ml de la solució de prehibridació, prèviament atemperada a 42°C sobre el filtre de nylon evitant la formació de bombolles.
- ❑ Es va incubar el filtre en agitació suau a 42°C durant 30 minuts.
- ❑ 15 minuts abans de què s'arribés als 30 minuts de prehibridació es va preparar la sonda, és a dir, es va desnaturalitzar el DNA marcat durant 10 minuts a 100°C en un bany sec seguit de 2 minuts en gel.
- ❑ S'afegí la sonda i es va deixar incubant a 42°C en agitació durant 18 hores (hibridació).

3.10.4 RENTATS I DETECCIÓ DE LES BANDES ESPECÍFIQUES D'HIBRIDACIÓ

Finalitzada la hibridació el filtre es va rentar amb solucions amortidores de pH de força iònica progressivament menor per eliminar la sonda que no hagués hibridat. Els passos següents foren:

- ❑ Fer 2 rentats de 5 minuts a T^a ambient i agitació suau amb 25 ml de la solució de rentat 1.
- ❑ Seguidament, fer 2 rentats en agitació suau de 15 minuts a 52°C amb 25 ml de la solució de rentat 2 atemperada a 52°C.
- ❑ Rentar la membrana amb la solució 3 durant 5 minuts a T^a ambient.

Immediatament es va procedir a la detecció de les bandes específiques de hibridació, en el nostre treball el fragment de restricció que conté seqüències de homologia amb la sonda el vam detectar per un mètode enzimàtic ja que la nostra sonda estava marcada amb digoxigenina.

La detecció es realitzà mitjançant un anticòs anti-DIG que s'uneix a la sonda, aquest anticòs porta unida covalentment una fosfatasa alcalina que transforma el substrat cromogènic (NBT/BCIP) en un producte de color blau, de manera que en les zones de la membrana on s'ha donat la reacció, és a dir, allà on s'ha unit el anticòs, veurem unes bandes blaves. En la figura 3.4 s'esquematitza el protocol de detecció dels fragments hibridats amb la sonda marcada amb digoxigenina (DIG).

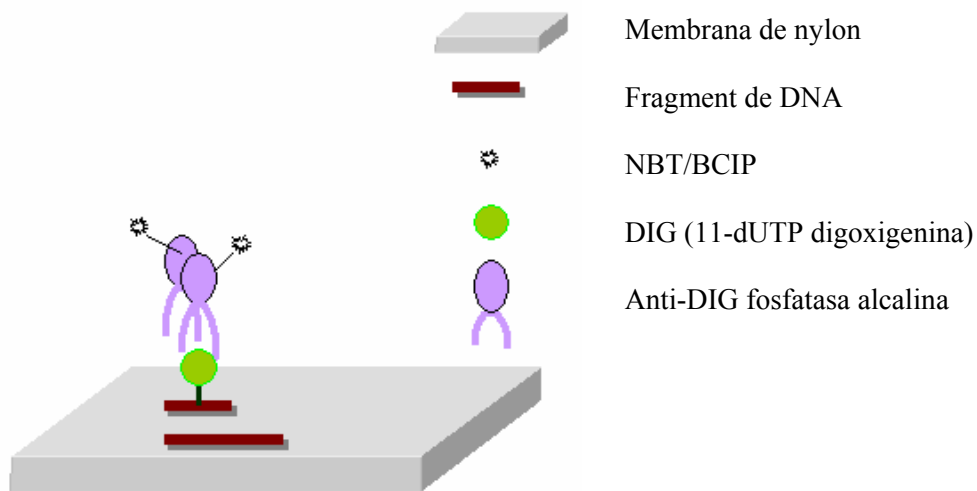


Figura 3.4. Detecció amb la sonda marcada amb digoxigenina

Per a la detecció es va seguir els següent protocol:

- ❑ Es va incubar la membrana durant 30 minuts amb 20 ml de la solució de bloqueig 1X.
- ❑ Seguidament, es va incubar durant 30 minuts amb 10 ml de solució de bloqueig 1X amb 1µl d'anti-DIG AP conjugada (*Roche Applied Science, Alemanya*).
- ❑ Es va fer 2 rentats durant 15 minuts amb 15 ml de la solució 3 de rentat.
- ❑ Durant 5 minuts es va equilibrar amb 20 ml de la solució de detecció.
- ❑ Es van afegir 10 ml de solució de detecció amb 85µl de solució de revelat NBT/BCIP (*Roche Applied Science, Alemanya*).
- ❑ Es va mantenir la membrana en la obscuritat fins que passades 24 hores va aparèixer la banda i es va parar la reacció amb 10 ml d'aigua.

La comparació d'aquesta banda amb la fotografia del gel d'agarosa transferit, ens va permetre identificar els fragments de restricció que contenen aquesta seqüència de DNA homòloga a la sonda marcada.

Solució de prehibridació:

SSC x 5

Formamida x 50

N-laurosylososini 0,1 x w/v

SDS 0,02 x w/v

Solució de bloqueig 2x (*Roche Applied Science, Alemanya*)

Solució de rentat 1:

SSC 2 x
SDS 0,1%

Solució de rentat 2 (T^a 52°C):

SSC 0,1 x
SDS 0,1%

Solució de rentat 3:

Àcid màlic 0,1M
NaCl 0,1M
Tween 20 (pH 7,5) 0,3% w/v

Solució de detecció (pH 9,5):

Tris HCl 0,1M
NaCl 0,1M
MgCl₂ 50mM

3.11 ANÀLISI DE PROTEÏNES DE LA MEMBRANA EXTERNA

3.11.1 AÏLLAMENT DE MEMBRANA EXTERNA

S'utilitzà el mètode descrit per Puig *et al.*, (1993) que breument es descriu a continuació.

- Es va fer créixer la soca desitjada en 10 ml de medi durant 18 hores.
- Seguidament, es va centrifugar a 8.000 x g durant 20 min a temperatura ambient i es va resuspendre el sediment en 5 ml de solució amortidora de pH, 10 mM Hepes pH 7.4.
- Posteriorment, es tornà a centrifugar la suspensió i es resuspenguè en 2 ml de la mateixa solució.
- La suspensió cel·lular fou sonicada durant tres períodes d'un minut cadascun, amb intervals de 30 segons i mantenint la mostra en un bany de gel. Amb l'objectiu de retirar les cèl·lules senceres, es centrifugà la mostra durant 20 min a 8.000 x g.
- El sobrenedant obtingut fou centrifugat a 100.000 x g durant 90 min a 20°C a fi de sedimentar les membranes totals. Per tal de solubilitzar la membrana interna, es va

rentar el sediment en 0.2 ml de SLS (laurilsarcosinat sòdic) al 2% en solució amortidora 10 mM HEPES pH 7.4 i es deixà reposar durant 30 min a temperatura ambient.

- Un cop transcorregut aquest temps, es sedimentà la membrana externa per centrifugació a 60.000 x g durant 60 min a 20°C.
- El sediment fou resuspès en 50 µl de solució 10 mM Hepes pH 7.4.

3.11.2 PURIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA OMP36

Per a la purificació de la proteïna Omp36 en les soques *M.morganii* HUB198351 i CECT173 es va seguir la tècnica descrita per Benz [15], tal i com es descriu a continuació:

- Es van fer créixer les soques a 37°C i en agitació durant 18 hores en 500 ml de medi LB.
- Seguidament, es va sedimentar el cultiu bacterià per centrifugació a 8.000 x g durant 10 min a temperatura ambient i es descartà el sobrenedant.
- Es va resuspendre el sediment en 5 ml de solució amortidora 50 mM Tris-HCl pH 7.2 i es va centrifugar de nou a temperatura ambient durant 10 min.
- Les cèl·lules foren resuspeses en 5 ml de solució 50mM Tris-HCl pH 7.7
- Amb l'objectiu d'obtenir envoltas bacterianes, les cèl·lules foren trencades a 6.2 MPa en una premsa de French repetint tres vegades el cicle.
- Per tal de retirar les cèl·lules senceres, es centrifugà la mostra durant 10 min a 8.000 x g a temperatura ambient.
- El sobrenedant fou centrifugat a 100.000 x g durant 45 min a 20°C per tal de sedimentar les membranes totals.
- Amb el propòsit de solubilitzar la membrana interna, es va rentar el sediment en 5 ml de SDS (dodecilsulfat sòdic sòdic) al 2% en solució 10 mM Tris-HCl pH 7.7 i 10mM de EDTA, es deixà reposar durant 30 min a temperatura ambient.
- Un cop transcorregut aquest temps, es sedimentà la membrana externa per centrifugació a 100.000 x g durant 45 min a 23°C.
- El sediment fou subjecte a un segon rentat amb SDS.
- El sediment així obtingut fou resuspès en una solució que contenia 10 mM Tris-HCl pH 7.7, 10mM de EDTA i 2% de detergent Genapol® (Fluka).

- ❑ La mescla fou incubada durant 30 minuts a temperatura ambient i, posteriorment, centrifugada a 100.000 x g durant 30 minuts a 23°C. El sobrenedant obtingut contenia la proteïna Omp36 purificada. El detergent Genapol® és utilitzat per solubilitzar les porines de la membrana externa.
- ❑ Per tal de visualitzar el grau de puresa de la proteïna es va preparar un gel SDS-PAGE al 12% i es va tenyir amb Blau de Coomassie.

3.11.3 VISUALITZACIÓ D'OMP PER ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA

Per visualitzar les proteïnes de la membrana externa es realitzaren electroforesis en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants.

Totes les electroforesis es van dur a terme en un aparell Mini-Protean II (*BioRad*). La mida dels gels fou de 100 mm d'amplada, 80 mm de llargada i 1 mm de guix.

- **Preparació del gel de poliacrilamida**

La mostra es visualitzà en gels de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (SDS-PAGE), segons el mètode descrit per Laemmli (1970) i modificat per Annes *et al.*, (1974). Les concentracions d'acrilamida foren del 12% al gel separador i del 4% al gel apilador o iniciador.

Gel separador (12% d'acrilamida):

Aigua destil·lada	1.68 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	1.25 ml
SDS 10% (w/v)	50.0 µl
Solució d'acrilamida/bisacrilamida	2.0 ml

Aquesta solució es desgasà al buit durant 15 min. A continuació s'hi afegiren els component següents:

Persulfat amònic 10%	25.0 µl
TEMED	2.5 µl

En ocasions, al gel separador se li afegí urea fins a una concentració final de 4 M. La urea permet que la resolució de bandes a la zona corresponent als pesos moleculars entre 25 i 45 kDa sigui més elevada. En aquest cas, la composició d'aquest gel separador fou la següent.

Gel iniciador (4% d'acrilamida):

Aigua destil·lada	3.05 ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1.25 ml
SDS 10% (w/v)	50.0 µl
Solució d'acrilamida/bisacrilamida	0.65 ml

Aquesta solució també es desgasà al buit durant 15 min i a continuació s'afegiren els components següents:

Persulfat amònic 10%	25.0 µl
TEMED	5.0 µl

Persulfat amònic al 10%: S'ha d'utilitzar immediatament després d'haver-se preparat o bé distribuir-lo en alíquotes i conservar-lo a -20°C.

Solució d'acrilamida/bisacrilamida:

Acrilamida	29.2 g
N',N'-bis-metilenacrilamida	0.8 g
Aigua destil·lada, q.s.p.	100 ml

La solució es filtra i es guardà a 4°C a la foscor.

- **Recorregut electroforètic**

El recorregut electroforètic (en solució amortidora de pH o solució de recorregut) es realitza a voltatge variable de 70 V al gel iniciador i de 110 V al gel separador. Els gels d'urea 4M es deixen córrer durant 30 min més, després que el front s'escapi per la part inferior.

Solució de recorregut (x 5):

Tris base	15.0 g/l
Glicina	72.0 g/l
SDS	5.0 g/l

equilibrat a un pH de 8.3

• **Tenyiment de les mostres**

Pel tenyiment de les mostres es van utilitzar dos mètodes diferents.

Mètode 1:

- S'afegí una solució I de Blau de Coomassie als gels i es va mantenir durant una hora en agitació constant.
- Posteriorment, es va decantar la solució de tenyiment i s'afegí la solució II de fixació, mantenint-la durant una hora amb dos o tres canvis de solució nova.
- Finalment, es va tornar a hidratar el gel amb solució III. Es pot mantenir el gel en aquesta solució durant força temps.

Solució I:

Metanol	450 ml
Àcid acètic	50 ml
Blau de Coomassie	1.0 g
Aigua destil·lada	450 ml

Solució II: Solució composta per metanol, àcid acètic i aigua destil·lada en proporció 5:1:5.

Solució III: Solució composta per aigua destil·lada, metanol i àcid acètic en proporció 18:1:1.

Mètode 2:

Un segon mètode utilitzat per tenyir les mostres fou el de tenyiment en plata reversible, tal i com es descriu a continuació:

- Es va fixar el gel 10 minuts en la solució A.
- A continuació es van realitzar dos rentats de 5 minuts amb aigua bidestil·lada.
- Seguidament, es va sensibilitzar el gel amb 50 ml de la solució B 1x durant 1 minut i dos rentats de 20 segons amb aigua bidestil·lada.

- ❑ Es va rentar amb aigua destil·lada a la que s'afegiren 10 ml de la solució D 1x només durant uns minuts.
- ❑ Finalment es va revelar amb 50 ml de la solució D x1 + 100 µl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10mg/ml + 25 µl de formaldehid al 37% fins a l'aparició de les bandes en el gel.
- ❑ Es va aturar la coloració afegint 2,5ml d'àcid cítric 2,3M i mantenir el gen en aigua bidestil·lada.

Solució A:

50ml d'etanol al 50%

25 µl de formaldehid al 37%

Solució B 5x:

0,5g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

500ml d'aigua bidestil·lada

Solució C:

0,06g de nitrat de plata

50 ml d'aigua bidestil·lada

Solució D 5x:

75g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

500ml d'aigua bidestil·lada

3.12 EXPERIMENTS PER MESURAR LA CAPACITAT FORMADORA DE PORUS: *BLACK LIPID BILAYER TECHNIQUE*.

3.12.1 MESURA DE LA CONDUCTÀNCIA DE CANALS SIMPLES

Hi ha una gran varietat de sistemes de reconstitució que han permès demostrar *in vitro* la funció de canals formadors de porus que tenen les porines.

El primer mètode fou descrit per Nikaido l'any 1973 i desenvolupat més tard per Nakae (1975). Consisteix en formar proteoliposomes a partir de fosfolípids, LPS i porines i ser resuspesos en una solució que contingui un sucre petit marcat radiactivament amb ^{14}C (solut permeable) i un polisacàrid gran marcat amb ^3H (solut impermeable que serveix de control, per exemple, el dextrà). A partir d'aquests proteoliposomes es fan mesures de reflux de radioisòtops i es pot determinar el límit d'exclusió aproximat de la porina.

El segon mètode també fou desenvolupat per Nakae, consisteix en la formació de proteoliposomes que continguin un enzim en el seu interior (α -glucosidasa, tripsina o fosfatasa alcalina). Es realitzen càlculs de permeabilitat dels substrats a través de les porines i seguint les cinètiques de Michaelis-Menten.

El tercer mètode consisteix en realitzar mesures òptiques de l'inflament osmòtic de liposomes per estimar la velocitat d'entrada de substàncies. Consisteix en formar proteoliposomes i observar-los quan s'afegeix un substrat. Si el substrat passa a través de les porines, hi ha un influx d'aigua continu per mantenir l'equilibri osmòtic. A mesura que el liposoma augmenta de grandària, els índexs de refracció canvien i és possible realitzar mesures per densitat òptica per observar aquests canvis.

Finalment, el quart i últim mètode és un procediment de mesura de la conductivitat d'ions a través de les porines. El procés fou desenvolupat per Benz i Hancock l'any 1981.

En aquesta tesi es va utilitzar el quart mètode posat a punt al laboratori del Prof. R. Benz, basat en la mesura de la conductància, en diverses condicions, de porines que són afegides a una cambra de tefló separada en dos compartiments per un envàs també de tefló que deixa en el centre una petita finestra amb una superfície d'aproximadament 0.4 mm^2 (fig.

3.12.1) [13,16]. Al voltant d'aquest forat es formarà una bicapa lipídica, que amb l'ajut d'un telescopi observarem de color negre (quan els lípids es disposen en forma de bicapa no es reflecteix la llum i visualment és negre).

El mètode de preparació consisteix en omplir ambdues bandes de la cubeta amb una solució salina que contingui el ió que es vol utilitzar, posteriorment formar la bicapa lipídica en la finestra. En aquestes condicions no hi pot haver pas de ions a través de la bicapa, i per tant no es detecta pas de corrent. Les solucions salines aquoses (grau analític, subministrades per la casa Merck, Alemanya) foren utilitzades sense solució amortidora i a un pH aproximat de 6. La temperatura fou mantinguda durant tots els experiments a 20°C. Les membranes es van formar a partir d'una solució de difitanoi fosfatidilcolina (DiPhPC) al 1% (pes/volum) (*Avanti Polar Lipids*, Alabaster, AL) en *n*-decà que es van dipositar en aquesta cambra de tefló. Una vegada es va formar la bicapa lipídica, aquesta és relativament estable, de manera que es poden anar provant condicions diferents.

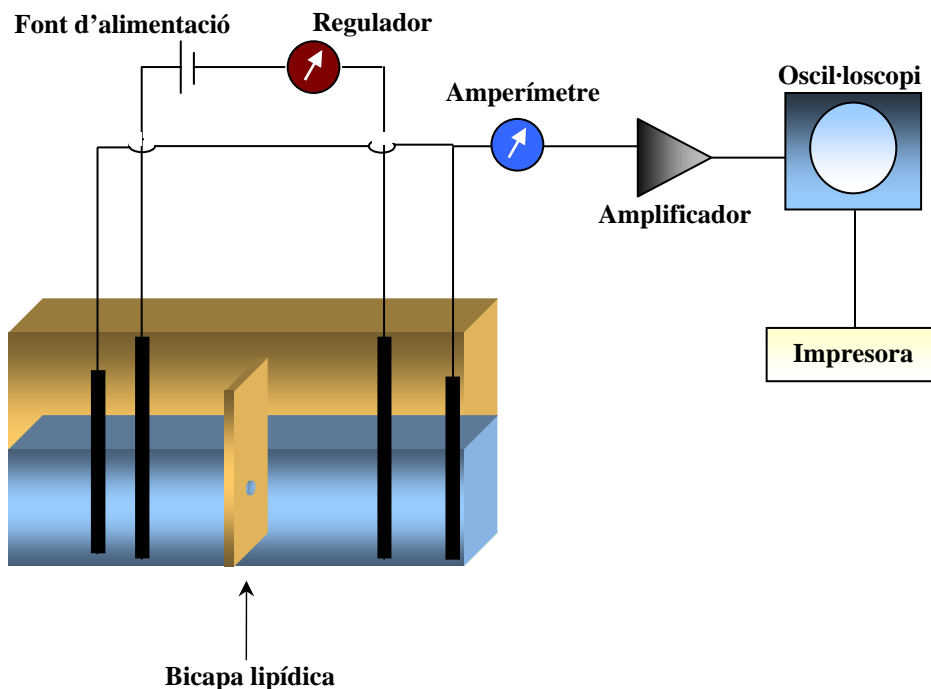


Figura 3.5. Esquema del sistema emprat per la tècnica de *Lipid Planar Bilayer*.

