

Identificación por PCR-SSCP de genes de cefotaximasas en aislamientos hospitalarios de *Enterobacteriaceae*

Identifying cefotaximase genes in *Enterobacteriaceae* hospital isolates by PCR-SSCP

José Ramón Mantilla Anaya¹, Emiliano Barreto Hernández², María Teresa Reguero Reza³, Daniel Augusto Velandia Rodríguez⁴

Resumen

Las cefotaximasas (CTX-M) son las beta-lactamasas de espectro extendido más ampliamente diseminadas entre especies de la familia *Enterobacteriaceae*, y son la causa principal de resistencia en aislamientos causantes de infección intrahospitalaria. El objetivo del presente trabajo fue identificar variantes de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 mediante el análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) de fragmentos de restricción provenientes de los productos de la amplificación por PCR de los genes *bla*_{CTX-M}. Con el procedimiento PCR-SSCP estandarizado, en este trabajo se analizaron 49 aislamientos de enterobacterias recolectados en 8 hospitales de Bogotá, D.C., adscritos a la Secretaría Distrital de Salud. Se detectaron las variantes CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-12a, y CTX-M-1 y una nueva variante denominada CTX-M-60. Todas las variantes fueron detectadas tanto en aislamientos intrahospitalarios como de la comunidad, lo que indica posible movilidad de estos genes desde y hacia los centros hospitalarios. Esta publicación constituye el primer reporte en Colombia de la variante CTX-M-12a y la nueva variante evolutiva CTX-M-60.

Palabras clave: resistencia microbiana, cefotaximasas (CTX-M), polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP), beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), infección hospitalaria.

Abstract

CTX-M cefotaximases are the most widely distributed extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* and they are an important cause of microbial resistance in nosocomial infection-causing isolates. The object of this work was to identify group 1 CTX-M cefotaximase variants from PCR amplified *bla*_{CTX-M} genes by single-stranded conformational polymorphism of restriction fragments (RF-SSCP). We analysed 49 Ente-

-
- 1 Químico Farmacéutico, M. Sc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Avenida 30 No. 45-03, Edificio Manuel Ancizar. jrmantillaa@unal.edu.co
 - 2 Químico Farmacéutico, M. Sc., Ph. D., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. ebarretoh@unal.edu.co
 - 3 Química Farmacéutica, M. Sc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. mtregueror@unal.edu.co
 - 4 Químico. M. Sc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. davelandiar@unal.edu.co

robacteria isolates using the RF-SSCP procedure standardised in this work; isolates were collected from eight hospitals attached to the Bogota Health Secretariat (Secretaría Distrital de Salud). CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-12a and CTX-M-1 variants were detected as well as a new one, designated CTX-M-60. All variants were detected in hospital and community isolates thereby indicating these genes' possible high mobility from and towards hospital centres. This study represents the first report in Colombia of CTXM-12a and of the new evolutionary variant: CTX-M-60.

Key words: drug resistance, cefotaximase (CTX-M), single-strand conformational polymorphism (SSCP), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), hospital infection.

Recibido: agosto 21 de 2009

Aprobado: noviembre 12 de 2009

Introducción

Las beta-lactamasas del tipo CTX-M, denominadas cefotaximasas, se caracterizan por hidrolizar eficientemente a cefotaxima. Estas beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) pueden conferir a las bacterias que las producen altos niveles de resistencia contra cefalosporinas de tercera generación (tales como cefotaxima y ceftriaxona) y monobactámicos (aztreonam), y niveles variables de resistencia contra cefalosporinas de cuarta generación (cefepime y ceftiprome). Aunque la mayoría de la enzimas CTX-M se caracterizan por tener mayor actividad sobre cefotaxima que sobre ceftazidima, también se han descrito variantes que muestran un perfil de actividad diferente. Así, en las variantes CTX-M-15, CTX-M-16 y CTX-M-27, la presencia de glicina en la posición 240 confiere un incremento significativo en los niveles de resistencia contra ceftazidima, y la presencia de serina en la posición 167, localizada en el "omega-loop", le confiere a la variante CTX-M-19 un mayor nivel de resistencia hacia ceftazidima que hacia cefotaxima (Bonnet *et al.*, 2001; Bonnet *et al.*, 2003; Karim *et al.*, 2001; Poirel *et al.*, 2001).

