



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN CEPAS DE
*Haemophilus influenzae***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
CON OPCIÓN EN: **MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA

Q.F.B. MARTHA ANDREA MONDRAGÓN SALINAS

ASESOR DE TESIS
D.C ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

PUEBLA, PUE.

ENERO 2015

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mi familia por ser el pilar más fuerte en mi vida, porque sin ella no lo hubiera logrado. A mi padre por el ejemplo de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor. A mi madre por ser mi amiga, por su confianza y apoyo, por demostrarme su amor corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos. A mis hermanos: Anita y Manolo por ser un ejemplo a seguir, por estar siempre presentes brindándome su apoyo y aliento, quienes con sus muestras de cariño me han motivado a seguir adelante. A mi novio Ernesto quien siempre me alentó a continuar y a no rendirme, gracias por toda tu paciencia y amor. A Yessi por todo tu apoyo y confianza. A mis sobrinos Yael y Regina que son una inspiración para mí.

También quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi asesora de tesis y mi guía Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia durante el desarrollo de la Maestría, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella, por haber tenido la paciencia necesaria para ayudarme, por transmitirme su conocimiento y por ser demasiado accesible en todo momento, así como sus palabras de aliento y motivación para seguir adelante.

Un agradecimiento especial a la Dra. Patricia Lozano Zaráin, por su grata colaboración, por su apoyo y valiosos consejos sobre este trabajo. También deseo agradecer al Dr. Ignacio Martínez y Dr. Miguel Castañeda por su orientación durante el desarrollo de mi trabajo. Gracias por hacerme crecer como profesionalista.

Al Dr. Alejandro Carabarán por su inmenso apoyo, tiempo, orientación y amistad brindada durante el último año de la maestría. A la M.C. Carolina Gareste por cada palabra de motivación hacia mi persona, por apoyarme a todo momento y sobre todo por su confianza, gracias Caro por permitirme conocerte. Al M.C Gerardo

Cortes por ser un gran compañero, por estar siempre dispuesto a ayudarme, así como brindarme tu tiempo y amistad. Gracias Ale, Caro y Gerardo, sin su apoyo no hubiera sido igual. También quiero agradecer a Tania por ser mi amiga, por ayudarme y darme tantas palabras de aliento cuando las necesite, gracias por hacer de este laboratorio un lugar de música, risas y alegrías. A Elena por ser tan buena compañera, siempre dispuesta a ayudar y colaborar, gracias por tus consejos. A mis demás compañeros de laboratorio, Migue, Tatiana, Aime y Claudia por hacer de nuestro lugar de trabajo un lugar más ameno y lleno de compañerismo. En general a todos en el laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad por compartir conmigo sus vidas y experiencias tan agradables.

Al Dr. Abraham Medrano López y M. C. Cristina Lara Ochoa por sus consejos, tiempo y orientación brindada durante el desarrollo de este proyecto, gracias por estar al pendiente de mi proyecto siempre, así como al Centro de Detección Biomolecular de la BUAP por permitirme utilizar sus instalaciones y equipo para facilitarme el desarrollo de este trabajo.

A CONACYT por la beca que me proporciono, porque gracias a ello, fue posible mis estancia en este proyecto de investigación. Al CICM-BUAP por la oportunidad de seguir adelante en mi formación y por el gran apoyo brindado durante este tiempo.

INDICE

I.	INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	I
	LISTA DE ABREVIATURAS	III
	RESUMEN	1
1.	INTRODUCCIÓN	2
1.1.	<i>Haemophilus influenzae</i>	2
1.1.1.	Características generales.....	2
1.1.2.	Clasificación	2
1.1.3.	Patogénesis	3
1.2.	RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	3
1.3.	MECANISMOS DE RESISTENCIA EN <i>H. influenzae</i>	4
1.3.1.	Gen <i>bla</i> _{TEM}	6
1.3.2.	Proteína de unión a penicilina tipo 3 (PBP-3).....	8
2.	ANTECEDENTES	12
3.	JUSTIFICACIÓN	16
4.	OBJETIVOS	17
5.	DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.....	18
6.	MATERIAL Y METODOS	19
6.1.	Material biológico.....	19
6.2.	Cultivo de cepas	20
6.3.	Almacenamiento	20
6.4.	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	20
6.5.	Pruebas moleculares para determinar la presencia de los genes <i>bla</i> _{TEM} y <i>ftsI</i> en cepas de <i>H. influenzae</i>	21
6.5.1.	Obtención del templado	21
6.5.2.	Condiciones para PCR	22
6.5.3.	Visualización del amplificado de PCR	23

6.5.4.	Amplificación por PCR del gen <i>bla</i> _{TEM}	23
6.5.5.	Amplificación por PCR del gen <i>ftsI</i> para las cepas de <i>H. influenzae</i> BLPACR.	24
6.6.	Secuenciación de los productos de PCR	24
6.7.	Análisis de las secuencias	25
6.8.	Evaluación de la expresión del gen <i>bla</i> _{TEM} mediante PCR-Tiempo Real.	25
6.8.1.	Aislamiento de ARN y síntesis de cADN	26
6.8.2.	qRT-PCR en tiempo real	27
7.	RESULTADOS	29
7.1.	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	29
7.3.	Secuenciación del gen <i>bla</i> _{TEM}	33
7.4.	Amplificación del gen <i>ftsI</i> por PCR	36
7.5.	Secuenciación del gen <i>ftsI</i>	38
7.6.	Análisis de los niveles de expresión del gen <i>bla</i> _{TEM} en las cepas de <i>H. influenzae</i> . ---	42
8.	DISCUSIÓN	48
9.	CONCLUSIONES	57
10.	PERSPECTIVAS	58
11.	BIBLIOGRAFÍA	59
12.	ANEXOS	67

I. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Sustituciones aminoacídicas en el gen <i>ftsI</i> de <i>Haemophilus influenzae</i>	10
Tabla 2. CMI de β -lactámicos frente a cepas de <i>Haemophilus spp.</i> según mecanismo de resistencia.....	11
Tabla 3. Cepas de <i>H. influenzae</i> utilizadas en este estudio.....	19
Tabla 4. Antibióticos β - lactámicos utilizados para la determinación de la CMI.....	21
Tabla 5. Componentes y cantidades empleadas en cada PCR.....	22
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes <i>bla_{TEM}</i> y <i>ftsI</i>	23
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para PCR tiempo real.	27
Tabla 8. Valores de CMI hacia antimicrobianos β -lactámicos.....	30
Tabla 9. Secuencias consenso -35 y -10 con los promotores descritos para el gen <i>bla_{TEM}</i>	50
Tabla 10. Preparación del stock de antibióticos para la determinación de la CMI por dilución en placa.....	70
Figura 1. Mecanismo de acción de antibióticos β -lactámicos.....	5
Figura 2. Variantes del promotor P3 del gen <i>bla_{TEM}</i>	8
Figura 3. Esquema de los fragmentos generados por PCR usando los tres pares de oligonucleótidos para el gen <i>bla_{TEM}</i>	32
Figura 4. Corrimiento electroforético de los amplificadores del gen <i>bla_{TEM}</i> en las cepas seleccionadas	33
Figura 5. Alineamiento nucleotídico de la región promotora del gen <i>bla_{TEM}</i> de las cepas estudiadas con la secuencia ICEHin1056 de <i>Haemophilus influenzae</i> (GeneBank: NC_011499)	35
Figura 6. Alineamiento nucleotídico de la región codificante del gen <i>bla_{TEM}</i> con la secuencia del plásmido ICEHin1056 de <i>Haemophilus influenzae</i> (GenBank NC_011409.1).....	35

Figura 7. Alineamiento entre residuos de aminoácidos del gen <i>bla</i> _{TEM} con la secuencia del plásmido de <i>Haemophilus influenzae</i> ICEHin1056 con el número de secuencia YP_002291.....	36
Figura 8. Fragmentos generados para el análisis del gen <i>ftsI</i> con tres pares de oligonucleótidos	36
Figura 9. Corrimiento electroforético de los amplificadores del gen <i>ftsI</i> en las cepas seleccionadas	37
Figura 10. Alineamiento nucleotídico del gen <i>ftsI</i> con la secuencia del GenBank NP_439290.1 de la cepa RdkW20 de <i>Haemophilus influenzae</i>	38
Figura 11. Alineamiento aminoacídico con la PBP-3 de la secuencia del GenBank NP_439290.1 de la cepa RdkW20.....	41
Figura 12. Comparación de la expresión relativa del gen <i>bla</i> _{TEM} a partir de los promotores P3, Pdel y Pa/Pb.....	44
Figura 13. Comparación de la expresión relativa del gen <i>bla</i> _{TEM} en presencia de ampicilina a partir de los promotores P3, Pdel y Pa/Pb.....	45
Figura 14. Influencia de la ampicilina sobre la expresión del gen <i>bla</i> _{TEM} en cada cepa para los tres promotores.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ala	Alanina
AMC	Amoxicilina/Acido clavulánico
AMP	Ampicilina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (siglas en inglés)
ATM	Aztreonam
BET	Bromuro de Etidio
BHI	Medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón
BLAST	Herramienta Básica de Búsqueda para Alineamientos Locales
BLEE	Betalactamasa de Espectro Extendido
BLNAR	β -lactamasa Negativa Ampicilina Resistente
BLPAR	β -lactamasa Positiva Ampicilina Resistente
BLPACR	β -lactamasa Positiva Ácido Clavulánico Resistente
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
°C	Grados Celsius
CAZ	Ceftazidima
CEC	Cefaclor
CF	Cefalotina
CFM	Cefixime
CICM	Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
CLSI	Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínicos (Siglas en inglés)
ClustalW	Programa para el alineamiento de secuencias nucleotídicas
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
Col.	Colaboradores
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxime
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
<i>et al.</i> ,	Y colaboradores
FEP	Cefepime

G	Gramo
H	Hora
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
I	Sensibilidad intermedia
Kb	Kilobases
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
L	Litro
µg	Microgramo
µl	Microlitro
M	Molar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
MH	Müller Hinton
min	Minuto
mM	Milimolar
mm	Milímetro
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
qRT-PCR	Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR
R	Resistente
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sensible
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SXT	Trimetoprim/sulfametoxazol
Tn	Transposón
Tnp	Transposasa
Tris	Tris (Hidroximetil) aminometano

RESUMEN

Haemophilus influenzae causa meningitis e infecciones agudas en el tracto respiratorio y en la piel, el tratamiento más común son los antibióticos β -lactámicos; sin embargo, también es frecuente que las cepas de *H. influenzae* sean resistentes a estos antimicrobianos mediante dos mecanismos: la producción de enzimas β -lactamasas de tipo TEM-1 dando el fenotipo de cepas β -lactamasa positiva ampicilina resistente (BLPAR) y la síntesis de la proteína de unión a penicilina tipo 3 con sustituciones aminoacídicas, dando el fenotipo β -lactamasa negativa ampicilina resistente (BLNAR). Cuando se presentan los dos mecanismos, se origina un tercer fenotipo llamado β -lactamasa positiva, ácido clavulánico resistente (BLPACR). En el gen bla_{TEM} , se han reportado cambios en la región reguladora que originan la existencia de tres diferentes promotores: P3, Pdel y Pa/Pb que podrían tener mayor o menor afinidad por la ARN polimerasa; sin embargo, hasta este momento no se ha comprobado cuál de estos promotores es el más fuerte.

En este trabajo, se determinó la susceptibilidad por concentración mínima inhibitoria (CMI) hacia algunos antibióticos β -lactámicos de un grupo de cepas de *H. influenzae* productoras de β -lactamasa; se identificó el gen bla_{TEM} , se buscaron las cajas promotoras y se evaluó la expresión del gen bla_{TEM} bajo dos condiciones de cultivo, en medio con ampicilina y sin ella. Se encontró que todas las cepas seleccionadas fueron resistentes a ampicilina (entre 4 y 128 $\mu\text{g/ml}$); a pesar de que todas las cepas fueron productoras de β -lactamasa TEM-1, tuvieron diferentes perfiles de susceptibilidad observando que algunas cepas como la BUAPNan (Pdel) y BUAP172178 (Pa/Pb) tuvieron susceptibilidad disminuida hacia cefalosporinas de 3ra y 4ta generación y además resultaron resistentes a la amoxicilina/ácido clavulánico (32/16 y 16/8 $\mu\text{g/ml}$), mientras que otras cepas como la BUAP28 (Pdel) solo fue resistente a ampicilina. Mediante ensayos de qRT-PCR en tiempo real, se evaluó la expresión relativa del gen bla_{TEM} en las cepas ATCC 33930 (P3), BUAPNan, BUAP28 y en la BUAP172178 observando que la presencia de los promotores Pdel y Pa/Pb incrementan la expresión del gen bla_{TEM} y que la ampicilina induce la expresión del mismo gen en algunas de las cepas estudiadas con los promotores P3 y Pa/Pb.

Por otro lado, el gen *ftsI* que codifica la PBP-3 se amplificó por PCR y se identificaron mutaciones en la proteína, encontrando sustituciones en aminoácidos en la región amino terminal de las cepas BUAP 172178, BUAPNan y ATCC 33930; además, la cepa BUAP172178 presentó múltiples sustituciones en el extremo carboxilo terminal correspondiente a la parte catalítica de la proteína.

En conclusión, la expresión del gen bla_{TEM} a partir de los promotores Pa/Pb o Pdel en las cepas BLPAR puede ser el mecanismo responsable del incremento en los valores de la CMI hacia ampicilina y amoxicilina, que también se ve favorecida por la ampicilina, la cual promueve la sobreexpresión del gen. Además, en las cepas BLPACR, la presencia de mutaciones en el dominio catalítico de la PBP-3, pueden ser la causa de la resistencia a la amoxicilina/ ácido clavulánico y la disminución de la susceptibilidad a cefalosporinas de 3ra y 4ta generación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Haemophilus influenzae*

1.1.1. Características generales

Es un coco-bacilo Gram negativo inmóvil no esporulado, pleomórfico con un tamaño menor de 1 μm de ancho y 0.5-2 μm de largo. Es un microorganismo quimiorganotrófico, reduce nitratos a nitritos, oxidasa y catalasa positivos, además tiene la capacidad metabólica de fermentar carbohidratos como: glucosa, xilosa y ribosa, no produce gas, produce ureasa y triptofanasa. El crecimiento óptimo se alcanza de 18 a 24 horas a una temperatura entre 35-36 °C, a un pH de 7.4-7.8 y en atmosfera con concentraciones de CO_2 entre 5-10%. Se le considera un germen “fastidioso” pues para su crecimiento requiere la adición de factores presentes en la sangre como la protoporfirina IX o hemina denominada factor X que la bacteria utiliza en la síntesis de catalasa, peroxidasa y en el sistema de transporte en los citocromos. Otro factor de crecimiento es el factor V o NAD siendo una coenzima termolábil de la piridina, una de las principales enzimas de óxido reducción del metabolismo celular.

1.1.2. Clasificación

H. influenzae se clasifica en 8 biotipos basados en tres reacciones bioquímicas: producción de indol, descarboxilación de ornitina y actividad de la ureasa; esta caracterización tiene utilidad epidemiológica, ya que se ha demostrado que el biotipo de una cepa está relacionado con la fuente de aislamiento. Por otro lado, la presencia de una cápsula permite la serotipificación con base en la composición química del polisacárido específico capsular, por lo que existen 6 serotipos

denominados con las letras a, b, c, d, e, f. Cuando los aislamientos no pueden serotipificarse se les denomina cepas no tipificables (NT) (Rodríguez *et al.*, 2010).

1.1.3. Patogénesis

H. influenzae es un parásito obligado de la mucosa de humanos, causante de infecciones de tracto respiratorio superior e inferior, tanto en adultos como en niños.

Las cepas capsuladas del serogrupo b y otros serogrupos causan enfermedades invasivas en niños como meningitis y epiglotitis aguda, celulitis, osteomielitis, artritis y neumonía. Mientras que la colonización con cepas no capsuladas es más frecuente y se encuentran asociadas a otitis media, bronquitis y sinusitis, tanto en niños como adultos.

Los antibióticos β -lactámicos en específico la ampicilina y la amoxicilina en combinación con inhibidores de β -lactamasas como sulbactam y ácido clavulánico son el tratamiento de primera mano para las infecciones causadas por *H. influenzae*. También es frecuente utilizar cefalosporinas como cefuroxima, cefaclor, cefotaxima y ceftriaxona que son cefalosporinas de segunda y tercera generación.

1.2. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

La gran capacidad de adaptación que presentan las bacterias para evadir los mecanismos de acción de los antimicrobianos, junto con el uso inadecuado y poco controlado de la terapia antimicrobiana ha dado como consecuencia la aparición, propagación y persistencia de microorganismos resistentes, por lo que

se dice que la resistencia antimicrobiana se ha vuelto un problema de Salud Pública a nivel mundial, no solo porque se prolonga la duración de una infección, sino también porque se encarece la asistencia médica.

En general, son cuatro los mecanismos principales de resistencia a antimicrobianos:

- 1.- Modificación del sitio blanco de acción del fármaco en la célula.
- 2.- Cambio en la permeabilidad de la célula para el antibiótico.
- 3.- Activación de bombas que expelen al fármaco de la célula.
- 4.- La producción de enzimas u otros componentes que desnaturalizan o inactivan el antibiótico.

Las bacterias pueden presentar uno o más mecanismos de resistencia que pueden ser adquiridos a través de la transferencia de elementos genéticos móviles como plásmidos, o transposones hacia células susceptibles desde bacterias resistentes o bien, por mutaciones en genes cromosomales.

1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *H. influenzae*.

El mecanismo de acción de los β -lactámicos está relacionado con la unión covalente a las proteínas de unión a penicilina denominadas PBP que se encuentran en la membrana citoplasmática y que participan en la síntesis del peptidoglicano que forma la pared celular; en específico los β -lactámicos inhiben irreversiblemente la transpeptidación por acilación de las PBP, con lo cual la pared celular se debilita lo suficiente como para favorecer la lisis osmótica de la célula bacteriana (Pascuzzo *et al.*, 2008).