L'instrument està provist d'un parell d'elèctrodes connectats a una font d'alimentació, un regulador i un parell d'elèctrodes de mesura de Ag/AgCl connectats en sèrie a un amplificador de corrent (Keithley 427), un oscil·loscopi i una registrador. El senyal d'amplificació va ser monitoritzat amb l'oscil·loscopi i el registrador. Quan la bicapa lipídica va estar ben estabilitzada, és a dir, era òpticament negra a la llum reflectida, es va addicionar a un dels compartiments o als dos, la solució que contenia la proteïna Omp36 pura de *M. morgani* (aproximadament 100 ng/ml). A un potencial de membrana de 20 mV es van enregistrar les pertorbacions de la conductància de la membrana artificial, que posteriorment van servir per calcular la conductivitat (G).

Els experiments es van realitzar en les següents solucions salines:

- a) KCl a les concentracions de 0.1, 0.3, 1.0 i 3.0 M
- b) LiCl a la concentració de 1.0 M.
- c) Acetat potàssic a la concentració de 1.0 M.

3.12.2 ESTUDI DE LA SELECTIVITAT DEL CANAL I AVALUACIÓ DE LA DEPENDÈNCIA DE VOLTATGE

Per analitzar si la conducció de la membrana provocada per l'Omp36 depenia del voltatge aplicat, es va dissenyar l'experiment següent. Es van formar membranes en una solució de 100 mM de KCl i es va anar afegint proteïna fins a una conductància de almenys 0.1 nS, que corresponia a la inserció d'un nombre suficient de canals d'Omp36. Seguidament, es va portar el voltatge a zero (el valor del potencial de membrana en aquest punt es designa per v_m) i es va establir un gradient de KCl, cinc vegades major, afegint una solució de 3M KCl a un costat de la membrana, en agitació. El voltatge de membrana de corrent zero va arribar al seu valor estacionari en 2-5 minuts després de l'addició de la solució de KCl.

Amb el valor de v_m i coneixent les concentracions iòniques en els dos compartiments de la cambra de tefló (100 mM i 500 mM de KCl) es pot calcular el coeficient de permeabilitat anió/catió (P_a/P_c) utilitzant l'equació de Goldman-Hodgkin-Katz [14].

$$v_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \left(\frac{P_c \cdot c_{II} + P_a \cdot c_I}{P_c \cdot c_I + P_a \cdot c_{II}} \right) \quad (\text{X})$$

on: R és la constant de gasos

T és la temperatura absoluta

F és la constant de Faraday

c_I és la concentració més diluïda

c_{II} és la concentració més alta

4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 SUSCEPTIBILITAT ALS ANTIBIÒTICS DE *M. morganii*

La sensibilitat dels bacteris als antibiòtics varia com a conseqüència de l'aparició de gens de resistència i la posterior selecció de les soques que els expressen. Aquesta resistència pot ser deguda a diferents factors, com són la incapacitat de l'antibiòtic per travessar l'envolta cel·lular, alteracions de les dianes específiques de l'antibiòtic, la capacitat del microorganisme d'expulsar l'antibiòtic, o la producció, per part del bacteri, d'un enzim que inactiva l'antimicrobià. La resistència a l'antibiòtic pot ser innata a tots els membres d'una espècie, *Morganella morganii* produeix una β -lactamasa induïble codificada cromosòmicament que li confereix una resistència natural a aminopenicil·lines i a algunes cefalosporines [100].

La selecció d'un antimicrobià amb una bona eficàcia clínica no és senzilla, tot i la disponibilitat de nombrosos antimicrobians i dels diferents mecanismes d'acció d'aquests. A més, la diversitat d'organismes causants d'infeccions i l'emergència de soques clíniques resistents als antibiòtics compliquen el tractament apropiat contra el bacteri. Per solucionar tots aquests problemes donats per la ràpida emergència de la resistència bacteriana es necessita un desenvolupament de nous procediments terapèutics i profilàctics [29].

M. morganii és principalment, un agent causant d'infeccions urinàries amb les complicacions que es puguin derivar de la infecció, ja que totes les parts de l'aparell urinari estan connectades per un medi líquid i la infecció pot disseminar-se i afectar a altres zones.

Es va determinar el patró de sensibilitat antimicrobiana de *M. morganii* HUB198351 degut a la seva implicació clínica. Aquesta soca s'havia aïllat d'unes mostres de sang i orina d'un malalt mascle de 73 anys afectat amb una diabetes Mellitus Tipus II insulina dependent amb una malaltia pulmonar obstructiva crònica i un carcinoma a la tràquea. En el moment de l'ingrés a l'hospital el malalt va presentar una alteració respiratòria causada per *Aeromonas hydrophila*, una sobreinfecció del tracte urinari i finalment una bacterièmia causada per *M. morganii* HUB198351.

M. morganii CECT173 és una soca de la col·lecció espanyola de cultius tipus que no ha estat sotmesa a la pressió selectiva dels antibiòtics i, per tant, presenta un patró ampli de sensibilitat, és per això que es va prendre com a referència en tots els estudis realitzats en aquest treball.

La sensibilitat dels bacteris als agents antimicrobians va ser valorada realitzant antibiogrames en MHA amb el mètode descrit a l'apartat 3.3.2. de material i mètodes. També es van determinar les concentracions mínimes inhibidores de diferents antibiòtics en *M. morganii* pel test de microdilució en brou descrit a l'apartat 3.3.3. de material i mètodes.

Amb la finalitat d'establir un patró de sensibilitat de les soques HUB198351 i CECT173, es van escollir antibiòtics de tres grups diferents d'antimicrobians: inhibidors de la síntesis proteica (cloramfenicol, tetraciclina, estreptomicina, gentamicina, eritromicina, novobiocina), inhibidors de la síntesis del peptideglicà (penicil·lina, ampici·lina, ceftriaxona, cefalotina, cefoxitina, ceftazidime, imipenem) i inhibidors de la síntesi d'àcids nucleics (rifampicina, quinolones: ciprofloxacina i àcid nalidíxic). La taula I mostra el patró de sensibilitat determinat per l'antibiograma i la taula II el patró determinat per les concentracions mínimes inhibidores de les soques de *M. morganii*.

Taula I. Susceptibilitat als antibiòtics assajats determinat per antibiograma [78].

ANTIBIÒTIC	<i>M.morganii</i> HUB198351	<i>M.morganii</i> CECT173
IMI	S	S
OFX	R	S
AK	S	S
CAZ	S	S
TC	R	S
K	S	S
C	R	S
TN	R	S
GM	R	S
NO	R	S
PRL	R	S
OP	R	R

IMI (imipenem 10µg), OFX (ofloxacina 5µg), AK (amikacina 30µg), CAZ (ceftazidime 30µg), TC (ticarcil·lina 75µg), K (kanamicina 30µg), C (cloramfenicol 30µg), TN (tobramicina 10µg), GM (gentamicina 10µg), NO (novobiocina 30µg), PRL (piperacil·lina 100µg), OPID (optoquina 5µg); R, soca resistent; S, soca sensible.

Taula II. Concentracions mínimes inhibidores ($\mu\text{g/ml}$) de les soques HUB198351 i CECT173 de *M. morganii*.

ANTIMICROBIA	<i>M.morganii</i> HUB198351	<i>M.morganii</i> CECT173
β-lactàmics		
Ampicil·lina	800	1.5
Penicil·lina	1600	25
Cefalotina	3200	200
Cefoxitina	100	6.25
Ceftriaxona	1.6	0.007
Aminoglucòsids		
Estreptomina	1600	6.25
Kanamicina	8	1
Gentamicina	50	0.4
Macròlids		
Eritromicina	400	100
Quinolones		
Ciprofloxacina	32	0.0035
Àcid nalidíxic	64	0.125
Altres		
Cloramfenicol	64	4
Novobiocina	100	6.25
Rifampicina	12.5	0.2
Tetraciclina	100	0.25
Cristall violeta	100	1

El NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) estableix per a cada microorganisme uns criteris de sensibilitat davant diversos antibiòtics [79]. Aquests valors van permetre classificar les soques de *M.morganii* en sensibles (S), resistents intermèdies (I) o resistents (R) enfront els diferents antibiòtics tal i com es presenta a la taula III.

Taula III. Patró de resistència d'ambdues soques de *M. morganii* enfront els 15 antimicrobians.

ANTIMICROBIÀ	<i>M.morganii</i> HUB198351	<i>M.morganii</i> CECT173
β-lactàmics		
Ampicil·lina	R	S
Penicil·lina	R	I
Cefalotina	R	R
Cefoxitina	R	S
Ceftriaxona	S	S
Aminoglucòsids		
Estreptomina	R	I
Kanamicina	S	S
Gentamicina	R	S
Macròlids		
Eritromicina	R	R
Quinolones		
Ciprofloxacina	R	S
Àcid nalidíxic	R	S
Altres		
Cloramfenicol	R	S
Novobiocina	R	S
Rifampicina	R	S
Tetraciclina	R	S
Cristall violeta	R	S

R, soca resistent; S, soca sensible; I, resistència intermèdia

Aquests assaigs van confirmar la sensibilitat als diferents antibiòtics de *M. morganii* CECT173 a més de servir com a control en la determinació de les MICs.

El patró de resistència de *M. morganii* HUB198351, un aïllament clínic, va ser clarament diferent al que presentà la soca CECT173. En primer lloc, vam analitzar la resistència enfront penicil·lines, cefalosporines i altres antibiòtics que pertanyen a la família de les β-lactames.

Cefalosporines de primera i segona generació com cefalotina i cefoxitina no van presentar activitat sobre *M. morganii* HUB198351, tal i com es demostra en el fet que la soca fora resistent. Ceftriaxona i ceftazidime, en canvi, són cefalosporines d'ampli espectre de

tercera generació que actuen sobre *M. morganii* HUB198351, ja que aquesta soca va ser sensible en front aquests antibiòtics.

Tal i com hem comentat a la introducció, *M. morganii* produeix una β -lactamasa cromosòmica induïble (de classe C) que inactiva ràpidament a cefalosporines de primera generació, algunes de segona i a carboxipenicil·lines. A *Morganella* també s'han descrit soques resistents a β -lactàmics degut a la presència de β -lactamases codificades per plasmidis tipus TEM-10, TEM-21 i TEM-72. La resistència a cefalosporines de tercera generació és deguda a una desinhibició d'aquestes β -lactamases [8,94].

L'ampicil·lina és un altre β -lactàmic fàcilment hidrolitzable per les variants de la β -lactamasa Amp C recentment descrites a *M. morganii* [100] i, per tant, podria atribuir-se el patró de resistència a ampicil·lina de la soca multiresistent HUB198351 a l'acció d'aquesta β -lactamasa. Al igual que la resistència a ticarcil·lina, una carboxipenicil·lina amb una acció molt similar a la ampicil·lina.

L'imipenem, un altre antibiòtic del grup dels β -lactàmics, es diferencia dels anteriors per la presència d'un nucli carbapenem que li confereix una elevada resistència a la hidròlisi enzimàtica per part de les β -lactamases. Ambdues soques assajades foren sensibles a aquest antimicrobià.

Els aminoglucòsids com l'estreptomicina, la kanamicina, l'amikacina, la netilmicina, la gentamicina i la tobramicina actuen en els ribosomes, inhibint la síntesi proteica. Aquests antimicrobians s'uneixen a una sola diana, la proteïna ribosòmica 12S de la subunitat 30S, per inhibir la síntesi proteica. El fet de presentar un únic punt d'acció facilita l'aparició ràpida de soques resistents, ja que es requereix una única mutació per aconseguir aquesta resistència. Dels antibiòtics que es van assajar, la estreptomicina, la gentamicina i la tobramicina presentaven resistència, en canvi, *M. morganii* presentà sensibilitat enfront la kanamicina i l'amikacina, un derivat de la kanamicina.

La soca HUB198351 va ser resistent a la tetraciclina. La tetraciclina és un agent bacteriostàtic que inhibeix la síntesi proteica, en concret, inhibeix l'enllaç de l'aminoacil tRNA a la subunitat ribosomal 30S del bacteri. En general, la resistència a tetraciclina

s'atribueix a una permeabilitat reduïda o a la inactivació de l'antibiòtic a l'interior de la cèl·lula.

El cloramfenicol és un altre dels antibiòtics que actua a nivell ribosomal, interferint en l'acció de la peptidiltransferasa i bloquejant, per tant, la unió dels aminoàcids a la cadena peptídica present a la subunitat 50S. La resistència enfront aquest antimicrobià és deguda a la inactivació del mateix per part de l'enzim acetiltransferasa. La soca HUB198351 presentà novament un patró de resistència al cloramfenicol.

Els macròlids com l'eritromicina es fixen a un receptor de la subunitat 50S del bacteri i inhibeixen la síntesi proteica, interferint en les reaccions de translocació i formació de complexos d'iniciació. La resistència a l'eritromicina pot resultar de l'alteració del receptor del RNAr i ser transmissible a través d'un plasmidi. En aquest cas, *M. morgani* HUB198351 va presentar una resistència molt elevada a aquest antibiòtic.

La rifampicina és un antibiòtic que inhibeix la transcripció, unint-se fortament a la RNA polimerasa. De la mateixa manera, la funció principal de la novobiocina consisteix en la inhibició de la síntesi de DNA i RNA. Aquests antibiòtics són actius sobre Gram positius i només sobre alguns Gram negatius. En *M. morgani* HUB198351 observem un patró de resistència a tots dos antibiòtics, fet que corrobora que aquest agent és poc actiu front bacteris Gram negatius.

L'activitat de les fluoroquinolones assajades va ser molt uniforme, la soca HUB198351 va ser resistent tant a la ciprofloxacina com a l'àcid nalidíxic i a l'ofloxacina. Aquest grup d'antibiòtics actuen inhibint la síntesi de DNA degut al bloqueig de la DNA girasa i/o topoisomerasa IV.

Aquests resultats ens indiquen que *M. morgani* HUB198351 presenta un patró de resistència a una gran varietat d'antimicrobians indicant-nos que aquest és un aïllament clínic multiresistent tant als diferents antibiòtics utilitzats com al colorant cristall violeta.

4.2 ESTIMACIÓ DE LA IMPLICACIÓ DEL REFLUX EN LA RESISTÈNCIA A DETERMINATS ANTIMICROBIANS

4.2.1 ACCIÓ D'INHIBIDORS METABÒLICS SOBRE LA SUSCEPTIBILITAT ALS ANTIMICROBIANS

Les proteïnes de reflux transporten compostos estructuralment diversos fora del bacteri, incloent antibiòtics com les fluoroquinolones i cations tòxics com el bromur d'etidi, preveient la seva acumulació intracel·lular. Les activitats de moltes d'aquestes bombes poden ser inhibides per diferents substàncies com l'alcaloide reserpina, i l'inhibidor metabòlic carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP), compostos que no es poden utilitzar en la pràctica clínica degut a la seva alta toxicitat.

A *M. morganii* s'ha descrit fins al moment una bomba de reflux, AcrAB, que pertany a la família RND (*resistance nodulation-cell division family*). Els gens de la bomba AcrAB de *M. morganii* tenen entre un 60 i un 80% d'identitat amb la seqüència de nucleòtids del gens de la bomba AcrAB de *Proteus mirabilis*. Aquest mecanisme de reflux augmenta la resistència a l'antibiòtic tigeiclina, una nova tetraciclina semisintètica d'espectre estés, motiu pel qual la majoria de les soques de *M. morganii* tenen una MIC amb uns valors entre 1 i 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ [111].

Amb l'objectiu de determinar si la resistència a alguns antimicrobians en *M. morganii* HUB198531 podia atribuir-se a l'acció d'una bomba de reflux, es van determinar les concentracions mínimes inhibidores d'alguns antibiòtics reconeguts com a substrats de bombes de reflux en presència i absència dels inhibidors CCCP, reserpina i cianur de potassi, tot i que el gènere *Morganella* es caracteritza per poder créixer en presència d'aquest últim. En principi la possibilitat d'obtenir evidències de l'extrusió quan els inhibidors metabòlics bloquegen la bomba de reflux té conseqüències directes en els valors de la MIC.

Els resultats de les concentracions mínimes inhibidores de diferents antimicrobians en la soca HUB198531 en presència i absència dels l'inhibidors metabòlics CCCP, reserpina i cianur de potassi, es presenten en la taula IV. La concentració dels inhibidors metabòlics fou en tots els casos 1/2 de la MIC d'aquests compostos. La concentració de CCCP fou de 12,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, la reserpina es va utilitzar a una concentració de 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ i finalment la concentració de cianur de potassi va ser de 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Taula IV. Concentracions mínimes inhibidores de *M. morganii* HUB198351 en presència i absència de CCCP, reserpina i KCN, expressades en µg/ml i determinades pel mètode de microdilució en brou.

<i>M.morganii</i> HUB198351				
ANTIMICROBIÀ	sense inhibidor metabòlic	+CCCP	+Reserpina	+KCN
β-lactàmics				
Ampicil·lina	800	400	800	200
Penicil·lina	1600	1600	1600	1600
Cefalotina	3200	25	400	400
Cefoxitina	100	100	100	50
Ceftriaxona	1.6	0.025	0.4	0.8
Aminoglucòsids				
Estreptomicina	1600	1600	800	1600
Gentamicina	50	6.25	12.5	50
Macròlids				
Eritromicina	400	25	400	100
Quinolones				
Àcid nalidíxic	64	32	32	32
Ciprofloxacina	32	8	32	8
Altres				
Cloramfenicol	64	32	64	16
Novobiocina	100	50	12.5	50
Rifampicina	12.5	0.8	6.25	12.5
Tetraciclina	100	0.75	50	12.5
Cristall violeta	100	100	100	200

Si comparem els valors de les MICs en presència i en absència dels tres inhibidors metabòlics estudiats, CCCP, reserpina i cianur de potassi, pot observar-se que els valors obtinguts en la gran majoria dels antimicrobians en presència dels inhibidors són molt similars als valors obtinguts sense la seva presència, en la majoria dels antibiòtics les MICs no disminueixen més de 1/4 de la concentració mínima inhibidora en absència dels inhibidors, aquest és el cas de l'ampicil·lina, l'àcid nalidíxic, la ciprofloxacina, el cloramfenicol i la novobiocina, en alguns inclús la variació és nul·la, com en els antibiòtics cefoxitina, estreptomicina, penicil·lina i el colorant cristall violeta. Aquestes petites diferències podrien suggerir-nos que en aquest bacteri no hi ha una extrusió evident, per part d'un mecanisme de reflux, de substàncies susceptibles de ser expulsades.