En la actualidad, las beta-lactamasas CTX-M son consideradas como las BLEE más ampliamente diseminadas en diferentes partes del mundo, y son las más prevalentes en países de Europa y Sur América (Canton, 2006; Mella, 2001; Valenzuela *et al.*, 2005; Quinteros *et al.*, 2003).

Desde cuando Bauerfeind *et al.* (1990) describieron la primera CTX-M, se ha observado una rápida y extensa aparición de nuevas CTX-M y, a la fecha, ya se han descrito más de 110 variantes, clasificadas de acuerdo con la similitud de sus secuencias en cinco grupos filogenéticos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25) (Bonnet, 2004; Grupo de Bioinformática, s. f.)

En estudios de epidemiología molecular de la resistencia bacteriana no solo es importante identificar los determinantes genéticos de resistencia, sino que además es conveniente reconocer las variantes que puedan estar asociadas con aislamientos causantes de brotes infecciosos, identificar nuevas variantes que pueden estar comenzando a prevalecer en un ambiente determinado, y reconocer aquellas con cambios en el espectro de actividad e incrementos de la actividad. Para la identificación de variantes de β -lactamasas se sugiere el análisis del polimorfismo del gen amplificado por PCR (PCR-RFLP) (Arlet, 1995; Bradford, 2001), sin embargo, estas técnicas carecen de suficiente sensibilidad para diferenciar enzimas con alto grado de similitud, por lo cual la secuenciación del gen sigue siendo la técnica de referencia.

Según Orita *et al.* (1989), el análisis del polimorfismo conformacional de cadenas sencillas de ADN (SSCP por las siglas del inglés: Single Strand Chain Polymorphism) ofrece un alto grado de sensibilidad para la detección de mutaciones puntuales en el ADN, puesto que

permite detectar diferencias hasta de una base, por lo que la SSCP se ha considerado equivalente a la secuenciación de genes (Hennessy *et al.*, 1998). Esta técnica se ha utilizado con éxito para la identificación de variantes de beta-lactamasas de las familias TEM, SHV y OXA (M'Zali *et al.*, 1996, 1998; Speldooren *et al.*, 1998).

Este trabajo describe una metodología para la identificación de genes que codifican cefotaximasas, basada en el análisis por SSCP de fragmentos de restricción de ADN obtenidos por amplificación por PCR de genes *bla*_{CTX-M} del grupo CTX-M-1. Esta metodología permitió analizar toda la región que codifica el gen *bla*_{CTX-M} y asignar un único perfil electroforético por SSCP a cada una de las variantes de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 identificadas en este estudio.

Materiales y métodos

Material biológico

En el estudio se incluyeron 49 aislamientos de enterobacterias portadores de genes *bla*_{CTX-M} que codifican para beta-lactamasas del grupo CTX-M-1; 38 asociados con infección intrahospitalaria (IIH), y 11 aislados de pacientes de consulta externa, denominados en el texto como de la comunidad (C), pertenecientes a las especies *Klebsiella pneumoniae* (n=28; 23 IIH y 5 C), *Klebsiella oxytoca* (n=8; 6 IIH y 2 C), *Escherichia coli* (n=8; 6 IIH y 2 C) y *Enterobacter cloacae* (n=5; 3 IIH y 2 C). Todos los aislamientos fueron recolectados durante los años 2004 y 2005, y criopreservados por el Laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

El control positivo para amplificación de genes *bla*_{CTX-M} del grupo CTX-M-1 fue *K. pneumoniae* (M-12), portadora del gen *bla*_{CTX-M-12}, cepa aislada en un hospital de Bogotá en el 2003, y el control negativo de amplificación fue *K. pneumoniae* (M-2) portadora del gen *bla*_{CTX-M-2} (cepa caracterizada bioquímica y molecular-

mente en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires) (Quinteros *et al.*, 2003).

Los cultivos de las cepas de referencia y los aislamientos en estudio se realizaron en agar Müeller Hinton suplementado con 50 µg/mL de cefotaxima

Amplificación del gen *bla* por PCR

Para la extracción del ADN las células de un cultivo reciente fueron suspendidas en 1 mL de solución salina estéril hasta densidad óptica de 0,2 absorbancias a 600 nm, luego se centrifugaron a 5.000 x g durante 5 minutos en tubo de polipropileno de 2 mL (perforado en la tapa); el paquete celular seco se resuspendió en 0,2 mL de agua desionizada estéril. La suspensión celular fue llevada a ebullición durante 10 minutos, y posteriormente enfriada en hielo durante 5 minutos. Los residuos celulares fueron separados por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C, y el ADN disuelto en el sobrenadante fue preservado a -20 °C. Para la amplificación por PCR se utilizó un volumen de la muestra así obtenida igual al 20% del volumen final de la reacción.

Para la amplificación por PCR del gen *bla* se utilizaron los iniciadores Ala2 (5' ATGGTAA AAATCACTGCG 3') y P2D (5' CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG 3') informados previamente por Gazouli (1998), los cuales permiten amplificar una región de 940 pb localizada entre las posiciones +1 a +940 con respecto a la región codificante reportada para la secuencia del gen *bla*_{CTX-M-1} (AC GenBank X92506). La mezcla de reacción estuvo compuesta por MgCl₂ 1,5 mM, mezcla de nucleótidos (dNTPs) 100 µM, oligonucleótidos iniciadores (Ala2 y P2D) 1 µM de cada uno, *Taq* ADN-Polimerasa 0,025 Unidades/µL de solución amortiguadora 1X suministrados por el proveedor (Promega Corp., Madison, WI USA). Para la amplificación en termociclador iCycler® (Bio-Rad Laboratorios) el ADN se desnaturalizó durante 5 minutos a 95 °C, luego 30 ciclos de: 30 s a 95 °C, 30 s

a 55 °C, 60 s a 72 °C, seguidos de una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Los productos de amplificación fueron evaluados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5% en TBE (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA), utilizando como marcador de peso molecular una escalera de 100 pb (100 pb ladder de Invitrogen®). Las muestras fueron cargadas en el gel con solución de carga tipo I (Ficoll 15%, azul de bromofenol 0,25%), y reveladas con bromuro de etidio (0,5 µg/mL).

Análisis bioinformático para la elección de enzimas de restricción

La selección de las enzimas de restricción para la obtención de fragmentos adecuados para el análisis por SSCP se realizó a partir del mapa de restricción generado para genes *bla*_{CTX-M} del grupo CTX-M-1. El mapa de restricción fue generado con el programa BioEdit v7.0.9 (disponible en: www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html), utilizando las secuencias reportadas en el GenBank para las enzimas CTX-M-01 (X92506); CTX-M-03 (Y10278); CTX-M-10 (AY598759); CTX-M-11 (AJ310929); CTX-M-12 (AF305837); CTX-M-15 (DQ302096); CTX-M-22 (AY954529); CTX-M-23 (AF488377); CTX-M-28 (AJ549244); CTX-M-29 (AY267213); CTX-M-30 (AY292654); CTX-M-32 (AJ557142); CTX-M-33 (AY238472); CTX-M-34 (AY515297); CTX-M-36 (AB177384); CTX-M-37 (AY649755); CTX-M-42 (DQ061159); CTX-M-52 (DQ223685) y CTX-M-53 (DQ268764).

Análisis por SSCP de fragmentos de restricción

Para la restricción de los productos de amplificación por PCR se usaron las enzimas de restricción *Hinf* I y *Pvu* II (Amersham Laboratories). Se utilizaron 5 µL del producto de amplificación de genes *bla* de grupo CTX-M-1, y 1,5 unidades de enzima para un volumen final de 15 µL. Las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C por 3 horas.

Los patrones de referencia de ADN utilizados para la estandarización de las condiciones de análisis por SSCP fueron seleccionados a partir de la población de estudio mediante ensayos preliminares, para los cuales se identificaron por secuenciación las variantes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-12} y *bla*_{CTX-M-15}, denominados en adelante como patrones M1, M12 y M15 respectivamente.

Para el análisis por SSCP los productos de restricción de las muestras amplificadas fueron mezclados en relación 1:1 con solución de desnaturalización (formamida 95%, azul de bromofenol 0,05%, xilen-cianol 0,05% y EDTA 20 mM), calentados a 95 °C por 5 minutos, y enfriados a 4 °C para la desnaturalización.

El análisis por SSCP se realizó en geles de poliacríamida no desnaturalizante al 8 y 2,5% de entrecruzamiento, empleando el sistema de electroforesis “*DCode Mutation Detection System*” de BioRad Laboratories, acoplado a un sistema de enfriamiento por recirculación para el control de temperatura (Isotemp Refrigerated Recirculators de Fisher Scientific). La electroforesis se realizó a 10 °C con buffer TBE 1X a 450 voltios durante 270 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó ADN de fago Lambda (12,5 ng/µL) digerido con la enzima de restricción *Pst* I.

Los geles fueron revelados por tinción con plata utilizando el siguiente protocolo, estandarizado en este trabajo: las bandas de ADN se fijaron sumergiendo el gel en solución de etanol al 10% por 5 minutos, y luego en solución de HNO₃ al 1% p/v por 3 min. La tinción se realizó durante 30 minutos con una solución fresca de nitrato de plata (0,1% p/v) y formaldehído (0,04%). El revelado se realizó con una solución a 4 °C de carbonato de sodio al 3%, formaldehído (0,04%) y tiosulfato de sodio (2 mg/L) hasta observar bandas. El revelado fue detenido con solución de ácido acético al 5% v/v.

Los geles fueron digitalizados en un escáner HP ScanJet2100C a una resolución de

600dpi, y el análisis de las imágenes se realizó con el programa Quantity One® V. 4.6.1 de Bio-Rad Laboratories.

Secuenciación del gen blaCTX-M

Los productos de amplificación del gen *bla*_{CTX-M} de los aislamientos que mostraron perfiles electroforéticos diferentes fueron secuenciados por un laboratorio independiente en instalaciones externas (servicio de secuenciación MacroGen®, Corea ABI3730XL de Applied Biosystems), y las secuencias fueron analizadas con el programa MEGA V 3.1 (Kumar, 2004).

Análisis y discusión de los resultados

De acuerdo con el de mapa de restricción obtenido “in-silico” para cada uno de los genes *bla*_{CTX-M} del grupo CTX-M-1 informados en el GenBank, se seleccionaron las enzimas de restricción *Pvu* II y *Hinf* I debido a que generan entre 3 y 4 fragmentos de ADN con tamaños entre 156 pb y 507 pb apropiados para el análisis por SSCP.

En el análisis por SSCP, utilizando la enzima de restricción *Hinf* I, se identificaron cinco perfiles electroforéticos diferentes, de los cuales tres correspondieron a los patrones M1, M12 y M15, y uno diferente relacionado con la variante *bla*_{CTX-M-12} correspondiente a una nueva variante denominada *bla*_{CTX-M-60} identificada en este estudio y depositada en el EMBL con el número de acceso AM411407. Adicionalmente, una de las muestras presentó un perfil estrechamente relacionado con el patrón *bla*_{CTX-M-15}, pero con diferencia en la posición de una banda, y que por secuenciación correspondió al gen *bla*_{CTX-M-12a}.