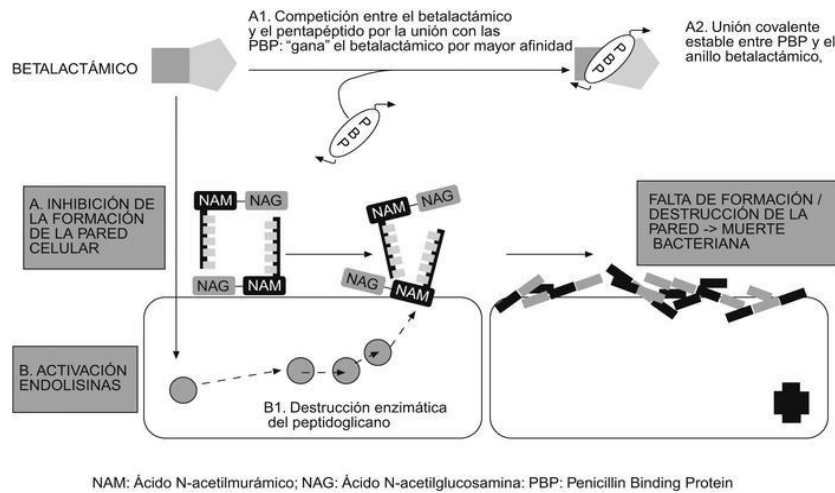


Figura 1. Mecanismo de acción de antibióticos β -lactámicos. (Suárez & Gudiol, 2009)

La efectividad del tratamiento que se emplea en niños y en adultos se ve afectado por la resistencia a antibióticos β -lactámicos, por lo cual esto se ha convertido en un gran problema de Salud Pública (Dabernat *et al.*, 2002). Son dos los mecanismos principales en *H. influenzae* que le otorgan resistencia a los antibióticos β -lactámicos: la producción de enzimas llamadas β -lactamasas tipo TEM-1 y con menor frecuencia ROB-1, ambas enzimas se encuentran dentro del grupo 2b en la clasificación de Bush-Jacoby y Medeiros, y de clase A según la clasificación de Ambler, cuyas características son la capacidad de hidrolizar penicilinas y el ser inhibidas por el ácido clavulánico (Bush, Jacoby, & Medeiros, 1995; Ambler *et al.*, 1991). El segundo mecanismo corresponde a cambios en la proteína de unión a la penicilina (PBP) tipo 3, que se encarga de la formación del septo durante la división celular. Las sustituciones aminoacídicas en la PBP-3 son muy importantes para expresar el fenotipo de resistencia (Kaczmarek *et al.*, 2004). Se ha descrito que los cambios dentro de la PBP-3 se encuentran en tres dominios conservados KTG, SSN y STVK dentro de la región catalítica (Barbosa *et al.*, 2011; Skaare *et al.*, 2010).

Para facilitar el trabajo, las cepas resistentes de *H. influenzae* se han clasificado en tres grupos: como BLPAR a las cepas productoras de β -lactamasa ampicilina

resistentes, como BLNAR a cepas no productoras de β -lactamasa pero que son ampicilina resistentes por modificaciones en la PBP-3 y cepas con ambos mecanismos de resistencia, denominadas de β -lactamasa positiva ácido clavulánico resistentes (BLPACR).

Las cepas con fenotipo BLPACR se han encontrado con poca predominancia y se caracterizan por tener altos niveles de resistencia a la ampicilina y amoxicilina junto a la disminución de la sensibilidad a amoxicilina- ácido clavulánico (S. Tristram, Jacobs, & Appelbaum, 2007). Hasta ahora se sugiere que la resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico podría deberse a la hiperproducción de β -lactamasas TEM-1 o la presencia de una nueva β -lactamasa, o la producción de PBP's alteradas superpuestas en la β -lactamasa TEM-1. En un estudio del 2010, se aislaron cepas con perfil BLPACR con producción de β -lactamasa TEM-1 y múltiples mutaciones en el gen *ftsI*, correspondientes a sustituciones aminoacídicas encontradas comúnmente en las cepas BLNAR (Bae *et al.*, 2010).

1.3.1. Gen *bla*_{TEM}

Las β -lactamasas rompen el enlace amida del anillo β -lactámico, previa unión al grupo carboxilo, con lo que los β -lactámicos pierden la capacidad de unirse a las PBP.

Existen dos esquemas de clasificación de las β -lactamasas, la clasificación molecular según Ambler basado en la secuencia de aminoácidos obteniendo 4 grupos de enzimas: A, C, y D las cuales poseen serina en su sitio activo para la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos y la clase B o metaloenzimas las cuales requieren iones divalentes de zinc para la hidrólisis del antibiótico; por otro lado, existe la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros basada en los perfiles de substratos e inhibición de las β -lactamasas, y su ubicación genética (codificados en plásmidos o cromosoma).

En *H. influenzae* se da con frecuencia la producción de β -lactamasa TEM-1 siendo el principal mecanismo de resistencia a la ampicilina, además está asociada a la presencia de plásmidos conjugativos específicos de este género, los cuales pueden también generar resistencia a cloranfenicol, trimetoprim, quinolonas y tetraciclinas (Farrell *et al.*, 2005; Leaves *et al.*, 2000; Roma & Canto, 2004; Snell, Perry, & Brown, 1991). Siendo así, encontramos a la β -lactamasa TEM-1 dentro del grupo 2b, que hidroliza cefalosporinas y penicilinas, y es inhibida por ácido clavulánico (Bush *et al.*, 1995).

*bla*_{TEM} es el gen que codifica a la β -lactamasa TEM, se encuentra en los transposones de resistencia bacteriana Tn1, Tn2 y Tn3 los cuales están estrechamente relacionados. Tn2 y Tn3 codifican a la misma proteína TEM pero difieren entre ellos en tres nucleótidos de su secuencia (Bailey, *et al.*, 2011). El gen *bla*_{TEM} en *H. influenzae* parece estar asociado con los promotores P3, el Pa/Pb que se forma por el solapamiento de dos cajas promotoras y la variante Pdel producida por una deleción en la región promotora, este último se asocia en algunos casos con la resistencia a cefaclor (Tristram, Hawes, & Souprounov, 2005). Aunque, la presencia del gen *bla*_{ROB} también se ha relacionado con el incremento de la CMI hacia cefaclor (Karlowsky *et al.*, 2000).

El análisis de la secuencia nucleotídica de los genes *bla*_{TEM}, codificados en plásmidos, en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (*E. coli* y *K. pneumoniae*), ha permitido observar que la expresión de esos genes es controlado por diferentes promotores, dentro de los cuales se encuentran P3, Pa/Pb y Pdel (Fre, Poirel, & Nordmann, 2002). El promotor P3 corresponde al promotor nativo del gen *bla*_{TEM}, con sus cajas correspondientes a las regiones -10 y -35 así como la posición 32 de la base citosina (C32) de acuerdo al sistema de numeración de Sutcliffe (Sutcliffe, 1978), y se asocia con la resistencia natural hacia ampicilina tanto en enterobacterias como en *H. influenzae*. El promotor Pa/Pb se caracteriza por un cambio de base de C32T que conduce al solapamiento de las regiones -35

(Promotor Pb) con la -10 (Promotor Pa), este promotor se ha asociado con un incremento hasta de 10 veces más la resistencia hacia amoxicilina en *H. influenzae*. La característica del promotor Pdel, es la deleción de 135 pb en la región reguladora y la sustitución de G162T (Figura 2), lo cual crea teóricamente un promotor más fuerte compuesto por las cajas -35 (Promotor Pa) y la -10 (Promotor P3) (S. Tristram *et al.*, 2007). La afinidad de la RNA polimerasa a cada uno de los promotores es diferente, lo cual cambia la expresión del gen *bla*_{TEM} y da lugar a diferentes niveles de resistencia a antibióticos β-lactámicos (García-Cobos, Campos, Cercenado, *et al.*, 2008^a). Sin embargo, esto no ha sido demostrado para *H. influenzae*, pues las evidencias consisten únicamente en evaluar los valores de CMI hacia los antibióticos β-lactámicos, confirmar la presencia del gen *bla*_{TEM} y determinar el promotor que posee, para asociar un grupo de cepas con resistencia incrementada hacia un β-lactámico y la presencia de un promotor en específico.



Figura 2. Variantes del promotor P3 del gen *bla*_{TEM}. Región promotora del gen *bla*_{TEM} con P3, Pa/Pb y la región de 135pb que se puede remover (Pdel). Las cajas en azul, verde y rosa representan las regiones -35 y -10 de los promotores P3, Pa/Pb y Pdel, respectivamente. En letras negras y grandes representan aquellas sustituciones ocurridas entre tipos de promotores. La región en sombra representa los 135pb (C23 a C157) deletados en el nuevo promotor (Fre *et al.*, 2002; Tristram *et al.*, 2005).

El segundo mecanismo de resistencia en *H. influenzae* no es enzimático ya que involucra la disminución de la afinidad de los antibióticos β -lactámicos por las proteínas de unión a la penicilina debido a la sustitución de aminoácidos generadas por mutaciones en el gen *ftsI* que codifica para la PBP-3. PBP-3 es una transpeptidasa necesaria para el entrecruzamiento del peptidoglicano durante la septación en la división celular (Barbosa *et al.*, 2011).

Se ha descrito que las principales mutaciones asociadas con la resistencia a los β -lactámicos se encuentran en tres dominios dentro del sitio activo de la proteína: STVK (posición 327-330), SSN (posición 379-381) y KTG (posición 512-514) (Tabla 1). En esta última región se han encontrado dos mutaciones asociadas al incremento de la resistencia a ampicilina y a cefalosporinas, sobre todo en aquellas cepas que no producen β -lactamasa. Estas mutaciones son la N526L y la R517H, la primera incrementa hasta dos veces la resistencia a ampicilina y hasta 8 veces a cefalosporinas como la cefuroxima (Osaki *et al.*, 2005). Mientras que el incremento aun mayor de la resistencia se debe a la combinación de más sustituciones en la PBP-3. De acuerdo con Ubukata *et al.*, 2001, los aislados con sustituciones R517H o N526K cerca del motivo conservado KTG son designadas dentro del grupo I y grupo II en cepas BLNAR, respectivamente, mientras que los aislados con sustituciones M377I, S385T y L389F cerca del motivo SNN en adición con N526K se encuentran en cepas del grupo II BLNAR (Ubukata *et al.*, 2001). Posteriormente, se asignó un sistema de subgrupos en donde se agregaron otras sustituciones en la PBP-3 (Dabernat *et al.*, 2002). Por otro lado, Hasegawa definió aislados con sustituciones únicamente cerca del motivo KTG como low-BLNAR y aislados con sustituciones alrededor de KTG y SSN como grow-BLNAR (Hasegawa *et al.*, 2004).

**Tabla 1. Sustituciones aminoácidas en el gen *ftsI* de *Haemophilus influenzae*.
(García-Cobos *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2011)**

Sustituciones aminoácidas																					
G R U P O	motivo STVK												motivo KTG								
	Lys 344	Ile 348	Asp 350	Thr 352	Lys 355	Leu 356	Ser 357	Met 377	Met 391	Ser 385	Ala 437	Ile 449	Ile 475	Gly 490	Ala 502	Arg 517	Ile 519	Asn 526	Ala 530	Thr 532	Val 547
	I																His				
IIa																		Lys Lys		Ser	
IIb			Asn Asn Asn				Ile Ile				Ser			Glu Glu	Val Val Val Val		Leu	Lys Lys Lys Lys Lys			
IIc			Asn												Thr Thr			Lys Lys			
IIId												Val						Lys			
III-like			Asn				Asn	Ile	Thr							His				Ser	Ile
M^a	Arg Arg	Val	Asn Asn							Ser					Leu		Thr				
			Asn Asn	Gly Gly			Thr Thr	Val Val			Ile Ile						Val Ser				Ser

^a M, miscellanea

En el fenotipo β-lactamasa Negativa Ampicilina Resistente que presenta este mecanismo, se han observado bajos niveles de resistencia a β-lactámicos y a sus combinaciones con los inhibidores cuando no está involucrado algún otro mecanismo de resistencia, como sucede con el fenotipo BLPACR el cual combina la producción de β-lactamasa con la presencia de mutaciones PBP-3 lo que lleva a tener altos niveles de resistencia a ampicilina y amoxicilina, y la disminución de la susceptibilidad al ácido clavulánico (Tabla 2).

Numerosos autores han propuesto que los puntos de corte para las cepas BLNAR deben ser cambiados para que este fenotipo de resistencia se detecte más rápido en las cepas de *H. influenzae*, algunos autores se inclinan por valores de CMI ≥ 1 mg/L para ampicilina y para cefixima CMI ≥ 0.5 mg/L, los cuales podrían ser indicativos de mutaciones en el motivo SSN (Jansen *et al*, 2006; Ubukata *et al*, 2003). Por último, valores de CMI ≥ 2 mg/L para amoxicilina con ácido clavulánico, indicaría alta probabilidad de ser cepas con fenotipo BLPACR. Diferentes grupos de investigadores analizaron la posible correlación de las mutaciones con los niveles de resistencia a los diferentes β -lactámicos, y en general coinciden en que las sustituciones de aminoácidos como Asn526Lys (N526K) o Arg517His (R517H), cerca del motivo KTG, se encuentran comúnmente en los aislados con resistencia moderada a cefotaxima (CMI 0,03 a 0,25 mg/L), y sustituciones adicionales de aminoácidos cerca del motivo SSN, como Met377Ile (M377I), Ser385Thr (S385T) y/o Leu389Phe (L389F), se encontraron con frecuencia en los aislados con mayores niveles de resistencia a cefotaxima dando lugar a valores de CMI hasta 60 veces superiores a la establecida (Mirelis & Navarro, 2011).

Tabla 2. CMI de β -lactámicos frente a cepas de *Haemophilus spp.* Según mecanismo de resistencia (Mirelis & Navarro, 2011).

CMI (mg/L) de:						
Fenotipo	Ampicilina	Amox/Clav	Cefaclor	Cefuroxima	Cefixime	Cefotaxima
Sensible (BLNAS)	0.06-0.5	0.25-1	1-4	0.006-1	0.015-0.06	0.008-0.03
BLPAR	2-64	0.25-2	1-8	0.25-2	0.015-0.12	0.008-0.03
BLNAR						
Motivo KTG	0.5-4	1-4	2-16	0.5-16	0.015-0.25	0.015-0.25
Motivo SSN	1-4	1-4	4-64	2-16	0.5-4	0.25-4
BLPACR	2-64	1-4	4-16	1-4	0.03-0.25	0.12
BLNAR +AcrAB	4-16	ND	ND	ND	ND	ND

2. ANTECEDENTES

El primer reporte de resistencia en *H. influenzae* a nivel mundial fue hacia la ampicilina en 1974. Demostrando años más adelante que la resistencia se debe a la producción de β -lactamasas mediadas por plásmidos capaces de hidrolizar e inactivar a la ampicilina. Los datos de la prevalencia de la resistencia antimicrobiana en *H. influenzae* son variables de un país a otro, inclusive dentro de un mismo país, una ciudad y hasta entre hospitales de la misma región. En estudios recientes con portadores faríngeos, los porcentajes de resistencia a ampicilina y cloranfenicol fueron variables y dependen de la población estudiada. En general la resistencia a la ampicilina se encuentra alrededor del 20% y al cloranfenicol en algunos países es nula o muy baja, mientras que la resistencia hacia macrólidos es variable debido a que *H. influenzae* es intrínsecamente resistente a este grupo de antimicrobianos (Bogdanovich *et al.*, 2006).

En un estudio realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez el porcentaje de cepas productoras de β -lactamasas fue del 22% con resistencia a diversos antibióticos β -lactámicos (Sepúlveda *et al.*, 2002). En otro estudio también en México durante el año 2009, se menciona la presencia de un 14% de resistencia a ampicilina, un 44% de resistencia a trimetoprim/ sulfametoxazol, y de un 9.6% hacia claritromicina, entre otros antimicrobianos, indicando la presencia de multirresistencia en el 2.8% de las cepas de un total de 250 aislamientos de *H. influenzae* (Rodríguez *et al.*, 2009). Nuestro grupo de trabajo ha reportado en un grupo de cepas pertenecientes a la Ciudad de Puebla y de Minatitlán, obtenidas durante el año de 1997, la presencia de un 12% de cepas de *H. influenzae* productoras de β -lactamasas aisladas de faringe de niños portadores no vacunados que asistían a guarderías (Rocha *et al.*, 1997). En otro estudio también en Puebla los resultados se duplicaron con la presencia del 21.05% de cepas productoras de β -lactamasas pero ahora en niños clínicamente sanos y vacunados (Rocha *et al.*, 2006).

En un estudio de nuestro grupo de trabajo aún no publicado, realizado en el año 2009 en el CICM de la BUAP se utilizaron 100 cepas de *H. influenzae* polivalentes, tipo b y no tipificables, con el objetivo de determinar los mecanismos de resistencia presentes en ese grupo de cepas. Los resultados indicaron la presencia de cepas β -lactamasa positivas ampicilina resistentes (BLPAR) en el 28% de los aislados, el 5% fueron β -lactamasa positivas ácido clavulánico resistentes (BLPACR) y el 16% presentaron fenotipo β -lactamasa negativas ampicilina resistentes (BLNAR). Dentro de los grupos de cepas productoras de β -lactamasa se confirmó la presencia de la β -lactamasa tipo TEM, además en dos cepas BLPAR y una cepa BLPACR se observó el promotor Pdel del gen *bla*_{TEM} (Millán y Rocha, 2009). Curiosamente estas cepas con el promotor Pdel, presentaron mayor espectro de resistencia, inclusive contra cefalosporinas de 3ra y 4ta generación, dando indicios de que los cambios en la región reguladora pueden incrementar la resistencia, hecho que no fue confirmado molecularmente.