En canvi, la presència dels inhibidors causa en algunes ocasions un increment molt elevat de la susceptibilitat, aquest és el cas de la rifampicina que en presència de CCCP el valor de la MIC disminueix considerablement (1/8) o la tetraciclina que presenta valors de fins a 1/64 el de la MIC en absència de l'inhibidor. Això, en canvi, podria ser un indicador de què algun mecanisme de reflux està actuant en el bacteri, encara que, no hi ha una evidència clara de l'existència de bombes de reflux.

Per tant, tal i com es pot observar, no hi ha diferències significatives entre els valors de les MICs obtinguts amb els inhibidors als obtinguts en absència de l'inhibidor, sent molt similars en la majoria dels casos estudiats. Encara que l'activitat de reflux no pot ser només mesurada comparant MICs, ja que tal i com s'ha descrit les MICs estan influenciades per llargs períodes de incubació necessaris per determinar-les [18], per això, les dades van ser confirmades amb experiments de fluorimetria en els que l'activitat de bombes de reflux va ser mesurada en curts períodes de temps.

4.2.2 EXPERIMENTS DE FLUORIMETRIA

4.2.2.1 Estudi comparatiu d'acumulació de ciprofloxacina en diversos bacteris Gram negatius

Existeixen, principalment, tres mecanismes de resistència bacteriana a las quinolones deguts a:

1. Mutacions en una regió concreta dels gens que codifiquen per a la DNA girasa i la topoisomerasa IV, denominada QRDR.
2. Expulsió de l'antibacterià des del medi intracel·lular a l'extracel·lular per acció de transportadors.
3. Alteracions en la membrana extena dels bacteris Gram negatius que originen modificacions en els gens que codifiquen per a les porines impeding l'entrada de l'antimicrobià en el bacteri.

En aquest últim cas, s'ha demostrat a *E.coli* que, mutants deficients en OmpF són menys susceptibles a totes les quinolones, en canvi, mutants deficients en Omp C són tan susceptibles com les seves soques salvatges. Això pot ser degut també a les diferències en els diamètres de les dues porines.

Per tal de comparar la susceptibilitat a ciprofloxacina i demostrar si es donaven diferències en l'entrada de ciprofloxacina en les soques HUB198351 i CECT173 amb diversos bacteris Gram negatius es van realitzar estudis d'acumulació utilitzant el mètode fluorimètric de l'apartat 3.5. de material i mètodes.

Vam decidir treballar amb *M.morganii* juntament amb altres dos gèneres, *Serratia marcescens* 2170 i *Escherichia coli* UH302 deficient en porines. Els resultats es presenten a la figura 4.1.

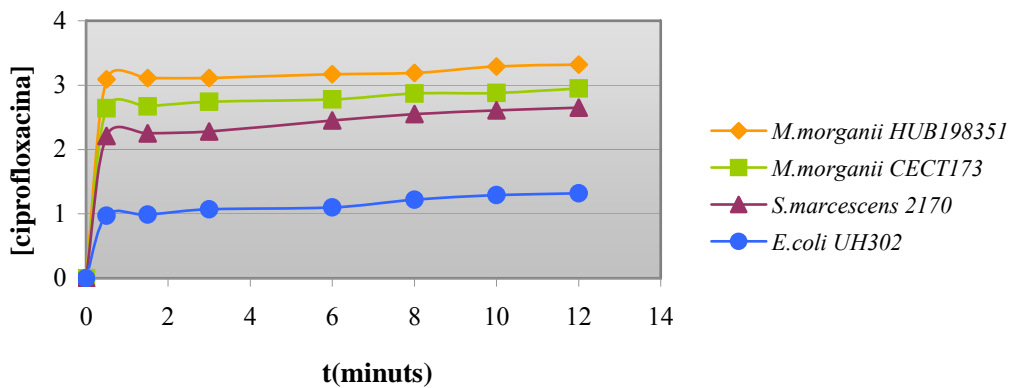


Figura 4.1. Assaig d'acumulació de ciprofloxacina ($\mu\text{g/ml}$) en *M.morganii* HUB198351, *M.morganii* CECT173, *S.marcescens* i *E.coli* UH302.

La cinètica d'acumulació de ciprofloxacina es satura als pocs minuts. En totes les espècies assajades l'acumulació és un procés ràpid, arribant a l'equilibri estacionari als pocs minuts d'incubació amb l'antibiòtic, tot i que la soca d'*E.coli* UH302, deficient en porines, presenta uns valors d'acumulació de l'antibiòtic significativament menors que els altres microorganismes, tal i com era d'esperar al no haver-hi entrada de l'antibiòtic a través de les proteïnes de canal.

4.2.2.2 Estudi fluorimètric d'acumulació de ciprofloxacina en *M. morganii* amb presència i absència de CCCP

L'acumulació de ciprofloxacina intracel·lular final reflexaria l'equilibri entre l'entrada i el reflux. Per tal de comprobar si existeixen diferències en l'acumulació degut al reflux, les cèl·lules de *M.morganii* es van incubar amb presència i absència de l'inhibidor metabòlic CCCP i es van realitzar experiments fluorimètrics.

L'objectiu principal d'aquest estudi fou confirmar la possible presència d'una bomba de reflux en la soca multiresistent HUB198351 mitjançant experiments amb períodes de temps molt curts. Per dur a terme aquest propòsit es va estudiar la possible contribució de la resistència a ciprofloxacina per part d'una bomba de reflux de manera quantitativa mitjançant l'aplicació d'un mètode fluorimètric. Aquest mètode va consistir en la determinació de la concentració de ciprofloxacina acumulada en cada soca segons el mètode descrit per Mortimer i Piddock [95]. La concentració de fluoroquinolona acumulada es va determinar tant en presència com en absència de l'inhibidor CCCP.

Les lectures de fluorescència per *M.morganii* HUB198351 en els assaigs de fluorimetria es van realitzar en intervals molt curts de temps durant un total de 7 minuts. Tal i com es descriu a l'apartat 3.5. de material i mètodes tots els experiments es van realitzar com a mínim en tres ocasions independents i per duplicat i es van determinar els valors mitjans de la quantitat de ciprofloxacina acumulada en la soca resistent HUB198351 per unitat de temps.

En la figura 4.2. està representada l'acumulació de ciprofloxacina en *M. morganii* HUB198351. Com es pot observar tant en presència com en absència de l'inhibidor metabòlic CCCP existeixen poques diferències.

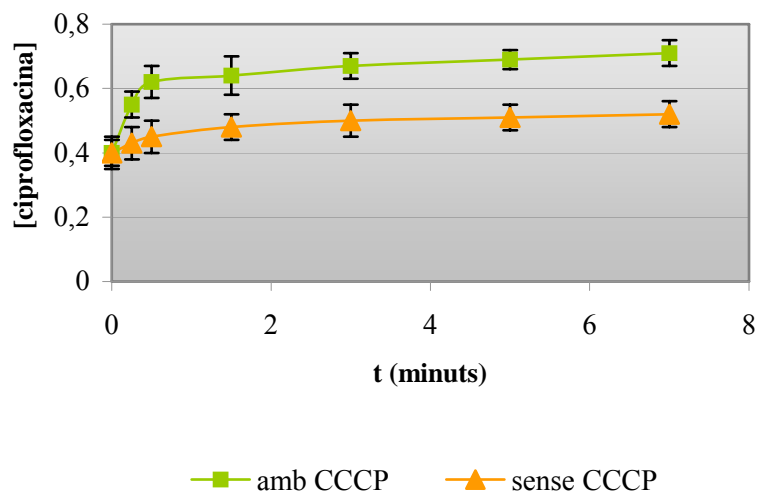


Figura 4.2. Acumulació de ciprofloxacina (µg/ml) en la soca *M. morganii* HUB198351 en presència i absència de CCCP.

Quan l'acumulació de ciprofloxacina es va mesurar en els 7 primers minuts, tant en presència com en absència de l'inhibidor CCCP, es van detectar poques diferències, tot i que n'hi van haver algunes entre els valors d'acumulació amb i sense CCCP.

L'acumulació en presència de CCCP va ser superior, això, en principi faria pensar que el CCCP estaria inhibint l'expulsió de l'antibiòtic i, per tant, presumptivament inhibiria una bomba de reflux. Donat que la bomba descrita en l'espècie és AcrAB tot apuntaria cap a una inhibició activa d'aquest sistema. De totes formes els petits marges en la diferència de valors fan pensar que, en tot cas, el paper jugat per *acrAB* a l'hora de determinar el quadre de resistència de HUB198351 és de escassa importància.

4.2.3 ASSAIG D'INHIBICIÓ DEL CREIXEMENT

Es va desenvolupar un assaig basat en l'estudi de L.R. Peterson *et al* [93], mesurant l'efecte de l'inhibidor CCCP en presència de ciprofloxacina. Les concentracions de ciprofloxacina van ser 4 vegades inferiors al valor de la MIC de *M. morgani*.

L'assaig d'inhibició del creixement es va realitzar amb *M. morgani* CECT173, com a control, ja que presentava una clara sensibilitat a ciprofloxacina, i *M. morgani* HUB198351 resistent a ciprofloxacina però sense un comportament clarament indicatiu de la contribució d'una bomba de reflux en la resistència a aquest antibiòtic.

Els assaigs d'inhibició del creixement utilitzant CCCP conjuntament amb l'agent antibacterià es van dur a terme per detectar l'actuació d'un sistema de reflux susceptible a CCCP. Els resultats obtinguts segons aquest mètode descrit al punt 3.4.1.2. de material i mètodes es mostren a la taula V.

Taula V. Efecte del CCCP en el creixement (densitat òptica a 550 nm) de *M. morgani* HUB198351 i CECT173, en presència de ciprofloxacina a 1/4 del valor de la MIC.

t (hores)	<i>M.morgani</i> HUB198351		<i>M.morgani</i> CECT173	
	- CCCP	+ CCCP	- CCCP	+ CCCP
0	0,131	0,125	0,126	0,127
1	0,144	0,125	0,123	0,121
2	0,152	0,132	0,139	0,141
3	0,182	0,128	0,181	0,17
4	0,32	0,139	0,233	0,21
5	0,452	0,138	0,301	0,28
6	0,669	0,139	0,444	0,401
7	0,986	0,127	0,74	0,68
8	1,068	0,131	0,825	0,736

A la figura 4.3. i 4.4. es mostren les representacions gràfiques dels valors que apareixen a la taula V.

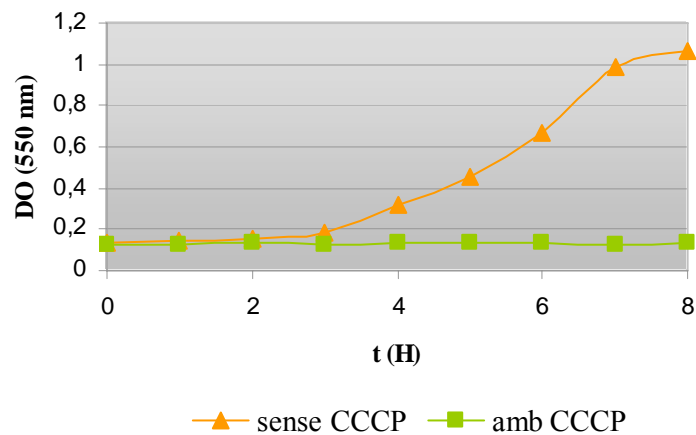


Figura 4.3. Representació de les corbes d'inhibició del creixement de *M. morgani* HUB198351 a una concentració de 1/4 el valor de la MIC de ciprofloxacina, en presència i absència de CCCP.

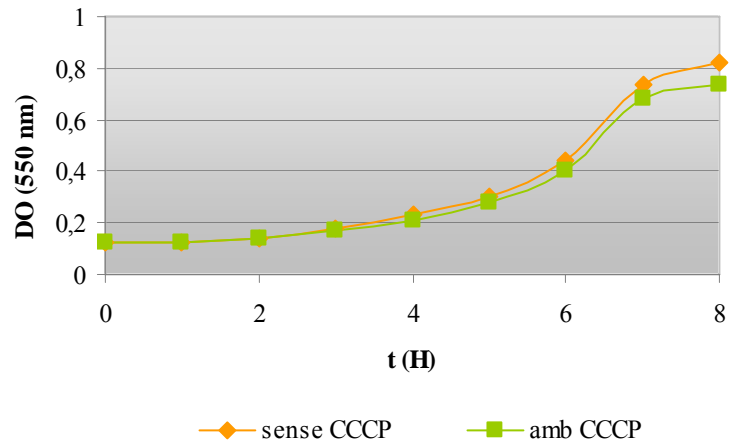


Figura 4.4. Representació de les corbes d'inhibició del creixement de *M. morganii* CECT173 a una concentració de 1/4 el valor de la MIC de ciprofloxacina, en presència i absència de CCCP.

El creixement de *M.morganii* en presència de l'antibiòtic va ser lleugerament més lent de l'habitual, segons estudis previs de corbes de creixement. A l'afegir l'inhibidor CCCP en els cultius i concentracions subletals de l'antibiòtic, es mostra clarament la diferència entre les dues soques. La soca CECT173, a diferència de la soca HUB198351 no va presentar gaires diferències en el creixement amb presència i absència de CCCP. Això és degut a que és una soca sensible a ciprofloxacina, en la que no actua cap mecanisme de reflux, per tant, l'efecte del CCCP tampoc es va observar. En canvi, en la soca HUB198351, a l'afegir el CCCP als cultius, no es va detectar creixement. Això s'explicaria per l'efecte del CCCP en la inhibició de la expulsió de ciprofloxacina per una bomba de reflux i la conseqüent acumulació de l'antibiòtic a l'interior de la cèl·lula. Per tant, si es fa servir aquesta metodologia, es posa de manifest que la bomba de reflux es funcional i, tot i que com hem apuntat abans pugui tenir un paper secundari aquest pot ésser significatiu sobre tot si coopera amb altres mecanismes.

4.2.4 EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DE CIPROFLOXACINA EN EL CREIXEMENT BACTERIÀ, EN PRESENCIA I ABSÈNCIA DE CCCP

Es va desenvolupar un assaig paral·lel a l'assaig descrit a l'apartat anterior amb la finalitat d'avaluar l'efecte de la concentració de ciprofloxacina en presència i absència de CCCP en el creixement de la soca HUB198351 de *M. morganii* que presentava resistència a ciprofloxacina probablement causada per un mecanisme de reflux i així confirmar la possible implicació d'una bomba de reflux en aquesta soca multiresistent.

Els resultats dels assaigs realitzats es presenten a la taula VI, on es mostren els valors de densitat òptica a 550 nm dels cultius crescuts durant 7 hores a diferents concentracions de ciprofloxacina, en presència i absència de CCCP (8 µg/ml) tal i com es descriu en l'apartat 3.4.1.3. de material i mètodes.

Taula VI. Efecte de la concentració de ciprofloxacina en presència i absència de CCCP en la cinètica de mort de les soques HUB198351 i CECT173.

[CIP] (µg/ml)	<i>M.morganii</i> HUB 198351		<i>M.morganii</i> CECT 173	
	- CCCP	+ CCCP	- CCCP	+ CCCP
0	1,076	0,636	1,05	0,985
0,25	1,044	0,638	0,904	0,786
0,5	1,042	0,593	0,318	0,171
1	1,014	0,576	0,224	0,161
2	1,004	0,512	0,178	0,151
4	0,929	0,486	0,153	0,143
8	0,808	0,4	0,142	0,138
16	0,458	0,301	0,139	0,138
32	0,207	0,188	0,135	0,129

Les representacions gràfiques corresponents es presenten a les figures 4.5. i 4.6., en les que es poden observar els valors de densitat òptica en el creixement a diferents concentracions de ciprofloxacina, amb i sense CCCP.

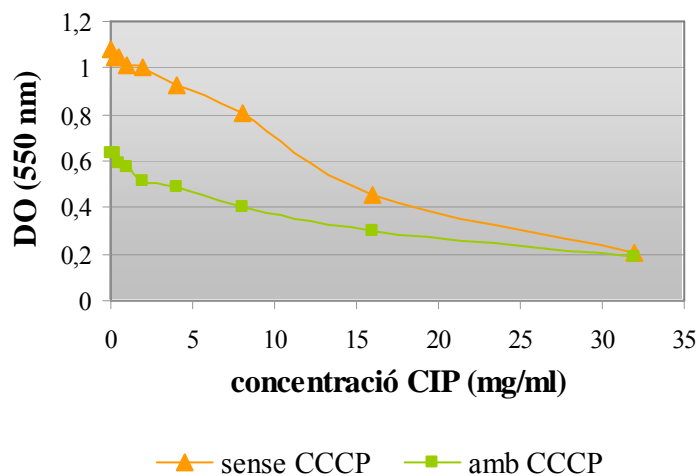


Figura 4.5. Representació de l'efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement de *M. morganii* HUB198351, en presència i absència de CCCP.

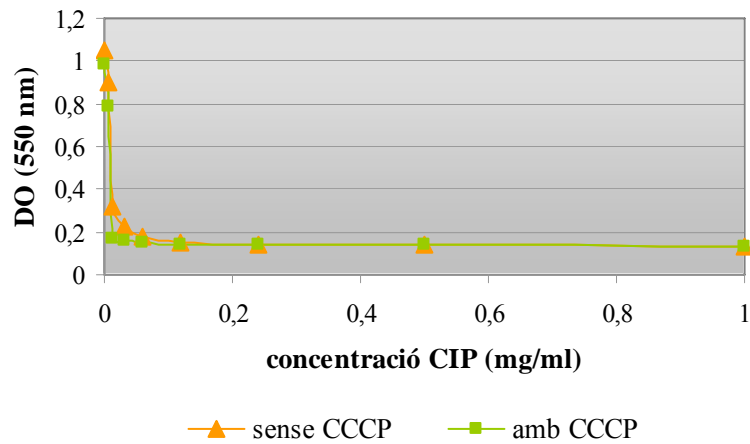


Figura 4.6. Representació de l'efecte de la concentració de ciprofloxacina en el creixement de *M. morgani* CECT173, en presència i absència de CCCP.

En les gràfiques representades pot observar-se que els valors de densitat òptica en absència de CCCP són, en tots dos casos, superiors als valors en presència de l'inhibidor. Tot i això, l'efecte de CCCP en la soca CECT173, conjuntament amb la ciprofloxacina a diferents concentracions, no és destacable comparat amb el creixement de la soca en absència de CCCP.

En la gràfica corresponent a la soca HUB198351 s'observa que a concentracions molt inferiors al valor de la MIC, quant menor és la concentració de l'antibiòtic, més gran és la diferència entre les dues condicions assajades. En aquest cas s'observa una disminució del creixement en presència de CCCP, aquests mutants confirmen la interpretació donada en l'apartat anterior.

4.3 ESTUDI DE LES PROTEÏNES DE MEMBRANA EXTERNA DE *M.morganii*

4.3.1 ANÀLISI DE LES OMPS DE *M.morganii*

Per completar aquests estudis de susceptibilitat amb el paper de la membrana externa en la resistència, vam realitzar una anàlisi dels perfils de proteïnes de membrana externa de la soca multiresistent HUB198351 i la soca control CECT173 en gels desnaturalitzants de poliacrilamida.