Al realizar el análisis con la enzima de restricción *Pvu* II, se confirmaron los resultados obtenidos con *Hinf* I; también se diferenciaron cinco perfiles electroforéticos, los tres que corresponden a cada uno de los patrones M1, M12 y M15, y dos perfiles adicionales que concuerdan con las variantes *bla*_{CTX-M-60} y

*bla*_{CTX-M-12a}, previamente identificadas por secuenciación.

Con base en la metodología desarrollada, se analizaron los 49 aislamientos considerados dentro del estudio, utilizando las estrategias de análisis con las dos enzimas de restricción seleccionadas para el análisis de PCR-SSCP. Las muestras fueron agrupadas de acuerdo con el perfil electroforético obtenido, utilizando como referencia las variantes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-12}, *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-60} identificadas por secuenciación en los ensayos preliminares. Con los resultados del análisis por PCR-SSCP, se generaron dendrogramas bajo el método UPGMA utilizando el coeficiente de Dice, como lo muestra la figura 1 correspondiente al análisis de un grupo de 13 muestras y 4 patrones (M1, M15, M12 y MV).

La comparación de los resultados de la secuenciación de los aislamientos que mostraron perfiles electroforéticos diferentes, con los obtenidos mediante PCR-SSCP, muestra una alta concordancia entre las técnicas en la diferenciación de variantes evolutivas asociadas con beta-lactamasas de la familia CTX-M del grupo CTX-M-1, lo cual permite confirmar la sensibilidad de la técnica de PCR-SSCP para la identificación y diferenciación de variantes de genes de la familia CTX-M, tal como se ha reportado en otros estudios (Alonso *et al.*, 2002; Chanawong *et al.*, 2000; Orita *et al.*, 1989; Sentinelli *et al.*, 2000; Xie 2002).

Mediante la estrategia de análisis de fragmentos de restricción por PCR-SSCP estandarizada en este trabajo, se pudieron diferenciar e identificar las variantes *bla*_{CTX-M-60} y *bla*_{CTX-M-12a}, que solo presentan una base de diferencia con respecto a la variante predominante *bla*_{CTX-M-12}, confirmando el alto grado de sensibilidad en la detección de mutaciones puntuales que presenta la técnica de SSCP, y la razón de su amplia utilización en genética humana para la detección de mutaciones puntuales, al igual que para el análisis de variaciones alélicas y polimorfismos en genes de otras especies, como en plantas, animales, virus, bacterias etc. (Xie,

Carril	Muestra	Gen <i>bla</i>
1	S9	CTX-M-12
2	S10	CTX-M-12
3	S25	CTX-M-12
4	S38	CTX-M-12
5	S40	CTX-M-12
6	S52	CTX-M-12
7	S53	CTX-M-12
8	S59	CTX-M-12
9	S79	CTX-M-12
10	S80	CTX-M-12
11	S89	CTX-M-12
12	S99	CTX-M-12
13	S105	CTX-M-12
14	M12	CTX-M-12
15	MV	CTX-M-60
16	M1	CTX-M-1
17	M15	CTX-M-15

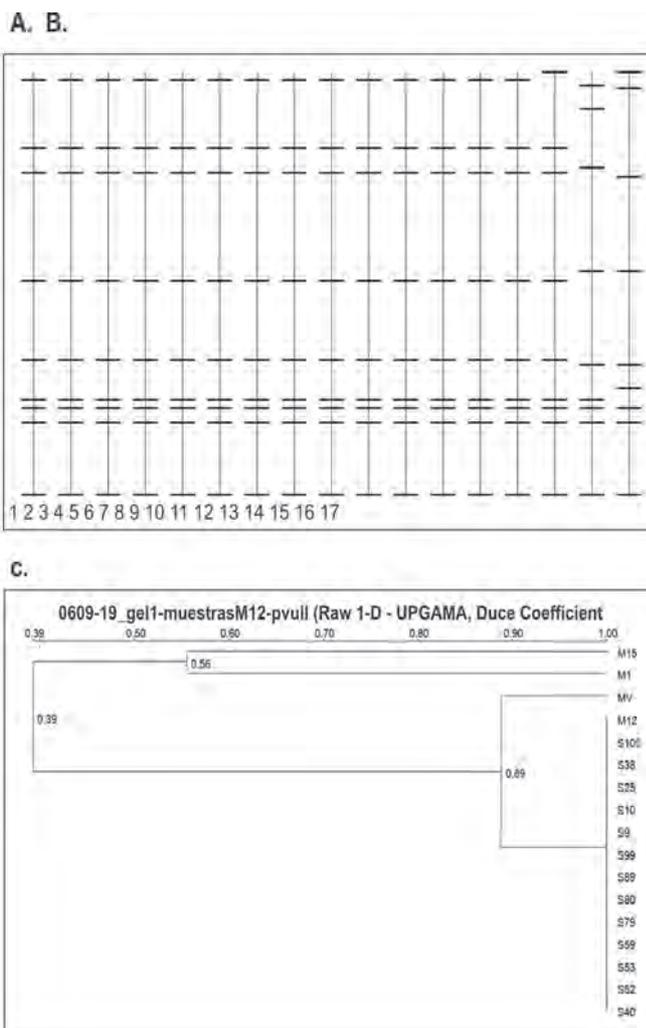


Figura 1. Análisis por PCR-SSCP de genes *bla*_{CTX-M} amplificados por PCR y sometidos a restricción con la endonucleasa *Pvu* II. **A.** Relación de las muestras dispuestas en los carriles del gel de electroforesis. **B.** Perfiles de bandas SSCP de 13 muestras dispuestas en los carriles 1 a 13 y de los patrones M12, MV, M1 y M15 dispuestos en los carriles 14 a 17 respectivamente. **C.** Dendrograma obtenido por el método UPGMA con los perfiles de bandas de los genes *bla*_{CTX-M} del grupo 1 de los patrones y de las muestras numeradas en la tabla **A.**

2002). En resistencia bacteriana esta técnica ha sido utilizada para identificar variantes de otras familias de genes de beta-lactamasas como TEM, SHV, y de beta-lactamasas resistentes a inhibidores (Alonso *et al.*, 2002; Speldooren *et al.*, 1998; Leflon-Guibout *et al.*, 2000; M'Zali *et al.*, 1998).

Los resultados de este trabajo indican la presencia predominante del gen que codifica para la beta-lactamasa CTX-M-12 en los hospi-

tales de Bogotá, ya que fue detectada en todos los hospitales incluidos en el estudio y en diferentes especies de enterobacterias. La variante CTX-M-1 solo fue detectada en 9 aislamientos, de los cuales 8 provenían de un mismo hospital. Las cefotaximas CTX-M-12a y CTX-M-15, que se caracterizan por presentar una mayor actividad contra ceftazidima que frente a cefotaxima, fueron detectadas en diferentes enterobacterias, aisladas de pacientes de cinco

hospitales. La variante CTX-M-60 solo fue detectada en un hospital, el único en el que se encontraron cuatro de las cinco variantes identificadas en este estudio.

En cuanto a la distribución por especies bacterianas, el gen *bla*_{CTX-M-12} presentó el mayor grado de diseminación debido a que se detectó en el 52,7% del total de aislamientos y en las cuatro especies de enterobacterias consideradas en el estudio, mientras que el gen *bla*_{CTX-M-1} se detectó en el 16,4% de los aislamientos, específicamente en tres *K. oxytoca* y en seis *K. pneumoniae*. El gen *bla*_{CTX-M-15} fue detectado principalmente en *E. coli* (4 aislamientos) y en un aislamiento de *K. pneumoniae*. Por otra parte, el gen *bla*_{CTX-M-12a} fue detectado en dos *E. cloacae* y en dos *K. pneumoniae*, mientras que el gen *bla*_{CTX-M-60} sólo se detectó en *K. pneumoniae*.

Aunque la mayor proporción de aislamientos provenían de infección intrahospitalaria (IIH), llama la atención que todas las variantes fueron detectadas también en aislamientos provenientes de la comunidad. Este hecho permitiría presumir que existe diseminación de la resistencia desde el ámbito hospitalario hacia la comunidad. Así, los seis aislamientos de *K. pneumoniae* portadores de gen *bla*_{CTX-M-1} se aislaron de pacientes del mismo hospital y cinco de ellos fueron asociados con IIH; en el caso de los cuatro *E. coli* portadores del gen *bla*_{CTX-M-15} que fueron obtenidos de cuatro hospitales, dos fueron asociados con IIH y dos fueron aislados de la comunidad; de igual manera, de las dos especies portadoras del gen *bla*_{CTX-M-12a} un aislamiento de cada una de ellas fue asociado con IIH y el otro fue aislado de la comunidad. En el caso de la variante *bla*_{CTX-M-60} solo se presentó en un hospital, y uno de los aislamientos portadores de este gen se aisló de un individuo no hospitalizado y el otro se asoció con IIH. El gen *bla*_{CTX-M-12} se detectó en 24 aislamientos asociados con IIH y en 5 de la comunidad (en ambos casos en las 4 especies de enterobacterias consideradas en el estudio).

Considerando que el número de aislamientos analizados en el estudio no es represen-

tativo para realizar inferencias epidemiológicas, solo se puede hacer mención sobre la tendencia del problema de la resistencia a beta-lactámicos debida a cefotaximasas en los centros hospitalarios de la ciudad de Bogotá, observándose una alta circulación del gen *bla*_{CTX-M-12} y de las variantes *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-12a} tanto en las diferentes especies de enterobacterias como en la mayoría de los hospitales involucrados en el estudio. Esta amplia diseminación puede estar asociada con la movilidad de plásmidos conjugativos, ya que estos genes son de carácter plasmídico.

Estos resultados constituyen una alerta para evaluar las políticas de manejo de antibióticos en los centros hospitalarios estudiados, así como para tomar medidas que permitan, en el corto y mediano plazo, controlar la diseminación de estos determinantes de resistencia entre hospitales y en la comunidad.

El costo-beneficio del análisis por muestra utilizando la metodología PCR-SSCP estandarizada es positivo con respecto al costo de la secuenciación, cuando el volumen de muestras es superior a 40, por lo cual la PCR-SSCP puede ser utilizada en estudios epidemiológicos de gran envergadura como procedimiento de tamizaje para el seguimiento de la diseminación de genes de resistencia, y para la identificación previa a la secuenciación de nuevas variantes genéticas.

Referencias bibliográficas

- Alonso, R., Fernández-Aranguiz, A., Colom, K., Cisterna, R. 2002. Non-radioactive PCR-SSCP with a single PCR step for detection of inhibitor resistant beta-lactamases in *Escherichia coli*. J Microbiol Methods 50 (1): 85.
- Arlet, G., Brami, G., Décrè, D., Flippo, A., Gaillot, O., Lagrange, PH., Philippon, A. 1995. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM beta-Lactamases. FEMS Microbiol Let 134 (2-3): 203-208.
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S., Casellas, J. M. 1996. Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and

- relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 40 (2): 509-513.
- Bonnet, R., Dutour, C., Sampaio, J. L., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R. *et al.* 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240 \rightarrow Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 45 (8): 2269-2275.
- Bonnet, R., Recule, C., Baraduc, R., Chanal, C., Sirot, D., De Champs, C., Sirot, J. 2003. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *Antimicrob Chemother* 52 (1): 29-35.
- Bonnet, R. 2004. Growing group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (1): 1-14.
- Bradford, P. A. 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14: 933-951.
- Canton, R., Coque, T. M. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Cur Opin Microbiol* Oct; 9 (5): 466-75. Epub 2006 Aug 30. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VS2-4KSD8CX-5/2/ad4198527fe4d2363030b83e21f3b5cf>
- Chanawong, A., M'Zali, F. H., Heritage, J., Lulitnond, A., Hawkey, P. M. 2000. Characterisation of extended-spectrum β -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett* 184 (1): 85-89.
- Gazouli, M., Tzelepi, E., Sidorenko, S. V., Tzouveleki, L. S. 1998. Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase (CTX-M-4): involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 42 (5): 1259-1262.
- Grupo de Bioinformática, Universidad Nacional de Colombia. s. f. Modelo para la identificación de genes para betalactamasas de espectro extendido (BLEE), [en línea]. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/servicios/BLEE>. [Consulta: marzo 2007].
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hennessy, L. K., Teare, J., Ko, C. 1998. PCR conditions and DNA denaturants affect reproducibility of single-strand conformation polymorphism patterns for BR-CA1 mutations. *Clin Chem* 44 (4): 879-882.
- Karim, A., Poirer, L., Nagarajan, S., Nordmann, P. 2001. Plasmid-mediated extended spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett* 201 (2): 237-241.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163.
- Leflon-Guibout, V., Speldooren, V., Heym, B., Nicolas-Chanoine, M. 2000. Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of bla(TEM) genes. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (10): 2709-2714.
- Mella, S. 2001. Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Rev Chil Infect* 18 (1): 7-17.
- M'Zali, F. H., Gascoyne-Binzi, D. M., Heritage, J., Hawkey, P. M. 1996. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV β -lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). *J Antimicrob Chemother* 37 (4): 797-802.
- M'Zali, F. H., Heritage, J., Gascoyne-Binzi, D. M., Snelling, A. M., Hawkey, P. M. 1998. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum β -lactamase and to identify different SHV genes within the same strain. *J Antimicrob Chemother* 41 (1): 123-125.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770.
- Poirer, L., Naas, T., Le Thomas, I., Karim, A., Bingen, E., Nordmann, P. 2001. CTX-M-type Extended-Spectrum β -Lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the Omega loop. *Antimicrob Agents Chemother* 45 (12): 3355-3361.
- Pulido, I. Y. 2006. Caracterización de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadores de genes blaCTX-M resistentes a ceftazidima. Bogotá. Tesis de maestría en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. 95 pp.

- Quinteros, M., Radice, M., Gardella, N., Rodríguez, M. M., Costa, N., Korbenfeld, D. *et al.*, 2003. Extended-spectrum beta-lactamases in *enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (9): 2864-2867.
- Sentinelli, F., Lovari, S., Vitale, M., Giorgi, G., Di Mario, U., Baroni, M. G. 2000. A simple method for non-radioactive PCR-SSCP using MDE gel solution and a midi gel format: application for the detection of variants in the GLUT1 and CTLA-4 genes. *J Biotechnol* 78 (2): 201-204.
- Speldooren, V., Heym, B., Labia, R., Nicolas-Chanoine, M. H. 1998. Discriminatory detection of inhibitor-resistant beta-lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 42 (4): 879-884.
- Valenzuela de Silva, E. M., Mantilla, J. R., Reguero, M.T., González, E.B., Pulido, I. Y., Llerena, I. D. *et al.*, Detection of CTX-M-1, CTX-M-15, and CTX-M-2 in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bogotá, Colombia. 2005. *J Clin Microbiol* 44 (5): 1919-20.
- Xie, J., Wehner, T. C., Conkling, M. 2002. PCR-based Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP) analysis to clone nine Aquaporin genes in cucumber. *J Amer Soc Hort Scr* 127 (6): 925-939.