Molina *et al.*, 2003 tras secuenciar el gen *bla*_{TEM}, fue el primero en describir la presencia del promotor Pdel en el 46.1% de las cepas de *H. influenzae* productoras de β -lactamasas, asociándolo con el incremento significativo de la resistencia a cefaclor y a loracarbef por medio de un análisis estadístico de los resultados de la CMI hacia dichos β -lactámicos, dando los primeros indicios de que Pdel es un promotor más fuerte que P3 (Molina *et al.*, 2003), aunque no se buscó la presencia de otro tipo de β -lactamasa que pudiera influir en este fenotipo; también se encontró que algunas de esas cepas que presentaron el promotor Pdel fueron negativas para el ensayo de nitrocefina. Mientras que Tristram en el año 2005 confirmó y describió por PCR específica la existencia de los promotores P3, Pdel y Pa/Pb entre sus cepas de trabajo; sin embargo, no logró asociar el incremento de los valores de la CMI hacia amoxicilina con un determinado promotor debido a la baja cantidad de cepas analizadas y a que el rango de la CMI hacia amoxicilina fue parecido entre todas las cepas. (Tristram *et al.*, 2005). El promotor Pdel ha sido descrito previamente en las β -lactamasas de espectro extendido (BLEES) TEM-20 y TEM-92 de Enterobacterias, donde fue relacionado

con los altos niveles de producción de β -lactamasa y altos niveles de resistencia a cefalosporinas (Arlet, Goussard, & Courvalin, 1999). Mientras que en otro estudio, se transformaron en *E. coli* dos plásmidos de *H. influenzae* conteniendo cada uno el gen bla_{TEM} con diferente promotor y por medio de un análisis de restricción al ARN, con la nucleasa S1, se reveló el inicio de la transcripción a partir de los promotores Pa/Pb y P3 (Chen *et al.*, 1984). Además, en *E. coli* se ha mostrado que los niveles de resistencia hacia amoxicilina se incrementan hasta 10 veces más con el promotor Pa/Pb que con el P3 (Chen *et al.*, 1987). En un estudio más reciente, en *E. coli*, se relacionó la presencia del promotor Pa/Pb con el incremento de la expresión de bla_{TEM-1} , pero el resultado fue inconsistente al relacionarlo con los valores de la CMI hacia ampicilina/ sulbactam (Waltner-Toews *et al.*, 2011). Estos estudios, sugieren la importancia de realizar estudios moleculares más a fondo que confirmen la relación entre un promotor y el incremento de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos, mediado por β -lactamasas en *H. influenzae*.

Por otro lado, las primeras observaciones del fenotipo β -lactamasa negativo ampicilina resistente (BLNAR), fue reportado en 1980 en cepas tipo b capsuladas y no capsuladas. Posteriormente, se mostró que la resistencia estaba correlacionada con alteraciones en la PBP-3. En 1984, Parr y Bryan fueron capaces de usar DNA genómico de un aislado clínico de Hib BLNAR para transformar una cepa de *H. influenzae* denominada Rd susceptible (BLNAS), para demostrar la disminución de la afinidad de unión de PBP-3 con el antibiótico en ambas cepas donadora y transformada, donde las alteraciones en la PBP fueron establecidas para el fenotipo BLNAR (Tristram *et al.*, 2007). Más adelante Ubukata en el 2001 demostró que mutaciones en la proteína PBP-3, influyen en el desarrollo de la resistencia a β -lactámicos en cepas BLNAR (Ubukata *et al.*, 2001). La identificación de las cepas BLNAR es variable en todo el mundo, siendo estas cepas extrañas en EUA y en la mayoría de los países Europeos. Sin embargo, existen estudios que han revelado una alta prevalencia en Japón (desde un 23% hasta un 43%), Korea (29%) y España (34-56%). Esta prevalencia se atribuye al

uso frecuente de cefalosporinas orales e intravenosas en esos países (García-Cobos *et al.*, 2008^b).

A pesar de que *H. influenza* solo cuenta con dos mecanismos de resistencia a los β -lactámicos, es importante llevar a cabo estudios moleculares para conocer cuáles son las modificaciones que hace la bacteria sobre sus propios mecanismos de resistencia que los hagan más eficientes y por lo tanto le permitan adaptarse y sobrevivir a la presencia de los antibióticos.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los antibióticos β -lactámicos son el tratamiento de primera elección para tratar las infecciones causadas por *H. influenzae*, que son de gran importancia porque afectan generalmente a la población infantil, y a pacientes adultos con EPOC.

Debido a que en *H. influenzae* se ha observado un incremento de la resistencia a los β -lactámicos, así como una variabilidad en el perfil de resistencia, que va a depender de la zona geográfica y el cuadro de antibióticos que se maneje en cada hospital.

Es probable que la variabilidad de la resistencia a los β -lactámicos en las cepas productoras de β -lactamasa TEM-1 se deba a los cambios en la región reguladora del gen *bla*_{TEM}, o bien por sustituciones aminoácidas en la proteína PBP3, que le confieren a la bacteria menor afinidad por el antimicrobiano.

Con base en esto se justifica realizar estudios que confirmen la relación entre un promotor y el incremento de la resistencia a los β -lactámicos, mediado por β -lactamasa tipo TEM-1, así como investigar los cambios en los residuos en la proteína PBP3, que conllevan al incremento de la aparición de cepas de *H. influenzae* BLPAR, BLPACR y BLNAR.

4. OBJETIVOS

GENERAL

- ▶ Caracterizar la resistencia a antibióticos β -lactámicos de cepas de *Haemophilus influenzae*.

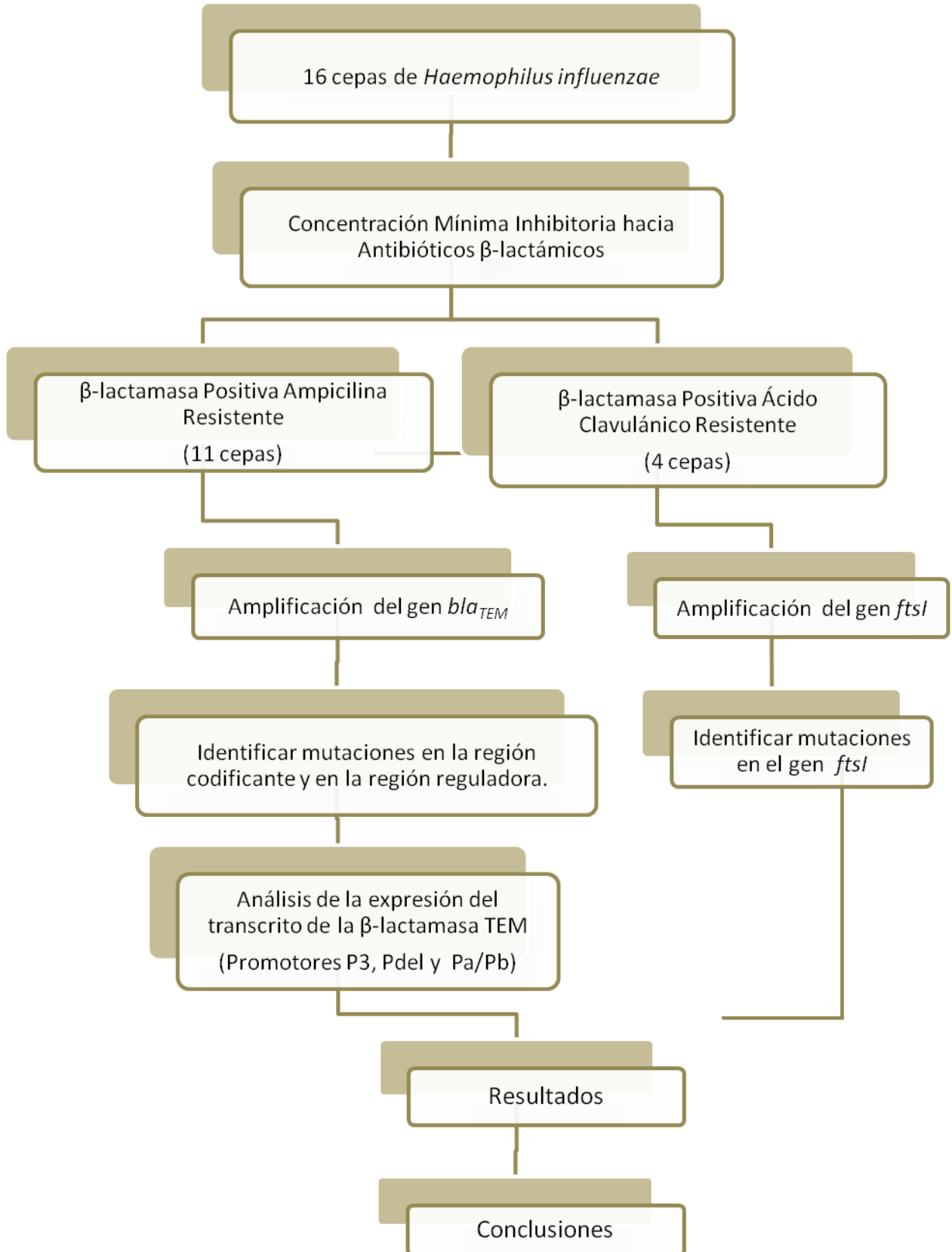
ESPECIFICOS

- *Evaluar la relación entre la resistencia a antibióticos β -lactámicos y la presencia de diferentes promotores en el gen bla_{TEM} de *Haemophilus influenzae*.*
- *Evaluar la resistencia a antibiótico β -lactámicos debida a modificaciones aminoacidicas en la Proteína de Unión a Penicilina tipo 3.*

PARTICULARES

- *Determinar la concentración mínima inhibitoria hacia antibióticos β -lactámicos a cepas con fenotipo BLPAR y BLPACR.*
- *Verificar la presencia del gen bla_{TEM} , así como la de los promotores P3, Pa/Pb y Pdel en las cepas BLPAR y BLPACR.*
- *Evaluar el nivel de expresión del gen bla_{TEM} en las cepas BLPAR y BLPACR.*
- *Determinar si existen y cuáles mutaciones están presentes en la PBP-3 en las cepas BLPACR.*

5. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Material biológico

Para el estudio se incluyeron 14 cepas de *H. influenzae* tipificables y no tipificables (Tabla 3) y se utilizaron 3 cepas control: la cepa ATCC® 33930™ que es una cepa β-lactamasa positivo de origen Tailandés, serotipo b, aislada de LCR con nivel de bioseguridad 2 y resistente a cloranfenicol, tetraciclina y ampicilina, la cepa ATCC® 49247™ que es una cepa β-lactamasa negativo serotipo b aislada en Worcester Massachusetts de la expectoración de un hombre de 76 años de edad que presento neumonía en 1984 con nivel de bioseguridad 2 (www.atcc.org) y que presenta resistencia a ampicilina (Scriver *et al.*, 1994, Kubota *et al.*, 2006) y la cepa RdKw20 (GenBank: NC_000907) no tipificable, avirulenta y sin mecanismos de resistencia a β-lactámicos.

Tabla 3. Cepas de *H. influenzae* utilizadas en este estudio.

CEPA	FENOTIPO	CEPA	FENOTIPO	CEPA	FENOTIPO
BUAP220394	BLPAR	BUAP27-1 CIF	BLPACR	BUAP172570	BLPAR
BUAP28	BLPAR	BUAP NAN	BLPACR	BUAP27-1 CIG	BLPAR
BUAP157	BLPAR	BUAP172178	BLPACR	ATCC 33930	BLPAR
BUAP27-2 CIH	BLPAR	BUAP172185	BLPACR	ATCC 49247	BLNAR
BUAP20-2 CIG	BLPAR	BUAP17-2 CIF	BLPAR	Rdkw20	BLNAS
BUAP11 CIG	BLPAR	BUAP172569	BLPAR		

BLPAR: β-lactamasa positiva ampicilina resistente, BLPACR: β-lactamasa positiva ácido clavulánico resistente.

6.2. Cultivo de cepas

Las cepas se cultivaron rutinariamente en medio Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) enriquecido con Fildes al 5%, el cual es un digerido de sangre de carnero, que aporta los factores X y V para el crecimiento de *Haemophilus influenzae*. Las cepas se incubaron a 37°C con tensión de CO₂ del 5-10%, durante 24 horas. En el caso del cultivo líquido se utilizó caldo BHI enriquecido con Fildes al 5%.

6.3. Almacenamiento

Las cepas de *H. influenzae* utilizadas en este estudio se conservaron en congelación a -70°C en crioviales de 1.0 ml con caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) al cual se le agregó Fildes y glicerol, ambos al 15%.

6.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La CMI mide cuantitativamente la actividad “*in vitro*” de un antimicrobiano frente a un microorganismo aislado, la cual se expresa en la concentración del antibiótico en microgramos por mililitro (µg/ml). Representa la menor concentración del antimicrobiano capaz de producir inhibición total del crecimiento bacteriano.

Procedimiento. Se utilizó la técnica de dilución en placa descrita por el CLSI (Laboratory Clinical Standards Institute, 2013). El método consistió en la preparación de una serie de placas de agar BHI enriquecido con Fildes al 15% y con diferentes concentraciones del agente antimicrobiano (Tabla 4) a las cuales se les inoculó una suspensión estandarizada de cada cepa de *H. influenzae*.

Posteriormente, las placas se incubaron de 18- 24 horas a 36°C/ 5-10% CO₂. El resultado de la CMI se registró como el valor de la menor dilución que inhibió completamente el desarrollo bacteriano en la placa, teniendo como control negativo a las cepas ATCC 49247 y la RdkW20, y como control positivo a la ATCC 33930.

Tabla 4. Antibióticos β- lactámicos utilizados para la determinación de la CMI.

ANTIMICROBIANO	CLASIFICACION	ANTIMICROBIANO	CLASIFICACION
Ampicilina (AMP)	Penicilina sintética	Cefixima (CFM)	Cefalosporina 3ra generación
Amoxicilina/ Acido Clavulánico (AMC)	Penicilina sintética con inhibidor	Ceftriaxona (CRO)	Cefalosporina 3ra generación
Ampicilina/ Sulbactam (SAM)	Penicilina sintética con inhibidor	Cefotaxima (CTX)	Cefalosporina 3ra generación
Cefalotina	Cefalosporina 1ra generación	Ceftazidima (CAZ)	Cefalosporina 3ra generación
Cefaclor (CEC)	Cefalosporina 2da generación	Cefepime (FEP)	Cefalosporina 4ta generación
Cefuroxima (CXM)	Cefalosporina 2da generación		

6.5. Pruebas moleculares para determinar la presencia de los genes *bla*_{TEM} y *ftsI* en cepas de *H. influenzae*.

6.5.1. Obtención del templado

A partir de un cultivo puro de *H. influenzae* se tomaron dos asadas y se suspendieron en 1 ml de solución salina estéril en un tubo eppendorf de 1.5 ml. La mezcla se disolvió por vórtex hasta que quedo homogenizada, y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm; se repitió este procedimiento 2 veces más. Posteriormente,

la pastilla se resuspendió en 100 µl de agua inyectable estéril, se agitó en vórtex, hasta quedar homogéneo, se colocó en baño María a 100°C por 10 minutos para obtener finalmente el lisado. Nuevamente se llevó a vortex y se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se separó en un tubo eppendorf estéril de 1.0 ml, sin llevar ningún fragmento de la pastilla obtenida tras el centrifugado, finalmente el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso para la amplificación de los genes *bla_{TEM}* y *ftsI*.

6.5.2. Condiciones para PCR

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl mezclando agua libre de endonucleasas, buffer de reacción, MgCl₂, dNTP's, oligonucleótidos delantero y reverso correspondientes al gen de estudio, Taq polimerasa y el templado de ADN (200-400 ng/µl) de acuerdo a las concentraciones indicadas en la Tabla 5. Se siguieron las condiciones de PCR para cada gen indicadas en la Tabla 6. El termociclador utilizado fue el Tprofessional Trio, Thermocycler. Se utilizaron controles positivos y negativos (ATCC 33930, ATCC 49247 y RdkW20) para cada gen.

Tabla 5. Componentes y cantidades empleadas en cada PCR.

Componente (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Cebador "forward"	25 µM	0.5 µL	1.25 µM
Cebador "reverse"	25 µM	0.5 µL	1.25 µM
TAQ TM DNA Polimerasa (Fermentas)	5 U/µL	0.1 µL	0.05 U
Tampón de reacción (Fermentas)	10 X	1 µL	1 X
MgCl ₂ (Fermentas)	50 mM	1 µL	5 mM
dNTPs mix (Sigma Aldrich)	2,5 mM	0.4 µL	0.1 mM
DNA	---	1 µL	---
Agua libre de endonucleasas	---	5.5 µL	---

6.5.3. Visualización del amplificado de PCR

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X con un voltaje de 90V por 50 minutos usando, un marcador de peso molecular para ADN que presenta un rango de 100 – 3000 pb, GeneRuler™ o 100pb Plus DNA Ladder, FERMENTAS, posteriormente los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET). Los geles se visualizaron en el foto-documentador con luz UV Minibis Pro, Bioimaging System, en el programa Gel Capture.

6.5.4. Amplificación por PCR del gen *bla*_{TEM}.

De las quince cepas resistentes a ampicilina se eligieron las cepas de mayor interés, de acuerdo a su perfil de resistencia para buscar el gen *bla*_{TEM} por PCR utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 6.

La secuencia utilizada como control para amplificar el gen *bla*_{TEM} fue el plásmido ICEhin1056 de *Haemophilus influenzae* reportado en el GeneBank con número de acceso: NC_011409.1, que presenta 861 pb y codifica para 286 aminoácidos.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *bla*_{TEM} y *ftsI*

Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplificado	Condiciones	Referencia
TEMF	5' GTG TTA CTC ATG GTT ATG 3'	600 pb	94°C – 5min 30 ciclos	Scriver <i>et al.</i> , 1994 Molina <i>et al.</i> , 2003
TEMR	5' GAA TTC TTG AAG ACG AAA GGG 3'		94°C-1min	
TEMF	5' TTA TCC GCC TCC ATC CAG TC 3'	848 pb	56°C- 1 min	Karlowski <i>et al.</i> , 2000 Molina <i>et al.</i> , 2003 Scriver <i>et al.</i> , 1994
TEMR	5' GAA TTC TTG AAG ACG AAA GGG 3'		72°C – 1 min 72°C – 7 min	
TEMF	5' AGT CAC AGA AAA GCA TCT TA 3'	686 pb	94°C – 5min 30 ciclos	Lee S.H. <i>et al.</i> , 2000 Belaouaj <i>et al.</i> , 1994
TEMR	5' ACG CTC AGT GGA ACG AAA AC 3'		94°C-1min 57°C- 1 min 72°C – 1 min 72°C – 7 min	

TEM-PF	5' CCT AGA ACG CAC GAA TGA G 3'		94°C – 5min 30 ciclos 94°C-1min	Este estudio.
TEM-PR	5' CCA ACT GAT CTT CAG CAT CTT 3'	490 pb	54°C- 1 min 72°C – 1 min 72°C – 7 min	
PPB3-1F	5'-AAG TGT TAG CTA TGG GGA CTG-3'		94°C – 10min 35 ciclos	Kubota <i>et al.</i> , 2006
PBP-3-1R	5'- AAC TGG CGG ATC AAC TTT AGT-3'	551 pb	94°C- 30 seg 56°C- 30 seg 72°C – 1 min	
PBP-3-3F	5'- TAA AGT TGA TCC GCC AGT TAT-3'	416 pb	72°C – 10 min	
PBP-3-3R	5'-GAT TCT TGT GTT CGC CAA TA-3'			
PBP-3-2F	5'- GAA GCT ACG GAA GGG GAT AGC-3'		94°C – 10min 30 ciclos 94°C- 30 seg	Este estudio.
PBP-3-2R	5'TCT GAT TTC ACG CCG ACA CG-3'	1049 pb	62°C- 30 seg 72°C – 1 min 72°C – 10 min	

6.5.5. Amplificación por PCR del gen *ftsI* para las cepas de *H. influenzae* BLPACR.

Se les realizó la búsqueda del gen *ftsI* por PCR utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 6 a cepas que fueron resistentes a ácido clavulánico (BUAPNan y BUAP172178) y cepa que no lo fueron (BUAP28 y ATCC 33930), de acuerdo a los resultados de la CMI.

La secuencia control para amplificar el gen *ftsI* fue la cepa RdKw20 de *Haemophilus influenzae* con número de acceso en el GeneBank: L42023.1 donde se indica que posee 1833 pb que codifican para 610 aminoácidos.

6.6. Secuenciación de los productos de PCR

Los fragmentos de ADN obtenidos por amplificación para ser secuenciados fueron purificados del gel usando el kit Zymoclean™ DNA Recovery Kit de ZymoResearch siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se mandó a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM y/o al Centro de

Detección de Biomolecular de la BUAP con las siguientes condiciones: 20µl de ADN purificado por muestra, 10µl del oligonucleótido a una concentración de 10 pmol/µl.

6.7. Análisis de las secuencias

Las secuencias se visualizaron usando el programa Chromas Lite 2.1.1 de Technelysium, posteriormente se realizó el análisis en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del National Center for Biotechnology Information Site (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) para comparar con secuencias de otras cepas reportadas en la base de datos. El alineamiento se realizó usando Clustal W2 Multiple Sequence Alignment con la cepas del GenBank ICEhin1056 de *Haemophilus influenzae* con número de acceso: NC_011409.1 y con la cepa RdKw20 de *Haemophilus influenzae* con número de acceso en el GenBank: L42023.1, de acuerdo al fenotipo de la cepas analizadas. Para la traducción de la secuencia de nucleótidos se utilizó el programa ExPASy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>).

6.8. Evaluación de la expresión del gen *bla*_{TEM} mediante PCR-Tiempo Real.

La PCR en tiempo real, es usada para cuantificar el ADN o ARNm de una muestra utilizando oligonucleótidos específicos de la secuencia y fluorocromos para determinar el número de copias o la cantidad relativa de una secuencia de ADN determinada. La cuantificación se realiza en cada ciclo de PCR, mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, de manera que a mayor producto de PCR habrá mayor fluorescencia emitida. El SYBRGreen

I es un fluoróforo intercalante que se une al surco menor del ADN de doble cadena y que emite una señal fluorescente tras la unión. Los máximos de excitación y emisión de SYBRGreen I son a 494 nm y 521 nm, respectivamente. Cuando se combina la qPCR con una reacción de retro-transcripción, puede determinarse el cambio de los niveles de expresión del ARNm interpretado como ADNc, mediante una cuantificación relativa, pues se compara la relación de ARNm de un gen específico respecto a la cantidad de ARNm de un gen constitutivo (control endógeno).

6.8.1. Aislamiento de ARN y síntesis de cADN

Los cultivos bacterianos crecidos en caldo BHI suplementado con Fildes o con 10 mg/ml de hemina y extracto de levadura al 2% durante 16 horas fueron subcultivados en los mismos medios con y sin 2 µg/ml de ampicilina durante 10 horas de incubación a 37°C en agitación constante y se obtuvieron muestras de cultivo a lo largo de la curva de crecimiento (OD550 1.0, 1.2, 1.4, 1.6) o hasta alcanzar el inicio de la fase exponencial tardía. Las células obtenidas se concentraron por centrifugación a 12,000 rpm por 10 min, se resuspendieron con PBS y se prosiguió con la extracción del ARN con el fenol ácido caliente, seguido del tratamiento con DNasa I, libre de RNasa (Thermoscientific) para eliminar cualquier contaminación con ADN genómico. El ARN se cuantificó con el Nano Drop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) y analizó cualitativamente sobre geles de agarosa (al 1.5%) y por PCR para descartar contaminación por ADN. Se usó 1 µg/µl de ARN total para la síntesis de cADN usando el estuche RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Un control negativo sin ARN se incluyó también. El cADN se utilizó posteriormente para realizar RT-PCR en tiempo real cuantitativo.

6.8.2. qRT-PCR en tiempo real

Se llevó a cabo RT-PCR cuantitativo en tiempo real usando Maxima SYBRGreen/ Rox qPCR Master Mix (Thermo Scientific) en el equipo de PCR en tiempo real LightCycler® 480 (Roche Applied Science Mannheim, Ger) y los oligonucleótidos diseñados específicamente para los genes *16S* y *bla_{TEM}* de *Haemophilus influenzae* indicados en la Tabla 7, la expresión del gen *16S* se usó para normalizar los datos. Para cada reacción 1 µl del producto de transcripción reversa (dilución 1:10) se usó como templado para PCR en un volumen final de 20 µl conteniendo 0.5 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 20 µM, 8 µl de agua libre de nucleasas y 10 µl de la mezcla SYBRGreen master mix 2x Maxima SYBRGreen/ ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific).

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para PCR tiempo real.

OLIGONUCLEOTIDOS		AMPLIFICADO	CONDICIONES
16S-F	5' CGA TTT GGG GGT TGG GGT TTA 3'	209 pb	Amplificación 95°C – 10min 50 ciclos 95°C-15seg 60°C- 1 min
16S-R	5' CCG AAG GCA CAA GCT CAT CTC TG 3'		
TEM4-F	5' TGG GTG CAC GAG TGG GTT AC 3'	224 pb	Curva melting 65°C a 95°C 0.5°C – 5 seg 40°C – 30 seg
TEM4-R	5' CGT AAG ATG CTT TTC TGT GAC TG 3'		

Este estudio.

Para la amplificación se usaron las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 50 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos y 1 minuto a 60°C para asegurar la especificidad de los productos de PCR se llevó a cabo el análisis de la curva *melting* al calentar los productos de 65°C a 95°C, con incrementos de 0.5°C cada 5 segundos mientras se monitoreaba la fluorescencia. Las reacciones para cada gen blanco se llevaron a cabo por duplicado por muestra y los resultados reflejan el promedio. Para determinar las eficiencias de amplificación de los genes blanco por PCR en tiempo real se realizaron diluciones seriadas del ADN hasta 10⁻⁵ y las curvas de amplificación se analizaron con el método de

cuantificación absoluta para determinar las eficiencias de amplificación. Los datos de los niveles de expresión genética se obtuvieron usando el software Light Cycler 480 (Roche) con el método de cuantificación relativa, los datos que este programa emplea son los valores Cp (Crossing points) basados sobre el *E-method* de la segunda derivada máxima teniendo la expresión del gen en la condición calibradora y la expresión del gen en las condiciones desconocidas. Finalmente, los valores normalizados se analizaron en Excel y los resultados se expresaron en forma de graficas.

7. RESULTADOS

Todas las cepas de *Haemophilus influenzae* utilizadas en este estudio forman parte del cepario del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP (ICUAP).

7.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) realizamos el protocolo que dicta el CLSI, de acuerdo a la metodología descrita en materiales y métodos. En la Tabla 8 se muestran los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria hacia los β -lactámicos. Las primeras tres columnas corresponden a las características de las cepas, en las columnas siguientes se encuentran los valores de CMI en microgramos por mililitro de 10 cepas BLPAR, 4 BLPACR y 3 cepas controles (control + ATCC 33930, Control - ATCC 49247 y RdkW20). En la fila superior se muestran los antibióticos con sus puntos de corte de acuerdo al CLSI 2013.

Con los resultados de este experimento observamos que todas las cepas productoras de β -lactamasa fueron resistentes a ampicilina con valores desde 4 a 128 $\mu\text{g/ml}$, también se observa que las 4 cepas BLPACR fueron resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, además de mostrar una susceptibilidad disminuida hacia cefalosporinas de 3ra y 4ta generación comparado con los valores de los controles negativos.

Tabla 8. Valores de CMI hacia antimicrobianos β-lactámicos.

CEPA	FENOTIPO	AMPLIFICADO <i>bla</i> _{TEM} (pb)	ANTIBIOTICO CON SUS PUNTOS DE CORTE (CLSI, 2013)										
			AMP R ≥ 4 µg/ml	CF	CEC R ≥ 32 µg/ml	CXM R ≥ 16 µg/ml	CFM S ≤ 1 µg/ml	CRO S ≤ 2 µg/ml	CAZ S ≤ 2 µg/ml	CTX S ≤ 2 µg/ml	CEP S ≤ 2 µg/ml	AMC R ≥ 8/4 µg/ml	SAM R ≥ 4/2 µg/ml
BUAP220394	BLPAR	712	16	s	s	4 (2)	s	s	s	s	0.5 (64.1)	s	4/2
BUAP28	BLPAR	712	128	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
BUAP157	BLPAR	712	4	2	s	s	0.125 (8.01)	0.0078 (2.6)	s	s	0.125 (16.02)	s	s
BUAP27-2 CIH	BLPAR	712	64	16	s	s	s	s	0.250 (32.05)	s	0.5 (64.1)	s	s
BUAP20-2 CIG	BLPAR	712	16	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
BUAP27-1 CIF	BLPACR	712	64	s	s	s	s	s	0.250 (32.05)	0.0625 (8.01)	s	64/32	s
BUAPNANCY	BLPACR	712	64	s	s	s	s	s	0.250 (32.05)	0.125 (16.02)	0.125 (16.02)	32/16	s
BUAP172178	BLPACR	848	> 128	4	128 (64)	>4 (2)	S	0.0156 (5.2)	0.250 (32.05)	0.250 (32.05)	0.250 (32.05)	16/8	>8/4
BUAP172185	BLPACR	848	64	s	S	s	s	s	s	s	s	8/4	s
BUAP17-2 CIF	BLPAR	848	64	64	256 (128)	s	0.250 (16.02)	s	s	s	s	s	8/4
BUAP172569	BLPAR	848	64	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
BUAP172570	BLPAR	848	64	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
BUAP11 CIG	BLPAR	848	4	8	s	s	s	s	s	s	0250 (32.05)	s	2

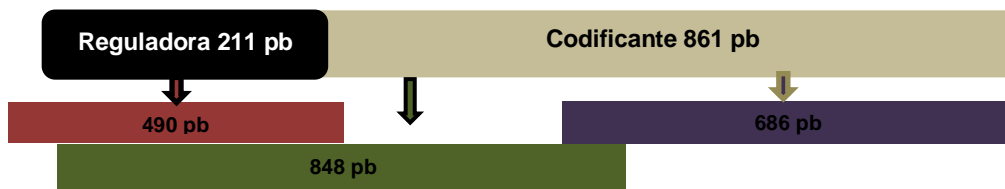
BUAP27-1 CIG	BLPAR	848	128	>1024	256 (128)	s	s	s	0.250 (32.05)	s	0.5 (64.01)	s	8
ATCC33930	BLPAR	848	8	128	s	s	S	s	s	s	s	s	s
ATCC49247	BLNAR	ATCC	2	2	2	2	0.5 (32.05)	<0.003	0.250 (32.05)	<0.0078	0.125 (16.02)	<1	<1
Rdkw20	BLNAS	ATCC	<1	2	2	2	0.0156	<0.003	<0.0078	<0.0078	<0.0078	<1	<1

AMP: ampicilina, CF: Cefalotina, CEC: cefaclor, CXM: cefuroxima, CFM: cefixima, CRO: ceftriaxona, CAZ: Ceftazidima, CTX: cefotaxima, CEP: cefepime, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, SAM: ampicilina/sulbactam, BLPAR: β -lactamasa positiva ampicilina resistentes, BLPACR: β -lactamasa positiva ácido clavulánico resistente, BLNAR: β-lactamasa negativa ampicilina resistente, BLNAS: β -lactamasa negativa ampicilina sensible. (#) **Entre paréntesis se indica las veces que se incrementa la resistencia comparado con los resultados de la RdkW20.**

7.2. Amplificación del gen *bla*_{TEM} mediante PCR

El gen *bla*_{TEM} se amplificó completo a partir de 3 pares de oligonucleótidos (Tabla 6) obteniendo tres fragmentos diferentes, uno de 490pb que amplifica la región promotora completa, otro de 848pb que amplifica la región promotora y parte de la región codificante y otro de 686pb correspondiente al resto de la región codificante (Figura 3).

Figura 3: Esquema de los fragmentos generados por PCR usando los tres pares de oligonucleótidos para el gen *bla*_{TEM}.



Se amplificó el gen *bla*_{TEM} en las cepas BUAP172185, BUAP172178, BUAP27-1CIF, BUAPNan y BUAP28, de las cuales, BUAP27-1CIF, BUAPNan y BUAP28 presentaron un amplificado de menor tamaño al esperado con los dos pares de oligonucleótidos que amplifican los fragmentos 1 (490 pb) y 2 (848 pb) de la región promotora, obteniendo amplificados de menor tamaño con 354 y 712 pb respectivamente (Figura 4. Panel A y B). Mientras que en todas las cepas se amplificó el fragmento 3 correspondiente a la mitad de la región codificante del gen *bla*_{TEM} con un tamaño esperado de 686p pb (Figura 4. Panel C). Para todos los amplificados se utilizó un control positivo producción de β -lactamasa (ATCC 33930) y un control negativo no productor de β -lactamasa (cepa ATCC 49247).

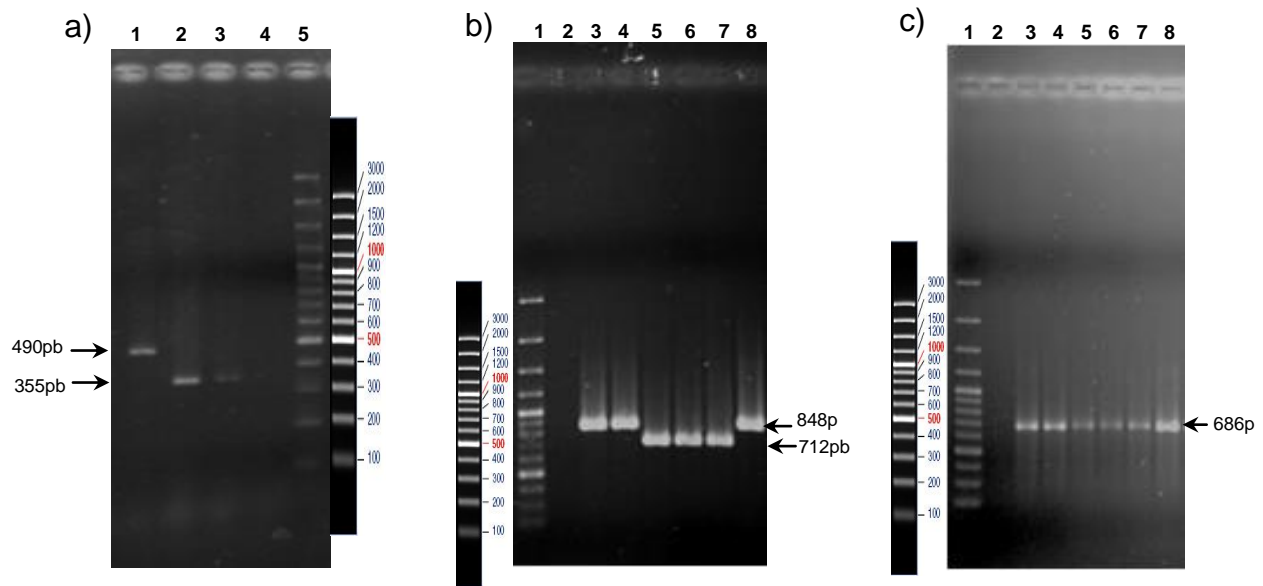


Figura 4. Corrimiento electroforético de los amplificadores del gen *bla*_{TEM} en las cepas seleccionadas.

Panel A. Amplificación del fragmento 1 para un tamaño esperado de 490 pb, sin embargo se obtuvieron amplificadores menores. Carril 1: cepa ATCC 33930 (control + 490 pb), Carril 2: cepa BUAPNan (354pb), Carril 3: cepa BUAP28 (354 pb), Carril 4: cepa ATCC 49247 (control -), Carril 5: marcador. **Panel B.** Amplificación del fragmento 2 con un tamaño esperado de 848 pb, sin embargo existen tres cepas que presentaron un amplificado menor. Carril 1: marcador molecular, Carril 2: cepa ATCC 49247 (control -), Carril 3: cepa ATCC 33930 (control + 848 pb), Carril 4: cepa BUAP172178 (848 pb), Carril 5: cepa BUAPNan (712 pb), Carril 6: cepa BUAP28 (712 pb), Carril 7: cepa BUAP27-1 CIF (712 pb), Carril 8: cepa BUAP172185 (848 pb). **Panel C.** Amplificado del fragmento 3 con un tamaño esperado de 686 pb. Carril 1: marcador molecular, Carril 2: cepa ATCC 49247 (control -), Carril 3: cepa ATCC 33930 (control + 686 pb), Carril 4: cepa BUAP172178, Carril 5: cepa BUAPNan, Carril 6: cepa BUAP28, Carril 7: cepa BUAP27-1 CIF, Carril 8: cepa BUAP172185.

7.3. Secuenciación del gen *bla*_{TEM}

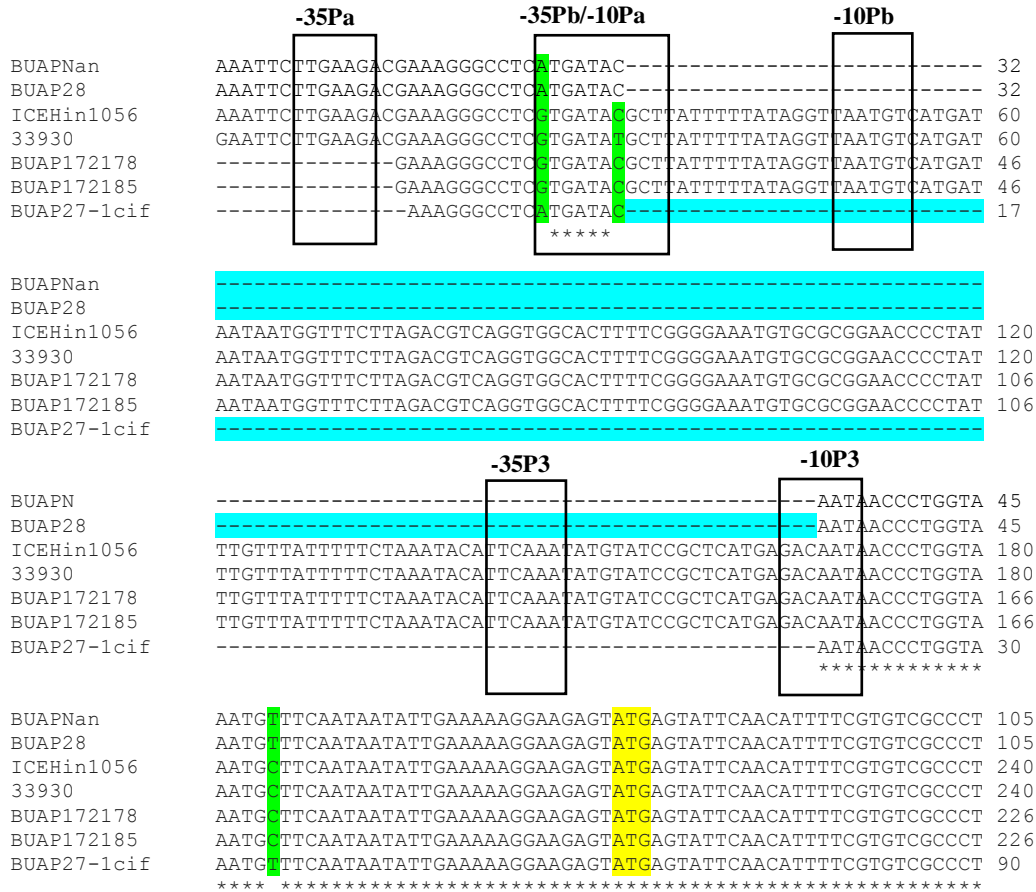
De acuerdo al perfil de resistencia a antibióticos que presentan las cepas y al amplificado el gen *bla*_{TEM} obtenido se seleccionaron las cepas BUAP28, BUAP172185, BUAP27-1CIF, BUAPNan, BUAP172178 y la ATCC 33930 como candidatas para el análisis de secuencia del gen *bla*_{TEM} completo y poder determinar la presencia de posibles mutaciones, así como identificar el tipo de promotor presente en cada cepa. Los alineamientos se realizaron comparando con

la secuencia del plásmido ICEHin1056 de *Haemophilus influenzae* reportado en el GeneBank con número de acceso: NC_011409.1, del gen *bla*_{TEM}, el cual presenta 211 pb correspondientes a la región reguladora y 861 pb que codifican para 286 aminoácidos. De tal forma que las secuencias de los genes *bla*_{TEM} de las cepas ATCC 33930 y la BUAP172178 presentaron un porcentaje de identidad del 99% con el gen *bla*_{TEM-1} de las cepas de *H. influenzae* ICEHin1056 y con *Serratia marcescens*; mientras que el gen *bla*_{TEM} de la cepa BUAP172185 presentó un porcentaje de identidad del 100%.

El gen *bla*_{TEM} de las cepas BUAPNan y BUAP27-1CIF mostró el 100% de identidad con un precursor de la β -lactamasa TEM de las cepas de *H. influenzae* Rd2866, 10810 y 86028NP, mientras que el gen *bla*_{TEM} en la cepa BUAP28 presentó identidad del 99% para las secuencias anteriormente mencionadas.

Por otro lado, al hacer el alineamiento de la región reguladora del gen *bla*_{TEM} con la secuencia del plásmido ICEHin1056, se encontró que la cepa ATCC 33930 posee el promotor nativo P3, las cepas BUAP172178 y BUAP172185 resistentes al ácido clavulánico resultaron tener el promotor Pa/Pb, y las cepas BUAPNan, BUAP28 y BUAP27-1CIF poseen el promotor Pdel, el cual presenta una delección de 135 pb previamente descrito (Molina *et al.*, 2003) (Figura 5). Además, estas últimas tres cepas tuvieron un 99% de identidad con la secuencia de *H. parainfluenzae* correspondientes a la β -lactamasa TEM-182 (IRT). La cepa 172178 presentó una mutación silenciosa en 266T (figura 6 y 7), por lo demás no presento cambios a nivel de secuencia en la región codificante del gen.

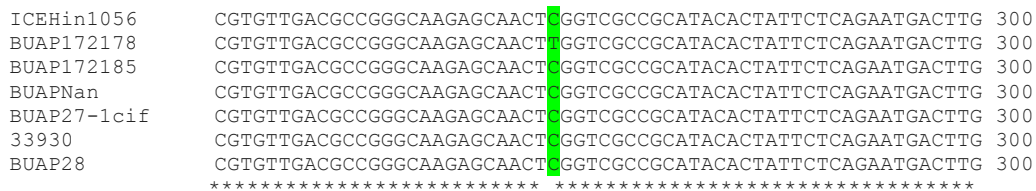
Figura 5. Alineamiento nucleotídico de la región promotora del gen *bla_{TEM}* de las cepas estudiadas, con la secuencia ICEHin1056 de *Haemophilus influenzae* (GeneBank: NC_011499)



Las regiones señaladas indican lo siguiente:

- Cajas promotoras -35 y -10 de P3, Pa/Pb y Pdel
- Inicio del gen *bla_{TEM}*
- Delección de 135 pb
- Cambios de base G26A, C32T y C185T

Figura 6. Alineamiento nucleotídico de la región codificante del gen *bla_{TEM}* con la secuencia del plásmido ICEHin1056 de *Haemophilus influenzae* (GeneBank NC_011409.1).



Las regiones señaladas indican lo siguiente:

- Cambios de basede C267T en la cepa BUAP172178 (mutación silenciosa)

Las bases 1 a 240 y 301 a 861 no se muestran debido a que no presentaron cambios nucleotídicos en todas las cepas estudiadas.

Figura 7. Alineamiento entre residuos de aminoácidos del gen *bla*_{TEM} con la secuencia del plásmido de *Haemophilus influenzae* ICEHin1056 con el número de secuencia YP_002291069.1.

```

ICEHin1056      EERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
27-1cif         EERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
172178         EERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
172185         EERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
Nancy          EERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
33930         EERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
27-2cih       EERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
28            EERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
*****
  
```

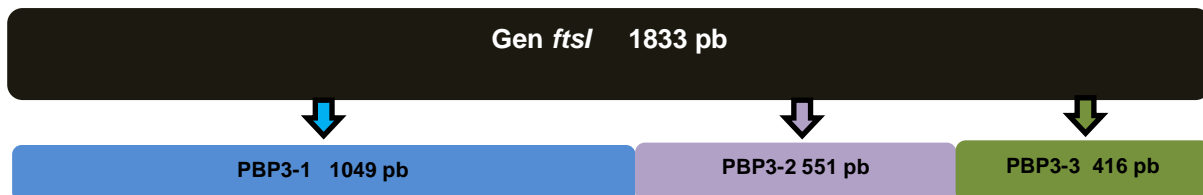
Las regiones señaladas indican lo siguiente:

No hubo cambio de aminoácido por la mutación C267T en la cepa BUAP172178. Los aminoácidos 1 a 60 y 121 a 861 no se muestran, ya que en todas las cepas estudiadas no se encontraron cambios aminoácidos

7.4. Amplificación del gen *ftsI* por PCR

La amplificación del gen *ftsI* se realizó en las cepas de *H. influenzae* BUAPNan y BUAP172178, debido a que presentaron el fenotipo de resistencia BLPACR sugiriendo la presencia de mutaciones en este gen, responsables de este fenotipo y como control positivo se utilizó la cepa ATCC 49247 con fenotipo BLNAR. También se amplificó el mismo gen en las cepas ATCC 33930 y BUAP28 con fenotipo BLPAR con la finalidad de usar estas cepas como controles negativos.

Figura 8. Fragmentos generados para el análisis del gen *ftsI* con tres pares de oligonucleótidos.



Para obtener el gen *ftsI* completo se amplificaron tres fragmentos del gen usando tres pares de oligonucleótidos, dos de ellos descritos en la bibliografía (fragmentos

2 y 3, morado y verde respectivamente) que amplifican el extremo carboxilo (Figura 8) con tamaños de 416 y 551 pb, y un par más que se diseñó para este estudio, y amplificar un fragmento 3 (azul) que incluya el extremo amino terminal de 1049 pb. Todas las cepas estudiadas amplificaron el gen *ftsI* con los tres pares de oligonucleótidos utilizados (Figura 9).

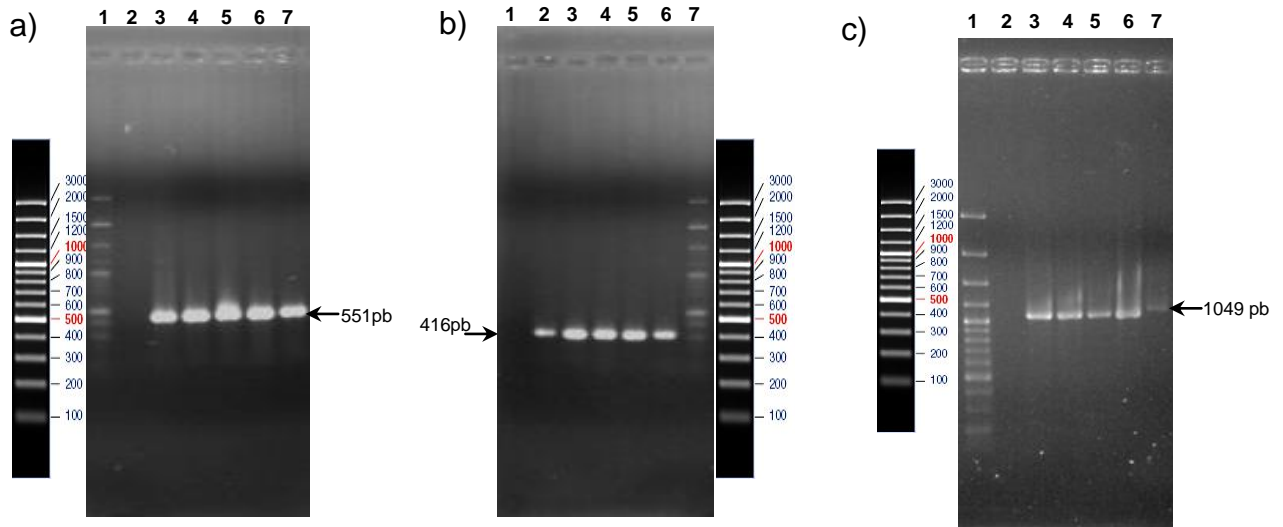


Figura 9. Corrimiento electroforético de los amplificadores del gen *ftsI* en las cepas seleccionadas.

Panel A. Corrimiento electroforético del fragmento 2, que se amplificó por PCR con los oligonucleótidos PBP-3-2 que amplifica parte de la región carboxílica de la proteína PBP-3 con un tamaño esperado de 551 pb. Carril 1: marcador molecular, Carril 2: control negativo, Carril 3: cepa ATCC 49247 (control positivo), Carril 4: ATCC 33930, Carril 5: BUAP28, Carril 6: BUAPNan y Carril 7: BUAP172178. **Panel B.** Corrimiento electroforético del fragmento 3, que se amplificó por PCR con los oligonucleótidos PBP-3-3 que amplifica el extremo carboxílico de la proteína PBP3 con un tamaño esperado de 416 pb. Carril 1: control negativo, Carril 2: cepa ATCC 49247 (control positivo), Carril 3: ATCC 33930, Carril 4: BUAP28, Carril 5: BUAPNan, Carril 6: BUAP172178 y Carril 7: marcador de peso molecular. **Panel C.** Corrimiento electroforético del fragmento 1, que se amplificó por PCR con los oligonucleótidos PBP-3-1 que amplifica el extremo amino terminal de la proteína PBP-3 con un tamaño esperado de 1049 pb. Carril 1: marcador molecular, Carril 2: control negativo, Carril 3: cepa ATCC 49247 (control positivo), Carril 4: ATCC 33930, Carril 5: BUAP28, Carril 6: BUAPNan y Carril 7: BUAP172178

7.5. Secuenciación del gen *ftsI*

Para determinar si la resistencia a los β-lactámicos en estas cepas de *H. influenzae* se debe a cambios en la secuencia de la proteína PBP-3, se mandó a secuenciar el gen *ftsI* y se realizaron los alineamientos con la proteína de unión a penicilina tipo 3 de la cepa RdkW20 de *H. influenzae* (GeneBank NP_439290.1) y se determinaron los cambios a nivel de secuencia nucleotídica y aminoacídica.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas fue realizado usando el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), este análisis reveló la presencia de múltiples mutaciones sobre todo para la cepa BUAP172178 presentando un porcentaje de identidad del 92% con la cepa control, mientras que en las otras tres cepas fue del 98%.

Figura 10. Alineamiento nucleotídico del gen *ftsI* con la secuencia del GenBank NP_439290.1 de la cepa RdkW20 de *Haemophilus influenzae*.

Rdkw20	CGTGGACGTTATATGCTTTCTACGGTTCTTATTTTACTTGGCCTGTGTGCTTTAGTCGCA	180
BUAP28	CGTGGACGTTATATGCTTTCTACGGTTCTTATTTTACTGGCTGTGTGCTTTAGTCGCA	180
33930	CGTGGACGTTATATGCTTTCTACGGTTCTTATTTTACTCGGCTGTGTGCTTTAGTCGCA	180
BUAPNan	CGTGGACGTTATATGCTTTCTACGGTTCTTATTTTACTGGCTGTGTGCTTTAGTCGCA	180
BUAP172178	-----CTACGGTTCTTATTTTACTGGCTGTGTGCTTTAGTCGCA	41
	***** ** *****	
Rdkw20	CGAGCAGCTTATGTTCAATCTATTAATGCCGATACGTTATCGAATGAAGCGGATAAGCGT	240
BUAP28	CGAGCAGCTTATGTTCAATCTATTAATGCCGATACGTTATCGAATGAAGCGGATAAGCGT	240
33930	CGAGCAGCTTATGTTCAATCTATTAATGCCGATACGTTATCGAATGAAGCGGATAAGCGT	240
BUAPNan	CGAGCAGCTTATGTTCAATCTATTAATGCCGATACGTTATCGAATGAAGCGGATAAGCGT	240
BUAP172178	CGAGCAGCTTATGTTCAATCTATTAATGCCGATACGTTATCGAATGAAGCGGATAAGCGT	101
	***** *****	
Rdkw20	GAAAATTCGCTTGCGGATAAAGAACGAATTGCAGCTTTAGCCGAAGAATTAGGTATGACT	420
BUAP28	GAAAATTCGCTTGCGGATAAAGAACGAATTGCAGCTTTAGCCGAAGAATTAGGTATGACT	420
33930	GAAAATTCGCTTGCGGATAAAGAACGAATTGCAGCTTTAGCCGAAGAATTAGGTATGACT	420
BUAPNan	GAAAATTCGCTTGCGGATAAAGAACGAATTGCAGCTTTAGCCGAAGAATTAGGTATGACT	420
BUAP172178	GAAAATTCGCTTGCGGATAAAGAACGAATTGCAGCTTTAGCCGAAGAATTAGGTATGACT	281
	***** *****	
Rdkw20	GAAAATGATTTAGTGAAAAAATTGAGAAAAATTCATAATCTGGTTATTTGTATTTAGCA	480
BUAP28	GAAAATGATTTAGTGAAAAAATTGAGAAAAATTCATAATCTGGTTATTTGTATTTAGCA	480
33930	GAAAATGATTTAGTGAAAAAATTGAGAAAAATTCATAATCTGGTTATTTGTATTTAGCA	480
BUAPNan	GAAAATGATTTAGTGAAAAAATTGAGAAAAATTCATAATCTGGTTATTTGTATTTAGCA	480
BUAP172178	GAAAATGATTTAGTGAAAAAATTGAGAAAAATTCATAATCTGGTTATTTGTATTTAGCA	341
	***** *****	
Rdkw20	CGTCAAGTTGAATTAAGTAAAGCTAACTATATTCGTAGATTAAAAATTAAGGGTATTATT	540
BUAP28	CGTCAAGTTGAATTAAGTAAAGCTAACTATATTCGTAGATTAAAAATTAAGGGTATTATT	540
33930	CGTCAAGTTGAATTAAGTAAAGCTAACTATATTCGTAGATTAAAAATTAAGGGTATTATT	540
BUAPNan	CGTCAAGTTGAATTAAGTAAAGCTAACTATATTCGTAGATTAAAAATTAAGGGTATTATT	540

BUAP172178	CGTCAAGTTGAATTAAGTAAAGCTAACTATATTCGTAATTAAAAATTAAGGGTATTATT 401 *****
Rdkw20	GTTGGTAAAGACGGTTCACGTAAGCTAACTATATTCGTAATTAAAAATTAAGGGTATTATT 720
BUAP28	GTTGGTAAAGACGGTTCACGTAAGCTAACTATATTCGTAATTAAAAATTAAGGGTATTATT 720
33930	GTTGGTAAAGACGGTTCACGTAAGCTAACTATATTCGTAATTAAAAATTAAGGGTATTATT 720
BUAPNan	GTTGGTAAAGACGGTTCACGTAAGCTAACTATATTCGTAATTAAAAATTAAGGGTATTATT 720
BUAP172178	GTTGGTAAAGACGGTTCACGTAAGCTAACTATATTCGTAATTAAAAATTAAGGGTATTATT 581 *****
Rdkw20	CAATCTATGGTGTATCGTGAGATTAATAAGCGGGTCTGAGAATAATGCTGAGTCTGGT 840
BUAP28	CAATCTATGGTGTATCGTGAGATTAATAAGCGGGTCTGAGAATAATGCTGAGTCTGGT 840
33930	CAATCTATGGTGTATCGTGAGATTAATAAGCGGGTCTGAGAATAATGCTGAGTCTGGT 840
BUAPNan	CAATCTATGGTGTATCGTGAGATTAATAAGCGGGTCTGAGAATAATGCTGAGTCTGGT 840
BUAP172178	CAATCTATGGTGTATCGTGAGATTAATAAGCGGGTCTGAGAATAATGCTGAGTCTGGT 701 * *****
Rdkw20	ACTGCGGTGTAGTTGATGTTTCGAACAGGGGAAGTGTAGCTATGGCGACTGCGCCCTCT 900
BUAP28	ACTGCGGTGTAGTTGATGTTTCGAACAGGGGAAGTGTAGCTATGGCGACTGCGCCCTCT 900
33930	ACTGCGGTGTAGTTGATGTTTCGAACAGGGGAAGTGTAGCTATGGCGACTGCGCCCTCT 900
BUAPNan	ACTGCGGTGTAGTTGATGTTTCGAACAGGGGAAGTGTAGCTATGGCGACTGCGCCCTCT 900
BUAP172178	ACTGCGGTGTAGTTGATGTTTCGAACAGGGGAAGTGTAGCTATGGCGACTGCGCCCTCT 761 *****
Rdkw20	TATAATCCAAACAACCGTGTGCGCGTGAATCAGAGTAAATGCGTAACCGTGAATTACC 960
BUAP28	TATAATCCAAACAACCGTGTGCGCGTGAATCAGAGTAAATGCGTAACCGTGAATTACC 960
33930	TATAATCCAAACAACCGTGTGCGCGTGAATCAGAGTAAATGCGTAACCGTGAATTACC 960
BUAPNan	TATAATCCAAACAACCGTGTGCGCGTGAATCAGAGTAAATGCGTAACCGTGAATTACC 960
BUAP172178	TATAATCCAAACAACCGTGTGCGCGTGAATCAGAGTAAATGCGTAACCGTGAATTACC 821 ** *****
Rdkw20	GATACTTTTGAGCCAGGTCTACGGTAAACCTTTCGTTGTTTTAACCGCACTTCAACGA 1020
BUAP28	GATACTTTTGAGCCAGGTCTACGGTAAACCTTTCGTTGTTTTAACCGCACTTCAACGA 1020
33930	GATACTTTTGAGCCAGGTCTACGGTAAACCTTTCGTTGTTTTAACCGCACTTCAACGA 1020
BUAPNan	GATACTTTTGAGCCAGGTCTACGGTAAACCTTTCGTTGTTTTAACCGCACTTCAACGA 1020
BUAP172178	GATACTTTTGAGCCAGGTCTACGGTAAACCTTTCGTTGTTTTAACCGCACTTCAACGA 881 *****
Rdkw20	GGTGTAGTTAAACGAGATGAAATATTGATACTACGTCCTTTAAATTAAGCGGTAAAGAA 1080
BUAP28	GGTGTAGTTAAACGAGATGAAATATTGATACTACGTCCTTTAAATTAAGCGGTAAAGAA 1080
33930	GGTGTAGTTAAACGAGATGAAATATTGATACTACGTCCTTTAAATTAAGCGGTAAAGAA 1080
BUAPNan	GGTGTAGTTAAACGAGATGAAATATTGATACTACGTCCTTTAAATTAAGCGGTAAAGAA 1080
BUAP172178	GGTGTAGTTAAACGAGATGAAATATTGATACTACGTCCTTTAAATTAAGCGGTAAAGAA 941 *****
Rdkw20	ATTGTGGACGTTGACCCAGTGTCTCAGCAAACCTTAGACGAGATTTAATGAACCTTAGT 1140
BUAP28	ATTGTGGACGTTGACCCAGTGTCTCAGCAAACCTTAGACGAGATTTAATGAACCTTAGT 1140
33930	ATTGTGGACGTTGACCCAGTGTCTCAGCAAACCTTAGACGAGATTTAATGAACCTTAGT 1140
BUAPNan	ATTGTGGACGTTGACCCAGTGTCTCAGCAAACCTTAGACGAGATTTAATGAACCTTAGT 1140
BUAP172178	ATTGTGGACGTTGACCCAGTGTCTCAGCAAACCTTAGACGAGATTTAATGAACCTTAGT 1001 *****
Rdkw20	AACCGTGGTGAAGTCGTCTTGCAATACGATAGCCACCTAGTGCATTAATGGAACTTAT 1200
BUAP28	AACCGTGGTGAAGTCGTCTTGCAATACGATAGCCACCTAGTGCATTAATGGAACTTAT 1200
33930	AACCGTGGTGAAGTCGTCTTGCAATACGATAGCCACCTAGTGCATTAATGGAACTTAT 1200
BUAPNan	AACCGTGGTGAAGTCGTCTTGCAATACGATAGCCACCTAGTGCATTAATGGAACTTAT 1200
BUAP172178	AACCGTGGTGAAGTCGTCTTGCAATACGATAGCCACCTAGTGCATTAATGGAACTTAT 1061 *****
Rdkw20	CAAAATGCAGGTTTAAGTAAACCGACAGATTTAGGCTTGATCGGAGAGCAAGTTGGGATT 1260
BUAP28	CAAAATGCAGGTTTAAGTAAACCGACAGATTTAGGCTTGATCGGAGAGCAAGTTGGGATT 1260
33930	CAAAATGCAGGTTTAAGTAAACCGACAGATTTAGGCTTGATCGGAGAGCAAGTTGGGATT 1260
BUAPNan	CAAAATGCAGGTTTAAGTAAACCGACAGATTTAGGCTTGATCGGAGAGCAAGTTGGGATT 1260
BUAP172178	CAAAATGCAGGTTTAAGTAAACCGACAGATTTAGGCTTGATCGGAGAGCAAGTTGGGATT 1121 *****
Rdkw20	TTGAATGCAAAATCGTAAACCGTGGGCAGATATTGAGCGTGAACAGTCGCTTATGGTTAT 1320
BUAP28	TTGAATGCAAAATCGTAAACCGTGGGCAGATATTGAGCGTGAACAGTCGCTTATGGTTAT 1320
33930	TTGAATGCAAAATCGTAAACCGTGGGCAGATATTGAGCGTGAACAGTCGCTTATGGTTAT 1320
BUAPNan	TTGAATGCAAAATCGTAAACCGTGGGCAGATATTGAGCGTGAACAGTCGCTTATGGTTAT 1320
BUAP172178	TTGAATGCAAAATCGTAAACCGTGGGCAGATATTGAGCGTGAACAGTCGCTTATGGTTAT 1181

```

** ***** ***** ***** ** **** ** * *****

Rdkw20      GGTATTACTGCGACACCTTTACAAATTGCTCGTGCCTATGCAACCCTTGGTAGTTTCGGT 1380
BUAP28      GGTATTACTGCGACACCTTTACAAATTGCTCGTGCCTATGCAACCCTTGGTAGTTTCGGT 1380
33930      GGTATTACTGCGACACCTTTACAAATTGCTCGTGCCTATGCAACCCTTGGTAGTTTCGGT 1380
BUAPNan     GGTATTACTGCGACACCTTTACAAATTGCTCGTGCCTATGCAACCCTTGGTAGTTTCGGT 1380
BUAP172178 GGTATTACTGCGACACCTTTACAAATTGCTCGTGCCTATGCAACCCTTGGTAGTTTCGGT 1241
***** * ***** ***** ***** ** **** ** * *****

Rdkw20      GTTTATCGTCCGCTTTCTATCACTAAAGTTGATCCGCCAGTTATTGGGAAACGGGTTTTTC 1440
BUAP28      GTTTATCGTCCGCTTTCTATCACTAAAGTTGATCCGCCAGTTATTGGGAAACGGGTTTTTC 1440
33930      GTTTATCGTCCGCTTTCTATCACTAAAGTTGATCCGCCAGTTATTGGGAAACGGGTTTTTC 1440
BUAPNan     GTTTATCGTCCGCTTTCTATCACTAAAGTTGATCCGCCAGTTATTGGGAAACGGGTTTTTC 1440
BUAP172178 GTTTATCGTCCGCTTTCTATCACTAAAGTTGATCCGCCAGTTATTGGGAAACGGGTTTTTC 1301
***** * ***** ***** *****

Rdkw20      AATGGACATTATGTAAATAAGTATGTGGCATTACTGCGGGTATTGCACCAATTAGTGAT 1620
BUAP28      AATGGACATTATGTAAATAAGTATGTGGCATTACTGCGGGTATTGCACCAATTAGTGAT 1620
33930      AATGGACATTATGTAAATAAGTATGTGGCATTACTGCGGGTATTGCACCAATTAGTGAT 1620
BUAPNan     AATGGACATTATGTAAATAAGTATGTGGCATTACTGCGGGTATTGCACCAATTAGTGAT 1620
BUAP172178 AATGGACATTATGTAAATAAGTATGTGGCATTACTGCGGGTATTGCACCAATTAGTGAT 1481
***** *****

Rdkw20      CCTCGTTATGCATTAGTGGTTTTGATCAATGATCCAAAAGCAGGAGAATATTATGGTGGT 1680
BUAP28      CCTCGTTATGCATTAGTGGTTTTGATCAATGATCCAAAAGCAGGAGAATATTATGGTGGT 1680
33930      CCTCGTTATGCATTAGTGGTTTTGATCAATGATCCAAAAGCAGGAGAATATTATGGTGGT 1680
BUAPNan     CCTCGTTATGCATTAGTGGTTTTGATCAATGATCCAAAAGCAGGAGAATATTATGGTGGT 1680
BUAP172178 CCTCGTTATGCATTAGTGGTTTTGATCAATGATCCAAAAGCAGGAGAATATTATGGTGGT 1541
***** *****

Rdkw20      CCGCAAGATGCTGAAGCAGCTGAAAACACAACAACGAAAAGTGCAAAACGTATTGTTTTAT 1800
BUAP28      CCGCAAGATGCTGAAGCAGCTGAAAACACAACAACGAAAAGTGCAAAACGTATTGTTTTAT 1800
33930      CCGCAAGATGCTGAAGCAGCTGAAAACACAACAACGAAAAGTGCAAAACGTATTGTTTTAT 1800
BUAPNan     CCGCAAGATGCTGAAGCAGCTGAAAACACAACAACGAAAAGTGCAAAACGTATTGTTTTAT 1800
BUAP172178 CCGCAAGATGCTGAAGCAGCTGAAAACACAACAACGAAAAGTGCAAAACGTATTGTTTTAT 1661
***** *****

Rdkw20      ATTGGCGAACACAAGAATCAAAAAGTGAATTAA 1833
BUAP28      AT----- 1802
33930      ATTGGCGAACACAAGAA----- 1817
BUAPNan     ATTGGCGAACACAAGAATCA----- 1820
BUAP172178 ATTGGCGAACACAAGAATCA----- 1681

```

**

Las regiones señaladas indican lo siguiente:

Cambios de nucleótido

Las bases 1 a 120, 241 a 360, 541 a 660, 721 al 780. 1441 al 1560 y 1681 a 1740 no se muestran debido a que no presentarían cambios nucleotídicos en todas las cepas estudiadas.

Al realizar el alineamiento aminoácido, las cepas BUAPNan y ATCC 33930 tuvieron cambios en la región amino terminal de la proteína PBP-3 (P31S, E141K, R173K y A239E) los cuales no corresponden a residuos del dominio catalítico de la proteína, la proteína de la cepa BUAP172178 presentó algunas de esas sustituciones además de la S122W y la Q261L, en el caso de la PBP-3 de la cepa BUAP28 solo presentó la mutación P31S. Mientras que en la región catalítica de la PBP-3, la proteína de la cepa BUAP172178 presentó muchas sustituciones,

siendo las mas importantes K344R, I348V, y D350N dentro del dominio STVK, y los cambios aminoacidicos T352G, K355T, L356V, A368P y M377I encontradas dentro del motivo SSN, clasificadas dentro del grupo IIb de acuerdo a la clasificación de Dabernat (Dabernat *et al.*, 2002). Para el caso de las cepas BUAPNan y BUAP28 sus proteínas solo presentaron las mutaciones A434V y V547I respectivamente, estos residuos se ubican cercanos al motivo conservado KTG, la sustitución de A434V no ha sido descrita hasta el momento. En la cepa ATCC 33930 la PBP-3 no presento cambios en la región carboxilo terminal. (Figura 11).

Figura 11. Alineamiento aminoacídico con la PBP-3 de la secuencia del GenBank NP_439290.1 de la cepa RdkW20

```

Rdkw20      MVKFNSSRKSGKSKKTIRKLTAPETVKQNKPKQVFEEKCFMRGRYMLSTVLILLGLCALVA 60
BUAP28      MVKFNSSRKSGKSKKTIRKLTAPETVKQNKPKQVFEEKCFMRGRYMLSTVLILLGLCALVA 60
33930       MVKFNSSRKSGKSKKTIRKLTAPETVKQNKPKQVFEEKCFMRGRYMLSTVLILLGLCALVA 60
BUAPNan     MVKFNSSRKSGKSKKTIRKLTAPETVKQNKPKQVFEEKCFMRGRYMLSTVLILLGLCALVA 60
BUAP172178 -----TVLILLGLCALVA 13
                                     *****

Rdkw20      RAAVYQSINADTLSNEADKRSRLKDEVLSVRGSIILDRNGQLLSVSVPMASIVADPKTMLK 120
BUAP28      RAAVYQSINADTLSNEADKRSRLKDEVLSVRGSIILDRNGQLLSVSVPMASIVADPKTMLK 120
33930       RAAVYQSINADTLSNEADKRSRLKDEVLSVRGSIILDRNGQLLSVSVPMASIVADPKTMLK 120
BUAPNan     RAAVYQSINADTLSNEADKRSRLKDEVLSVRGSIILDRNGQLLSVSVPMASIVADPKTMLK 120
BUAP172178 RAAVYQSINADTLSNEADKRSRLKDEVLSVRGSIILDRNGQLLSVSVPMASIVADPKTMLK 73
                                     *****

Rdkw20      ENSLADKERIAALAEELGMTENDLVKKIEKNSKSGYLYLARQVELSKANYIRRLKIKGII 180
BUAP28      ENSLADKERIAALAEELGMTENDLVKKIEKNSKSGYLYLARQVELSKANYIRRLKIKGII 180
33930       ENSLADKERIAALAEELGMTENDLVKKIEKNSKSGYLYLARQVELSKANYIRRLKIKGII 180
BUAPNan     ENSLADKERIAALAEELGMTENDLVKKIEKNSKSGYLYLARQVELSKANYIRRLKIKGII 180
BUAP172178 ENLADKERIAALAEELGMTENDLVKKIEKNSKSGYLYLARQVELSKANYIRRLKIKGII 133
                                     ** *****

Rdkw20      LETEHRRFYPRVEEAHVVGTYDIDNGIEGIEKSFNSLLVGKDGSRVTRKDKRGNIVAH 240
BUAP28      LETEHRRFYPRVEEAHVVGTYDIDNGIEGIEKSFNSLLVGKDGSRVTRKDKRGNIVAH 240
33930       LETEHRRFYPRVEEAHVVGTYDIDNGIEGIEKSFNSLLVGKDGSRVTRKDKRGNIVAH 240
BUAPNan     LETEHRRFYPRVEEAHVVGTYDIDNGIEGIEKSFNSLLVGKDGSRVTRKDKRGNIVAH 240
BUAP172178 LETEHRRFYPRVEEAHVVGTYDIDNGIEGIEKSFNSLLVGKDGSRVTRKDKRGNIVAH 193
                                     *****

Rdkw20      ISDEKKYDAQDVTLSIDEKLSMVYREIKKAVSENNAESGTAVLVDVRTGEVLAMATAPS 300
BUAP28      ISDEKKYDAQDVTLSIDEKLSMVYREIKKAVSENNAESGTAVLVDVRTGEVLAMATAPS 300
33930       ISDEKKYDAQDVTLSIDEKLSMVYREIKKAVSENNAESGTAVLVDVRTGEVLAMATAPS 300
BUAPNan     ISDEKKYDAQDVTLSIDEKLSMVYREIKKAVSENNAESGTAVLVDVRTGEVLAMATAPS 300
BUAP172178 ISDEKKYDAQDVTLSIDEKLSMVYREIKKAVSENNAESGTAVLVDVRTGEVLAMATAPS 253
                                     *****

Rdkw20      YNPNNRVGVKSELMRNRAITDTFEPGSTVKPFVVLTAQQRGVVVRDEIIDTTSFKLSGKE 360
BUAP28      YNPNNRVGVKSELMRNRAITDTFEPGSTVKPFVVLTAQQRGVVVRDEIIDTTSFKLSGKE 360
33930       YNPNNRVGVKSELMRNRAITDTFEPGSTVKPFVVLTAQQRGVVVRDEIIDTTSFKLSGKE 360
BUAPNan     YNPNNRVGVKSELMRNRAITDTFEPGSTVKPFVVLTAQQRGVVVRDEIIDTTSFKLSGKE 360
BUAP172178 YNPNNRVGVKSELMRNRAITDTFEPGSTVKPFVVLTAQQRGVVVRDEIIDTTSFKLSGKE 313
                                     *****

```


extracto de levadura al 2%. Además, con el objetivo de analizar si la presión de selección por ampicilina es un factor que intervenga en la modificación en la expresión del gen *bla*_{TEM}, los experimentos de qRT-PCR en tiempo real se realizaron utilizando cepas que fueron crecidas en medios de cultivo bajo dos condiciones; una añadiendo 2 µg/ml de ampicilina y otra sin añadir antibiótico.

Se determinó la expresión relativa del gen *bla*_{TEM} en las cuatro cepas estudiadas ATCC 33930 (con promotor P3), las cepas BUAP28 y BUAPNan (con promotores tipo Pdel) y la cepa BUAP172178 (con promotor Pa/Pb). Para este análisis, la condición usada como parámetro fue la expresión del gen *bla*_{TEM} en la cepa ATCC 33930 crecidas en medios de cultivo con ampicilina y sin ampicilina, respectivamente.

En los paneles A y B de la figura 12, se muestra que las cepas BUAPNan, BUAP28 y BUAP172178 tienen una expresión incrementada del gen *bla*_{TEM} con respecto a la expresión de gen en la cepa ATCC 33930 en condiciones de crecimiento sin ampicilina.

El perfil de expresión del gen *bla*_{TEM} se modifica dependiendo del medio de cultivo que se emplee para crecer a *H. influenzae*, ya que como se puede observar en la figura 12, la cepa BUAP28 es la que presenta mayor expresión del gen de la β-lactamasa cuando es crecida en el medio de cultivo es el BHI con Fildes (Figura 12A) mientras que al ser crecidas con el medio de cultivo BHI suplementado con NAD y hemina, la cepa BUAP172178 es la que tiene mayor expresión y los niveles de expresión se incrementan para todas (Figura 12B).

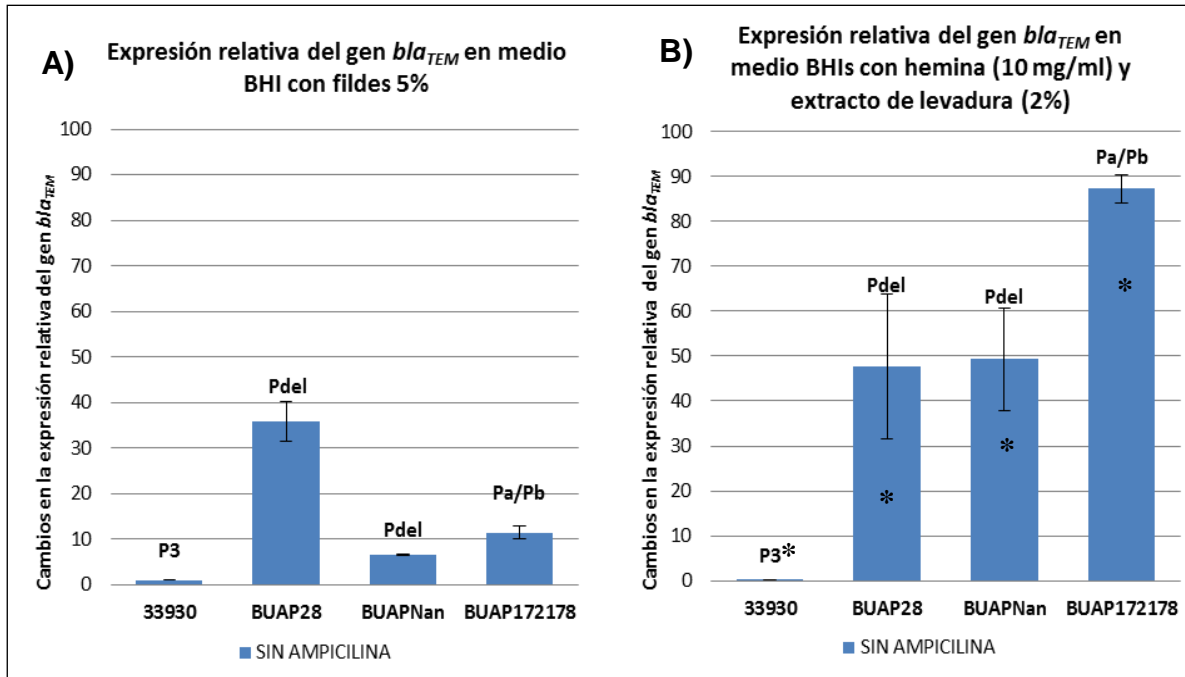


Figura 12. Comparación de la expresión relativa del gen bla_{TEM} a partir de los promotores P3, Pdel y Pa/Pb. Las cepas se crecieron en dos medios de cultivo diferentes sin ampicilina: medio BHI con Filices 5% (Panel A) y en medio BHI suplementado con 10 mg/ml de hemina y 2% de extracto de levadura (Panel B). La expresión del gen bla_{TEM} de la cepa ATCC 33930 (promotor P3) fue utilizada como parámetro para realizar las comparaciones.* Los valores fueron divididos entre 100 para mejor comparación entre los datos.

Cuando se hace éste análisis usando la condición de crecimiento en presencia de ampicilina, la cepa BUAP172178 es la que tiene la expresión más elevada del gen bla_{TEM} en ambos medios de cultivo, mientras que la cepa ATCC 33930 aparentemente es la de menor expresión (figura 13A y 13B).

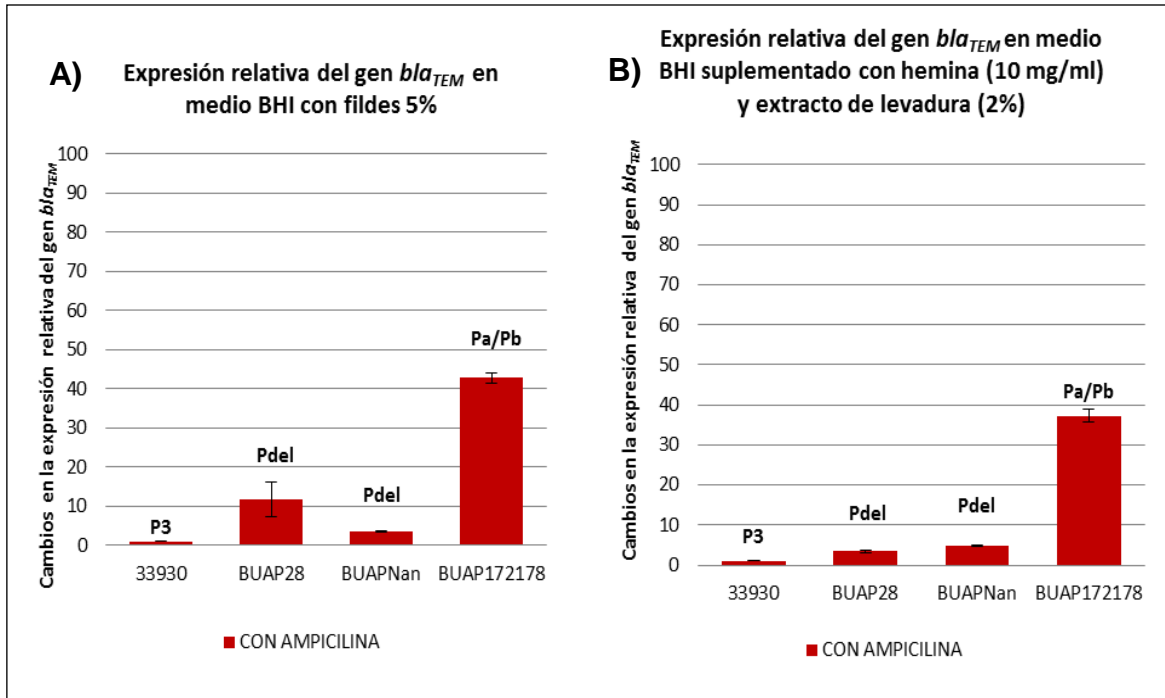


Figura 13. Comparación de la expresión relativa del gen bla_{TEM} en presencia de ampicilina a partir de los promotores P3, Pdel y Pa/Pb. Las cepas se crecieron en dos medios de cultivo diferentes añadiendo a cada uno de ellos 2 μ g/ml de ampicilina: medio BHI con Fildes 5% (Panel A) y en medio BHI suplementado con 10 mg/ml de hemina y 2% de extracto de levadura (Panel B). La expresión del gen en la cepa ATCC 33930 (promotor P3) fue utilizada como parámetro para realizar las comparaciones.

Para conocer si la ampicilina es un factor que induce la expresión del gen bla_{TEM} , se realizó el análisis de expresión del gen de cada cepa de forma individual, bajo dos condiciones: a) sin ampicilina y b) con ampicilina; teniendo como parámetro la expresión del gen cuando se crece la bacteria en medio sin ampicilina y se comparó contra la expresión del gen cuando se crece en presencia de ampicilina, para saber si esta se incrementa o disminuye con la presencia del antibiótico. Esta evaluación se realizó con cada uno de los medios de cultivo probados (figura 14).

En las cepas ATCC 33930 (promotor P3), BUAP172178 (promotor Pa/Pb) y BUAPNan (promotor Pdel) se observa que la expresión del gen *bla*_{TEM} se incrementa en presencia de ampicilina en ambos medios de cultivo utilizados, por el contrario, en la cepa BUAP28 (promotor Pdel) la expresión disminuye cuando a los medios de cultivo se les añade ampicilina (figura 14). Aunque la desviación estándar en el medio de BHIs con hemina y EL en las cepas BUAP28 y BUAPNan, es muy cercana en ambas condiciones de crecimiento. Es importante mencionar que en esta figura se encuentran dos grupos diferentes de cepas clasificadas fenotípicamente como β-lactamasas positivo ampicilina resistente (ATCC 33930 y BUAP28) y β-lactamasa positivo ácido clavulánico resistentes (BUAP172178 y BUAPNan). Las primeras dos cepas a pesar de poseer el mismo fenotipo de resistencia, tienen un comportamiento inverso en cuanto a la expresión del gen en presencia de ampicilina; mientras que en las BLPACR, se incrementa la expresión bajo la presencia de ampicilina a pesar de que poseen promotores diferentes.

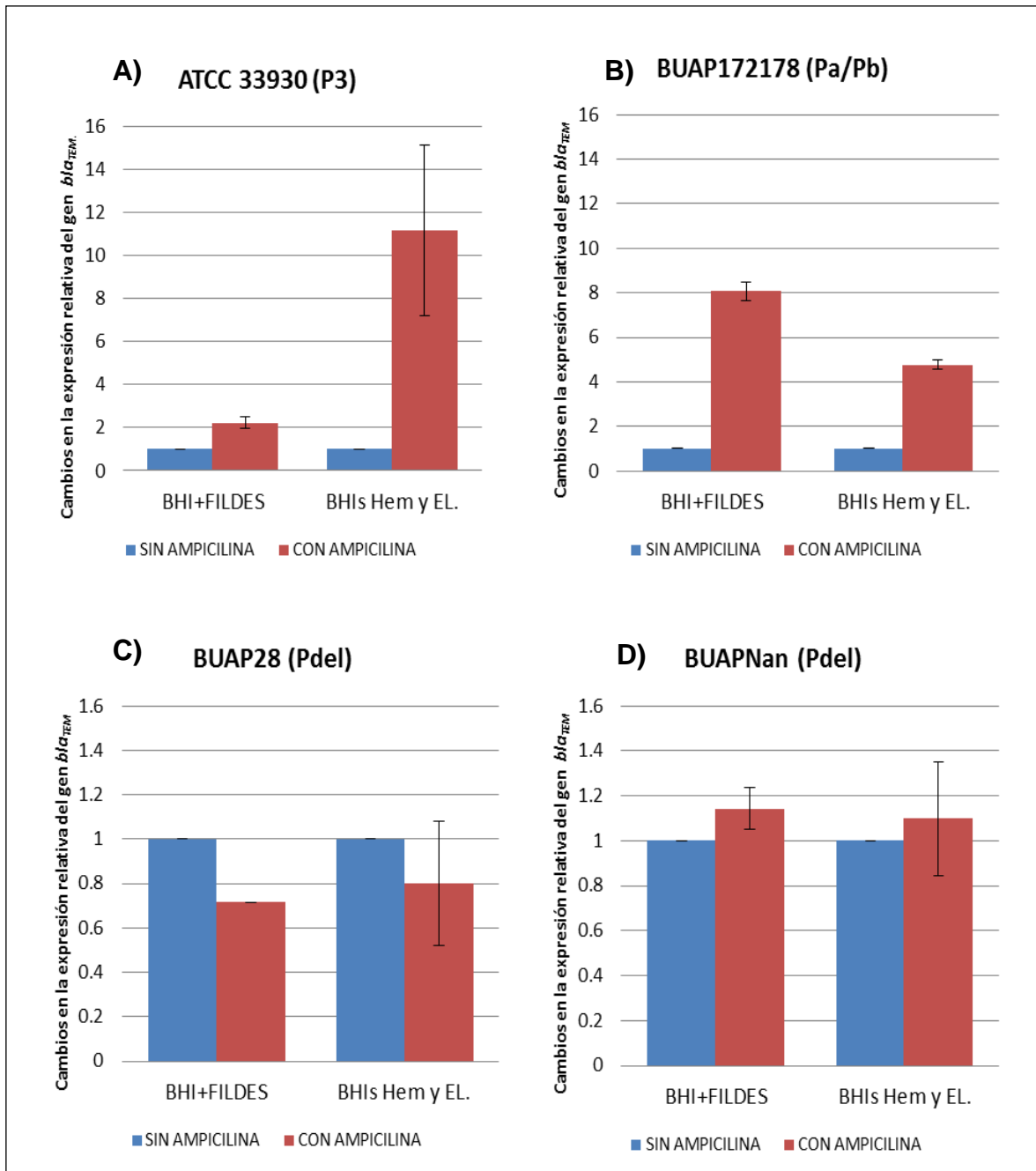


Figura 14. Influencia de la ampicilina sobre la expresión del gen bla_{TEM} en cada cepa para los tres promotores. Las cepas fueron crecidas en dos condiciones de cultivo diferentes añadidas o no con ampicilina: BHI con Fildes 5% y BHIs con hemina (10 mg/ml) y extracto de levadura (2%). Cada panel muestra los cambios en la expresión del gen en respuesta a la presencia del antibiótico para las cepas ATCC33930 (BLPAR), BUAP28 (BLPAR), BUAPNan (BLPACR) y BUAP172178 (BLPACR).

8. DISCUSIÓN

En el análisis de la determinación cuantitativa de la resistencia a los β -lactámicos se observó que todas las cepas fueron resistentes a ampicilina, obteniendo valores de CMI desde 8 hasta más de 128 $\mu\text{g/ml}$, además cuatro cepas fueron resistentes a amoxicilina con valores de 8 hasta 64 $\mu\text{g/ml}$, sugiriendo que probablemente las cepas estudiadas poseen la β -lactamasa TEM-1 descrita para *H. influenzae*, hecho que fue consistente al obtener el amplificado del gen *bla*_{TEM} en las cepas BUAPNan, BUAP28, BUAP172178 y ATCC33930; sin embargo la presencia del gen que codifica la β -lactamasa TEM-1 no correlaciona con los diferentes valores de CMI hacia ampicilina entre las cepas estudiadas, por lo que deben existir otros factores que influyan en el nivel de resistencia. Diferentes autores han descrito que el incremento de la resistencia a ampicilina en *H. influenzae* y a otros β -lactámicos en Enterobacterias se debe a cambios presentes en la región reguladora y en la región codificante del gen *bla*_{TEM}; los cambios en la región estructural del gen llevan a la producción de BLEES en Enterobacterias; sin embargo en *H. influenzae* no se ha confirmado la presencia de este tipo de β -lactamasas, una explicación a este hecho es quizás, a que este género bacteriano posee una membrana plasmática relativamente permeable a los β -lactámicos, por lo que una BLEE posiblemente no sea muy eficaz para incrementar la resistencia hacia este grupo de antibióticos (Tristram y Burdach, 2007). Por lo tanto, *H. influenzae* debe utilizar otras formas de incrementar la resistencia hacia este grupo de antibióticos. Como resultado del análisis del gen *bla*_{TEM} en las cepas usadas en este trabajo, se encontró la presencia de los promotores P3, Pdel y Pa/Pb, indicando que estas variaciones en los promotores son las probables responsables de las diferencias en la expresión del gen *bla*_{TEM}. La presencia de estos diferentes promotores en la región reguladora ha llevado a la hipótesis de que estos, tienen la capacidad de incrementar la cantidad de la enzima β -lactamasa (Chent y Clowes, 1987; Fre *et al.*, 2002; Mary, Compound, y Kong, 1997; Tristram *et al.*, 2007). De acuerdo a los resultados de cuantificación de la

expresión del gen *bla*_{TEM} se encontró que aquellas cepas con los promotores Pdel y Pa/Pb resultaron tener una mayor expresión comparada con el promotor *wild type* (P3), que concuerda con lo descrito por Chen y Clowes en 1984 y 1987, quienes describen la presencia de tres cajas promotoras, P3, Pa y Pb en *H. influenzae* y evalúan la expresión a partir de estos promotores, resultando que el promotor Pa y Pb incrementan hasta 10 y 2 veces, respectivamente la expresión del gen *bla*_{TEM} de forma individual, comparado con el promotor P3 en *E. coli*. Lartigue en 2002, clonó y transformó el gen *bla*_{TEM-1B} junto con su región reguladora de cuatro cepas de *E. coli* cada una conteniendo un promotor diferente y midió la actividad de la β -lactamasa concluyendo que la resistencia a los diferentes antibióticos probados (amoxicilina/ ácido clavulánico, cefalotina, tazobactam y piperacilina) se incrementan con el promotor Pa/Pb al igual que la actividad de la enzima (Fre *et al.*, 2002). De igual manera en un estudio con *K. pneumoniae* se describió la presencia de los promotores Pdel y Pa/Pb en las β -lactamasas de Espectro Extendido TEM-20 y TEM-22, asociado con un incremento de la resistencia a cefalosporinas; en este se propone el incremento de la enzima como respuesta al incremento de la resistencia, sin embargo no muestran otra evidencia que apoye esa teoría. En otro estudio con un número importante de cepas de portadores de *H. influenzae*, se encontraron cepas que contenían una delección de 135 pb, correspondiente con el promotor Pdel del gen *bla*_{TEM} asociado con el aumento de la resistencia a antibióticos como cefaclor y loracarbef en comparación con los aislamientos con promotores normales (Molina *et al.*, 2003). García-Cobos describió por PCR la presencia de diferentes promotores en *H. influenzae*, encontrando que el más común era el Pdel, asociándolo con un mayor incremento de la resistencia a amoxicilina en aquellas cepas que poseían este promotor (García-Cobos *et al.*, 2008^a).

En éste estudio, observamos que las dos cepas con el promotor Pdel fueron más resistentes a la ampicilina, una de ellas fue también resistente a amoxicilina con clavulánico (BUAPNan) pero la cepa que tuvo el valor de CMI de ampicilina más

elevado fue la BUAP172178 que posee el promotor Pa/Pb (CMI >128 µg/ml) siendo hasta 16 veces más resistente que la cepa con el promotor *wid-type* (P3).

Los resultados de la expresión genética de la β-lactamasa en las cepas de trabajo sugieren que aparentemente el promotor Pa/Pb es el que incrementa más la expresión del gen *bla_{TEM}* y quizá esto se deba a que exista un sinergismo entre las dos cajas promotoras Pa/Pb como previamente había sido descrito (Chen *et al.*, 1984), mientras que la expresión incrementada con la presencia del promotor Pdel se deba quizás al incremento de la afinidad de la RNA polimerasa por las cajas promotoras, en donde la caja -35 del promotor Pdel tiene 4 de 6 bases correspondientes a la secuencia consenso, y en la caja -10 hay 5 de 6 bases idénticas a la secuencia consenso (Tabla 9), recordando que la región TA inicial y T terminal están altamente conservadas en la caja -10 y que son cruciales para el reconocimiento del promotor (Feklistov y Darst, 2009; Koo *et al.*, 2009), lo que indicaría una probable causa que incremente la expresión del gen cuando se inicia la transcripción a partir de Pdel.

Tabla 9. Secuencias consenso -35 y -10 con los promotores descritos para el gen *bla_{TEM}*

Promotores	Caja -35						n 16-18 pb	Caja -10					
	T ₈₂	T ₈₄	G ₇₈	A ₆₅	C ₅₄	A ₄₅		T ₈₀	A ₉₅	T ₄₅	A ₆₀	A ₅₀	T ₉₆
Consenso													
P3	t	t	c	a	a	a	17	g	a	c	a	a	t
Pdel	t	t	g	a	a	g	17	t	a	c	a	a	t
Pa	t	t	g	a	a	g	17	t	a	c	g	c	t
Pb	g	t	g	a	t	a	17	t	a	a	t	g	t

Sin embargo, deben existir otras causas que lleven al incremento de la expresión del gen *bla_{TEM}* con el promotor Pdel, como parte de nuestros resultados encontramos que a pesar de que se estudiaron dos cepas con este promotor, los niveles de expresión en el medio enriquecido con Fildes (figura 12A) fueron diferentes entre ellas, pues el gen de la cepa BUAP28 tuvo una expresión casi cuatro veces mayor que la expresión del gen de la cepa BUAPNan, lo que indica que existen características propias y únicas de las cepas que conlleven a un comportamiento diferente, como puede ser el origen de la cepa, la virulencia, la

presión selectiva a la que fue sometida, fenotipo de resistencia, el medio de cultivo, el ambiente, entre otras características. Con base en lo anterior, la cepa BUAP28 proviene de un aislamiento nasofaríngeo de un niño portador, los cuales generalmente son tratados con ampicilina y/ o amoxicilina con inhibidor como el ácido clavulánico, suspendiendo el tratamiento antes de lo debido, permitiendo que la cepa BUAP28 además de poseer la β -lactamasa TEM como único mecanismo de resistencia haya adquirido otras características asociadas a la presencia del gen bla_{TEM} que le permitan responder ante cualquier agresión, indicando que el incremento de la expresión del gen bla_{TEM} sea su herramienta más efectiva para sobrevivir y adaptarse al medio. Mientras que la cepa BUAPNan proviene de líquido cefalorraquídeo y posee dos mecanismos de resistencia (BLPACR), tanto producción de β -lactamasa como la presencia de mutaciones en la proteína PBP-3 lo que hace que no sea necesario incrementar mucho los niveles de expresión de la β -lactamasa, como se ve reflejado en los resultados, sin descartar que pueden existir modificaciones adicionales río arriba de la región reguladora del gen o la probable pérdida de sitios de regulación negativa que se eliminaron por la delección de 135 pb de la región reguladora. Estos últimos datos deben de ser confirmados más adelante, así como la determinación del número de copias presentes del plásmido en las cepas BUAP28 y BUAP172178, que probablemente permitieron ver el incremento en la expresión del gen bla_{TEM} en los ensayos de PCR en tiempo real.

Por otro lado, a pesar de que el gen bla_{TEM} se expresa de forma constitutiva (Bush *et al.*, 1995), la presencia de ampicilina favorece la expresión del gen como lo muestran los resultados con las cepas BUAP172178 y ATCC33930 en la figura 14A y 14B, indicando que los promotores Pa/Pb y P3 son inducibles, lo que hace necesario evaluar cuál sería el mecanismo que lleve al incremento de la expresión del gen bla_{TEM} , uno de ellos podría ser la localización de sitios de regulación positiva que interactúen de manera directa con la ampicilina o con alguna otra molécula asociada a este antibiótico activando la transcripción de manera indirecta. A pesar de que no contamos con más evidencias que apoyen esta

teoría, al observar el mismo comportamiento con ambas cepas en los diferentes medios de cultivo evaluados, podemos suponer como probable la hipótesis arriba mencionada. En las cepas con el promotor Pdel la ampicilina tiene un efecto represor, más evidente en la cepa BUAP28 donde disminuye la expresión del gen *bla*_{TEM}, mientras que en la cepa BUAPNan se observa un débil incremento o se mantiene el nivel expresión. Es necesario evaluar las diferencias genotípicas entre estas dos cepas para poder deducir como es el comportamiento del promotor Pdel, que lo hacen actuar diferente bajo diversas condiciones de crecimiento y entre diferentes cepas.

En este trabajo, pudimos asociar los valores de resistencia con la expresión elevada o disminuida del gen *bla*_{TEM}, donde los valores de CMI de 8, 64, 128 y > 128 µg/ml de ampicilina se asociaron con el incremento de la expresión del gen en las cepas ATCC 33930, BUAPNan, BUAP28 y BUAP172178, respectivamente, donde la cepa ATCC 33930 es la que tiene menor expresión (1) y la BUAP172178 es la que tiene la expresión más elevada (42.7) (Figura 13A). Quizás, los valores CMI de cada cepa no se logran asociar con el comportamiento en la expresión en el otro medio de cultivo (BHIs con hemina y extracto de levadura) (Figura 13B) porque el enriquecimiento del medio usado en la determinación de la CMI fue el Fildes, y no usando la adición por separado de la hemina y el extracto de levadura al medio de cultivo, por lo que sería útil realizar nuevamente la determinación de CMI bajo estas características del medio para saber si el patrón de la expresión se mantiene entre cada cepa de *H. influenzae* estudiada. Poco se sabe sobre la influencia de los suplementos del medio base en la CMI de los antibióticos y tampoco hay evidencia molecular de la influencia de las características del medio de cultivo sobre la actividad de la β-lactamasa; sin embargo, nuestros resultados indican que algunos factores externos o ambientales como es el medio de cultivo, pueden influir sobre el incremento o la disminución en la producción de la β-lactamasa. Muchos autores han discutido la influencia del medio de cultivo en la determinación de la susceptibilidad a los antibióticos, algunos indican que los valores de CMI de aproximadamente 21 antibióticos pueden ser reproducibles

utilizando diferentes medios en *H. influenzae* (Jacobs *et al.*, 2002), otros mencionan que el uso de un medio diferente al HTM (*Haemophilus Test Medium*) que es el establecido por CLSI que contiene Mueller-Hinton, hemina, NAD y extracto de levadura, tiene un efecto mínimo en los resultados de susceptibilidad para los macrólidos, pero no así para la ampicilina sobre todo en cepas BLNAR, donde se presentan grandes discrepancias (Fuchs, Barry, y Brown, 2001). También, se ha demostrado la influencia de 3 medios de cultivo sobre la actividad antibacteriana de diferentes fármacos, encontrando que en aquellos medios que contienen Fildes al 5% no hay variación significativa en la CMI, pero si cambiaba el comportamiento de la cepa y la susceptibilidad al cambiar de suplemento (Bergeron, Simard, y Provencher, 1987), observaciones previas apoyan los resultados obtenidos en este estudio, sin embargo son necesarios estudios adicionales para determinar por qué el comportamiento de las cepas resistentes de *H. influenzae* es diferente en diferentes medios de cultivo. A excepción de cuando se añade ampicilina al medio de cultivo.

Por otro lado, las cepas BLPACR están tomando gran relevancia debido a que su presencia se ha ido incrementando a través de los años en países como Corea, Japón, España y Noruega (García-Cobos *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Skaare *et al.*, 2010), después de su primer reporte en Estados Unidos (Doern *et al.*, 1997). En España, el incremento en la prevalencia del fenotipo BLPACR se ha dado más en niños que en adultos, de acuerdo a un estudio epidemiológico en ese país (Sevillano *et al.*, 2009), esto puede estar asociado con la frecuencia elevada de la colonización de la nasofaringe con múltiples cepas de *H. influenzae* y el consumo más elevado de ácido clavulánico en niños que en adultos (Smith-Vaughan *et al.*, 2009). Existe una gran cantidad de mutaciones en el gen *ftsI*, que generan cambios en la secuencia de la proteína PBP-3 de las cepas BLPACR y BLNAR. En este grupo de cepas los valores de CMI de cefotaxima pueden variar desde 0.006 a 2 mg/L comparado con un máximo de 0.06 mg/L para las cepas BLPAR o cepas sin mecanismos de resistencia hacia los β -lactámicos (Ubukata *et al.*, 2001; Dabernat *et al.*, 2002). Las cepas BLNAR se han clasificado en 3 grupos con base

en las mutaciones que presentan en la PBP-3, siendo las del grupo I como las menos resistentes, y las del grupo III como las cepas con mayores niveles de resistencia. Las cepas con susceptibilidad disminuida a ampicilina se han encontrado comúnmente en los grupos I y II, mientras que las que pertenecen al grupo III fueron normalmente asociadas con altos niveles de resistencia ampicilina, así como a cefalosporinas (Hasegawa *et al.*, 2004; Ubukata *et al.*, 2001; Hasegawa *et al.*, 2003).

También los valores de CMI de amoxicilina son diferentes entre ambos grupos de cepas, 8-32 mg/L en las BLNAR y >64 mg/L en BLPACR, sin encontrar correlación entre la CMI hacia amoxicilina y las mutaciones en la PBP-3 (Matic *et al.*, 2003). Esta relación no existe entre estos dos fenotipos de resistencia debido a que en el fenotipo BLPACR se encuentra la hidrólisis de la amoxicilina por parte de la β -lactamasa, por lo que la resistencia a este antibiótico está mediada por dos mecanismos, mientras que la β -lactamasa no está presente en el fenotipo BLNAR. Las dos cepas BLPACR, BUAPNan y BUAP172178 analizadas en este estudio representan un rango medio de resistencia con valores de 0.125 mg/L y 0.250 mg/L hacia cefotaxima mientras que para amoxicilina/ácido clavulánico es de 32/16 y 16/8 mg/L, respectivamente.

Se ha demostrado que la resistencia a la amoxicilina/ácido clavulánico se debe principalmente a mutaciones en la PBP-3 en aquellas cepas BLNAR. El primer esquema de clasificación de las mutaciones en la PBP-3 correspondía a los grupos I, II y III, encontrando las mutaciones solo de Arg517His o la Asn526Lys en el grupo I, mientras que en grupo II además de la presencia de estas mutaciones también se pueden encontrar algunas otras dentro de los dominios SSN y/o STVK que no afectan tanto la susceptibilidad. Las sustituciones dentro del grupo III están las mutaciones anteriormente mencionadas, además de la Ser385Thr y Met377Ile, que incrementan la resistencia en las cepas BLNAR y BLPACR. Para el 2002, el esquema de clasificación fue modificado parcialmente, agregando subgrupos (a - d) dentro del grupo II (Dabernat *et al.*, 2002). Más recientemente, se describió la

presencia de un nuevo grupo llamado III-like con mutaciones en los motivos KTG y STVK (García-Cobos *et al.*, 2007), adicional a los descritos en el grupo III en Japón (Ubukata *et al.*, 2001) con mutaciones solo en el motivo SSN.

Nuestros resultados muestran que la cepa BUAP172178 (BLPACR) presenta gran cantidad de mutaciones de las cuales solo están reportadas las Lys344Arg, Ile348Val, Asp350Asn, Thr352Gly, Lys355Thr, Leu356Val, Ala368Pro (sustitución original Thr), y Met377Ile, que pueden ser encontradas dentro del grupo III (dentro del motivo SSN). Además, se encontraron mutaciones que aún no han sido descritas, dentro del dominio SSN y STVK. Para la cepa BUAPNan, también BLPACR, se encontró la sustitución A434V que no ha sido reportada y sugerimos que sea evaluada en estudios posteriores, para conocer si esta mutación es la responsable de la resistencia al ácido clavulánico, de la susceptibilidad disminuida hacia las cefalosporinas y de contribuir con la β -lactamasa TEM-1 para incrementar la resistencia a la amoxicilina, aunque no se pueden descartar otros mecanismos como el probable cambio del espectro de resistencia debido a la presencia de otras enzimas no descritas a la fecha, la sobreexpresión de la bomba de eflujo AcrAB o alteraciones en la proteína 2 de membrana externa (OMP2). Diferentes estudios sugieren la posible asociación entre las sustituciones en el motivo SSN (M377I, S85T) y la susceptibilidad disminuida a cefalosporinas (Hasegawa *et al.*, 2004; Sanbongi *et al.*, 2006; García-Cobos *et al.*, 2007). Quizás en nuestro análisis con la cepa BUAP172178 si se determinó la presencia de al menos una de las mutaciones (Met377Ile) que también puede estar asociada a la disminuida susceptibilidad hacia ceftazidima, ceftriaxona y cefepima en esta cepa, sin embargo presenta otras mutaciones que aún no han sido descritas y que puedan estar involucradas en la susceptibilidad hacia este tipo de antibióticos (Barbosa *et al.*, 2011). En la cepa BUAP28 no se clasifico como BLPACR sino como BLPAR debido a que no presento resistencia a la amoxicilina/ácido clavulánico, sin embargo se encontró la mutación Val547Ile dentro del dominio KTG, descrita dentro del grupo I de Dabernat, y que junto con la mutación Asn569Ser son relacionadas con reducida susceptibilidad a ampicilina

con CMI de 128 mg/L en comparación con aquellas cepas que no presentan estas mutaciones (CMI 1 mg/L) (Barbosa *et al.*, 2011). A pesar de que la cepa solo presento una mutación, los valores de CMI hacia ampicilina fueron elevados con 128 mg/L, existiendo dos razones posibles para estos valores de CMI, a) pudiera deberse a la sobreexpresión de la β -lactamasa TEM-1 a partir del promotor Pdel o b) la presencia de la β -lactamasa en conjunto con la mutación Val547Ile.

Por lo tanto, las mutaciones en el gen *ftsI* en *H. influenzae*, llevan a modificaciones en la proteína de unión a penicilina tipo 3 (PBP-3). Esta alteración provoca cambios conformacionales en la PBP-3 que culminan en una afinidad disminuida entre *H. influenzae* y los β -lactámicos, principalmente ampicilina, amoxicilina y amoxicilina con ácido clavulánico. Poco se sabe sobre la función de la región no catalítica de la PBP-3, pero al realizar mutaciones esenciales en este dominio, se sugiere que actúa como un dominio que permite el adecuado plegamiento de la región catalítica, (Wissel *et al.*, 2003), además también se propone que este dominio interactúa con otras proteínas importantes para la función de la proteína PBP-3 y que regula el dominio catalítico y su actividad transpeptidasa (Sauvage *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 1998). Aunque el dominio no catalítico de las proteínas de clase B de unión a penicilina están altamente conservadas (Ghuysen J.M., 1991), no se sabe el rol que juegue en *H. influenzae* y cómo interviene con la susceptibilidad disminuida a los β -lactámicos. Sería lógico pensar que mutaciones en esta región pueden intervenir con la conformación e interacción entre los residuos aminoacídicos de toda la proteína, pero hasta el momento los resultados no son concluyentes en nuestras cepas de trabajo, pues las mutaciones encontradas en las cepas BUAPNan, BUAP33930 y BUAP172178 fueron las mismas (Glu141E, Arg173Lys y Ala239Glu), lo que indicaría que esta región no está influyendo con la resistencia a los β -lactámicos. