**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA** 

**TESINA DE GRADO** 

## EMERGENCIA DE "NEW DELHI METALLO-β-LACTAMASE" EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL URUGUAY

Lucía Bassetti Baccino

Tutor: Dra. Carolina Márquez Villalba

Cátedra de Microbiología Clínica Facultad de Química Montevideo Uruguay 2013

## RESÚMEN

La "New Delhi Metallo- $\beta$ -betalactamase" (NDM) es una carbapenemasa que posee una potente actividad hidrolítica frente a los carbapenemes, es resistente a los inhibidores clínicos de  $\beta$ -lactamasas y está asociada a elementos genéticos móviles que facilitan su dispersión.

Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar los primeros aislamientos productores de NDM en el Uruguay, estudiar el potencial del gen  $bla_{NDM}$  para diseminarse y conocer su entorno genético.

Se analizaron seis aislamientos de Providencia rettgeri, uno de Morganella morganii y uno de Proteus mirabilis recuperados de exudados rectales provenientes de pacientes hospitalizados. La identificación y ensayos de sensibilidad fue realizada por Vitek 2 GN and AST-N082-card. Tres de los aislamientos de Providencia rettgeri y el de Morganella morganii fueron resistentes a todos los antibióticos ensayados incluyendo todos los βlactámicos, tigeciclina y fosfomicina. La confirmación fenotípica de una metalo-β-lactamasa (MBL) en todos los aislamientos se realizó por ensayo de sinergia con disco de EDTA, el cual dio resultado positivo. Posteriormente se confirmó la presencia de bla<sub>NDM-1</sub> por PCR y posterior secuenciación. Se realizaron ensayos de conjugación entre una P.rettgeri, M.morganii y una cepa *E.coli* Top 10, confirmándose la transferencia del gen *bla*<sub>NDM-1</sub> desde la primera a una frecuencia de  $1 \times 10^{-5}$  y desde la segunda a  $2 \times 10^{-6}$  por cepa receptora. Desde P.rettgeri dadora se detectó la transferencia de dos plásmidos, uno mayor a 33 kb y otro de aproximadamente 11kb, los cuales mediante Inc/Rep PCR no fueron tipables con el panel de cebadores utilizados. Con el fin de secuenciar los plásmidos transferidos a partir de la *P.rettgeri* dadora, se realizó una extracción a gran escala y purificación mediante un sistema comercial. El análisis e interpretación de la información genética obtenida a partir de la secuencia se realizó utilizando la herramienta BLAST. El gen  $bla_{NDM-1}$  fue hallado en un contig de 11kb y se obtuvo un 99% de homología con un plásmido pNDM-BJ02 de 46 kb correspondiente a Acinetobacter Iwofii (GenBank: JQ060896.1). Se encontraron tres genes de resistencia antimicrobiana (*bla*<sub>NDM-1</sub>, *aphA6* y una proteína de resistencia a bleomicina) y dos elementos móviles (transposasa de la familia IS911, y ISAba125). Con el fin de analizar los entornos genéticos del gen bla<sub>NDM-1</sub> en los diferentes aislamientos, se diseñó una batería de cebadores, en base al conocimiento de la secuencia del plásmido transferido, dirigidos hacia el entorno genético del gen *bla*<sub>NDM-1</sub>, siendo aphA6, ISAba125, y groEL los genes escogidos. Se analizó la extensión de esta plataforma en el resto de los aislamientos utilizando dicha batería para amplificar el resto de los entornos genéticos mediante cartografía por PCR. Se logró ver que tres aislamientos de *P.rettgeri*, provenientes del mismo centro hospitalario, presentaron una plataforma genética entorno al gen  $bla_{NDM-1}$  similar, y a su vez diferente a la plataforma del aislamiento de *M.morganii*, proveniente del mismo centro. Para el resto de los aislamientos de *P.rettgeri y el de P.mirabilis,* provenientes de otro centro hospitalario, el entorno genético de bla<sub>NDM-1</sub> dió resultados diferentes a los del centro anterior.

Se realizaron estudios de estabilidad entre la *P.rettgeri* dadora y su respectiva transconjugante (Tc) y estos sugirieron que el plásmido portador de  $bla_{NDM-1}$  es mas inestable en las *E.coli* Tc. que en el aislamiento clínico *P. rettgeri*.

## ÍNDICE

1.	INTRO	DUCCIÓN1
2.	OBJETI	<b>VOS</b> 5
	2.1.	Objetivo general5
	2.2.	Objetivos específicos5
3.	MATER	RIALES Y MÉTODOS6
	3.1.	Aislamientos clínicos6
	3.2.	Medios de cultivo6
	3.3.	Identificación y ensayos de sensibilidad7
	3.4.	Preparación de moldes para la reacción de PCR7
	3.5.	Cuantificación de ADN7
	3.6.	Condiciones de reacción de PCR8
	3.7.	Detección de los productos de amplificación8
4.	ESTRA	ſEGIA
5.	RESUL	Г <b>ADOS</b> 12
	5.1.	Ensayos de sensibilidad12
	5.2.	Confirmación fenotípica y molecular del gen bla_{\text{NDM-1}}13
	5.3.	Ensayo de conjugación y transferencia del gen14
	5.4.	Identificación de los plásmidos transferidos a partir de
		<i>P.rettgeri</i> pan-resistente por estudios de secuenciación18
	5.5.	Entorno genético de bla <sub>NDM-1</sub> en el resto de lo
		aislamientos
		<b>5.5.1</b> Diseno de cebadores específicos20
		<b>5.5.2</b> Cartografia por PCR
	5.6.	Tipificación por Inc/Rep PCR
~	5.7.	Estudio de estabilidad de los plasmidos transferidos
6. -	DISCUS	SION
/.		USIUNES
8. 0	KEFEKE	-INCIAS
9.	ANEXO	
10.	ANEXO	ب <b>∠</b> 4t

#### 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos en bacterias es un problema mundial de gran interés para las autoridades de Salud Pública debido a que limita severamente las estrategias terapéuticas, aumenta el tiempo de internación y los costos de salud. Muy pocos antibióticos nuevos han sido introducidos últimamente, lo que hace imperativo maximizar la eficacia de los antibióticos existentes como de los que se desarrollen en el futuro.

La resistencia a varios antibióticos es común en la familia *Enterobacteriaceae*, en el género *Pseudomonas* y está emergiendo en varios patógenos primarios. Para la mayoría de los patógenos la resistencia clínica a los antibióticos está causada principalmente por la adquisición de nuevos genes y en menor medida por mutaciones (1).

La epidemiología de la resistencia es compleja debido a que existe más de un gen que confiere resistencia a un determinado antibiótico, distinguiéndose para cada uno de ellos tres fases: emergencia, amplificación y diseminación, de modo que la diseminación de la resistencia involucra una serie de evoluciones superpuestas, una para cada gen involucrado, a lo que se agrega la diseminación de las bacterias que han adquirido estos genes.

La emergencia corresponde a la aparición por primera vez de un gen de resistencia, en una población bacteriana previamente sensible. Este evento si bien es poco frecuente, ocurre continuamente y no depende de la utilización del antibiótico. La presión selectiva ejercida por el amplio uso de antibióticos en el tratamiento de infecciones hospitalarias contribuye a la amplificación de los organismos resultantes aumentando la probabilidad de que se diseminen y que los genes de resistencia que contienen se diseminen a otros organismos (2). La etapa final de diseminación de la resistencia a otras especies bacterianas, se debe fundamentalmente a la transferencia de elementos genéticos móviles (EGM) a saber; plásmidos, transposones, secuencias de inserción y casetes de genes de resistencia insertados en integrones, y a la diseminación geográfica de las bacterias resistentes (3).

En los últimos años se ha descrito un aumento en el número de Enterobacterias poductoras de carbapenemasas (β-lactamasas con actividad frente a carbapenemes) que confieren generalmente resistencia a carbapenemes, y a otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Las carbapenemasas presentes en Enterobacterias pertenecen a la clase A de Ambler (KPC, Sme, NMC-A, IMI, variantes de GES/IBC), clase B de Ambler (metalo- $\beta$ -lactamasas) de Ambler (oxacilinasas) siendo las enzimas KPC las v clase D carbapenemasas de clase A más frecuentes. El hecho de que las metalo- $\beta$ lactamasas (MBL) posean una potente actividad hidrolítica frente a los carbapenemes, sean resistentes a los inhibidores clínicos de  $\beta$ -lactamasas y estén asociados a EMG hace que sean uno de los mayores desafíos a los que se enfrentan los programas de control de infecciones en los últimos años. En particular la "New Delhi Metallo-β-lactamase" (NDM) fue identificada en el año 2008 en Klebsiella pneumoniae y Escherichia coli de un paciente Sueco hospitalizado en Nueva Delhi, India de donde proviene su nombre (4,5). Desde su aparición, el gen bla<sub>NDM</sub> se ha identificado en varias regiones

geográficas; Europa, América del Norte (6) América Central (7), y recientemente en América del Sur (8); y en varios géneros bacteriano. Esta situación epidemiológica evidencia la facilidad que presentan los genes

*bla*<sub>NDM</sub> para ser movilizados por transferencia horizontal. Diversos análisis genéticos indican que la movilidad del mismo estaría asociada con la diseminación de diferentes plásmidos y transposones, y que a su vez es frecuente su co-transferencia con otros factores de resistencia a antibióticos (9). Los genes *bla*<sub>NDM</sub> se han detectado en plásmidos de diversos tamaños y estructuras, pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad, tales como IncFII, IncN e IncL/M (10).

En general el gen  $bla_{NDM}$  se encuentra asociado a más de un gen de resistencia а antibióticos, incluyendo aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos y a sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), formando regiones complejas de resistencia a múltiples drogas (RMD). Estos podrían movilizarse lateralmente lo cual complicaría aún más la terapia antibiótica debido a que tratamiento el de infecciones organismos productores por de carbapenemasas se encuentra restringido a una terapia combinada que no posee eficacia clínica comprobada y que incluye a la fosfomicina, tigeciclina y colistin.

Desde el año 2008 se vienen identificando diferentes genes de resistencia a los carbapenemes como ser  $bla_{VIM2}$  en *P.aeruginosa (11,12), bla*<sub>KPC2</sub> en *K.pneumoniae* y *E.coli* (13,14) y recientemente  $bla_{NDM}$  en otras especies de *Enterobacterias (15)*. En nuestro país estamos en la etapa de emergencia de *Enterobacterias* productoras de la "New Delhi metallo- $\beta$ -betalactamase" específicamente en los géneros *Providencia sp., Proteus sp., Morganella sp., Citrobacter sp., y E.coli,* etapa que generalmente es seguida por la amplificación de la resistencia (aumento del número de infecciones por esta bacteria) y luego por la diseminación de la resistencia a otras especies

bacterianas. En particular los géneros *Providencia* y *Morganella* presentaron un fenotipo RMD, incluyendo todos los  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, SXT, tigeciclina y fosfomicina. A pesar de que estos últimos géneros no se encuentran en la lista de patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa y Enterobacter spp.*) definida por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas, son intrínsicamente resistentes al colistin, hecho que tiene gran relevancia clínica ya que se trata de bacterias que se tornan resistentes a virtualmente todos los antibióticos disponibles (16).

Consideramos que la resistencia antibiótica no puede ser completamente entendida únicamente a través del análisis de aislamientos hospitalarios resistentes definidos, sin tener en cuenta el papel que juegan los EGM en la circulación de los genes involucrados en bacterias de origen ambiental, animal y humano.

En este trabajo se plantea conocer las plataformas genéticas que sostienen el gen *bla*<sub>NDM</sub> en los primeros aislamientos detectados en el Uruguay y estudiar su potencial para diseminarse a otros géneros bacterianos. Estudios preliminares sobre ensayos de conjugación sugieren que existe transferencia de la resistencia a los carbapenemes si bien es necesario la confirmación y la caracterización de las transconjugantes.

El hallazgo de maquinarias moleculares de concentración de genes de resistencia representaría una herramienta muy valiosa a la hora de predecir futuras resistencias siendo un aporte relevante a la epidemiología y a la farmacovigilancia local.

## 2. OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo general

Contribuir al entendimiento de la elevada frecuencia de aparición de bacterias con resistencia a múltiples antibióticos mediante la búsqueda de maquinarias moleculares de concentración de genes de resistencia.

#### 2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Analizar el o los plásmidos circulantes portadores del gen bla<sub>NDM-1</sub> en diferentes géneros de Enterobacterias con fenotipo RMD.
- Estudiar la transferencia del fenotipo pan-resistente presentado por un aislamiento de *P.rettgeri* a otra *Enterobacteria* por ensayo de conjugación.
- 3. Identificar el plásmido transferido a partir de la *P.rettgeri* panresistente por estudios de secuenciación.
- 4. Analizar los entornos genéticos del gen *bla*<sub>NDM-1</sub> en los diferentes géneros de *Enterobacterias*.
- 5. Analizar la estabilidad de los plásmidos transferidos.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### 3.1 Aislamientos clínicos

Se emplearon ocho aislamientos productores de NDM (seis pertenecen a *P.rettgeri*, uno a *P.mirabilis* y uno a *M.morganii*), provenientes de exudado rectal detectados durante un estudio de vigilancia de pacientes colonizados por *Enterobacterias* productoras de carbapenemasas, siguiendo el protocolo de la CDC. Todos los aislamientos fueron recolectados de pacientes hospitalizados en dos centros de salud públicos de Montevideo en el período abril-setiembre del 2012.

#### 3.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron: medio rico Luria-Bertani (LB) y medio Mueller Hinton Agar (MHA) (Anexo 1).

Los antibióticos utilizados se añadieron en las concentraciones finales siguientes:

Meropenem (MEM) 2  $\mu$ g/ml para los medios utilizados en los estudios de estabilidad.

Cefotaxima (Ctx) 1  $\mu$ g/ml, Rifampicina (Rif) 100  $\mu$ g/ml y Azida de sodio 100  $\mu$ g/ml para los medios utilizados en los estudios de conjugación.

Las soluciones de los antibióticos anteriormente mencionados se esterilizaron por filtración.

#### 3.3 Identificación y ensayos de sensibilidad

Esta colección de bacterias fue identificada por procedimientos estándar. Para tres de los aislamientos de *P.rettgeri* y el aislamiento de *M.morganii* la identificación y la sensibilidad a antibióticos fue realizada por el sistema VITEK 2 C (bioMérieux, Francia) y AST-N082-card. La sensibilidad a tigeciclina (TIG) y fosfomicina (FOS) se realizó por el método de difusión en agar utilizando discos de 15 µg de TIG y discos de 200 µg de FOS con 50 µg de glucosa-6-fosfato. Se emplearon los criterios de interpretación definidos por EUCAST (17).

#### 3.4 Preparación de moldes para la reacción de PCR

Las muestras de ADN plasmídico fueron obtenidas por el método de extracción de ADN de cepas puras (Anexo 1). Todas las muestras de ADN fueron evaluadas por una reacción de control de inhibición de amplificación del gen codifcante del ARNr 16s con el uso de los cebadores F27 y R1492 (Anexo 1).

#### 3.5 Cuantificación de ADN

Se realizó por medidas de absorbancia a 260nm y 280 nm, utilizando Nanodrop Jenway Genova Nano (Tabla 1). Se utilizó una cantidad adecuada como molde de ADN (10-40ng/ $\mu$ l) para las reacciones de amplificación.

Aislamiento	Concentración (ng/µl)	ADN <sub>260</sub> /ADN <sub>280</sub>
Transconjugante*	30.6	1.6
P.rettgeri 50521085	16.5	1.7
P. rettgeri 50543479	47.1**	1.7
P. rettgeri 50526342	25.6	1.6
M. morganii 50547399	17.5	1.4
P. rettgeri 518	13.5	1.9
P. rettgeri 6747	23.6	1.5
P. rettgeri Maciel	13.1	1.5
P. mirabilis 512	45.1**	1.7

**Tabla 1**. Medidas de concentración de ADN, y absorbancia ADN<sub>260</sub>/ADN<sub>280</sub>.

\*Transconjugante proveniente de la conjugación a partir de una *P.rettgeri* 50521085. \*\*Para *P. rettgeri* 50543479 y *P. mirabilis* 512, se realizaron diluciones al medio, para lograr una concentración de ADN óptima para realizar PCR.

#### 3.6 Condiciones de reacción de PCR.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo termociclador automático Thermo Scientific Arktik y utilizando los correspondientes cebadores sintetizados en Macrogen. Las condiciones de los ciclos de amplificación dependerán de los cebadores empleados (Anexo 1).

#### 3.7 Detección de los productos de amplificación

Los amplicones fueron detectados por electroforesis convencional en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados mediante iluminación UV con el uso de una cámara Kodak Digital Science.

#### **4.ESTRATEGIA**

## <u>Objetivo 1</u>: Analizar el o los plásmidos circulantes portadores del gen bla <sub>NDM-1</sub> en diferentes géneros de *Enterobacterias* con fenotipo RMD

Se realizó una extracción de ADN plasmídico para los 8 aislamientos de *Enterobacterias* productoras de NDM mediante lisis alcalina (Anexo 1). Los plásmidos obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con una solución de bromuro de etidio y fotografiados mediante iluminación UV (18).

Los aislamientos de *P.rettgeri* 10851 y *M.morganii* 399,  $bla_{NDM-1}$  (+), Ctx<sup>R</sup> (cefotaxima), Rif<sup>S</sup> (rifampicina) y azida de sodio<sup>S</sup> fueron ensayados por conjugación (Anexo 1) a una cepa receptora de *Escherichia coli* Top 10 Ctx<sup>S</sup>, Rif<sup>R</sup> y azida de sodio<sup>R</sup>. La selección de Tc se realizó en un medio de cultivo LB agar conteniendo 1 mg/L de Ctx, y 100 mg/L de Rif con el posterior subcultivo de las mismas en medio LB agar conteniendo 100mg/L de azida de sodio para su confirmación. La detección del gen  $bla_{NDM-1}$  en las Tc se realizó por amplificación del gen por PCR con primers específicos a partir una muestra de ADN.

Las Tc de interés se conservaron por congelación a -70°C en BHI glicerol para estudios posteriores.

Se realizó la tipificación de los plásmidos transferidos desde *P.rettgeri* 10851, así como del resto de los aislamientos productores de NDM, por Inc/Rep PCR, mediante el uso de 9 pares de cebadores para la amplificación de los Inc HI1, HI2, I1-Iy, X, L/M, N, A/C, T y FIIA (19). <u>Objetivo 2</u>: Estudiar la transferencia del fenotipo pan-resistente presentado por un aislamiento de *P.rettgeri* a otra *Enterobacteria* por ensayo de conjugación.

La transferencia del fenotipo de RMD se estudió mediante la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (C.I.M) de las Tc, previamente conservadas, por el método E-test a los antibióticos gentamicina, ciprofloxaxina, ceftazidima, meropenem, imipenem y SXT. La interpretación del antibiograma se realizó aplicando los puntos de corte de CLSI (20).

## <u>Objetivo 3</u>: Identificación del plásmido transferido a partir de la *P.rettgeri* pan-resistente por estudios de secuenciación.

Se realizó una extracción a gran escala y purificación del plásmido transferido portador del gen *bla*<sub>NDM-1</sub> mediante un sistema comercial (Qiagen Large-Construct Kit 10) para su secuenciación total en un centro privado de Biotecnología.

El análisis e interpretación de la información genética obtenida a partir de la secuencia, se realizó utilizando la herramienta Basic Local Alignment Tool (BLAST) y apoyo técnico del personal especializado en Bioinformática.

# <u>Objetivo 4</u>: Analizar los entornos genéticos del gen *bla*<sub>NDM-1</sub> en los diferentes géneros de *Enterobacterias*.

Para alcanzar este objetivo, la estrategia fue diseñar una batería de cebadores, en base al conocimiento de la secuencia del plásmido transferido, dirigidos hacia el entorno genético del gen *bla*<sub>NDM-1</sub> y que abarcó aproximadamente 7 Kb.

Con el fin de analizar la extensión de esta plataforma en el resto de los aislamientos, se utilizó dicha batería para amplificar el resto de los entornos genéticos mediante cartografía por PCR.

#### Objetivo 5: Analizar la estabilidad de los plásmidos transferidos.

Se descongeló el aislamiento de *P.rettgeri* 50521085 y su respectiva Tc resistente a carbapenemes en medio MHA conteniendo 2mg/L de MEM. Se subcultivó una colonia aislada en MHA sin antibiótico (primer subcultivo) por 7 veces consecutivas, hasta obtener el séptimo subcultivo. Se determinó la proporción de células resistentes a carbapenemes en los subcultivos 2, 4 y 7 mediante la preparación de un inóculo equivalente a 0.5 de la escala Mc Farland en suero fisiológico y posterior recuento por el método de siembra en superficie en medio MHA con MEM 2 mg/L y sin MEM (Figura 1).



Figura 1. Esquema del procedimiento llevado a cabo para realizar el estudio de estabilidad.

### **5. RESULTADOS**

#### 5.1 Ensayos de sensibilidad

Tres de los aislamientos de *P. rettgeri y* el aislamiento de *M. morganii*, intrínsecamente resistentes a colistin, fueron resistentes a todos los antibióticos ensayados incluyendo todos los β-lactámicos, carbapenemes, TIG y FOS, excepto a amicacina, presentando un fenotipo pan resistente (Tabla 2).

0															`	Vite	k C.	I.M	mcg	ml <sup>-1</sup>	a lo	s <sup>a</sup> :											
Aislamient	Identidad	Fecha	Muestra	AMI	D	SA	M	ΤZ	P	CF		FO	х	СТ	Х	CA	Z	CE	Р	M	EM	Ak		GE	N	NAL		CIF	D	F		SX	Г
50521085	P. rettgeri	25/04/12	Exudado Rectal	≥32	R	≥32	R	≥128	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	8*	*	≥16	R	4	*	8	*R	232	R	≥4	R	256	R	≥320	R
50526342	P. rettgeri	09/05/12	Exudado Rectal	≥32	R	≥32	R	≥128	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	16*	*	≥16	R	ß	*	8	*R	≥32	R	≥4	R	256	R	≥320	R
50543479	P. rettgeri	15/06/12	Exudado Rectal	≥32	R	≥32	R	≥128	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	8	S	≥16	R	4	S	≥16	R	≥32	R	≥4	R	256	R	≥320	R
50543479	M. Morganil	20/06/12	Exudado Rectal		R		R				R				R		R				R		S		R				R				R

 Tabla 2.
 Sensibilidad de los aislamientos productores de NDM.

Nota: a- Antimicrobianos: AMP Ampicilina, SAM Sulbactam amoxilina, TZP Tazobactam Piperacillina, CF Cefalotina, FOX Cefoxitina, CTX Cefotaxima, CAZ Ceftazidima, CEP Cefepima, MEM Meropenem, AK Amikacina, GEM Gentamicina, NAL Ácido nalidíxico, CIP Ciprofloxacina, F Nitrofurantoína, SXT Sulfametoxazol-trimetoprim.

#### 5.2 Confirmación fenotípica y molecular del gen bla<sub>NDM-1</sub>

Se confirmó un fenotipo para la presencia de una MBL ya que se observó sinergia con EDTA (372  $\mu$ g) para los discos de MEM e IMI (Figura 2) mientras que no se observó sinergia para los discos de IMI y ácido borónico (300 $\mu$ g) ni para los discos de cefalosporinas de tercera generación y cloxacillina (10/750 $\mu$ g).



Figura 2. Ensayo de sinergia con discos de EDTA, MEM e IMP.

Las amplificaciones para los genes codificantes de las MBL  $bla_{IMP}$ ,  $bla_{VIM}$ ,  $bla_{SPM-1}$ ,  $bla_{GIM-1}$ ,  $bla_{SIM-1}$  fueron negativas y positiva para  $bla_{NDM-1}$  (Figura 3).



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa de amplicones del gen bla <sub>NDM-1</sub>. Carriles 1: marcador PM en 200pb (Bioline), 2: control negativo, 3: *P. rettgeri* 50521085, 4: *P. rettgeri* 50543479, 5: *P. rettgeri* 50526342, 6: *M. morganii* 50547399, 7: *P. rettgeri* 518, 8: *P. rettgeri* 6747, 9: *P. rettgeri* Maciel, 10: *P. mirabilis* 512.

#### 5.3 Ensayo de conjugación y transferencia del gen

A partir de la conjugación de la *P.rettgeri* 50521085 se obtuvieron Tc a una frecuencia  $1 \times 10^{-5}$  por cepa receptora, mientras que a partir de la conjugación de *M.morganii* 50547399 se obtuvieron Tc a una frecuencia de conjugación de  $2 \times 10^{-6}$  por cepa receptora. Todas las Tc crecieron en LB agar conteniendo MEM 0.5 µg/ml y 100 µg/mL de Rif y por lo tanto se confirmó la transferencia de un fenotipo de resistencia a los β-lactámicos incluyendo los carbapenemes.

La detección del gen  $bla_{NDM-1}$  en las Tc se realizó por amplificación del mismo por PCR con primers específicos a partir de ADN plasmídico y fue positiva en un número representativo de las Tc.

A diferencia de *P.rettgeri* 50521085 (dadora), su respectiva Tc fue sensible a amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, nitrofurantoína, sulfametoxazol-trimetoprim, y colistin (Tabla 3). Este hallazgo sugiere que estas resistencias no estan codificadas en el plásmido transferido.

amiento	intidad	echa													Vite	ek	( C.I.I	М	l mcg	g r	nl <sup>-1</sup> a	ı I	os <sup>a</sup> :												
Aisla	Ide	LL.	AMP	,	SAIV	1	TZP		CF		FO	(	СТХ	(	CAZ	Z	CEP	,	IMI		ME	R	AK	GE	N	NA	L	CIP		F		SXT	-	COI	-
TC 7	E. coli	23/08/12	≥32	R	≥32	R	≥128 	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	16	1	8	R	≥16	R	<sup>22</sup> S	2	S	≥32	R	≤0,25	S	≤16	s	≤20	s	≤0,5	s

Tabla 3. Sensibilidad de la Tc.

Nota: a- Antimicrobianos: AMP Ampicilina, SAM Sulbactam amoxilina, TZP Tazobactam Piperacillina, CF Cefalotina, FOX Cefoxitina, CTX Cefotaxima, CAZ Ceftazidima, CEP Cefepima, MER Meropenem, AK Amikacina, GEM Gentamicina, NAL Ácido nalidíxico, CIP Ciprofloxacina, F Nitrofurantoína, SXT Sulfametoxazol-trimetoprim.

En la figura 4 se observa la extracción plasmídica por lisis alcalina del aislamiento de *E. coli* TOP (receptora), una Tc proveniente del ensayo de conjugación a partir de la *P.rettgeri* 50521085, todos los aislamientos de estudio y una cepa de *E. coli* R388 con plásmido de PM conocido de 33Kb. Se detectó la transferencia de dos plásmidos en la Tc (carril 4), uno de tamaño mayor a 33kb y un segundo plásmido de bajo peso molecular (11kb aproximado). En el aislamiento de *M.morganii* (carril 12) se logró ver un plásmido de apenas mayor peso molecular al del plásmido de menor tamaño de la Tc. Para el resto de los aislamientos la extracción plasmídica fue de baja calidad, ya que no se lograron visualizar los plásmidos presentes.



**Figura 4**. Electroforesis en gel de agarosa de ADN plasmídico extraído por lisis alcalina. Carriles 1: *E.coli* TOP (receptora), 2: *E.coli* R388, 3: Transconjugante, 4: Transconjugante, 5: *P. rettgeri* 50521085, 6: *P. rettgeri* 50543479, 7: *P. rettgeri* 50526342, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel, 11: *P. mirabilis* 512, 12: *M. morganii* 50547399. En el carril 3 se sembró ADN plasmídico extraído a gran escala de una transconjugante, mediante iluminación UV.

Con el fin de mejorar la calidad de la extracción para poder visualizar los perfiles plasmídicos en el resto de los aislamientos, se utilizó un método de extracción de ADN diferente al de lisis alcalina. En las figuras 5 y 6 se observa

una extracción plasmídica realizada por el método de extracción de ADN de cepas puras. En la figura 5 la corrida fue realizada en un gel de agarosa 0.8% durante 2 horas, mientras que en la figura 6 se utilizó el mismo porcentaje de agarosa, pero la corrida fue de 4 horas. Cuando transcurren mayores tiempos se observan diferencias en los perfiles plasmídicos, que en poco tiempo no eran distinguibles. El ADN extraído a gran escala (carril 1, figura 6), corre a la altura que el plásmido de menor peso molecular de la misma transconjugante (carril 2, figura 6). Para la *P.rettgeri* dadora, se logra ver un tercer plásmido de alto peso molecular, que parece ser que no pasó a la tranconjugante (carril 3, figura 6). Para el aislamiento de *M.morganii* se ve un plásmido, que transcurridas las 4 horas, parece ser de mayor tamaño al plásmido de menor peso molecular (portador de NDM) en *P.rettgeri* dadora y su respectiva transconjugante. La P. rettgeri 50521085, P. rettgeri 50543479 y P. rettgeri 50526342 (provenientes del mismo centro hospitalario), como se observa en la figura 6, carriles 3, 4 y 5, parecen tener un perfil plasmídico similar, que a su vez es diferente al del aislamiento de *M.morganii* (carril 6), que proviene del mismo centro hospitalario. Para P. mirabilis 512, P. rettgeri 518, P. rettgeri 6747 y P. rettgeri Maciel (figura 6, carriles 7, 8, 9 y 10) provenientes de otro centro hospitalario, se observan perfiles plasmídicos que difieren entre sí, y a su vez parecerían ser diferentes a los del otro centro.



**Figura 5**. Electroforesis en gel de agarosa de ADN plasmídico extraído por el método de extracción de ADN de cepas puras. Carriles 1: Transconjugante, 2: *P. rettgeri* 50521085, 3: *P. rettgeri* 50543479, 4: *P. rettgeri* 50526342, 5: *M. morganii* 50547399, 6: *P. mirabilis* 512, 7: *P. rettgeri* 518, 8: *P. rettgeri* 6747, 9: *P. rettgeri* Maciel.



**Figura 6**. Electroforesis en gel de agarosa de ADN plasmídico extraído por el método de extracción de ADN de cepas puras. Carriles 1: Transconjugante (se sembró ADN plasmídico extraído a gran escala de una transconjugante), 2: Transconjugante, 3:*P. rettgeri* 50521085, 4: *P. rettgeri* 50543479, 5: *P. rettgeri* 50526342, 6: *M. morganii* 50547399, 7: *P. mirabilis* 512, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel.

## 5.4 Identificación de los plásmidos transferidos a partir de *P.rettgeri* panresistente por estudios de secuenciación

De la extracción a gran escala y purificación del ADN plasmídico de la Tc mediante un sistema comercial, se obtuvo una fracción enriquecida únicamente en el plásmido de menor PM, de aproximadamente 11 kb, lo cual se evidenció mediante una electroforesis convencional en gel de agarosa (carril 3, figura 4), habiéndose probablemente degradado el plásmido de mayor PM. La amplificación de esta extracción dio positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> (Figura 7).



**Figura 7**. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones del gen bla <sub>NDM-1</sub>. Carriles 1: marcador PM en 100pb (Bioron), 2: control negativo, 3: Control positivo *P. rettgeri* 50521085, 4: Transconjugante, ADN extraído a gran escala.

El análisis e interpretación de la información genética obtenida a partir de la secuencia utilizando la herramienta BLAST dio como resultado que el gen  $bla_{NDM-1}$ , hallado en un contig de 11kb (Anexo 2), tuviera un 99% de

homología con un plásmido pNDM-BJ01 de 47 kb correspondiente a *Acinetobacter lwofii* (GenBank: JQ060896.1) (Figura 8).



**Figura 8**. Plásmido de Acinetobacter *lwofii* (GenBank: JQ060896.1). El corchete rojo indica la región del plásmido que presenta un 99% de homología con nuestro contig de 11kb.

Mediante el análisis de la secuencia se encontraron tres genes de resistencia antimicrobiana (*bla<sub>NDM-1</sub>, aphA6* y una proteína de resistencia a bleomicina) y dos elementos móviles (transposasa de la familia IS911, y ISAba125) (Figura 9).



Figura 9. Entorno genético de bla NDM-1.

#### 5.5 Entorno genético de *bla*<sub>NDM-1</sub> en el resto de los aislamientos

#### 5.5.1 Diseño de cebadores

En base al conocimiento de la secuencia del plásmido transferido, se diseñaron cebadores específicos para los genes aphA6, ISAba125 y groEL, dirigidos hacia el entorno genético del gen *bla*<sub>NDM-1</sub> y que abarcó aproximadamente 7 Kb.

El diseño de los cebadores se realizó utilizando la herramienta de Bioinformática Primer3plus, y se obtuvieron las secuencias que se indican en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Cebadores diseñados en Primer3plus para el estudio del entorno genético de bla<sub>NDM-1</sub>.

Gen	Tamaño del producto	Cebador	Secuencia 5´-3´	Tm (°C)
aphA6	629pb	FW	aaaattggtcagtcgccatc	56.4
		RV	gcatcctctttaggcaacg	60.5
ISAba125	552pb	FW	aagcgatccgttgtttatgg	56.4
		RV	ctttttgccagggtgaatgt	56.4
groEL	816pb	FW	aaggaaatcgaactggctga	56.4
		RV	gttttccttcgacacctgga	58.4

El ciclo de PCR para dichos genes fue puesto a punto, obteniéndose un único

ciclo de PCR para los tres genes.

Ciclo: 94°C x 3 min 94°C x 0.5 min 54°C x 0.5 min 72°C x 1 min 72°C x 2 min La amplificación de aphA6 fue positiva para todos los aislamientos (Figura 10), mientras que para ISAba125 únicamente el aislamiento de *M.morganii* fue negativo (Figura 11).

Respecto a groEL, como se observa en la Figura 12, solo tres de los aislamientos de *P.rettgeri* (provenientes del mismo centro hospitalario) fueron positivos para este. Los resultados se resumen en la Tabla 5.



**Figura 10**. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones del gen aphA6. Carriles 1: marcador PM (Bioron), 2: control negativo, 3: control positivo (Tc), 4: *P. rettgeri* 50521085, 5: *P. rettgeri* 50543479, 6: *P. rettgeri* 50526342, 7: *M. morganii* 50547399, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel, 11: *P. mirabilis* 512.



**Figura 11**. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones del gen ISAba125. Carriles 1: marcador PM (Bioron), 2: control negativo, 3: control positivo (Tc), 4: *P. rettgeri* 50521085, 5: *P. rettgeri* 50543479, 6: *P. rettgeri* 50526342, 7: *M. morganii* 50547399, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel, 11: *P. mirabilis* 512.



**Figura 12**. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones del gen groEL. Carriles 1: marcador PM (Bioron), 2: control negativo, 3: control positivo (Tc), 4: *P. rettgeri* 50521085, 5: *P. rettgeri* 50543479, 6: *P. rettgeri* 50526342, 7: *M. morganii* 50547399, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel, 11: *P. mirabilis* 512.

#### 5.5.2 Cartografía por PCR

Con el fin de analizar la extensión de la plataforma conocida a partir de la secuencia, en el resto de los aislamientos, se realizaron combinaciones con los cebadores diseñados, de manera de obtener amplicones que incluyesen parte del gen bla<sub>NDM-1</sub> así como sus entornos río arriba y río abajo (Figura 13).



**Figura 13**. Esquema de las plataformas elegidas para el estudio del entorno genético de bla<sub>NDM-1</sub>.

Las amplificaciones de la plataforma 1 (aphA6 FW - ISAba125 RV), 2 (ISAba125 FW- NDM RV), 3 (aphA6 FW- NDM RV) y 4 (ISAba125 FW- groEL RV) se lograron mediante la puesta a punto de los ciclos de PCR que se muestran a continuación, obteniéndose los productos de tamaño esperado para cada plataforma (Tabla 5).

Ciclo plataforma 1: 94°C x 3 min 94°C x 0.5 min 54°C x 0.5 min 👆 x 35 ciclos 72°C x 2 min 72°C x 4 min Ciclo plataforma 2: 94°C x 3 min 94°C x 0.5 min 55°C x 0.5 min - x 35 ciclos 72°C x 2 min J 72°C x 4 min Ciclo plataforma 3: 94°C x 3 min 94°C x 0.5 min 54°C x 0.5 min - x 35 ciclos 72°C x 3 min 72°C x 6 min Ciclo plataforma 4: 94°C x 3 min 94°C x 0.5 min 53°C x 0.5 min - x 35 ciclos 72°C x 6 min 72°C x 12 min

Se logró ver que tres aislamientos de *P.rettgeri*, provenientes del mismo centro hospitalario (carriles 4, 5 y 6, figuras 14, 15, 16 y 17), presentaron una plataforma genética entorno al gen bla<sub>NDM-1</sub> similar, y a su vez diferente a la plataforma del aislamiento de *M.morganii* (carril 7, figura 14, 15, 16 y 17), proveniente del mismo centro. Para el resto de los aislamientos de *P.rettgeri y el de P.mirabilis* (carriles 8, 9, 10 y 11, figura 14, 15 y 16) provenientes de otro centro hospitalario, el entorno genético de bla<sub>NDM-1</sub> para esas plataformas dio similar al del centro anterior, mientras que para la plataforma 4 (cariles 8, 9, 10 y 11, figura 17) los resultados fueron diferentes ya que estos aislamientos resultaron ser negativos para el gen groEL (Tabla 5).



**Figura 14**. Electroforesis en gel de agarosa de plataforma de aphA6 FW - ISAba125 RV (1691pb). Carriles 1: marcador PM (Bioline), 2: control negativo, 3: control positivo (Tc), 4: *P. rettgeri* 50521085, 5: *P. rettgeri* 50543479, 6: *P. rettgeri* 50526342, 7: *M. morganii* 50547399, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel, 11: *P. mirabilis* 512.



**Figura 15**. Electroforesis en gel de agarosa de plataforma de ISAba125 FW- NDM RV (1615pb). Carriles 1: marcador PM (Bioline), 2: control negativo, 3: control positivo (Tc), 4: *P. rettgeri* 50521085, 5: *P. rettgeri* 50543479, 6: *P. rettgeri* 50526342, 7: *M. morganii* 50547399, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel, 11: *P. mirabilis* 512.



**Figura 16**. Electroforesis en gel de agarosa de plataforma de aphA6 FW- NDM RV (2754pb). Carriles 1: marcador PM (Bioline), 2: control negativo, 3: control positivo (Tc), 4: *P. rettgeri* 50521085, 5: *P. rettgeri* 50543479, 6: *P. rettgeri* 50526342, 7: *M. morganii* 50547399, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel, 11: *P. mirabilis* 512.



**Figura 17**. Electroforesis en gel de agarosa de plataforma de ISAba125 FW- groEL RV (5589pb). Carriles 1: marcador PM (Bioline), 2: control negativo, 3: control positivo (Tc), 4: *P. rettgeri* 50521085, 5: *P. rettgeri* 50543479, 6: *P. rettgeri* 50526342, 7: *M. morganii* 50547399, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel, 11: *P. mirabilis* 512.

**Tabla 5**. Resultados de la amplificación de los genes aphA6, ISAba125 y groEL, así como también de las cuatro plataformas para el estudio de entornos genéticos, en todos los aislamientos.

PLATAFORMA	PRIMERS	PRODUCTO ESPERADO	RESULTADO PARA CADA AISLAMIENTO									
			Tc	P. rettgeri 50521085	<i>P. rettgeri</i> 50543479	<i>P. rettgeri</i> 50526342	M. morganii 50547399	P. rettgeri 518	P. rettgeri 6747	<i>P. rettgeri</i> Maciel	P. mirabilis 512	
aphA6	FW - aphA6 RV - aphA6	629 pb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ISAba125	FW - ISAba125 RV - ISAba125	552 pb	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
groEL	FW - groEL RV - groEL	816 pb	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
1	FW - aphA6 RV - ISAba125	1691 pb	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
2	FW - ISAba125 RV - NDM	1615 pb	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
3	FW - aphA6 RV - NDM	2754 pb	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
4	FW - ISAba125 RV - groEL	5589 pb	+	+	+	+	-	-	-	_	-	

#### 5.6 Tipificación por Inc/Rep PCR

Todos los aislamientos excepto el de *M.morganii* resultaron positivos para Inc A/C, pero los plásmidos transferidos a partir de la *P.rettgeri* 50521085, (Tc, carril 4, figura 18, 19 y 20) no fueron tipables con el panel de cebadores utilizados.



**Figura 18**. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de Inc HI1, HI2 y I1-I<sub>2</sub>. Carriles 1: marcador PM en 100pb (Bioron), 2: control negativo, 3: Control positivo deInc I1-I<sub>2</sub> (8047), 4: Transconjugante, 5: *P. rettgeri* 50521085, 6: *P. rettgeri* 50543479, 7: *P. rettgeri* 50526342, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel, 11: *M. morganii* 50547399, 12: *P. mirabilis* 512.



**Figura 19**. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de Inc X, L/M y N. Carriles 1: marcador PM en 100pb (Bioron), 2: control negativo, 3: Control positivo de Inc N (Tc *E.coli* KPC), 4: Transconjugante, 5: *P. rettgeri* 50521085, 6: *P. rettgeri* 50543479, 7: *P. rettgeri* 50526342, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel, 11: *M. morganii* 50547399, 12: *P. mirabilis* 512.



**Figura 20**. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de IncA/C, T y FII. Carriles 1: marcador PM en 100pb (Bioron), 2: control negativo, 3: Control positivo de Inc A/C y FII (K.pneumoniae 296), 4: Transconjugante, 5: *P. rettgeri* 50521085, 6: *P. rettgeri* 50543479, 7: *P. rettgeri* 50526342, 8: *P. rettgeri* 518, 9: *P. rettgeri* 6747, 10: *P. rettgeri* Maciel, 11: *M. morganii* 50547399, 12: *P. mirabilis* 512.

#### 5.7 Estudio de estabilidad de los plásmidos transferidos

En la Tabla 6 se muestran los recuentos de *P. rettgeri* 50521085 (dadora) y su respectiva Tc, para el 2<sup>do</sup>, 4<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> subcultivo, mientras que en la Tabla 7 se expresan dichos resultados en términos de frecuencia de pérdida.

Los estudios de estabilidad sugieren que el plásmido portador de *bla<sub>NDM-1</sub>* se pierde más bruscamente en las *E.coli* Tc. que en el aislamiento clínico *P. rettgeri* (Figura 21).

	2do subcu	<b>ltivo</b> (ufc/mL)	4to subcu	<b>ltivo</b> (ufc/mL)	7mo subcultivo (ufc/mL)					
	MHA	MHA+MEM	MHA	MHA+MEM	MHA	MHA+MEM				
Tc7	7.9x10 <sup>6</sup>	4.1x10 <sup>4</sup>	1.2x10 <sup>7</sup>	4.6x10 <sup>3</sup>	7.8x10 <sup>7</sup>	2.8x10 <sup>3</sup>				
P. rettgeri 1058/1	1.4x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>7</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>	1.0x10 <sup>6</sup>	1.1x10 <sup>8</sup>	2.5x10 <sup>4</sup>				

**Tabla 6**. Recuentos de *P. rettgeri* 50521085 (dadora) y su respectiva Tc, para el 2<sup>do</sup>, 4<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> subcultivo, en MHA como en MHA y MEM.

**Tabla 7**. Frecuencia de pérdida del plásmido bla<sub>NDM-1</sub> (+) para *P. rettgeri* 50521085 (dadora) y su respectiva Tc, en el  $2^{do}$ ,  $4^{to}$  y  $7^{mo}$  subcultivo.

FRECUENCIA DE PÉRDIDA									
	2do subcultivo	4to subcultivo	7mo subcultivo						
Tc7	-2	-4	-4						
<i>P. rettgeri</i> 1058/1	-1	-2	-4						



**Figura 21**. Gráfico de frecuencia de pérdida en *P. rettgeri* 50521085 (dadora) y su respectiva Tc, para los sucesivos subcultivos.

### 6.DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los ensayos de sensibilidad para tres de los aislamientos de *P. rettgeri* y el aislamiento de *M. morganii*, dieron como resultado un fenotipo pan resistente, que no se transfirió por completo a la *E.coli* TOP receptora en los ensayos de conjugación. Estos cuatro aislamientos, intrínsecamente resistentes a colistin, fueron resistentes a todos los antibióticos ensayados incluyendo todos los  $\beta$ -lactámicos, carbapenemes, tigeciclina y fosfomicina, excepto a amicacina. Luego de realizar el ensayo de conjugación de *P.rettgeri* con dicho fenotipo pan resistente, a una *E.coli* TOP receptora, las Tc resultaron tener un perfil de sensibilidad diferente al de la dadora. Estas fueron sensibles a amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, nitrofurantoína, sulfametoxazol-trimetoprim y colistin. Este hallazgo sugiere que estas resistencias no estan codificadas en el plásmido transferido portador de bla<sub>NDM-1</sub>.

A partir de los resultados de las CIM para meropenem e imipenem en el antibiograma, es que se sospechó la presencia de una carbapenemasa. Luego que el ensayo de sinergia con discos de EDTA, meropenem e imipenem dio positivo, mientras que no se observó sinergia para los discos de imipenem y ácido borónico, ni para los discos de cefalosporinas de tercera generación y cloxacillina, es que finalmente se confirmó la presencia de una MBL, y se descartó la posibilidad de otra clase de carbapenemasa. Recientemente la endemia regional para NDM era nula, por lo cual en estos aislamientos clínicos primero se buscaron las MBL más diseminadas, como ser IMP, VIM, SPM-1, GIM-1 y SIM-1, y cuando por ensayos moleculares se obtuvieron resultados negativos para estas, finalmente se probó realizar la amplificación del gen  $bla_{NDM-1}$ , la cual dio resultado positivo para todos los aislamientos. Por ello es que fue difícil hallarla, y no se puede descartar la hipótesis de que el gen  $bla_{NDM-1}$  estuviera presente desde hace tiempo, y que no hubiera sido detectado pues no era común la búsqueda de resistencia a carbapenemes en la flora normal intestinal.

Los plásmidos portadores del gen  $bla_{NDM-1}$  presentaron relativamente una alta frecuencia de conjugación, ya que a partir de la *P.rettgeri* 50521085 se obtuvieron Tc a una frecuencia  $1 \times 10^{-5}$  por cepa receptora, mientras que a partir de la conjugación de *M.morganii* de obtuvieron Tc a una frecuencia de conjugación de 2x10<sup>-6</sup> por cepa receptora. Estos resultados sugieren una gran habilidad del plásmido  $bla_{NDM-1}$  positivo para transferirse.

Además todas las Tc crecieron en LB agar conteniendo meropenem y rifampicina, por lo tanto se confirmó la transferencia de un fenotipo de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos incluyendo los carbapenemes.

Mediante la extracción plasmídica por el método de lisis alcalina, se detectó la transferencia de dos plásmidos en la Tc proveniente del ensayo de conjugación a partir de una *P.rettgeri* dadora. Uno de los plásmidos posee un tamaño mayor a 33kb mientras que el otro es de bajo peso molecular (11kb aproximado).

Cuando se realizó la extracción plasmídica a gran escala, esta se enriqueció en el plásmido de 11kb. Además la amplificación de esta extracción dio positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>, y posteriormente cuando se envió a secuenciar, se obtuvo como resultado que el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> se encontró en un contig de 11 kb, lo cual concuerda con el tamaño del plásmido visualizado en el gel.

En esta extracción a gran escala, es probable que el plásmido de mayor peso molecular se haya degradado o se encuentre en muy baja cantidad, ya que no lo logramos ver en el gel de agarosa, pero los resultados de la secuenciación arrojaron más de un contig diferente, probablemente provenientes de fragmentos de este plásmido. Con los resultados de la extracción plasmídica y de la secuencia podemos inferir que el gen *bla<sub>NDM-1</sub>* se encuentra en un plásmido de bajo peso molecular, aproximadamente 11 kb, mientras que el plásmido de mayor tamaño podría ser el plásmido conjugativo.

Cuando se realizó una extracción plasmídica por otro método, y se dejo correr suficiente tiempo en el gel, se logró ver en la Tc dos plásmidos, al igual que se veía por el método de lisis alcalina. Y a su vez, el ADN plasmídico obtenido por la extracción a gran escala corre al mismo nivel que el plásmido de menor tamaño de la Tc, lo que reafirma la hipótesis de que el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> se encuentra en ese plásmido.

Para la *P.rettgeri* dadora, además de ver los dos plásmidos presentes en su respectiva Tc, se logra ver un tercer plásmido de alto peso molecular, que parece ser que no pasó a la transconjugante. Podría ser que algunas de las resistencias que no pasaron a la Tc, se encuentren codificadas en este tercer plásmido presente en la dadora.

Las tres *P.rettgeri* provenientes de un mismo centro hospitalario (50521085, 50543479 y 50526342) parecería que poseen un perfil plasmídico similar. Pero para el aislamiento de *M.morganii*, que proviene de ese mismo centro, el perfil es diferente ya que se ve un plásmido de mayor tamaño al plásmido de menor peso molecular (portador de *bla*<sub>NDM-1</sub>) de la *P.rettgeri* dadora y de

su respectiva Tc. Para el resto de los aislamientos (*P. mirabilis* 512, *P. rettgeri* 518, *P. rettgeri* 6747 y *P. rettgeri* Maciel) provenientes de otro centro hospitalario, los perfiles plasmídicos resultaron diferentes entre sí, y a su vez diferentes a los del otro centro.

Los plásmidos transferidos, en la Tc, no fueron tipables con el panel de cebadores utilizados, mientras que para todos de los aislamientos, excepto el de *M.morganii*, se obtuvieron plásmidos Inc A/C. Se puede sospechar que el tercer plásmido observado en la *P.rettgeri* dadora, que no pasó a la Tc en la conjugación, sea el positivo para Inc A/C.

A partir de la secuencia obtenida mediante la extracción a gran escala de ADN plasmídico de la Tc, se obtuvo como resultado que el contig de 11 kb donde se haya el gen  $bla_{NDM-1}$  tuviera un 99% de homología con un plásmido  $bla_{NDM-1}$  positivo de 47 kb correspondiente a *Acinetobacter lwofii*. Esto nos lleva a pensar que *A.lwoffi* podría ser un reservorio ambiental para este gen.

Mediante el análisis del entorno genético de *bla*<sub>NDM-1</sub> a partir de la secuencia, se logró establecer que NDM a diferencia de otras MBL, no esta asociado a integrones. NDM parece ser una enzima que presenta un contexto genético diferente para diseminarse, ya que tiene elementos genéticos móviles como ISAba125, transposasas de la familia de IS911, y genes de resistencia a otros antibióticos. Existen mecanismos de recombinación, transposición, conjugación, que hacen pensar que la evolución de NDM es diferente al menos en estos casos. Su diseminación estaría limitada a un plásmido conjugativo.

Cuando se estudiaron los entornos genéticos de  $bla_{NDM-1}$  en el resto de los aislamientos por cartografía por PCR, se vió que mientras que el gen aphA6,

que confiere resistencia a aminoglicósidos, se encuentra en todos los aislamientos, no ocurrió lo mismo para ISAba125 y groEL. El elemento genético móvil ISAba125, se encontró en todos los aislamientos excepto en el de *M.morganii*, y la chaperonina groEL, se encontró únicamente en las tres *P.rettgeri* provenientes del mismo centro hospitalario.

Parecería ser que todos los aislamientos, excepto el de *M.morganii*, comparten la primer plataforma en común, es decir desde aphA6 a ISAba125, amplificaron el producto del tamaño esperado. Es lógico que para *M.morganii* no hayamos visto amplificación de esta plataforma, ya que este aislamiento era negativo para ISAba125. Se observaron diferencias en la migración de los amplicones en la *P.rettgeri* dadora y su respectiva Tc, lo cual no es correcto ya que se trata del mismo entorno. Estas diferencias en la migración de los amplicones en el gel de agarosa podrían deberse a que en estos casos no se realizó tinción incorporada al gel, sino que se incorporó el agente intercalante con la muestra de ADN en el gel. Para corroborar que efectivamente los amplicones en el resto de los aislamientos sean los mismos, deberíamos realizar una purificación del ADN a partir del gel y posteriormente enviar a secuenciar, ya que estas pequeñas diferencias en la amplificación podrían deberse a inserciones, por lo tanto hasta no tener la secuencia no podrá confirmarse.

La segunda plataforma, que abraca desde ISAba125 a NDM, dio igual en todos los aislamientos, excepto en el de *M.morganii*, el cual es negativo para ISAba125.

Para la tercer plataforma, que abarca desde aphA6 a NDM, los amplicones migraron igual en todos los aislamientos, excepto para el aislamiento de

*M.morganii*, que migró más hacia abajo, es decir se amplificó un fragmento más pequeño que el del resto de los aislamientos, lo que concuerda con el resultado de que este aislamiento es negativo para ISAba125, al no tener este gen, el fragmento desde aphA6 a NDM es de menor tamaño.

La cuarta plataforma, desde ISAba125 a groEL dio positivo solo para los tres aislamientos de *P.rettgeri* provenientes del mismo centro hospitalario, mientras que tanto para *M.morganii*, del mismo centro, como para el resto de los aislamientos dio negativo, lo cual era de esperar ya que estos aislamientos eran negativos para groEL desde un principio.

En todos los casos, lo correcto sería secuenciar los amplicones para confirmar que efectivamente se estén amplificando esos genes, y además evidenciar posibles inserciones o delecciones que hacen que los tamaños de los amplicones sean apenas diferentes, así como también posibles mutaciones, que afecten la amplificación dando un resultado negativo.

Los resultados del estudio de estabilidad sugieren que el plásmido portador de *bla<sub>NDM-1</sub>* se pierde más bruscamente en las *E.coli* Tc. que en el aislamiento clínico *P. rettgeri.* 

#### **7.CONCLUSIONES**

La existencia de aislamientos productores de carbapenemasas, actualmente es una amenaza global para la salud pública, ya que junto con la multiresistencia, se produce alta mortalidad y diseminación, se dificulta la detección y además el desarrollo de antibióticos es escaso.

Como actualmente en Uruguay nos encontramos en etapa de emergencia de *Enterobacterias* productoras de carbapenemasas, es por ello muy importante actuar en esta primera etapa de emergencia de la resistencia, de modo de cortar la evolución a las otras etapas, abordar la problemática desde una visión molecular con el fin de optimizar la capacidad de detección, adoptar las medidas de contención de la diseminación de las cepas involucradas, investigar sobre los posibles orígenes de las mismas, profundizar sobre la sensibilidad a otros antibióticos y vigilar su evolución.

Este hallazgo sugiere la búsqueda de resistencia a los carbapenemes en aislamientos de *Providencia sp., Morganella sp.* y *Proteus sp.* 

El gen *bla<sub>NDM-1</sub>* se encuentra en un plásmido de bajo peso molecular, aproximadamente 11 kb, mientras que el plásmido de mayor tamaño podría ser el plásmido conjugativo.

NDM es un gen epidémico y no se puede descartar que estuviera presente desde hace tiempo, y que no hubiera sido detectado pues no era común la búsqueda de resistencia a carbapenemes en la flora normal intestinal.

A pesar de que los géneros estudiados no se encuentran en la lista de patógenos ESKAPE, éstos son intrínsecamente resistentes a colistin, hecho que tiene gran relevancia clínica dado que se tornaron resistentes a virtualmente todos los antibióticos disponibles sumado al potencial demostrado para la diseminación del gen *bla<sub>NDM-1</sub>*.

## 8.REFERENCIAS

1-Tenover F. Mechanism of antimicrobial resistance in bacteria. The American Journal of Medicine. 2006; 119: S3-S10.

2-Paterson DL, Robert AB. Extended spectrum B-lactamase: a clinical update. Clinical Microbiology Reviews. 2006; 18:657-686.

3-Davies J. Inactivation of antibiotics and the disemination of resistance genes. Science 1994; 264:375-382.

4-Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. 2011. The emerging NDM carbapenemases. Trends Microbiol 19:588-595.

5-Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis 10:597-602.

6-Poirel L, Hombrouck-Alet C, Freneaux C, Bernabeu S, Nordmann P. 2010. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. Lancet Infect Dis 10:832.

7-Pasteran F, Albornoz E, Faccone D, Gomez S, Valenzuela C, Morales M, Estrada P, Valenzuela L, Matheu J, Guerriero L, Arbizu E, Calderon Y, Ramon-Pardo P, Corso A. 2012. Emergence of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in Guatemala. J Antimicrob Chemother 67:1795-1797.

8-Escobar Pérez Javier Antonio, Olarte Escobar Narda María, Castro-Cardozo Betsy, Valderrama Márquez Ismael Alberto, Garzón Aguilar Martha Isabel, Martinez de la Barrera Leslie, Barrero Barreto Esther Rocio, Marquez-Ortiz Ricaurte Alejandro, Moncada Guayazán Maria Victoria, Vanegas Gómez Natasha. 2013. Outbreak of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in a neonatal unit in Colombia, South America. American Society for Microbiology. 10-Bonnin RA, Poirel L, Carattoli A, Nordmann P (2012) Characterization of an IncFII Plasmid Encoding NDM-1 from Escherichia coli ST131. PLoS ONE 7(4): e34752. doi:10.1371/journal.pone.0034752

11-Martinez E; Márquez, CM; Ana ; Merlino J; Djordjevic S; H. Stokes; Piklu Roy Chowdhury. Diverse mobilized class 1 integrons are common in the chromosome of pathogenic Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.: 56 4, p.: 2169 - 2172, 2012.

12-A.J. Ingold; M. Castro; G. Borthagaray ; Márquez, CM. Detección de una metalo B-lactamasa bla <sub>VIM-2</sub> asociada a un integrón de clase 1 en un aislamiento clínico de Pseudomonas aeruginosa en Uruguay Ref. № 10/061. Revista Argentina de Microbiologia, v.: 43, p.: 198 - 202, 2011

13-Ingold, N. Echeverría, A. Acevedo, G. Borthagaray, R. Vignoli, J. Viroga, O. Gonzalez, V. Odizzio, K. Etulain, E. Nuñez, C. Márquez, H. Albornoz, A. Galiana\* (Montevideo, Maldonado, UY). KPC producing Klebsiella pneumoniae in Uruguay: first two clinical cases and isolates' characteristics report. Internacional, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Londres, 2012

14-Ingold, N. Echeverría, A. Acevedo, G. Borthagaray, R. Vignoli, J. Viroga, O. Gonzalez, V. Odizzio, K. Etulain, E. Nuñez, H. Albornoz, A. Galiana, C. Márquez\*. KPC producing Klebsiella pneumoniae in Uruguay: the first clinical cases and isolates characteristics report- Manuscrito finalizado para su envío a publicación.2013.

15-Márquez CM. Detección, localización y dispersion de carbapenemasas en Uruguay. Jornadas de acutalización. Sociedad Uruguaya de Microbiología. Instituto de Higiene, Montevideo, noviembre, 2012.

9, 16 -Patrick Mc Gann, Jun Hang, Robert J. Clifford, Yu Yang, Yoon I. Kwak,aRobert A. Kuschner,bEmil P. Lesho, and Paige E. Waterman. 2012. Complete Sequence of a Novel 178-Kilobase Plasmid Carrying blaNDM-1in a Providencia stuartii Strain Isolated in Afghanistan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 1673–1679

17- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0, 2013. http://www.eucast.org

18- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) "Molecular Cloning". Cold Spring Harbor Laboratory Press.

19- Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins K.L. y Threlfall E.J. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods. 63:219-228.

20- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st Informational Supplement. CLSI Document M100-S21. Wayne, PA: CLSI, 2011.

## **9. ANEXO 1**

## **MEDIOS DE CULTIVO**

Medio completo Luria-Bertani (LB)

Contiene por litro de solución: Triptona bacto......10g Extracto de levadura.....5g NaCl.....10g

El medio LB sólido se prepara añadiendo 15g de agar por litro de medio de cultivo. Se esteriliza por autoclave (15 minutos a 121°C).

Medio Mueller Hinton Agar

Contiene por litro de solución:

Infusión de carne......300g Peptona ácida de caseína...17.5g Almidón.....1.5g

El medio MHA sólido se prepara añadiendo 15g de agar por litro de medio de cultivo. Se esteriliza por autoclave (15 minutos a 121°C).

## EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Lisis alcalina (Maniatis, 1989)

1. Realizar una suspensión con una ansada de un cultivo de células de 24 hs en LB, en 100 μl de solución I fría. Vortexear y colocar en hielo.

2. Agregar 200  $\mu$ l de solución II preparada en el momento. Mezclar invirtiendo el eppendorf suavemente por 5 veces; no vortexar. Dejar el eppendorf en hielo por 10 minutos.

3. Agregar 150  $\mu l$  de solución III fría, invertir al menos 5 veces y dejar en hielo 15 minutos.

4. Centrifugar 12000-13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. transferir el sobrenadante a eppendorf limpios y rotulados.

5. Al sobrenadante agregarle 950  $\mu l$  de etanol 95 % frío; mezclar invirtiendo los eppendorf suavemente y dejar a temperatura ambiente por 10 minutos.

6. Centrifugar a 12000.13000rpm por 10 minutos a 4°C.

7. Opcional: Remover el sobrenadant y realizar un lavado con etanol 70 %, centrifugando posteriormente por 2 minutos a 13000rpm y 4°C.

8. Remover el sobrenadante, apoyar los tubos en posición invertida sobre papel secante para eliminar el alcohol y si es necesario, llevar a estufa a 37°C dejando evaporar bien el alcohol.

9. Redisolver el precipitado en 25  $\mu$ l de buffer TE, pH 8.0 con tips de punta roma y congelar a -20°C.

#### Solución I:

50 mM glucosa 25 mM Tris-Cl (pH 8.0) 10 mM EDTA (pH 8.0)

#### Solución II:

0.2 N NaOH 1% SDS

#### Solución III:

3 M Acetato de potasio (pH 4.8)

#### Extracción de ADN cromosomal de cepas puras

1. Se obtiene un pellet centrifugando un cultivo a partir de colonias aisladas de una placa de agar (3 Mac Farland) con 600  $\mu$ l de suero fisiológico, a 10000 rpm por 10 minutos. El pellet se coloca en hielo.

2. Resuspender el pellet obtenido en 200  $\mu$ l de buffer TE ph 8.0 y se agregan 20  $\mu$ l de lisozima 50 mg/ml. Se incuba a 37°C durante 15 minutos.

3. Se agregan 250 μl de buffer TE ph 8.0 y se agregan 25 μl de SDS 10% y 3 μl de Proteinasa K 20mg/ml. Se mezcla por inversión y se incuba 1 hora a 37°C.

4. Inmediatamente colocar los tubos en hielodurante 5 minutos. Agregar 285 µl de NaCl 5M frío y agitar por inversión. Incubar en hielo durante 10 minutos, agitando por inversión al menos 5 veces durante la incubación.

5. Centrifugar a 13000 rpm, 15 minutos a 4°C.

7. Transferir el sobrenadante (aproximandamente 400  $\mu$ l) a un eppendorf de 1.5 ml con cuidado de no aspirar el precipitado, el cual se desprende fácilmente. Si el sobrenadante esta muy sucio, centrifugar nuevamente a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C y transferir el sobrenadante a un nuevo eppendorf de 1.5 ml.

8. Agregar igual volumen de isopropanol frío y agitar por inversión hasta que se observe la formación de una "medusa". Agitar al menos 20 veces antes de centrifugar. Si no se observa la medusa se puede dejar incubando a -20°C durante la noche.

9. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

10. Eliminar el sobrenadante por inversión y lavar el precipitado con 900  $\mu$ l de etanol 70% frío. Centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Retirar el sobrenadante y dejar secar el precipitado hasta comprobarse la completa desaparición de etanol.

11. Resuspender el precipitado en 100  $\mu l$  de  $H_20$  mQ incubando a 65°C durante 15 minutos.

## **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

Se prepara una mezcla de Master Mix conteniendo el buffer, primers, dNTPs y la Taq ADN polimerasa. Con el fin de calcular el volumen total de cada reactivo en la Mix, se multiplica cada volumen por n+1, siendo n el número de reacciones de PCR a realizar. Se realizan controles negativos con H<sub>2</sub>O mQ y controles positivos adecuados según el producto a amplificar.

Master Mix: Vol. final 25 µL

Buffer 10X	2.5 μL
MgCl 50 mM	0.75 μL
Primer FW	0.5 μL
Primer RV	0.5 μL
dNTPs 40mM	0.5 μL
Taq pol	0.25 μL
H₂O mQ	18 µL
Molde de ADN	2 μL

#### Amplificación de NDM

Primer NDM FW Primer NDM RV Producto 621 pb Ciclo:  $94^{\circ}C \times 5 \min$   $94^{\circ}C \times 0.5 \min$   $52^{\circ}C \times 0.5 \min$   $72^{\circ}C \times 1 \min$  $72^{\circ}C \times 2 \min$ 

## PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DE ARNr 16 s

Se realiza la amplificación con los primers Eub 27F - 1492R. Control positivo *E.coli* R388. Producto de 1465pb.

Ciclo:  $94^{\circ}C \times 5 \min$   $94^{\circ}C \times 1 \min$   $55^{\circ}C \times 1 \min$   $72^{\circ}C \times 3 \min$  $72^{\circ}C \times 7 \min$ 

## PCR MULTIPLEX (Carattoli, 2005)

En esta técnica se utilizaron 9 pares de primers para desarrollar 3 multiplex reconociendo los replicones HI1, HI2, I1-y, L/M, X, N, A/C, T, FII.

Ciclo: 94°C x 5 min 94°C x 1 min 60°C x 0.5 min 72°C x 1 min 72°C x 5 mi

Primers Multiplex 1	Producto esperado	Control positivo utilizado
HI1	471 pb	
HI2	644 pb	
1-γ	139 pb	8047
Primers Multiplex 2		
x	376 pb	
L/M	785 pb	
Ν	559 pb	Tc. <i>E.coli</i> KPC
Primers Multiplex 5		
A/C	465 pb	K.pneumoniae 296
Т	750 pb	
FII	270 pb	K.pneumoniae 296

## PROTOCOLO DE CONJUGACIÓN

1. Verificar que la cepa dadora sea Ctx<sup>R</sup>, Rif<sup>S</sup> y Azida de sodio<sup>S</sup>, y que la *E.coli* Top doble mutante (receptora)sea Ctx<sup>S</sup>, Rif<sup>R</sup> y Azida de sodio<sup>R</sup>.

2. Descongelar la cepa dadora en LB agar con Ctx 1µg/ml, y la cepa receptora en LB agar con Rif 100 µg/ml y Azida de sodio 100 µg/ml. Dejar en estufa 37°C durante 18hs.

3. Resuspender cada cepa por hisopado de todo el crecimiento en 1ml de caldo LB (1 Mc Farland). Mezclar 0.5ml de receptora en el ml de la dadora, y sembrar 0.5ml de la mezcla en LB agar, en forma de "botón" que se mantenga horizontal. Dejar en estufa 37°C durante 18hs.

4. Se remueve todo el crecimiento y se resuspende en 1ml de caldo LB. A partir de este, se preparan diluciones seriadas al décimo (hasta la dilución -9). Luego se siembran con rastrillo estéril 100  $\mu$ l de las diluciones 0, -1, -2 y -3 en LB agar con Ctx y Rif, y las diluciones -6, -7, -8 y -9 tanto en LB agar con Rif, como en LB agar con Ctx. Se incuba en estufa 37°C over night.

5. Verificar crecimiento. Realizar recuento de las presuntas transconjugantes (diluciones en LB agar con Ctx y Rif), así como también de las receptoras (diluciones en LB agar con Rif). Subcultivar las presuntas transconjugantes (al menos 5 colonias) en LB agar con Azida de sodio para confirmación.

Cálculo de frecuencia de conjugación:

**Frecuencia de conjugación**= recuento de transconjugantes/ recuento de receptoras.

## 10.ANEXO 2

	- Proteína hinotética
	i i otema inpotetica
taaaacatgccccaaccttgcattattatggatgcaaaaatgtatagccgagttaata	
aacgetttgaageegagettgageaggegeattateaagaegatgtaaaeetattageaa	
ttgggacttttggatttgcggatagtggtatcgcaaagattgaagaaattgctctagtgc	
ctttaaatcaaacttggctaccatttgagagcttgggtgaaaaagaactcttagacacgc	
ttacaatgcagaataggtcattcattaagtgcttgcgatataatctaagccctaaaagtc	
<pre>caattgcaaacgtattgcttacagacaccaacccaacggcattttacttaatcaatg</pre>	
atcagactgaagattcttatattactgaagcaaaggaattgattg	
<pre>catcaattctggtcaatgtcgatcgggacgttgtagacattccaccacctgaaaataaac</pre>	•
<mark>cgttgttaggctataacaatcatactgacaccgcagttaatagttaa</mark> ggattcatat <mark>atg</mark>	•
gattaccaagaacaggaacaatttaaaatttttgcgggctttgtcgcttttctgatagct	
gttttttgctttctagtatggaaaggctcaagtgccgtaggtttagattttgccactgga	
${\tt atgaagtctagtgttggcttaattgctttggtagtggcgctgtactttgctatcaaatgg}$	Proteína hipotética
<pre>gatatacctaaagctatgctttaccctacggtagctgttttattggttgtctgcttattc</pre>	
<pre>cctgcattaaattattatgcgcttgaagcttcagaaaaatcatttaatcaaacaactaat</pre>	
tttcttggtcagccagtacaagaattttcagcgaccacaattaccgttatgtggggcatg	
<mark>tggtatatgaaagcggtttacatgcttgtagcgggcttaattggagttgttctacaaaga</mark>	-
attaggtatcctgaagaaaattatttttaagcgtactaagcaaaaaagccagttctata	
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt	
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata	
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt	
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc	
ctggcttttttatttttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt	
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaatatttcataaacaagaattgcga	
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataatttcataaacaagaattgcga qtgctaaaaacatcccccgcaaaaactgtaatttctttgctaaaattacacctaagtat	
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttgctaaaattacacataagttt cacttataattgaatttaataaaataa	
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaatatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttgctaaaattacacctaagtatt cacttataatgaatttaataaaaataactaaagctacaacgaaaatcaaaatttccagta tgtttagaagagatggatccgtaaatttgaacaactcctatagtgtcctcctc	_
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgttttttgatctttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttggtaaattacaactaagtt cacttataatgaatttaataaaataa	1
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttggtaaaattacaactaagttt cacttataatgaatttaataaaataa	Transposasa
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttggcaagtcagaaattacaatttcagta tgtttagaaggatggatccgtaaattgaacaactcaaggaaaatcaaaatttccagta tgtttagaaggatggatccgtaaattgggatatttatggcacgtagacaagaaat cattcaaatgatttaaaacataatatggagattttatggcacgtagaccaagaaaat cattcaaatgatttaaaacataatatggagattttatggcacgtagaccaagaaaat cattcaaatgattttaaagctaaggtagcacttgctgcgattaaagcagaaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaaccaaattattgacaaaaaaaa	Transposasa
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttggcaagtaaaatttcagta tgtttagaaggatggatccgtaaattggaacaacgaaaatcaaaatttccata tgtttagaagagatggatccgtaaattggagtattttatggcacgtagaccaagaaaat cattcaaatgatttaaaaaataataggagatccgaaaattgggaaaat cattcaaatgattttaaagctaaggtagcacttgctgcgattaaagcagaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgtcatcaaaagcaaaattattgacagaaaacactt	Transposasa - IS911
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttggcaagtaaattcaacatagtatt cacttataatgaatttaataaaaataactaaagctacaacgaaaatcaaaatttccagta tgtttagaagagatggatccgtaaatttggagtattttatggcacgtagaccaagaagaaat cattcaaatgatttaaaacataatatggagtattttatggcacgtagaccaagaagaaat cattcaaatgattttaaagctaaggtagcacttgctgcgattaaagcagaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaaaccaaattattgactggaaaaacact attgatccagcttcctcgcaagctttcgatcaatcaaagtgatatttttatgacagaaccaccaca tgatctaaaaaaacaacaaaatcggtgagcaggcattagaaattgattttttagaaaaaatcaaa	Transposasa - IS911
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataattcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttgctaaaaattacacctaagtatt cacttataatgaatttaataaaaataactaaagctaccaacgaaaatcaaaatttcagta tgtttagaagagatggatccgtaaatttgaacaactcctataagtgatattctgctcctc aaatgatgttataaacatcaatatatggagtattttatggcacgtagaccaagaagaaat cattcaaatgattttaaagctaaggtagcacttgctgcgattaaagcagaaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaaaccaaattattgactggaaaaacactc gatctaaaaaacaccactggagcggttcaacaaggtagaccaacgaaattgatttttagaa ggtgtgttgaagaaactggggcggttcaaccacaaagttagaccaacgaaccaccac gatctaaaaaaactacatggagcggttcaaccacaaagttagattgatt	Transposasa - IS911
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttgctaaaaattacacctaagtatt cacttataatgaatttaataaaaataactaaagctaccaacgaaaatcaaaatttcagta tgtttagaagagaggatggatccgtaaattggagtattttatggcacgtagaccaagaagaaat cattcaaatgattttaaagctaaggtagcacttgctgcgattaaagcagaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaaaccaaattattgactggaaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaagctacaacgaaaatcaaaatcaaa ttgatctcagcttcctcgcaagctttcgatcaatcaaagttagaaattgatttttagaa gtgttaaaaaacacaccatcaataa ttgatctcagcttcctcgcaagctttcgatcaatcaaaagttagaaattgatttttagaa ttgatctcagcttcctcgcaagctttcgatcaatcaaaagttagaaattgattttttagaa ttgatctcagcttcctcgcaagcttcaaccacaaagttagaaattgatttttagaa gtgtgttgaagaaactgggcgcttcaaccacaaagttaa	Transposasa - IS911
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataattcatacacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttgctaaaaattacacctaagtatt cacttataatgaatttaataaaaataactaaagctacaacgaaaatcaaaatttcagta tgtttagaagagatggatccgtaaatttgaacaactcctataagtgatattctgctcctc aaatgatgttataaacatcaatatatggagtattttatggcacgtagaccaagaagaaat cattcaaatgattttaaagctaaggtagcacttgctgcgattaaagcagaaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaaaccaaattattgactggaaaaacactc gatctaaaaaaactacatggggcggttcaaccacaaagtaa ttgatctcagcttcctcgcaagctttcgatcaacaaagttaa ttgatctaagaaactgggcgcgttcaaccacaaagttaa ttgatctaagaaactggggcgcttcaaccacaaagttaa ttgatctaagaaactggggcgcttcaaccacaaagttaa ttgatctaagaaactggggcgcttcaaccacaaagttaa ttgatctaagaaactgggcgcttcaaccacaaagttaa ttgatctaaggaagtggagcagcattagaaattgatttttagaa ggtgtgttgaagaactgggcgcttcaaccacaaagttaa	Transposasa IS911
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataattcatacacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttgctaaaaattacacctaagtatt cacttataatgaatttaataaaaataactaaagctacaacgaaaatcaaaatttcagta tgtttagaagagatggatccgtaaatttgaacaactcctataagtgatattctgctcctc aaatgatgttataaacatcaatatatggagtagtttgatgtcacaagaagaaaat cattcaaatgattttaaagctaaggtagcacttgctgcgattaaagcagaaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaaagcaaaattatgacacaccaa ttgatccagcttcctcgcaagctttcgatcaacaaagttaa tgatctaaaaaaacacaatgggcggtgagagcaggaaaatcaaa ttgatctaagaaaactacatggggcgcttcaaccacaaagttaa ttcagtatctaagcaagtaggcgtgtgagttgatgttattatggcacgtggtgttatacacaccaca aatgatgttgaggtgcaaaatcggtgagcaggcattagaaattgatttttagaa ggtgtgttgaagaaactgggcgcttcaaccacaaagttaa ttcagtatctaagcaagctaggcggtgaagtccggtgtgttattactaccgcc caaaacctgtgggtgcatcagatctgaagctgagcaggaagtcacactcact	Transposasa - IS911
ctggcttttttattttctaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgttccacgttgatctgcgtcatagt gaattttattaattagtctagatatacaaattgaaataatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaattcttgctaaaaattacacctaagtatt cacttataatgaatttaataaaaataactaaagctacaacgaaaatcaaaattttcagta tgtttagaagagatggatccgtaaattggagtatttatggcacgtagaccaagaagaaat cattcaaatgatttaaagctaaggtagcacttgctgcgattaaagcagaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaagcaaattattgacacaccaa tgatccagcttcctcgcaagcttcgatcaaaccaaattattgacagaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaagttaa tgatccagcttcctcgcaagcttcgatgaccaagaaatcaa ttgatctcagcttcctcgcaagcttcgatgaccaagaattattgacaccaccacc gatctaaaaaaactacatgcaaaatcggtgagcaggcattagaaattgatttttagaa gtggtgttgaagaaactgggccgcttcaaccaaaagttaa ttcagtatctaagcaagctaggtggtgtgtattatactatcgcc caaaacctgtgagtgcatcagatcgagctgattgatgtattgatgattatcatatgcc aattactaagcaagctaagct	Transposasa - IS911
ctggcttttttaattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaatttattaattagtctagatatacaaattgaaatatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttgctaaaaattacacctaagtatt cacttataatgaatttaataaaaataactaaagctacaacgaaaatcaaaattttcagta tgtttagaagagatggatccgtaaattggagtatttatggcacgtagaccaagaagaaat cattcaaatgatttaaaagtaggtagcacttgctgcgattaaagcagaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgtcatcaacaaagttaattggaaaaacacctc gatctaaaaaactacatgaagttggagcaggcattagaaattgatttttagaa gtgctaaaaactacatggacgtcgtaaattggaggagtatttttagacaggaaaaacacct gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaagctccaacagaaccacccatc gatctaaaaaaactacatggacgtgtgagagggagtattgatgatttttagaa ggtgtgttgaagaaactgggccgcttcaaccacaaagttaatcgacgtagattacattcaga attcagtatctaagcaagctgcgagcggaggaggattagaattgatttttagaa ggtgtgttgaagaactgggcgcttcaaccacaaagttaatcgacgactaattcaacatagca aataccttttgcaggcagtcgtagatcgaggaggattagaattgattacatatgc aataccttttgcagcagtcgtagatcgaggagagga	Transposasa IS911 Transposasa
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgtttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaatttattaattagtctagatatacaaattgaaataatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttgctaaaaattacaactaagtatt cacttataatgaatttaataaaaataactaaagctacaacgaaaatcaaaatttcagta tgtttagaagagatggatccgtaaattgagtatttatggcacgtagaccaagaagaaa cattcaaatgatttaaaaaataactaaagctacaacgaaaatcaaaatttcagta tgtttagaaggagtggatcgtaagttgagaccattgctgcgattaaagcagaaaaacactt gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaaggtaaaacaccatt gctgaattgagtgctgagtttgatgttcatcaaaaggtagaaaaacacctt gatctaaaaaaactacatggagcagtggagcaggcattagaagaccacccatc gatctaaaaaaactacatggagcagtgagaccaaggagaaattacaattattgac ttcagtatctaagcaagctgcgaaggtggagcaggcattagaaattgatttttagaa gtgtgttgaagaactgggcgcttcaaccaaaagttaa ttgatcctaggtgctgagttgatgtgagagcaggaaaattacaattga tttcagtatctaagcaagctagtgagcaggattgattgat	Transposasa IS911 Transposasa
ctggcttttttattttctaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgttccaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaatttattaattagtctagatatacaaattgaaataatttcataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaatttctttgctaaaaattacacctaagtatt cacttataatgaattaataaaataa	Transposasa IS911 Transposasa
ctggcttttttattttctaaaggttgtttttagtctaagtttcttttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagttgatgcttttcaaatgttccaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaatttattaattagtctagatatacaaattgaaataattccataaacaagaattgcga gtgctaaaaacatccccgcaaaaactgtaattctttgctaaaaattacacctaagtatt cacttataatgaattaataaaataa	Transposasa IS911 Transposasa
ctggcttttttattttctaaaaggttgtttttagtctaagtttctttaatgatgattt tgtatttattatggtcacgctttccacgttgccctgaaaaatatattcctgaagtagata cattgtctgaattaatcaaaacaaatggtaaattttgtttcgctagagtgatataagctt caacacaatcttttaactcattgtttttttgatcttttggcaagtcagctacgataaagc caacattaagtgatgcttttcaaatgttcaatagcttcacgttgatctgcgtcatagt gaatttaattagtctagatatacaaattgaaatattcataaacaagaattgcga gtgctaaaacatccccgcaaaactgtaatttctttgctaaaaattcaactaagtatt cacttaatagaattaataaaataa	Transposasa IS911 Transposasa

tagataatgtgatggttgaacgattatggcggagcgttaaatatgaagaggtgtatctca aagcttatagcagtgtcacagatgcgaaaaagcaattaagtgcatattttgagttttata atttgaaacgacctcattcgagtctagacaaaatgacaccaaatgagttttactatgatc agctaccccaacaaaacaa	aphA6
aaacttgaagtgcgacataaaccactaattaatttaaagggtttatggagtatataaaa ttgtcataccatcatcttaactttgaagatcgtactgcattaatgcttgagtcaagaaaa gaaggcttttcagccagaaaattgctgaactcattaaaggcatctat cgtgagcttaaaagaaatagcatcaatgacgtttatcaagctcgatatgcttctgataac accttcgctagacgtagacgtggtcacagaaaactcaaaatcgattcaatcctctggaaa tttattgttg <mark>aagcgatccgttgtttatgg</mark> tctcctcagcaaatagcaaagcgtttaaag acatttcctgatttggatcaaacaatgaatgtaagccatacaacgatttattcaacgata cgagcattaccaaagggtgagttgaaaaaagacttattatcctgtctacgtcatgaaaat aaaaagcgaaaagctaacggtgaacctaaaaaaggattcaattacaggatattaaaact attcatgaggcgccagccgaagttcaagaaagaaaaataccgggtcattgggaagctgat ttaattaaaggtaaagacaataaaagttcgatagcaacacttattgaacgaaatacacgg ctctgtatcttggcaacattacctgatgcaaaggcagaatcagtggccaaggctttaact gaagctctgaaatattacctgaagaaggagattagatgaagtgatattattctgtgac cc <mark>acattcacctggcaaaag</mark> gcacatgcgaaaatatgaatgtaatttctgtgac ttactaaagggatgatttaaatccgagaagtttagatgtaatttctgtgac ccacattacctgagaaggcagaataggagattagatgtaatttctgtgac ttactaaagggatgatttaaatccgagaagttagatgtaatttctgtgac cccacattacctgagaacatgcgaaatatgaatggtttaattaggcaatat ttactaaagggattgatttaaatcaggcagattagatgttaatttctgtgac ccacattcacctggcaaaaggcgtagattgactagatgttaattaggcaatat ttacctaaagggattgatttaaatcaggcagatcagcatattaaaagttgccatg tcactgaatactcgtcctagaaaggcgttagattggcttacccattagagaaattgccatg	- ISAba125
atatttttgctacagtgaaccaaattaagatcatctatttactaggcctggattggg ggttttaatgctgaataaaaggaaaacttgatggaattgccaatattatgcaccggt cgcgaagctgagcaccgcattagccgctgcattgatgctgagcgggtgcatgcccggtga aatccgcccgacgattggccagcaaatggaaactggcgaccaac <mark>ggttggcgatcggtg</mark> <b>ftte</b> cgccagctcgcaccgaatgtctggcagcacacttcctatctcgacatgccgggtt cggggcagtcgcttccaacggtttgatcgtcagggatggcggcgcggtgctggtggtggat accgcctggaccgatgaccagaccgcccagatcctcaactggatcaagcaggagatcaa cctgccggtcgcgcggggggtggtgcactcacgcgcatcaggacaagatggcggtggtggtgg accagcaaccggcccaactttggccgccacagttctccaactggatcaagcaggtggt accagcaaccggcccaactttggccgctcaaggtatttagccaatgcggtggtgg accagcaaccggcccaactttggccgctcaaggtatttagccaatgcggtggtggtg accagcaaccggcccaactttggccgctcaaggtatttagccaatgcgtggtggtg cgcgtcaatatcaccgttgggatcgaccgacaccgacatcgcttttggtggcgcaccac cagtgacaatatcaccgttggggcgtccgcaatccggtgatggtgatggtggtggtggtgcgatccaaggccaact cgcggccgcgcgggtgtggtgcgcgcccaactcggtgatggaccaactgggccgacaccg cgcgtcagcgcgcggtttggtgcggcgttccccaaggccagcatggccgacaactacgc cgcgtcagcgcgcggtttggtgcggcgttccccaaggccagcatggccgacaactacgc cgcgtcagcgcgcggtttggtgcggcgttccccaaggccagcatggccgacaagccggc cgcgtcagcgcgcgcgcgcgcaatcactcatacggccgcatggccgacaagctgcg ctgagccatggctgaccacgtcaccccaatctgccatcgcgcatggccgacagcagcggcggttgcacgacagc	bla <sub>NDM-1</sub>
ggcgttttatgcgaagctgggctttgcgacgagttggaaggatcgcggctggatgatcct gcagcgcggcggtttgcagctcgaattcttcccctatcctgacctcgacccagctacgag ctcgttcggctgttgcctgcggttggatgatctcgatgccatggtggcattggtgaacgc	Proteina de - resistencia a bleomicina

ggcgggagccgaggaaaaaagcaccggctggccgcgcttcaaagctccgcaactggaggc gagcggcctgaggatcggctacctgatcgatcccgactgcacgctggtgcggctgatcca gaaccccgactgaccgcatgcccgcgaaaatcaagatttgcgggatcagcacacccgagg cgctcgatgcgaccatcgcggcgggggggactatgccgggttggtgttctatccagcgt  ${\tt cgccccgtgcggttacgtcgaatgtcgcgggcgctttgacatcgcgcgcagctggccaga$ tcgccatggtcggtttgttcgtcgatgcggatgatgctgtcatcgccgacgcactggtgg cagccaagctgaacgcgctgcagctgcacggttcggaatcgcccgaacgcgtggcccagt tgcgcgcgcggtttggcaagccggtgtggaaggcgctgcccgtcgccagcgccagcgatg tcgcacgccgccgccagcctatgccggggcggcggacttgatcttgttcgacgccaagaccc ccaaaggcgcgctgcccggcggcatggggttggcgttcgactggtcgctgctggccggat atcgcggtgccttgccgtgggggctggcaggcgggctaaatccgacgaatgttgccgagg cgattgcgcgcaccggagcgccgctggtcgatacctccagcggcgtcgaaagcgcgccgg gcgtcaaggataccgacaagattaccaatttcgcctttgcggtgcgcttggcctaaatcg cgtcgatcaataggcgtcgttcagcgcaaagatcggcttgcgggtgcgccactgccctcgggtgaagtcgggaaaatct<mark>aacgtgcgattgccctcagcaatcgattgttccgacagagg</mark> cgtgatcgcgctccaggccagcgcgtcgtaaatgtcgattggcatcggggccttggcctt cagegeetegacaaaagegtggateaegaaceagteeateeegeeatgeeeggeeeetge cgccagatcggcgtagcgtttccatagcgggtgatcgtatttcgcaaaccagccctcggc catccacagcccctcggtgccttgcacccgaaagccgagagaataggggcgcggcagcga  ${\tt ggtgtcgtggcacagcatgatcgtttcaccattagtgcagccgatcatggtgttgaccac$  ${\tt atcacccagtgcgaatttcacctcggcgttgggatgatcggcagagccgttcttgacgac$ ataatcatgcagcccgcgcgccttacagccgaagccgccagcgcccgcttcgcccggcaa cgcgaccttcagggtgcgggtctgcggcgggtagcacacgccggcatcggcgcagccctg gtacttcacggtcagggtggtcgcgctcgccggccgggcgtgccggtgagggtgcc  ${\tt gag}$  caatteettgeggtaggtttegaegtegeegaagaattegtegeggtaggeettgee cttcggcagcgccatggtcgcgccggtgaaggcggcatcggccttgaccgaggtgcggtg ccggtacaggtaatagccgtcggcgatccgccagcgcacctcgatgcggtccggcgcggt ggcctgcgcggacaggacgaagacctcgtcgaccggcggcagttcgaagtcctgggcgac ggtattcgggcaggccggacgcggcttcgaccgcgagcagctccgggagttcgtagggat gcagttggcgcaggcgttcctgcagggcggggtaggcctcggcactggtcttgaccagca gcaggacctcggccgcggcctcgaccttgcgttgccagcgatagaccgaacgcaggccgg gcaggaggttgacgcaggcggccaggcgctcggccaccagcgcggtggcgatgcgctcgg cgctgtcggcgtcgggacaggtgcagaagcagatcagggcgctcaccggcatagggtagg cggctgccccgatccggcgggcctggcggacatccgcgtgcggcccttgaaagtcggcgg <mark>gcccgccccat</mark>ctcggtggcatgccgggttcgcccggttctgttgtccgcggtttggcac gttgccatgtccaatatcaagccgctgcacgaccgcgtggtcatcaagcgcatggaagaa gagaagctgtccgccggcgggatcgtgatcccggattcggccaccgagaagccgatcaag caggtcaaggtcggcgacaaggtgctgttcggcaagtacagcggcaccgaagtgaagctg gacggcgtcgagctgctggtggtgaaggaagacgacctgttcgcgatcctcggctgatcg cgcgtcgctcccacacatttctcatccgaataatttttcgaggtaattcgcaatggctgc caaggacattcgtttcggcgaagacgcgcgctccaagatggtgcgcggcgtcaacgtgct cgccaacgccgtgaaggcgaccctcggcccgaagggccgcaacgtcgtgctgcagaagag ctacggcgcgccgaccatcaccaaggacggcgtctccgtcgccaaggaaatcgaact <mark>tga</mark>cgcgttcgagaacatgggcgcgcagatggtgaaggaagtcgcttccaagacctccga caacgccggcgacggcaccaccgccaccgtgctggcgcaggcgttcatccgcgaggg catgaaggcggtcgccggcatgaacccgatggacctgaagcgcggcatcgaccaggc ggtgaaggccgcggtcggcgaactgaagtcgctgtccaagccgtcgtcgaccagcaagga aatcgcccaggtcggcgcgatctccgcgaactcggatgccaacatcggcgacctgat gcaggcgatggacaaggtcggcaaggaaggcgtgatcacggtcgaggaaggcagcgg ggacaacgaactcgacgtggtcgagggcatgcagttcgaccgcggctacctgagcccgta cttcgtcaacaaccagcagtcgatgtcggccgacctggatgatcccttcatcctgctgta cgacaagaagatctccaacgtgcgcgacctgctgcccgtcctcgagggcgtggccaaggc

Trp F (phosphoribosyl Anthranilate isomerase)

Tat twin-arginine translocation pathway signal sequence domain protein

Periplasmic divalent cation tolerance protein

GroS

cggcaagccgctgctgatcgtggcggaggaagtcgaaggcgaagcgctggcgaccctggt
<mark>ggtcaacaccatccgcggcatcgtcaaggtctgcgcggtgaaggccccgggcttcggcga</mark>
<pre>ccgtcgcaaggcgatgctggaagacatggcgatcctgaccggcggcgtggtgatttccga</pre>
ggaagtcggcctgtcgctggagaaggccaccatcaaggacctcggccgcgccaagaaga <mark>t</mark>
<pre>ccaggtgtcgaaggaaaacaccatcatcgatggcgccggcgaaggcgcgggcatcga</pre>
ggcgcgcatcaagcagatcaaggcgcagatcgaggagacctcctccgactacgaccgcga
gaagctgcaggagcgcgtggccaagctggccggcggcgttgcggtgatcaaggtcggtgc
cgccaccgaagtcgagatgaaggaaaagaaggcgcgcgtcgaagacgccctgcacgcgac
<pre>ccgtgcggccgtcgaggaaggcatcgtcccgggcggcggcgtcgccctgatccgtgccaa</pre>
ggcggcgatcgccggcatcaagggcgtgaacgaagaccagaaccacggcatccagatcgc
cctgcgcgcgatggaagccccgctgcgcgagatcgtgaccaatgccggcgatgagccgtc
ggtcatcctcaaccgcgtggtcgaaggttcgggtgcgttcggctacaacgccgccaacgg
cgagttcggcgacatgatcgagttcggcatcctggacccgaccaaggtcacccgcaccgc
gctgcagaacgccgcgtcgatcgcgggcctgatgatcaccaccgaagcgatggtggccga
ggccccgaagaaggacgagccggcgatgccggccggcggcatgggcggcatgggcgg
catggatttctaagccccgcgatccatcaagcaagaccacaaagcccggcctcgtgccgg
gctttgtgcgttctggcgtccgaggcgggagacttcctacccgccccgcggcaatgtctg
acgcgaagatcagaaaacgccgatatgaacgcgtgctcgcgggcgcaaccctgagcagcc
gtccctgcaacggagcgctgcgtgccgcgcctgaccgcacc

GroEL