La figura 4.7. mostra el perfil electroforètic de la proteïna de membrana externa Omp36 de *M.morganii* detectada en aquest estudi. Les cèl·lules foren crescudes en TSB i l'extracció de les proteïnes de membrana externa fou obtinguda segons la metodologia descrita a l'apartat 3.11.1 de material i mètodes i visualitzada per electroforesi en gels desnaturalitzats d'acrilamida segons el mètode descrit per Laemmli. També es va visualitzar la porina en gels tenyits de plata tal i com es descriu en l'apartat 3.11.3 de material i mètodes.

En tots dos casos el tractament amb calor, és a dir, bullint les mostres a 100°C durant 10 minuts ens va permetre visualitzar el monòmer de 36 KDa. En el gel tenyit en plata, en les mostres sense bullir, es va visualitzar la banda de la configuració nativa trimèrica de la porina de *M.morganii*.

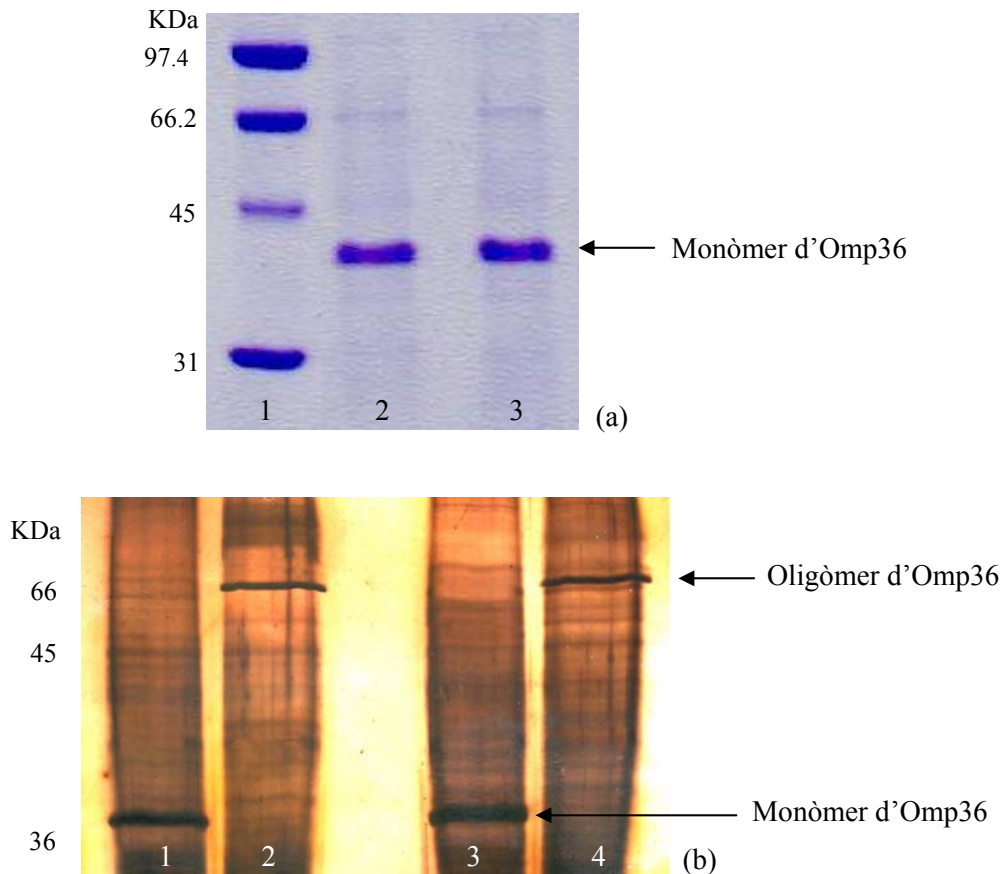


Figura 4.7. (a) Perfil electroforètic en SDS-PAGE de les proteïnes de membrana externa. Carril 1: marcador molecular; carril 2: proteïna de 36 kDa parcialment purificada de *M. morgani* HUB198351; carril 3: proteïna de 36 kDa parcialment purificada de *M. morgani* CECT173. (b) Perfil electroforètic en tinció de plata. Carril 1: presenta la proteïna Omp36 tractada prèviament a 100°C durant 10 min. de *M. morgani* HUB198351; carril 2: proteïna de 36 KDa parcialment purificada de *M. morgani* HUB198351 sense bullir; carril 3: presenta la proteïna Omp36 tractada prèviament a 100°C durant 10 min. de *M. morgani* CECT173; carril 4: proteïna de 36 kDa parcialment purificada de *M. morgani* CECT173 sense bullir.

En principi no s'observen diferències significatives en els perfils electroforètics. En totes dues soques localitzem una banda majoritària que correspon a la porina Omp36 de *M. morgani* amb un pes molecular estimat de 36 kDa (figura 4.7 a). L'expressió d'aquesta proteïna de membrana externa és molt similar en la soca salvatge (CECT173) i en la soca resistent (HUB198351).

Aquest oligòmer és presumiblement un trímer en analogia amb altres bacteris entèrics amb un pes molecular aparent de 66,5 kDa (figura 4.7 b). Amb aquests resultats preliminars

no podem establir *a priori* cap relació entre la resistència a antibiòtics hidrofílics i l'expressió de porines.

4.3.2 PURIFICACIÓ D'OMP36

Hi han dues propietats importants comuns a totes les porines que han permès desenvolupar processos de purificació d'aquestes proteïnes. La primera propietat és que són insolubles en detergents iònics fortament desnaturalitzats com el SDS a baixes temperatures, probablement degut a la seva associació no covalent, però forta, amb la capa de peptidoglicà. La segona, és que les porines poden ser eluïdes del peptidoglicà i solubilitzades per una combinació de sals (0,1-0,5 M NaCl), 10 mM EDTA i 2% SDS o Genapol® [15]. Aquesta segona propietat es deu a l'estabilitat de l'estructura terciària i quaternària de les porines al tractament amb detergent a moderades temperatures.

Seguint el mètode descrit a l'apartat 3.11.2. de material i mètodes es va obtenir la proteïna Omp36 purificada tal i com es mostra a la figura 4.8. d'ambdues soques de *M.morganii*.

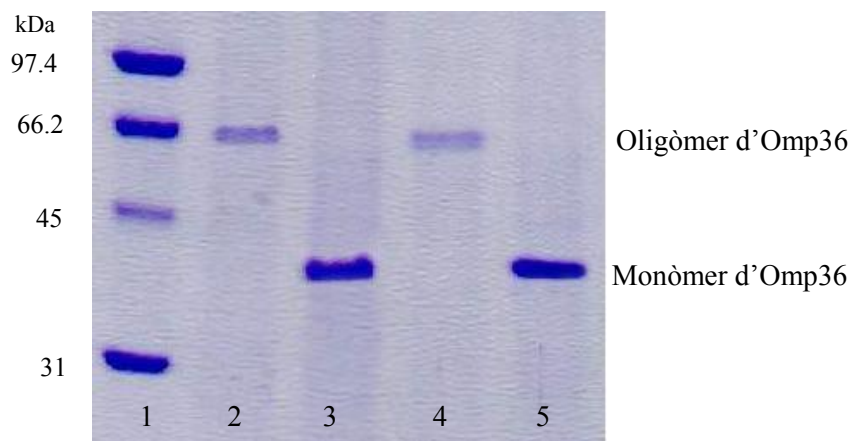


Figura 4.8. Perfil SDS-PAGE de la proteïna Omp36 solubilitzada en Tris-HCL pH=7,7, 2% Genapol i 10mM d'EDTA. Carril 1 mostra el marcador de pesos moleculars. Carril 2 mostra la proteïna Omp36 sense bullir de *M.morganii* HUB198351; Carril 3 presenta la proteïna Omp36 tractada prèviament a 100°C durant 10 min. de *M.morganii* HUB198351. Carril 4 mostra la proteïna Omp36 sense bullir de *M.morganii* CECT173. Carril 5 presenta la proteïna Omp36 tractada prèviament a 100°C durant 10 min. de *M.morganii* CECT173.

En aquest gel es pot observar tant la forma monomèrica (carrils 3 i 5) com la polimèrica (carrils 2 i 4), que possiblement és una associació trimèrica.

4.4 EXPERIMENTS DE “BLACK LIPID BILAYER CONDUCTANCE”

Hi ha una gran varietat de sistemes de reconstitució que han permès demostrar in vitro la funció formadora de canals que tenen algunes porines. Destaquem entre aquests mètodes, la formació de proteoliposomes utilitzant un reflux de radioisòtops, la formació de proteoliposomes contenint un enzim i permetent l'entrada del seu substract, l'inflament de liposomes (liposome swelling assay) i l'estudi de conductància a través d'una bicapa lipídica (planar lipid bilayer technique). Aquest últim mètode és un procediment de mesura de la conductivitat d'ions a través de les porines. El mètode fou desenvolupat per Benz i Hancock l'any 1981.

L'aparell en el que es dur a terme l'experiment inclou una cambra de tefló dividida en dos compartiments que estan separats per un envà de tefló que conté un petit forat de 1-2 mm² i que connecta ambdós espais. Hi ha electrodes en tots dos compartiments en la solució aquosa. En aquest forat es forma una membrana lipídica utilitzant com a solvent n-decà. La membrana que es forma és una bicapa que és òpticament negra quan la mirem amb llum natural i és impermeable als ions. Per això, quan s'aplica un voltatge entre les dues capes de l'envà, no s'observa conducció de corrent. Si s'afegeixen porines en un costat de la bicapa s'observen fluctuacions en la conductància. Aquestes fluctuacions poden ser interpretades com els passos d'incorporació d'oligòmers formadors d'un únic porus a la membrana. L'augment de corrent és petit, aproximadament de 10⁻¹¹ o 10⁻¹² A, mitjançant un amplificador de senyal pot ser enregistrat. Aquest mètode té l'inconvenient que únicament es pot estudiar la permeabilitat a ions. Tanmateix, permet estimar el diàmetre del porus, estudiar la selectivitat del porus per una gran quantitat d'anions i cations, ens dona informació sobre els llocs d'unió dels ions al canal i determinar si el canal és regulat per voltatge.

A partir de la purificació de la proteïna Omp36 de *M.morganii* es procedí a l'aplicació d'aquesta tècnica.

4.4.1 ÀNALISI DE CONDUCTÀNCIA DEL CANAL PRODUÏT PER LA PORINA OMP36 DE *M. morganii*

Es va analitzar la formació del canal de la porina de 36 KDa de *M.morganii* amb experiments de conductància. Es van afegir petites quantitats de porina (aproximadament 100ng/ml) a la fase aquosa d'una o ambdues cares de l'envà que separa els compartiments de

la cambra descrita a l'apartat 3.12.1. de material i mètodes. Després d'un temps d'inactivitat d'aproximadament un o dos minuts, probablement a conseqüència de la lenta difusió aquosa de la proteïna, es va observar un augment esglaonat de corrent similar al observat en d'altres porines de Gram negatiu [Benz et al 1978 i 1988]. Cada salt representa la inserció dins de la membrana d'una unitat conductiva (un canal de membrana). La figura 4.9. ens presenta l'experiment després d'afegir la porina de *M. morganii* HUB198351, uns cinc minuts després de la formació de la membrana. Sota aquestes condicions, l'augment de corrent és lent i la conductància d'aquest canal arriba fins els 2 nS quan s'afegeix la porina a la membrana preexistent. Tanmateix, la conductància dels esglaons de corrent va ser també de 2 nS quan després de la formació de la membrana es va afegir la porina de *M.morganii* CECT173 (figura 4.10.). Els canals tenen un temps de vida llarg perquè en cada experiment foren observats almenys durant uns deu minuts.

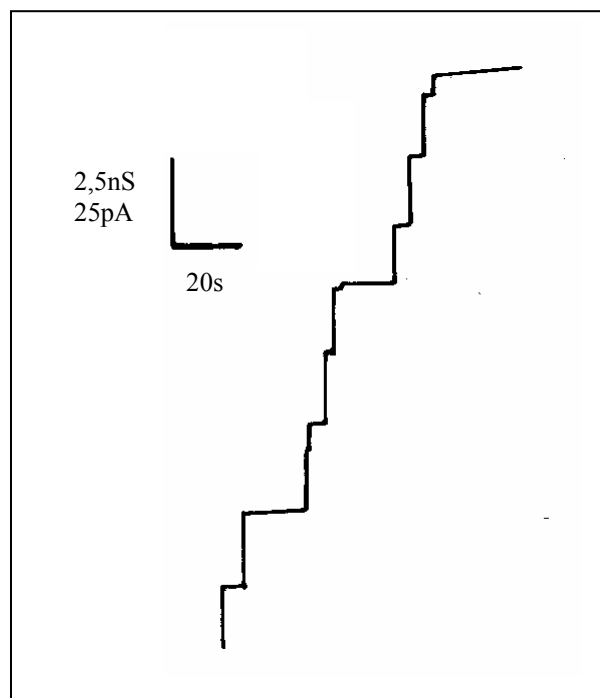


Figura 4.9. Registre de conductància de canals simples de la porina de *M.morganii* HUB198351 en una membrana de difitanoil fosfatidilcolina/n-decà aplicant un voltatge de 10mV. La fase aquosa contenia 1 M KCl. La temperatura de l'experiment va ser de 20°C.

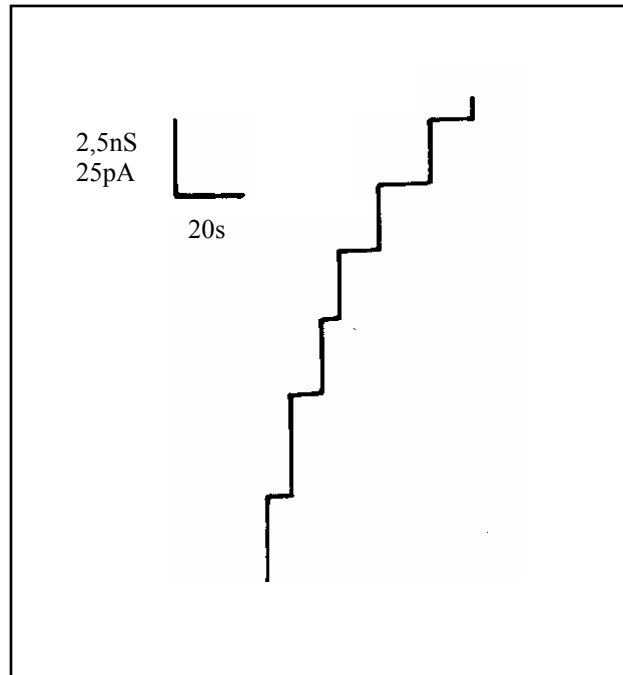


Figura 4.10. Registre de conductància de canals simples de la porina de *M.morganii* CECT173 en una membrana de difitanoil fosfatidilcolina/n-decà aplicant un voltatge de 10mV. La fase aquosa contenia 1 M KCl. La temperatura de l'experiment va ser de 20°C.

Aquestes dues figures mostren el registre esglaonat típic de conductància de canals de porina, indicant cada salt, la introducció d'una unitat conductiva en la membrana preexistent. Es important destacar que la conductància de 2,0 nS de la porina Omp36 de *M.morganii* és molt propera a la conductància d'altres porines de bacteris Gram negatius, com les porines OmpC i OmpF d'*E.coli*, les quals presenten uns valors de conductància entre 1,5 i 2,0 nS sota les mateixes condicions [Benz 1988, 1978,1985, 1979] i Omp1 de *S.marcescens* que presenta un valor de conductància de 2,0 nS també sota les mateixes condicions [110].

Aquests registres van ser representats posteriorment en un histograma (figura 4.11.) que presenta el percentatge de totes les unitats conductives observades en la proteïna Omp36 de *M.morganii* HUB198531 reconstituïda en una membrana de difitanoil fosfatidilcolina/n-decà. La solució aquosa contenia 1 M de KCl i el voltatge aplicat fou de 10mV amb una temperatura de 20°C. Aquesta distribució és el resultat de nombrosos registres (214) de 3 assaigs.

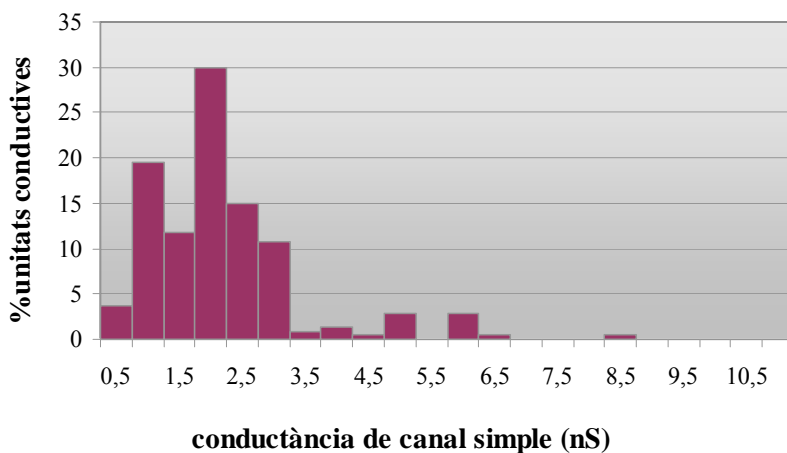


Figura 4.11. Histograma de totes les unitats conductives observades en membranes DiPhPC/n-decà en presència d'aproximadament 10ng/ml de la proteïna Omp36 de *M.morganii* HUB198351. La solució aquosa contenia 1 M KCl.

La distribució de canal simple presenta un màxim a l'histograma que correspon a un canal de 2 nS que representa probablement la resolució de trímers monomèrics de la porina de *M.morganii* HUB198351.

De la mateixa manera es va representar posteriorment en un histograma (figura 4.12.) el percentatge de totes les unitats conductives observades en la proteïna Omp36 de *M.morganii* CECT173 reconstituïda en una membrana de difitanoil fosfatidilcolina/n-decà. La solució aquosa contenia 1 M de KCl i el voltatge aplicat fou de 10mV amb una temperatura de 20°C. Aquesta distribució és el resultat de nombrosos registres (219) de 3 assaigs.

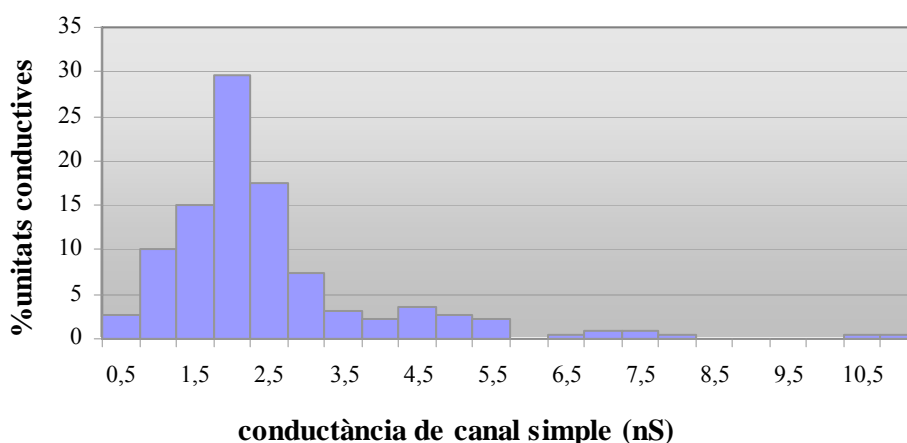
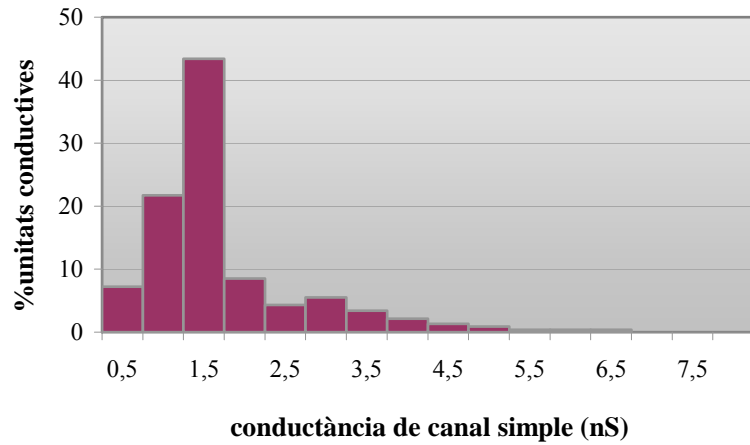


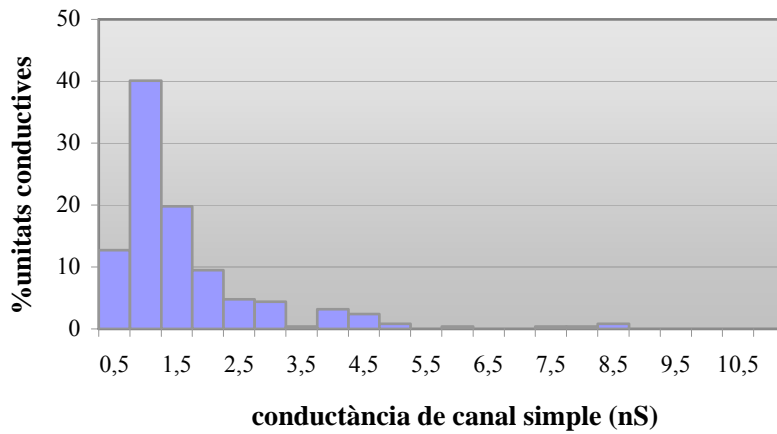
Figura 4.12. Histograma de totes les unitats conductives observades en membranes DiPhPC/n-decà en presència d'aproximadament 10ng/ml de la proteïna Omp36 de *M.morganii* CECT173. La solució aquosa contenia 1 M KCl.

En aquest cas els resultats foren els mateixos, la distribució de canal simple presenta un màxim a l'histograma que correspon a un canal de 2 nS que representa probablement la resolució de trímers monomèrics de la porina de *M.morganii* CECT173.

Posteriorment, es van realitzar experiments anàlegs als anteriors, utilitzant com a solució salina altres concentracions de KCl i altres ions com LiCl 1 M i acetat potàssic 1 M. Les figures 4.13. i 4.14. representen el percentatge de totes les unitats conductives observades en la proteïna Omp36 de *M.morganii* HUB198351 i *M.morganii* CECT173 reconstituïda en una membrana de difitanoil fosfatidilcolina/n-decà utilitzant com a solució aquosa LiCl 1M i acetat potàssic 1M respectivament. El voltatge aplicat en tots els experiments fou de 10mV amb una temperatura de 20°C. Aquesta distribució és el resultat de nombrosos registres, en la figura 4.13.(a) foren 235, en la figura 4.13.(b) 252, en la figura 4.14.(a) 171 i finalment en la figura 4.14.(b) 183 registres.



(a)



(b)

Figura 4.13. Histogrames de totes les unitats conductives observades en membranes DiPhPC/n-decà en presència d'aproximadament 10ng/ml de la proteïna Omp36 de *M.morganii* HUB198351 (a) i *M.morganii* CECT173 (b). La solució aquosa contenia 1 M LiCl.

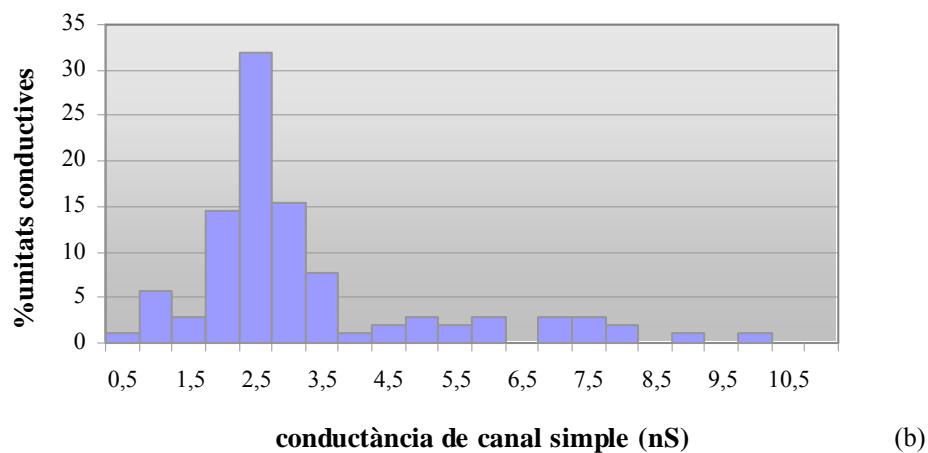
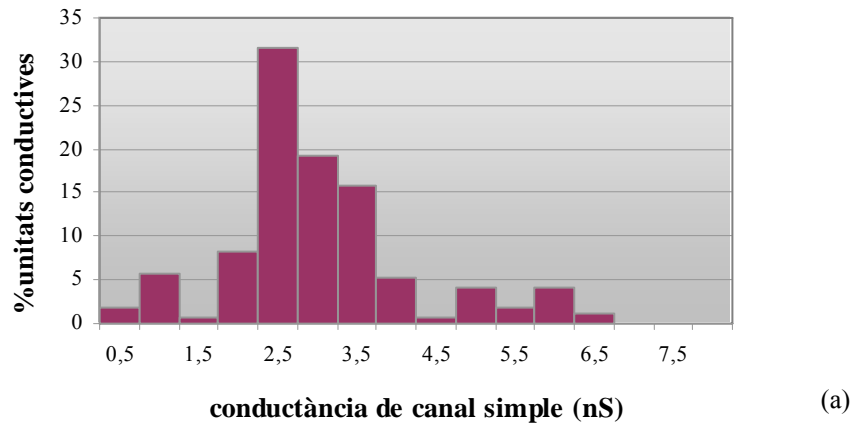


Figura 4.14. Histogrames de totes les unitats conductives observades en membranes DiPhPC/n-decà en presència d'aproximadament 10ng/ml de la proteïna Omp36 de *M.morganii* HUB198351(a) i *M.morganii* CECT173 (b). La solució aquosa contenia 1 M d'acetat potàssic.

La taula VII mostra un resum dels resultats de conductància obtinguts. En aquest cas, les membranes també van formar-se a partir de 1% de difitanoil fosfatidilcolina dissolt en n-decà, a 20°C. El pH de les solucions de sals aquoses fou aproximadament de 6 almenys que s'indiqui el contrari. G representa la mitjana de conductància calculada a partir de 100 porus conductius similars als de la figura 4.9. i figura 4.10.

Taula VII. Mitjana de la conductància de canal simple G de la porina Omp36 de les soques CECT173 i HUB198531 de *M.morganii* mesurada amb diverses solucions de sals a concentracions (M) diferents.

SAL	Concentració (M)	Conductància G (nS) de la soca CECT173	Conductància G (nS) de la soca HUB198351
LiCl	1,0	1,0	1,5
KCl	0,1	0,2	0,1
KCl	0,3	0,5	0,6
KCl	1,0	2,0	2,0
KCl	3,0	6,0	6,0
KCH ₃ COO (pH 7)	1,0	1,0	1,0

Respecte la selectivitat del canal, a partir d'aquests experiments de conductància de canals simple podem observar que el porus de la membrana de les dues soques de *M.morganii* presenten moderada selectivitat catiònica. Això se'n pot concloure dels experiments de canal simple, en els quals el KCl fou reemplaçat per LiCl o acetat potàssic, els ions mòbils K⁺ i Cl⁻ foren reemplaçats per ions menys mòbils com Li⁺ i acetat (taula VII). La conductància del canal simple a 1M LiCl i a 1M acetat potàssic disminueixen aproximadament en un factor de dos. També observem que la conducció per als ions de les diferents sals utilitzades en l'experiment segueix més o menys la seqüència de mobilitat que tenen els ions en la fase aquosa, que són la meitat de 1M de KCl. Això és el que s'esperaria quan s'assumeix que la porina de membrana externa de *M.morganii* es podria comportar com un ampli canal ple d'aigua per on es mourien els ions, sense lligands que hi conferissin un moviment específic, tal i com s'ha suggerit per la seva conductància d'un únic canal en 1M de KCl. Mesures a diferents concentracions de KCl són consistents amb aquesta observació perquè la conductància de canal simple fou una funció lineal de la conductància que tenen els ions a la fase aquosa (taula VII) la qual cosa és típic de les porines de difusió general de les enterobacteriacies [12].

4.4.2 MESURES DE POTENCIAL DE MEMBRANA A CORRENT ZERO

Les mesures de potencial de membrana en presència de gradients de sal es van realitzar establint una diferència cinc vegades major de gradient a un costat de la membrana, per addició de petites quantitats de solució KCl, després de la incorporació d'un gran nombre de canals en membranes banyades en 100 mM de KCl. Pel KCl el costat més diluït de la membrana va esdevenir lleugerament positiu i presentava un potencial promig de 20mV.

Aquest resultats indiquen, en realitat, que existeix un moviment preferencial del potassi a través del canal, és a dir, selectivitat lleugerament catiònica. L'anàlisi del potencial de membrana a corrent zero utilitzant l'equació de *Goldman-Hodkin-kantz* [Benz et al 1979] va revelar un coeficient de permeabilitat catió/anió (P_K/P_{Cl}) = 2 (equació X de l'apartat 3.12.2. de material i mètodes) la qual cosa vol dir que per a cada anió de Cl^- passen aproximadament 2 cations de K^+ . Aquest potencial de membrana de corrent zero demostra, de la mateixa manera que en els experiments de conductància, que existeix únicament una diferència de permeabilitat petita entre anions i cations, la qual cosa indica que el canal de membrana externa de *M.morganii* representa un porus de difusió general.

4.4.3 AVALUACIÓ DE LA DEPENDÈNCIA DE VOLTATGE

Els experiments d'avaluació de dependència de voltatge es van realitzar formant una membrana amb molts porus. El voltatge a través de la membrana es va establir amb un rang de 10 a 100 mV i la corrent de membrana es va enregistrar amb un oscil·loscopi. Immediatament després de l'aplicació del voltatge, la corrent era una funció lineal del potencial de membrana.

La disminució de conductància es va observar en l'interval de 70mV a 100mV en *M.morganii* HUB198351 (figura 4.15.), en aquest interval de valors de potencial, la conductància G va passar a ser un 10-15% menor del valor inicial G_0 .

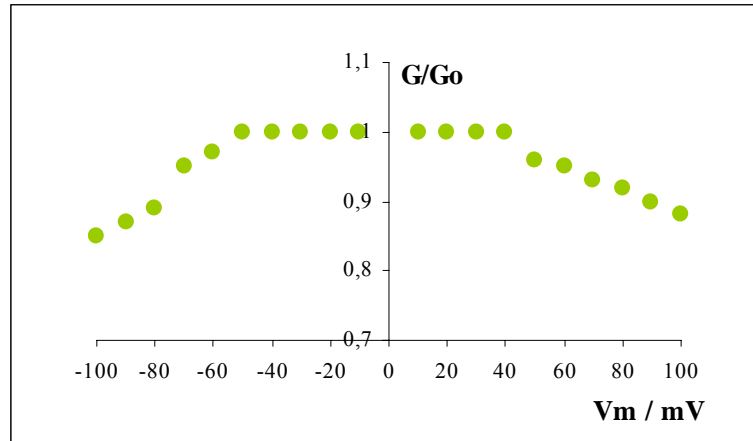


Figura 4.15. Corba del ratio G/G_0 mesurat en funció del potencial de membrana a *M.morganii* HUB198351.

En el cas de *M.morganii* CECT173 les mesures només arribaren fins a 80 mV. En aquesta soca la disminució de conductància es va observar en l'interval de 50 a 80 mV, tot i que el valor inicial de conductància G_0 només va disminuir un 20% (conductància G). La figura 4.16. mostra el ratio G/G_0 com a funció del potencial transmembranal V_m .

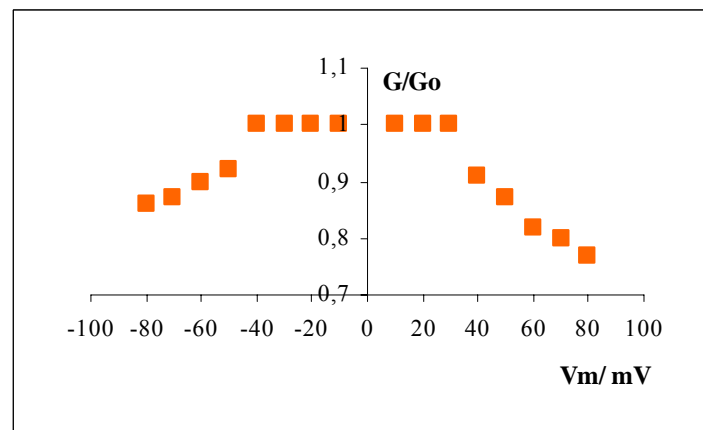


Figura 4.16. Corba del ratio G/G_0 mesurat en funció del potencial de membrana a *M.morganii* CECT173.

Aquests resultats ens indiquen que la porina Omp36 d'ambdues soques està regulada per voltatge, és a dir es depenen de voltatge. Els potencials transmembranals per sobre de 50 mV redueixen la conductàcia. Aquest és el comportament típic de les porines bacterianes, que requereixen potencials de 100mV aproximadament, per produir el tancament del canal. La conductància G dividida per G_0 , conductància en absència de potencial de membrana, dibuixa aquesta curva típica en forma de campana.

4.4.4 ESTIMACIÓ DEL DIÀMETRE DEL CANAL FORMAT PER OMP36.

Amb els experiments anteriors es van obtenir registres discrets de conductància, que pertanyien a la formació d'un canal de porina Omp36. La conductància (G) pot utilitzar-se per estimar el diàmetre del canal de la porina, segons l'equació següent [11]:

$$G = \rho \cdot \pi \cdot r^2 / l \quad (XX)$$

essent ρ : conductància de la fase aquosa, composta de KCl 1 M (110nS/cm)

Assumint que el porus està omplert de la mateixa fase aquosa del medi i que el porus és cilíndric, amb una longitud l de 6nm (aproximadament el gruix d'una membrana plasmàtica). Aplicant l'equació XX i considerant una conductància de 2 nS pels canals de la proteïna Omp36, hem estimat un diàmetre de porus ($d = 2r$) de 1,18 nm.

Aquest valor de diàmetre de porus de 1,18 nm és idèntic al descrit per la porina Omp1 de *S.marcescens* [110] i s'aproxima força al descrit per les porines d'*E.coli*. En el cas de la proteïna OmpF s'han descrit valors de 1,2 nm de diàmetre de porus i en el d'OmpC de 1 nm de diàmetre, seguint la mateixa metodologia [50]. S'ha de dir, però, que el valor estimat dels diàmetres de porus s'ha de prendre com el límit inferior de la grandària dels canals, ja que la tècnica de la conductància en bicapes lipídiques subestima en certes condicions la grandària dels canals. Però, d'altra banda, s'ha comprovat que les dades que generen aquests càlculs estan força d'acord amb les que es generen quan s'utilitzen altres mètodes (microscopia electrònica o dades cristal·logràfiques) [14].

4.5 DETECCIÓ I DETERMINACIÓ DE LES SEQÜÈNCIES DELS INTEGRONS PLASMÍDICS Int1,5 i Int 2,0 DE *M. morganii*

Està àmpliament descrita la implicació dels plasmidis en la transferència d'informació genètica, tant entre dos bacteris actuant com a plasmidis conjugatius com en la disseminació de gens de resistència a través d'elements mòbils com els transposons i els integrons. Els transposons són elements que es caracteritzen per tenir seqüències de DNA amb capacitat pròpia per moure's en el genoma sense necessitar homologia amb la seqüència receptora i els integrons, estructures descrites a principis dels anys 80 es caracteritzen per ser estructures gèniques capaces d'integrar o mobilitzar gens *cassette* que poden codificar per gens de resistència als antibiòtics o gens amb altres funcions.

Els integrons s'han descrit àmpliament entre les espècies d'*Enterobacteriaceae*, un treball realitzat per Goldstein i els seus col·laboradors va demostrar que un 52% del total dels aïllaments d'enterobacteris en estudi contenien integrons de les classes 1 o 2, es va observar que un 92% presentava la integrasa de classe 1, un 42% la integrasa de classe 2 i un 13 % la integrasa de classe 3 [45].

La potència dels integrons ve donada per la seva versatilitat, és a dir, l'habilitat de reconèixer una àmplia varietat de seqüències de recombinació i l'aparent capacitat il·limitada d'intercanvi de gens *cassette*. Aquesta flexibilitat permet una ràpida adaptació al flux dels nínxols ecològics.

Amb el propòsit de continuar caracteritzant la soca multiresistent *M.morganii* HUB198351 es van realitzar experiments per detectar la presència d'algun plasmidi i en cas positiu estudiar la seva possible implicació en el patró de resistència que presentava aquesta soca.

4.5.1 DETECCIÓ I AÏLLAMENT DEL PLASMIDI PML2003 EN *M. morganii*

La presència del plasmidi va ser detectada pel mètode electroforesis en camp polsant seguint la metodologia descrita per Barton i els seus col·laboradors (figura 4.17.) [9]. Seguidament es va realitzar un aïllament tal i com es descriu a l'apartat 3.6.2. de material i mètodes, es va digerir amb enzims de restricció i es va visualitzar mitjançant electroforesis en gel d'agarosa (figura 4.18.).

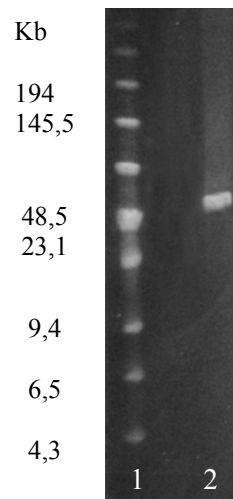


Figura 4.17. Perfil del plasmidi detectat a *M.morganii* HUB198351 mitjançant la tècnica Electroforesis en Camp Polsant. Carril 1: marcador Low range PFG; carril 2: plasmidi de *M.morganii*.

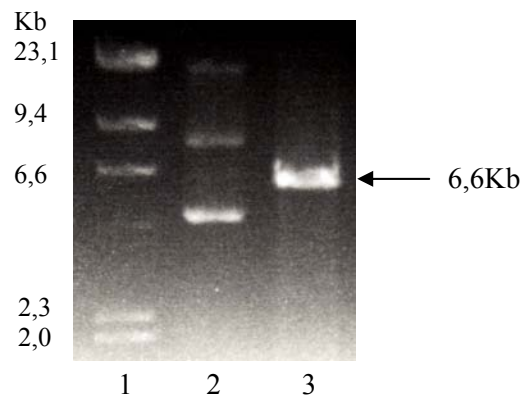


Figura 4.18. Gel d'agarosa al 1%. Carril 1: marcador λ -HindIII; carril 2: plasmidi pML2003 detectat en *M. morganii* HUB198351; carril 3: pML2003 digerit amb l'enzim de restricció BamHI amb una mida aproximada de 6,6Kb.

Tal i com ens presenten les dues figures, es va detectar la presència d'un plasmidi en *M.morganii* HUB198351, se'l va anomenar pML2003, amb una única diana per a BamHI. La seva mida aproximada va ser de 6,6 Kb.

4.5.2 DETECCIÓ DELS INTEGRONS

Com a vehicle dels gens de resistència, vam buscar elements genètics, concretament integrons, capaços d'integrar aquests gens de resistència en el genoma cromosòmic o plasmídic del bacteri. Per detectar la presència dels integrons en la nostra soca, es va realitzar una PCR de DNA total utilitzant els *primers* 5'CS i 3'CS que corresponen a les regions conservades 5' i 3' dels integrons de classe 1, els més freqüentment aïllats en mostres clíniques. Com a producte de la PCR amb DNA plasmídic vam observar dos integrons de 2000 pb i 1500 pb (Figura 4.19.). En el cas de la PCR amb DNA cromosòmic no es va obtenir cap producte amplificat.

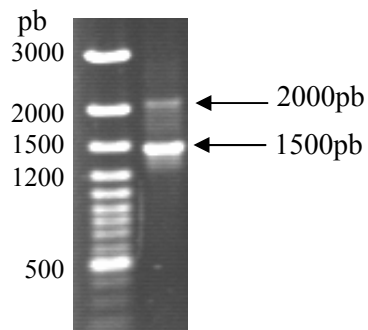


Figura 4.19. Productes amplificats amb els *primers* 3'CS i 5'CS en DNA plasmídic de la soca *M.morganii* HUB198351. Els fragments es van separar per electroforesis en gel d'agarosa al 0,7%. Carril 1: marcador Gene Ruler 100bp DNA. Carril 2: fragments corresponents a 1,5 Kb i 2,0 Kb aproximadament.

Per confirmar que els dos integrons obtinguts formaven part del genoma plasmídic i no del cromosòmic es va realitzar la hibridació d'una membrana on previament s'havia transferit el plasmidi pML2003 mitjançant la tècnica Southern descrita a l'apartat 3.9. de material i mètodes. Es va utilitzar com a sonda específica els amplicons de 1,5 Kb i 2,0 Kb marcats amb digoxigenina (figura 4.20.).

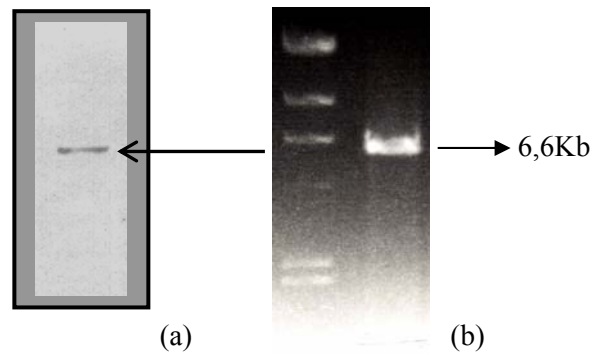


Figura 4.20. (a) Membrana de nylon amb la hibridació del plasmidi amb la sonda específica. (b) Gel d'agarosa amb el plasmidi pML2003.

Tal i com s'observa en la figura 4.20.(a), la sonda específica va hibridar amb el plasmidi prèviament transferit, d'aquesta manera es demostrava que efectivament els dos integrons es troben al plasmidi pML2003 de la soca multiresistent HUB198351.

4.5.3 DETERMINACIÓ DE LES SEQÜÈNCIES DELS INTEGRONS INT1,5 I INT2,0 DE *M. morganii*

Tal i com hem comentat a l'inici d'aquest capítol, està àmpliament descrita la importància dels integrons com a mecanisme d'adquisició de nous gens de resistència. Actualment en bacteris Gram negatius hi han descrits més de 60 gens *cassette* de resistència, sent alguns dels darrers els gens codificadors d'oxacil·linasa (*oxa20*), gens que confereixen resistència al cloramfenicol (*catB6* i *cmlA2*) i el gen que confereix resistència al trimetoprim (*drfA1*) [73].

Fins al moment a *M. morganii* s'ha descrit un integró de classe 2 amb el *cassette* de gens *dhfrA1-sat-aadA1* que confereix resistència a amoxicil·lina, ampicil·lina, cefalotina i trimetoprim [7].

Per tal de conèixer quins gens de resistència formaven part dels dos integrons detectats en el plasmidi pML2003 de *M. morganii* HUB198351 es va procedir a seqüenciar ambdós integrons.

4.5.3.1 Determinació de la seqüència de l'integró de 1,5 kb

Es van recuperar i purificar els productes amplificats per PCR i es van determinar les seqüències de DNA tal i com es descriu a l'apartat 3.8. de material i mètodes. La seqüència d'aquest integró de 1,5Kb es detalla a la figura 4.21.

```

1   tggggagcagcagcaacgatgtttacgcagcagggcagtcgcccctaaaacaaagttagccctt
                                attI
61  atggacacaacgcaggtcacattgatcacaaaaattctagctgcggcagatgagcgaat
    M D T T Q V T L I H K I L A A A D E R N
121 ctgccgctctggatcgggtgggggctgggcgatcgatgcacggctagggcgtgtaacacgc
    L P L W I G G G W A I D A R L G R V T R
181 aagcacgatgatattgatctgacgtttcccgagagggcgggcgagctcgaggcaata
    K H D D I D L T F P G E R R G E L E A I
241 gttgaaatgctcggcggggcgctcatggaggagttggactatggattcttagcggagatc
    V E M L G G R V M E E L D Y G F L A E I
301 ggggatgagttacttgactgcgaacctgcttggtgggcagacgaagcgtatgaaatcgcg
    G D E L L D C E P A W W A D E A Y E I A
361 gaggctccgcagggctcgtgcccagagggcggtgagggcgtcatcgccggggcgccagtc
    E A P Q G S C P E A A E G V I A G R P V
421 cgttgtaacagctgggagggcgatcatctgggattacttttactatgccgatgaagtacca
    R C N S W E A I I W D Y F Y Y A D E V P
481 ccagtgactggcctacaaagcacatagagtcctacaggctcgcacacctcactcggg
    P V D W P T K H I E S Y R L A C T S L G
541 gcggaaaaggttgaggtccttgctgcccgtttcaggtcgcgatatgcccctaacaattc
    A E K V E V L R A A F R S R Y A A -
601 gtccaagccgcagcgcgcttcgcgggcgggcttaactcaggtgtagacggcaaaagtcaca
                                attC
661 gaccgcgggatctctatgaccaactactttgatagccccttcaaaggcaagctgctttct
    M T N Y F D S P F K G K L L S
721 gagcaagtgaagaacccaatatcaaagttgggcggtacagctattactctggctactat
    E Q V K N P N I K V G R Y S Y Y S G Y Y
781 catgggcactcattcgatgactgcgcacgggatctggttccggaccgtgatgacgttgat
    H G H S F D D C A R Y L F P D R D D V D
841 aagttgatcatcggtagtttctgctctatcgggagtggggcttcctttatcatggctggc
    K L I I G S F C S I G S G A S F I M A G
901 aatcaggggcatcggtacgactgggcacatccttcccgcttctttatgatgcaggaagaa
    N Q G H R Y D W A S S F P F F Y M Q E E
961 cctgcattctcaagcgcactcgatgccttccaaaagcaggttaatactgtcattggcaat
    P A F S S A L D A F Q K A G N T V I G N
1021 gacgtttggatcggctctgaggcaatggctcatgcccggaatcaagatcgggcacggtgcg
    D V W I G S E A M V M P G I K I G H G A
1081 gtgataggcagccgctcgttggtgacaaaagatgtggagccttacgctatcgttggcggc
    V I G S R S L V T K D V E P Y A I V G G
1141 aatcccgctaagaagattaagaaacgcttcaccgatgaggaaatttcattgcttctggag
    N P A K K I K K R F T D E E I S L L L E

```

```

1201 atggagtgggtggaattgggtcactggagaagatcaaagcggcaatgcccatgctgtgctcg
      M E W W N W S L E K I K A A M P M L C S
1261 tctaataattggtggcctgcacaagtattggctcgagtttgccgtctaacaaatcaatcaa
      S N I V G L H K Y W L E F A V -
1321 tgccgaatcttcgcgggcacggcatatatcaggcgtttagatgcactaagcacataattgct
      attC
1381 cacagccaaactatcaggtcaagtct

```

Figura 4.21. Seqüència parcial de nucleòtids de l'integró Int1,5 amb les seqüències deduïbles d'aminoàcids dels gens *aadB* (nt 61 al 595) i *catB3* (nt 676 al 1308). En vermell s'indica la regió corresponent al lloc d'integració *attI*, en vermell fosc els pentanucleòtids corresponents al lloc d'integració de *attI*. En blau l'element de 59bp o lloc *attC* i en blau fosc els pentanucleòtids corresponents al lloc d'integració de *attC* (*accession number* DQ 237858).

Aquest resultat ens presenten la identificació del lloc de recombinació específic o regió *attI* del nucleòtid 9 al 59 i en aquesta regió es van localitzar les seqüències més freqüents en els extrems inicial i final que formen el palíndrom imperfecte 5'-GCAAC...(40pb)...GTTAG-3'.

A més es van identificar dos gens de resistència, el primer d'ells és el gen de resistència aminoglicòsid adeniltransferasa (*aadB*) que confereix resistència a aminoglucòsids; el segon és el gen *cassette* cloramfenicol acetiltransferasa (*catB3*), aquest gen confereix resistència a cloramfenicol. Com era d'esperar, els antibiòtics als quals els gens *cassette* confereixen resistència coincideixen amb les resistències fenotípiques determinades en els estudis de susceptibilitat de l'apartat 4.1.

D'altra banda, també s'ha identificat el lloc *attC* o element de 59bp de cada un dels gens *cassette* amb els pentanucleòtids corresponents al seu lloc d'integració amb la seqüència característica en els extrems 5'-CTTAC.....GTTAG-3'. Aquests elements es caracteritzen per situar-se a continuació de la regió codificant (gen) i són seqüències de recombinació de lloc específic que en molts casos permeten el reconeixement i la mobilització dels gen *cassette* [31].

Les seqüències dels gens de resistència foren comparades i alineades amb altres gens d'enterobacteris tal i com es mostra en les figures 4.22. i 4.23. El programa *BLAST* fou utilitzat per obtenir el percentatge d'identitat entre cada seqüència.

Aquest percentatge d'identitat respecte el gen de resistència *aadB* de *M.morganii* amb el de *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Salmonella typhimurium* i *Proteus mirabilis* fou en tots els casos d'un 100%.

Els percentatges d'identitat respecte el gen de resistència *catB3* de *M.morganii* foren de: 93% per, *Klebsiella pneumoniae*, *S.typhimurium* i *Serratia marcescens*, i un 83% per *P.aeruginosa*.

<i>M.morganii</i>	1	MDTTQVTLIHKILAAADERNLPLWIGGGWAIDARLGRVTRKHDDIDLTFPGERRGELEAI
<i>P.aeruginosa</i>	1	MDTTQVTLIHKILAAADERNLPLWIGGGWAIDARLGRVTRKHDDIDLTFPGERRGELEAI
<i>E.coli</i>	1	MDTTQVTLIHKILAAADERNLPLWIGGGWAIDARLGRVTRKHDDIDLTFPGERRGELEAI
<i>S.typhimurium</i>	1	MDTTQVTLIHKILAAADERNLPLWIGGGWAIDARLGRVTRKHDDIDLTFPGERRGELEAI
<i>P.mirabilis</i>	1	MDTTQVTLIHKILAAADERNLPLWIGGGWAIDARLGRVTRKHDDIDLTFPGERRGELEAI
<i>M.morganii</i>	61	VEMLGGRVMEELDYGFLAEIGDELDDCEPAWWADEAYEIAEAPQGSCEAAEGVIAGR PV
<i>P.aeruginosa</i>	61	VEMLGGRVMEELDYGFLAEIGDELDDCEPAWWADEAYEIAEAPQGSCEAAEGVIAGR PV
<i>E.coli</i>	61	VEMLGGRVMEELDYGFLAEIGDELDDCEPAWWADEAYEIAEAPQGSCEAAEGVIAGR PV
<i>S.typhimurium</i>	61	VEMLGGRVMEELDYGFLAEIGDELDDCEPAWWADEAYEIAEAPQGSCEAAEGVIAGR PV
<i>P.mirabilis</i>	61	VEMLGGRVMEELDYGFLAEIGDELDDCEPAWWADEAYEIAEAPQGSCEAAEGVIAGR PV
<i>M.morganii</i>	121	RCNSWEAIIWDYFYYADEVPPVDWPTKHIESYRLACTSLGAEKVEVLRAAFRSRYAA
<i>P.aeruginosa</i>	121	RCNSWEAIIWDYFYYADEVPPVDWPTKHIESYRLACTSLGAEKVEVLRAAFRSRYAA
<i>E.coli</i>	121	RCNSWEAIIWDYFYYADEVPPVDWPTKHIESYRLACTSLGAEKVEVLRAAFRSRYAA
<i>S.typhimurium</i>	121	RCNSWEAIIWDYFYYADEVPPVDWPTKHIESYRLACTSLGAEKVEVLRAAFRSRYAA
<i>P.mirabilis</i>	121	RCNSWEAIIWDYFYYADEVPPVDWPTKHIESYRLACTSLGAEKVEVLRAAFRSRYAA

Figura 4.22. Alineació de la seqüència d'aminoàcids del gen de resistència *aadB* de *M.morganii* amb el de *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.typhimurium* i *P.mirabilis*.

<i>M.morganii</i>	1	MTNYFDSPFKGKLLSEQVKNPNIKVGR-----FDDCARYLFPDRDDVDKLIIG
<i>K.pneumoniae</i>	1	MTNYFDSPFKGKLLSEQVKNPNIKVGR <u>YSYYSGYHGH</u> SFDDCARYLFPDRDDVDKLIIG
<i>S.typhimurium</i>	1	MTNYFDSPFKGKLLSEQVKNPNIKVGR <u>YSYYSGYHGH</u> SFDDCARYLFPDRDDVDKLIIG
<i>P.aeruginosa</i>	1	MKNYF <u>N</u> SPFKGELLSEQVKNPNIRVGR <u>YSYYSGYHGH</u> SFDE <u>C</u> ARYLFPDRDDVDKLIIG
<i>S.marcescens</i>	1	MTNYFDSPFKGKLLSEQVKNPNIKVGR <u>YSYYSGYHGH</u> SFDDCARYLFPDRDDVDKLIIG
<i>M.morganii</i>	61	SFCSIGSGASFIMAGNQGHRYDWASSFPFFYMQEPAFSSALDAFQKAGNTVIGNDVWIG
<i>K.pneumoniae</i>	61	SFCSIGSGASFIMAGNQGHRYDWASSFPFFYMQEPAFSSALDAFQKAGNTVIGNDVWIG
<i>S.typhimurium</i>	61	SFCSIGSGASFIMAGNQGHRC <u>D</u> WASSFPFFYMQEPAFSSALDAFQKAGNTVIGNDVWIG
<i>P.aeruginosa</i>	61	SFCSIGSGASFIMAGNQGHRC <u>H</u> DWASSFPFFYMQEPAFSSALDAFQ <u>RAGD</u> TVIGNDVWIG
<i>S.marcescens</i>	61	SFCSIGSGASFIMAGNQGHRYDWASSFPFFYMQEPAFSSALDAFQKAGNTVIGNDVWIG
<i>M.morganii</i>	121	SEAMVMPGIKIGHGAVIGSRSLVTKDVEPYAIVGGNPAKKIKKRFTDEEISLLEMEWVN
<i>K.pneumoniae</i>	121	SEAMVMPGIKIGHGAVIGSRSLVTKDVEPYAIVG <u>S</u> NPAKKIKKRFTDEEISLLEMEWVN
<i>S.typhimurium</i>	121	SEAMVMPGIKIGHGAVIGSRSLVTKDVEPYAIVGGNPAKKIKKRFTDEEISLLEMEWVN
<i>P.aeruginosa</i>	121	SEAM <u>I</u> MPGIKIG <u>D</u> GAVIGSRSLVTKDVEPYA <u>L</u> I <u>G</u> GNPAK <u>Q</u> IKKR <u>F</u> SDEEISL <u>M</u> EMEWVN
<i>S.marcescens</i>	121	SEAMVMPGIKIGHGAVIGSRSLVTKDVEPYAIVG <u>S</u> NPAKKIKKRFTDEEISLLEMEWVN
<i>M.morganii</i>	181	WSLEKIKAAAMPMLCSSNIVGLHKYWLEFAV
<i>K.pneumoniae</i>	181	WSLEKIKAAAMPMLCSSNIVGLHKYWLEFAV
<i>S.typhimurium</i>	181	WSLEKIKAAAMPMLCSSNIVGLHKYWLEFAV
<i>P.aeruginosa</i>	181	W <u>P</u> L <u>D</u> KIK <u>T</u> T <u>M</u> P <u>L</u> L <u>C</u> SSNI <u>F</u> GLHKY <u>W</u> LEFAV
<i>S.marcescens</i>	181	WSLEKIKAAAMPMLCSSNIVGLHKYWLEFAV

Figura 4.23. Alineació de la seqüència d'aminoàcids del gen de resistència *catB3* de *M.morganii* amb el de *K.pneumoniae*, *S.typhimurium*, *P.aeruginosa* i *S.marcescens*. Els aminoàcids marcats en negreta i subratllats indiquen les diferències.

De la comparació de seqüències s'observa, tal i com era d'esperar, que les seqüències dels gens de resistència *catB3* i *aadB* de *M.morganii* són en el cas del gen de resistència *aadB* 100% idèntiques als mateixos gens de resistència dels altres bacteris i en el cas del gen de resistència *catB3* són pràcticament idèntiques, tot i que cal destacar la delecció de 12 aminoàcids entre la posició 27 i 39 d'aquest gen de resistència *catB3* en *M.morganii*.

4.5.3.2 Determinació de la seqüència de l'integró de 2,0 kb

Per obtenir la seqüència completa de l'integron es van dissenyar els primers interns INT21 i INT22, la seva seqüència es presenta a l'apartat 3.8 de material i mètodes. La seqüència d'aquest integró de 2,0Kb es detalla a la figura 4.24.

```

1   aaaaccgaccataactgggggttacttacatgaagtttttattggcattttcgcttttaata
      attI                M K F L L A F S L L I
61  ccatccgtgggtttttgcaagtacttcaaagtttcagcaagttgaacaagacgtaaggca
      P S V V F A S T S K F Q Q V E Q D V K A
121 attgaagtttctctttctgctcgtataggtggttccggttcttgatactcaaaatggagaa
      I E V S L S A R I G V S V L D T Q N G E
181 tattgggattacaatggaaatcagcgttcccgaaaacaagtacttttaaaacaatagct
      Y W D Y N G N Q R F P K T S T F K T I A
241 tgcgctaaattactatatgatgctgagcaaggaaaagttaatcccaatactacagtcgag
      C A K L L Y D A E Q G K V N P N T T V E
301 attaagaaagcagatcttgtgacctattcccctgtaatagaaaagcaagtagggcaggca
      I K K A D L V T Y S P V I E K Q V G Q A
361 atcacactcgatgatgctgcttccgcaactatgactacgagtgataatactgcgggcaaat
      I T L D D A C F A T M T T S D N T A A N
421 atcatcctaagtgctgtatgtggcccaaggcggttactgatttttaagacaaaattggg
      I I L S A V C G P K G V T D F L R Q I G
481 gacaaagagactcgtctagaccgtattgagcctgatttaaatgaaggtaagctcgggtgat
      D K E T R L D R I E P D L N E G K L G D
541 ttgagggatcgcacaactcctaaggcaatagccagtttgaataaaattttatttgggt
      L R D T T P K A I A S T L N K F L F G
601 tccgcgctatctgaaatgaaccagaaaaaattagagtccttgaatggggaacaatcaagtc
      S A L S E M N Q K K L E S W M V N N Q V
661 actggtaatttactacttttcagttattgcccggcgggatggaacattgccaatcgctcagg
      T G N L L L S V L P A G W N I A N R S G
721 gctggggcatttgggtgctcggagttattacagcagttgtgtggagtgagcatccagcccca
      A G A F G A R S I T A V V W S E H P A P
781 attatggggagcccttatctagctcaaacacagcctccaatggcagagggaaatgatgca
      I M G S P Y L A Q T Q P P M A E G N D A
841 attgtcaaaattgggtcattcaatttttgacgtttattcttcacaggccccctgataaggc
      I V K I G H S I F D V Y S S Q A P -
901 taacaggccatcaagttgacggctttccgctcgttgttttgggttaacgttacgctac
      attC
961 cacaaaatcaactccaaagccgcaacttatggcggcggttagacatctcatgagggtagcg
      M R V A
1021 gggaccatcgaaatttcggacccaatatcagaggtgcttagcgtcattgagcgcctctg
      G T I E I S D P I S E V L S V I E R H L
1081 aaatcaacggttctgaccgtgcatttgaacggctccgagtggatggcgtcctgaagcca
      K S T L L T V H L Y G S A V D G V L K P
1141 tacagcgatattgatttgggttactgtggccgtaaaagcttgatgaaacgacgcggcgca
      Y S D I D L L V T V A V K L D E T T R R

```



```

1201 gcattgctcaatgaccttatggaggcttcggctttccctgtcgagaacgagacgctccgc
    A L L N D L M E A S A F P V E N E T L R
1261 gctatagaagtcacccttgtcgtgcatgacgacatcatcccgtggcggttatccggctaag
    A I E V T L V V H D D I I P W R Y P A K
1321 cgcgagctgcaatgggagaatggcagcgcaatgacattccttgcgggtatccttcgagcca
    R E L Q F G E W Q R N D I L A G I F E P
1381 gccatgatcgacattgatctagctatcctgcttacaagcaagagaacatagcgttgcc
    A M I D I D L A I L L T K A R E H S V A
1441 ttggtagggtccggcagcggaggaattccttgaccgggttcctgaacaggatctattcgag
    L V G P A A E E F F D P V P E Q D L F E
1501 gcgctgagggaaaccttgaagctatggaactcgcaccccgcactgggcccggcgatgagcga
    A L R E T L K L W N S H P D W A G D E R
1561 aatgtagtgcttacgcttgccttgggtacagcgcaataaccggcaaaatcgcgccg
    N V V L T L S R I W Y S A I T G K I A P
1621 aaggatgtcgttccgactgggcaataaaaacgcctacctgccagtatcagcccgtctta
    K D V A S D W A I K R L P A Q Y Q P V L
1681 cttgaagctaagcaagcttatctgggacaaaaagaagatcacttggcctcacgcgcagat
    L E A K Q A Y L G Q K E D H L A S R A D
1741 cacttgcaagaatatttcgctatgaggaaggcgagatcatcaagtcagttggtaaataga
    H L Q E F I R Y E E G E I I K S V G K -

```

Figura 4.24. Seqüència parcial de nucleòtids de l'integró Int2,0 amb les seqüències deduïbles d'aminoàcids dels gens *blaP1b* (nt 28 al 894) i *aadA2* (nt 1009 al 1800). En vermell s'indica la regió parcialcorresponent al lloc d'integració *attI*, en vermell fosc un pentanucleòtid corresponent al lloc d'integració de *attI*. En blau l'element de 59bp o lloc *attC* i en blau fosc els pentanucleòtids corresponents al lloc d'integració de *attC*. En verd els primers interns utilitzats per completar la seqüenciació de Int2,0 (*accession number* DQ 237857).

Aquesta seqüència ens indica, parcialment, el lloc de recombinació específic o regió *attI* del nucleòtid 1 al 23 amb només la seqüència de l'extrem final descrita més freqüentment 5'-GTTAG-3'.

A més es van identificat dos gens de resistència, el primer d'ells el gen *cassette* carbenicilinas (*blaP1b*) que confereix resistència a β -lactamases, el segon, el gen de resistència adeniltransferasa (*aadA2*), aquest gen confereix resistència a estreptomycin. Com era d'esperar, els antibiòtics als quals els gens *cassette* confereixen resistència coincideixen amb les resistències fenotípiques determinades ens els estudis de susceptibilitat de l'apartat 4.1.

D'altre banda, també s'ha identificat el lloc *attC* o element de 59 bp del primer gen *cassette* amb els pentanucleòtids corresponents al seu lloc d'integració amb la seqüència en els extrems característica 5'-CTTAC.....GTTAG-3' i amb un tamany considerable de 100pb, aquestes seqüències tenen normalment una mida de entre 60 a 110 pb. Aquest element es caracteritza per situar-se a continuació de la regió codificant (gen) i són seqüències de

recombinació de lloc específic que en molts casos permeten el reconeixement i la mobilització dels *cassette* [31].

La seqüències dels gens de resistència foren comparades i alineades amb altres gens d'enterobacteris tal i com es mostra en les figures 4.25. i 4.26. El programa *BLAST* fou utilitzat per obtenir el percentatge d'identitat entre cada seqüència.

Aquest percentatge d'identitat respecte el gen de resistència *blaP1b* de *M.morganii* amb el de *P.aeruginosa*, *S. typhimurium* i *E.coli* fou de tots els casos d'un 94%.

Els percentatges d'identitat respecte el gen de resistència *aadA2* de *M.morganii* foren de: 94% per *E.coli*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae* i un 93% per *Salmonella enterica subsp. enterica*.

<i>M.morganii</i>	1	MKFLLAFLSLLIPSVVFASTSKFQQVEQDVKAIEVLSARIGVSVLDTQNGEYWDYNGNQ
<i>P.aeruginosa</i>	1	MKFLLAFLSLLIPSVVFASTSKFQQVEQDVKAIEVLSARIGVSVLDTQNGEYWDYNGNQ
<i>S.typhimurium</i>	1	MKFLLAFLSLLIPSVVFASTSKFQQVEQDVKAIEVLSARIGVSVLDTQNGEYWDYNGNQ
<i>E.coli</i>	1	MKFLLAFLSLLIPSVVFASTSKFQQVEQDVKAIEVLSARIGVSVLDTQNGEYWDYNGNQ
<i>M.morganii</i>	61	FPKTSTFKTIACAKLLYDAEQGKVNPNSTVEIKKADLVITYSPVIEKQVQAITLDDACFA
<i>P.aeruginosa</i>	61	FPLTSTFKTIACAKLLYDAEQGKVNPNSTVEIKKADLVITYSPVIEKQVQAITLDDACFA
<i>S.typhimurium</i>	61	FPLTSTFKTIACAKLLYDAEQGKVNPNSTVEIKKADLVITYSPVIEKQVQAITLDDACFA
<i>E.coli</i>	61	FPLTSTFKTIACAKLLYDAEQGKVNPNSTVEIKKADLVITYSPVIEKQVQAITLDDACFA
<i>M.morganii</i>	121	TMTTSDNTAANIILSAVCGPKGVTDFLRQIGDKETRLDRIEPLDNEGKLGDLRDTTPKA
<i>P.aeruginosa</i>	121	TMTTSDNTAANIILSAVGGPKGVTDFLRQIGDKETRLDRIEPLDNEGKLGDLRDTTPKA
<i>S.typhimurium</i>	121	TMTTSDNTAANIILSAVGGPKGVTDFLRQIGDKETRLDRIEPLDNEGKLGDLRDTTPKA
<i>E.coli</i>	121	TMTTSDNTAANIILSAVGGPKGVTDFLRQIGDKETRLDRIEPLDNEGKLGDLRDTTPKA
<i>M.morganii</i>	181	IASTLNKFLFGSALSEMNOQKLESWMVNNQVTGNLLRSVLPAGWNIADRSGAGGFGARSI
<i>P.aeruginosa</i>	181	IASTLNKFLFGSALSEMNOQKLESWMVNNQVTGNLLRSVLPAGWNIADRSGAGGFGARSI
<i>S.typhimurium</i>	181	IASTLNKFLFGSALSEMNOQKLESWMVNNQVTGNLLRSVLPAGWNIADRSGAGGFGARSI
<i>E.coli</i>	181	IASTLNKFLFGSALSEMNOQKLESWMVNNQVTGNLLRSVLPAGWNIADRSGAGGFGARSI
<i>M.morganii</i>	241	TAVVWSEHPAPIMGSPYLAQTQPPMAEGNDAIVKIGHISIFDVYSSQAR
<i>P.aeruginosa</i>	241	TAVVWSEHQAPIIVSIYLAQTQASMAERNDIAIVKIGHISIFDVYTSQSR
<i>S.typhimurium</i>	241	TAVVWSEHQAPIIVSIYLAQTQASMAERNDIAIVKIGHISIFDVYTSQSR
<i>E.coli</i>	241	TAVVWSEHQAPIIVSIYLAQTQASMAERNDIAIVKIGHISIFDVYTSQSR

Figura 4.25. Alineació de la seqüència d'aminoàcids del gen de resistència *blaP1b* de *M.morganii* amb *P.aeruginosa*, *S.typhimurium* i *E.coli*. Els aminoàcids marcats en negreta i subratllats indiquen les diferències.

<i>M.morganii</i>	1	MRVAGTIEISDP ISEVLSVIERHLKSTLLTVHLYGSAVDGVLKPYSDIDLLVTVAVKLDE
<i>E.coli</i>	1	MRVAVTIEIS NQL SEVLSVIERHLE ESTLLAV HLYGSAVDG GL KPYSDIDLLVTVAVKLDE
<i>P.aeruginosa</i>	1	MRVAVTIEIS NQL SEVLSVIERHLE ESTLLAV HLYGSAVDG GL KPYSDIDLLVTVAVKLDE
<i>V.cholerae</i>	1	MRVAVTIEIS NQL SEVLSVIERHLE ESTLLAV HLYGSAVDG GL KPYSDIDLLVTVAVKLDE
<i>S.enterica</i>	1	MRVAVTIEIS NQL SEVLSVIERHLE ESTLLAV HLYGSAVDG GL KPYSDIDLLVTVAVKLDE
<i>M.morganii</i>	61	TTRRALLNDLMEASAFPVENETLRAIEVTLVVHDDIIPWRYPAKRELQFGEWQRNDILAG
<i>E.coli</i>	61	TTRRALLNDLMEASAFP GE SETLRAIEVTLVVHDDIIPWRYPAKRELQFGEWQRNDILAG
<i>P.aeruginosa</i>	61	TTRRALLNDLMEASAFP GE SETLRAIEVTLVVHDDIIPWRYPAKRELQFGEWQRNDILAG
<i>V.cholerae</i>	61	TTRRALLNDLMEASAFP GE SETLRAIEVTLVVHDDIIPWRYPAKRELQFGEWQRNDILAG
<i>S.enterica</i>	61	TTRRALLNDLMEASAFP GE SETLRAIEVTLVVHDDIIPWRYPAKRELQFGEWQRNDILAG
<i>M.morganii</i>	121	IFEPAMIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEEFFDPVPEQDLFEALRETLKLNWSHPDWA
<i>E.coli</i>	121	IFEPAMIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEEFFDPVPEQDLFEALRETLKLNWS Q PDWA
<i>P.aeruginosa</i>	121	IFEPAMIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEEFFDPVPEQDLFEALRETLKLNWS Q PDWA
<i>V.cholerae</i>	121	IFEPAMIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEEFFDPVPEQDLFEALRETLKLNWS Q PDWA
<i>S.enterica</i>	121	IFEPAMIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAT TE EFFDPVPEQDLFEALRETLKLNWS Q PDWA
<i>M.morganii</i>	181	GDERNVVLTLRSRIWYSAITGKIAPKDVA SD WAIKRLPAQYQPVLLEAKQAYLGQKEDHLA
<i>E.coli</i>	181	GDERNVVLTLRSRIWYSAITGKIAPKDVAADWAIKRLPAQYQPVLLEAKQAYLGQKEDHLA
<i>P.aeruginosa</i>	181	GDERNVVLTLRSRIWYSAITGKIAPKDVAADWAIKRLPAQYQPVLLEAKQAYLGQKEDHLA
<i>V.cholerae</i>	181	GDERNVVLTLRSRIWYSAITGKIAPKDVAADWAIKRLPAQYQPVLLEAKQAYLGQKEDHLA
<i>S.enterica</i>	181	GDERNVVLTLRSRIWYSAITGKIAPKDVAADWAIKRLPAQYQPVLLEAKQAYLGQKEDHLA
<i>M.morganii</i>	241	SRADHLQEFIRYEEGEI I KSVGK
<i>E.coli</i>	241	SRADHL EE FIR FVK GEI I KSVGK
<i>P.aeruginosa</i>	241	SRADHL EE FIR FVK GEI I KSVGK
<i>V.cholerae</i>	241	SRADHL EE FIR FVK GEI I KSVGK
<i>S.enterica</i>	241	SRADHL EE FIR FVK GEI I KSVGK

Figura 4.26. Alineació de la seqüència d'aminoàcids del gen de resistència *aadA2* de *M.morganii* amb *E.coli*, *P.aeruginosa*, *V.cholerae*, *S.enterica*. Els aminoàcids marcats en negreta i subratllats indiquen les diferències.

De la comparació de seqüències s'observa, tal i com era d'esperar, que les seqüències dels gens de resistència *blaP1b* i *aadA2* de *M.morganii* són pràcticament idèntiques a les seqüències dels mateixos gens de resistència dels altres bacteris.

5 RESUM I CONCLUSIONS

1. *M. morganii* HUB198351 es va aïllar d'un malalt a la UCI que va morir d'una infecció. S'ha demostrat que es tracta d'un microorganisme multiresistent amb una resistència a ampicil·lina, penicil·lina, cefalotina, cefoxitina, estreptomina, gentamicina, eritromicina, ciprofloxacina, àcid nalidíxic, cloramfenicol, novobiocina, rifampicina, tetraciclina, ticarcil·lina, tobramicina, piperacil·lina i cristall violeta.
2. La porina única de *M. morganii* HUB198351 és una porina trimèrica de 36 KDa. Això la diferencia d'altres enterobacteris que presenten dues (*E.coli*) o fins i tot tres (*S.marcescens*) porines majoritàries.
3. L'anàlisi de conductància de canal simple produït per la proteïna Omp36 de *M. morganii* i les mesures de potencial de membrana a corrent zero, demostren que es tracta d'una proteïna formadora de canal, amb uns valors de conductància de 2nS similars als obtinguts en altres porines de Gram negatius i no sembla ser responsable de la resistència als antibiòtics observada. Aquesta proteïna presenta una lleugera selectivitat catiònica, amb un coeficient de partició entre el potassi i el clor de 2, una mida de poro de 1,18 nm i és depenen de voltatge.
4. *M. morganii* HUB198351 dur un plasmidi de 6,6 kb que hem aïllat, purificat i estudiat al qual hem anomenat pLM2003.
5. *M. morganii* HUB198351 conté dos integrons en el plasmidi, un d'ells amb dos gens de resistència; el gen aminoglicòsid adeniltransferasa (*aadB*) que confereix resistència a aminoglucòsids i el gen cloramfenicol acetiltransferasa (*catB3*), que confereix resistència a cloramfenicol. El segon integró també conté dos gens de resistència, el primer d'ells el gen *cassette* carbenicilinas (*blaP1b*) que confereix resistència a β -lactamases, el segon, el gen de resistència adeniltransferasa (*aadA2*), aquest gen confereix resistència a estreptomina.

6 BIBLIOGRAFIA

1. **Achouak W, Heulin T, Pagès JM.** Multiple facets of bacterial porins. FEMS 2000;199:1-7.
2. **Ambile-Cuevas CF, Chicurel ME.** Bacterial plasmids and gene flux. Cell.1992;70:189-199.
3. **Ambler R.** The structure of β -lactamases.Philos Trans R Soc Lond B Biol Sc. 1980; 289:321-331.
4. **Arakawa Y, Murakami M, Suzuki S, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M.** A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}*. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1612-1615.
5. **Arranz Caso JA,Cuadrado Gomez LM, Romanik Cabrera J etal.** Pyomyositis caused by *Morganella morganii* in a patient with AIDS. Clin infect dis 1996; 22:372-374.
6. **Baranaud G, Arlet G, Danglot C, Philippon A.** Cloning and sequencing of the gene encoding the AmpC beta-lactamase of *Morganella morganii*. FEMS Microbiol Lett. 1997;1:15-20.
7. **Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, Gobius KS.** Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. Antimicrobial Agents Chemother 2004;48:838-842.
8. **Barroso H, Freitas-Vieira A, Duarte A.** Molecular characterization of a ceftazidime-resistance *Morganella morganii* isolate producing a TEM-10 beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother.1999;2:434-435.
9. **Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ.** A general method for detecting and sizing large plasmids. Anal Biochem 1995;226:235-240.
10. **Bennet PM.** Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. J antimicrob Chemother. 1999;43:1-4.
11. **Benz R.** Structure and function of porins from Gram-negative bacteria. Ann Rev Microbiol 1988; 36:359-393
12. **Benz R.** Uptake of solutes through bacterial outer membranes. In: Bacterial cell wall. J.M. Ghuyesen R, Hakenbeck, editor. 1994;397-423. Elsevier Science B.V. Amsterdam.
13. **Benz R, Janko K, Boos W, Laüger P.** Formation of large, ion-impermeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta 1978; 511:305-319.
14. **Benz R, Janko K, Laüger P.** Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta 1979;551:238-247.

15. **Benz R, Maier E, Chakraborty T.** Purification of OmpU from *Vibrio cholerae* classical strain 569B: evidence for the formation on large cation-selective ion-permeable channels by OmpU. *Microbiología SEM.* 1997;13:321-330.
16. **Benz R, Schmid A, Hancock REW.** Ion selectivity of Gram-negative bacterial porine. *J Bacteriol* 1985;162:722-727.
17. **Bergey DH, Breed RS, Murray EGD, Hitchens AP.** Bergey's manual of determinative bacteriology, abridged 5th ed. P.76. Biotech Publications, Geneva, N.Y
18. **Berlanga M, Ruiz N, Hernández-Borrell J, Montero MT, Viñas M.** Role of outer membrane in the accumulation of quinolones by *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol.* 2000;46:716-722.
19. **Beyer R, Pestova E, Millichap JJ, Stosor V, Noskin GA, Peterson LR.** A convenient assay for estimating the possible involvement of efflux of fluoroquinolones by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: evidence for diminished moxifloxacin, sparfloxacin and trovafloxacin efflux. *Antimicrob. Agents Chemother.*2000;44:798-801.
20. **Bissonnette L, Roy RH.** Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 1992;174:1248-57.
21. **Boussemart T, Piet-Duroux S, Manouana M, Azi M, Perez JM, Port-Lis M.** *Morganella morgani* and early onset neonatal infection. *Arch Pediatr* 2004;11:37-39.
22. **Borges-Walmsley MI, McKeegan KS, Walmsley.** Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.* 2003;376:313-338.
23. **Brenner DJ, Farmer III JJ, Fanning GR, Steigerwalt AG, Klykken P, Wathen HG, Hickman FW, Ewing WH.** Desoxyribonucleic acid relatedness of *Proteus* and *Providencia* species. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1978;28:269-282.
24. **Bunny KL, Hall RM, Stokes HW.** New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene, aacA7, and chloramphenicol resistance gene, catB3, in an integron in pBWH301. *Antimicrob Agents Chemother.*1995;39:686-693
25. **Bush K, Jacoby G, Medeiros A.** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chem.* 1995;39:1211-1233.
26. **Carmona F, Fabregues F, Alvarez R, Vila J, Cararach V.** A rare case of chorioamnionitis by *Morganella morgani* complicated by septicemia and adult respiratory distress syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1992;45:67-70.

27. **Casanova-Roman M, Sanchez-Porto A, Casanova-Bellido M.** Early onset neonatal sepsis caused by vertical transmission of *Morganella morganii*. Scand J Infect Dis 2002;34:534-535.
28. **Castellani A.** Note on cases of fever due to *Bacterium columbense* (Cast 1905). Zentbl. Akteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I Orig. 1914;74:197-200.
29. **Chopra I, Hobson J, Metcalf B, Poste G.** The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:497-503.
30. **Collis CM, Grammaticopoulos G, Briton J, Stoses HW, Stokes HW, Hall RM.** Site-specific insertion gene cassettes into integrons. Mol Microbiol. 1993;9:41-52.
31. **Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM.** Characterization of the Class 3 Integron and site-specific recombination system it determines. J Bacteriol. 2002;3017-3026.
32. **Collis CM, Hall RM.** Gene cassettes from the insert region of integrons are existed as covalently closed circles. Mol Microbiol.. 1992;6:2875-2885.
33. **Collis CM, Hall RM.** Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:155-162.
34. **Cunningham ET, Whitcher JP, Kim RY.** *Morganella morganii* postoperative endophthalmitis. Br J Ophthalmol. 1997;81:170-171
35. **Cunha BA, Qadri SM, Ueno Y, Walters EA, Domenico P.** Antibacterial activity of trovafloxacin against nosocomial Gram-positive and Gram-negative isolates. J. Antimi. Chemoth. 1997;39 suppl:29-34.
36. **Delcour AH.** Function and modulation of bacterial porins: insights from electrophysiology. FEMS Microbiol Lett. 1997;151:115-123.
37. **Dutta S, Narang A.** Early onset neonatal sepsis due to *Morganella morganii*. Indian Pediatr 2004;41:1155-1157.
38. **Ewing WH.** The tribe *Proteae*: its nomenclature and taxonomy. Int Bull. Bacteriolog. Nomencl. Taxon. 1962;12:93-102.
39. **Farmer JJ 3rd, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR, Steigerwalt AG, O'Hara CM, Morris GK, Smith PB, Brenner DJ.** Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 1985;21:46-76.

40. **Feliciello I, Chinali G.** A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal Biochem.* 1991;28:639-653.
41. **Fulton M.** The identity of *Bacterium columbiensis* Castellani. *J. Bacteriol.* 1943;46:79-82.
42. **Gautam V, Gupta V, Joshi RM, Sawhney G, Duhan S.** *Morganella morganii* associated arthritis in a diabetic patient. *J Clin Microbiol* 2003;41:3451
43. **García de Lomas JD, Navarro D, Gimeno D.** 1993. Mecanismo de acción de los antibióticos. En Tratamiento antimicrobiano. Drobnic L. Editor Grupo Bristol. Ediciones Doyma. Barcelona
44. **Gravel A, Fournier B, Roy PH.** DNA complexes obtained with the integron integrase IntI1 at the *attI1* site. *Nucleic Acids Res.* 1998.26:4347-4355
45. **Goldstein C, Lee MC, Sánchez S, Hudson C, Philips B, Register B et al.** Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals and exotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:723-726.
46. **González G, Sossa K, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R.** Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean Hospitals. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;161:125-128.
47. **Gootz TD.** The forgotten Gram-negative bacilli: what genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. 2006. *Biochemical Pharmacology.* 71:1073-1084
48. **Guo M, Liu P.** Serological specificities of ureases of *Proteus* species, *J Gen Microbiol.* 1965.38:417-422.
49. **Hall RM, Collis CM.** Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site specific recombination. *Mol Microbiol.* 1995;15:593-600.
50. **Hancock REW.** Model membrane of porin function, pag 187-225. AM Inouye (ed.). bacterial outer membranes as model systems. 1987. John Wiley and Sons, Inc.
51. **Hickman FW, Farmer III JJ, Steigerwalt, Brenner DJ.** Unusual groups of *Morganella* ("Proteus") *morganii* isolated from specimens: lysine-positive and ornithine-negative biogroups. *J. Clin. Microbiol.* 1980;12:88-94.
52. **Hu L, Nicholson E, Bradley J, Lynch M, Mobley H.** *Morganella morganii* urease: purification, characterization and isolation of gene sequences. *J. Bacteriology* 1990;3073-3080.
53. **Injatovich M.** Bacterial causes of meningitis in newborns. *Srp Arh Celok Lek.* 2001;129:36-41.

54. **Isaacs RD, Ellis-Pegler RB.** Successful treatment of *Morganella morganii* meningitis with pefloxacin mesylate. *J Antimicrob Chemother* 1987;20:769-770
55. **Isobe H, Motomura K, Kotou K, et al.** Spontaneous bacterial empyema and peritonitis caused by *Morganella morganii*. *J Clin Gastroenterol.* 1994; 18:87-88.
56. **Jacoby GA.** β -lactamase nomenclature. Minireview. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;11203-1129.
57. **Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Robin T.** Biochemical investigations of biogroups and subspecies of *Morganella morganii*. *J Clin Microbiol.* 1996;34:108-113.
58. **Jehad Abdalla MD, Mustafa Saad MD et al.** Central nervous system infection caused by *Morganella morganii*. *Am J Med* 2006;331:44-47.
59. **Jensen K, Fredericksen W, Hicianan-Brenner F, Steigerwalt G, et al.** Recognition of *Morganella* subspecies with proposal of *M.morganii* subsp. *morganii* and *M. morganii* subsp. *sibonii*. *Intern J. Syst. Bacteriol.* 1992;42:613-620.
60. **Johnson JR, Feingold M.** Case of chorio-amnionitis in an immunocompetent woman caused by *Morganella morganii*. *J Matern Fetal Med* 1998; 7: 13-14.
61. **Jones BD, Mobley H.** Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. *Infect Immu.* 1987;2198-2203.
62. **Jones ME, Peters E, Weersink AM, Fluit A, Verhoef J.** Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet.*1997;349:1742-1743.
63. **Kratz J, Schmit F, Wiedemann B.** Characterization of Tn2441 and Tn2410, two transposons derives from R-plasmid R1767 and related to Tn2603 and Tn21. *J Bacteriol.* 1983;155:1333-1342.
64. **Koronasis V, Cross M, Senior E, Koronasix E, Hughes C.** The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the alpha-hemolysis of *Escherichia coli*. *J. Bacteriology.* 169: 1509-1515.1987.
65. **Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Aminosante G, Fontana R, Rossilin GM.** Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.*1999;43:1548-1590.

66. **Leranoz S, Fusté MC, HullRP, Williams, ViñasM.** Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding proline oxidase of *Serratia marcescens*. *Microbios*.1991;67:87-94.
67. **Levésque C, Piché L, Larose C, Roy PH.** PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39:185-191.
68. **Lindberg F, Lindsquist S, Normark S.** Genetic basis of induction and overproduction of chromosomal class 1 β -lactamases in nonfastidious gramnegative bacilli. *Rev. Infect. Dis.* 1988;10:782-785.
69. **Lu CH, chang WN, Chuang YC.** Resistance to third-generation cephalosporins in adult gram-negative bacillary meningitis. *Infection.* 1999;27:208-211.
70. **Lynch S.** Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view. *Biochemical Pharmac.* 2006;71:949-956.
71. **Maslow JN, Slutxky AM, Arbeit RD.** Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In Persing DH, editors. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications.* 1993;563-571.
72. **Mastronianni A, Coronado O, Chiodo F.** *Morganella morganii* meningitis in a patient with AIDS. *J Infect.* 1994;29(3):356-7.
73. **Mazel D, Davies J.** Antibiotic resistance. The big picture. *Adv. Esp. Med. Biol.* 1998;456:1-6.
74. **Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J.** A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science.* 1998;280:605-608.
75. **McDermott C, Mylotte JM.** *Morganella morganii*: epidemiology of bacteremic disease. *American Journal of infec Control.* 1984;5:131-137.
76. **Medeiros A.** Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactams antibiotic. *Clin Infect, Dis.* 1997;24:19-45.
77. **Morgan H de R.** Upon the bacteriology of the summer diarrhoea of infants. *Br. Med. J.* 1906;1:908-912.
78. **National Commitee for Clinica Laboratory Standards.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 8th ed. Approved standard document M2-A8. National Committee for CLinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2003.

79. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 8th ed. Approves standard document M100-S10. National Committee for CLinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2000.
80. **Nesvera J, Hockmannova J, Patek M.** An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol Lett. 1998;169:391-395.N
81. **Neu HC.** The crisis in antibiotic resistance. Science. 1992;257:1064-1072
82. **Nikaido , H.** Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33:1831-1836.
83. **Nikaido H.** Porins and specific channels of bacterial outer membranes. Mol Microbiol. 1992;6:435-442.
84. **Nikaido , H.** Transport across the outer membrane. J. Bioenergetics Biomembranes. 1993;25:581-589.
85. **Nikaido H.** Prevention of drug access to bacterial targets: permeability and active efflux. Science. 1994;264:382-388.
86. **Nikaido H.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 2003;67:593-656.
87. **Nikaido H, Normark S.** Sensitivity of *Escherichia coli* to varios β -lactams in determined by interplay of outer membrane permeability and degradation by periplasmatic β -lactamases: a quantitative predective treatment. Mol Microbiol.1987; 1:29-36.
88. **Nikaido H, Vaara M.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. 1985;49:1-32.
89. **Nowakowska M, Rogala-Zawada D, Wiechula B et al.** Urinary tract infections in children, etiologic agents and susceptibility antibiotics. Wiad Lek. 2004;57:438-443.
90. **O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM.** Classification identification and clinical significance of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. Clin Microbiol Rev. 2000;13:534-546.
91. **Osborn MJ, Wu HCP.** Proteins of the outer membrane of Gram negative bacteria. Acta Rev. Microbiol. 1980;34:369-422.
92. **Partridge SR, Recchia GD, Sacarmuzzi C, Collis CM, Stokes HW, Hall RM.** Definition of the attI1 site of class 1 integrons. Microbiol. 2000;146:2855-2864.
93. **Pathengay A, Pilli S, Das T.** Acute postoperative *Morganella morganii* panophthalmitis. Eye. 2005;19:711-713.

94. **Perilli M, Segatore B, de Massis MR et al.** TEM-72 , a new extended-spectrum beta-lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. Antimicrob. Agents Chemother. 2000;9:2537-2539.
95. **Piddock LJ, Johnson MM.** Accumulation of 10 fluoroquinolones by wild-type or efflux mutant *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother.2002;46:813-820.
96. **Poirel L, Guibert M, Girlich D, Naas T, Nordmann P.** Cloning, sequence analyses, expression and distribution of ampC-ampR from *Morganella morganii* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 1999;4:769-776.
97. **Poirel L, NassT, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordman P.** Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel classA extended spectrum beta-lactamase encoded by *Escherichia coli* integron gene. Antimicrob Agents Chemother.1999;43:573-581.
98. **Poole K.** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria.2004;10:12-26.
99. **Power P, Galleni M, Di Conza J, Ayala JA, Gutkind G.** Description of In116, the first blaCTX-M-2- containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. J Antimicrob Chemother. 2005;4:461-465.
100. **Power P, Galleni M, Ayala JA, Gutkind G.** Biochemical and molecular characterization of three new variants of AmpC β -lactamases from *Morganella morganii*. Antimicrob Agents Chemother.2006;962-967.
101. **Puig M, Palomar J, Lorén JG, Viñas M.** Modification by analgesics of the susceptibility to antibiotics in *Serratia marcescens*. Microbiologia. 1995;18:385-390.
102. **Putman M, van Veen HW, Konings WN.** Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000;34:672-693.
103. **Ranu SS, Valencia GB, Picuch S.** Fatal early onset infection in an extremely low birth weight infant due to *Morganella morganii*. J Perinatol1999; 19: 533-535.
104. **Rau CS, Cahng WN, Lin YC et al.** Brain abscess caused by aerobic Gram-negative bacilli: clinical features and therapeutic out comes. Clin neurol neurosurg 2002;105:60-65.
105. **Rauss KF.** The systematic position of Morgan's bacillus. J. pathol. Bacteriol. 1936;42:183-192.
106. **Recchia GE, Hall RM.** Origins of mobile gene cassettes found in integrons. Trend Microbiol. 1997;5:389-394.

107. **Recchia GE, Sherrat DJ.** Gene acquisition in bacteria by integron mediated site specific recombination. En: Craig N, Craigie R, Gellert M and AM Lambowitz, ed. Mobile DNA II. ASM Press, Washington, DC, USA 2002;162-76.
108. **Rosser SJ, Young HK.** Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from aquatic environment. J. Antimicrob Chemother.1999;44:11-18.
109. **Rowen JL, Lopez SM.** *Morganella morganii* early onset sepsis. Pediatr Infect Dis J 1998; 17: 1176-1177.
110. **Ruiz N, Maier E, Andersen C, Benz R, Viñas M.** Molecular and functional characterization of the *Serratia marcescens* outer membrane protein Omp1. Biophys Chemistry. 2004;215-227.
111. **Ruzin A, Keeney D, Bradford A.** AcrAB efflux pump plays a role in decreased susceptibility to tigeciclina in *Morganella morganii*. Antim. Ag. Chemoth.2005;49:791-793.
112. **Salen PN, Eppes S.** *Morganella morganii*: a newly reported, rare case of neonatal sepsis. Acad Emerg Med. 1997;4:711-714
113. **Salyers AA, Whitt DD.** Bacterial pathogenesis, a molecular approach. 1994: 97-110. ASM Pres (Washington, D.C.).
114. **Sambrock J, Frish EF, Maniatis T.** Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nex York,1989.
115. **Samonis G, Anatoliotaki M, Apostolakou H, Souglakos j, Georgoulis V.** Fatal septicemia and meningitis due to *Morganella morganii* in a patient with Hodgkin's disease. Scand J Infect Dis. 2001;33:553-555.
116. **Schonwetter R, Orson F.** Chronic *Morganella morganii* arthritis in a elderly patient. J Clin Microbiol. 1988:1414-1415.
117. **Schulz G.** Porins: general to specific, native to engineered passive pores. Current Opinion in Sructural Biology. 1996;6:485-490.
118. **Schwartz DC, Cantor CR.** Separation of yeast chormosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. 1984;37:67-75.
119. **Sen S, Nikaido H.** Lipopolysaccharide structure required for *vitro* trimerization of *Escherichia coli* OmpF porin. J. Bacteriol. 1991;173:926-1028.
120. **Sica S, Di Mario A, Salutari P, et al.** *Morganella morganii* pericarditis after resilvent splenectomy for immune pancytopenia following allogenic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. Clin infect dis. 1995;21:1052-1074.

121. **Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA.** Approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol.1980;30:225-420.
122. **Spratt BG.** Resistance to antibiotics mediates by target alterations. Science. 1994; 264: 388-392.
123. **Stokes HW, Hall RM.** A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site specific gene integration functions:integrans. Mol Microbiol. 1989;3:1669-1683.
124. **Sundstrom L, Skold O.** The dhfrI trimethoprim resistance gene of Tn7 can be found at specific sites in other genetic surroundings. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34:642-650
125. **Tessier F, Arpin C, Allery A, Quentin C.** Molecular characterization of a TEM-21 beta-lactamase in a clinical isolate of *Morganella morganii*. Antimicrob Agents Chemother.1998;8:2125-2127.
126. **Tsanaktsidis G, Anarwal SA, Maloof AJ, Cahndra J, Mitchell P.** Postoperative *Morganella morganii* endophthalmitis with subclinical urinary tract infections. J Cataract Refract Surg. 2003;29:10011-1013
127. **Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens P.** Antibiotic efflux pumps.Biochem Pharmacol 2000;60:457-470.
128. **Vawn Duyne GD.** A structural view of tyrosine recombinase site-specific recombination. En: Craig N, Craigie R, Gellert M and AM Lambowitz, ed. Mobile DNA II. ASM Press, Washington, DC, USA 2002;93-117
129. **White PA, McIver CJ, Rawlinson WD.** Integrans and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother.2001;45:2658-2661.
130. **Wolfson JS, Hooper DC.** Fluoroquinolone antimicrobial agents. Clin Microbiol. Rev. 1989;2:378-424.
131. **Zugurskaya HI.** Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. Int J Med Microbiol. 2002;292:95-105.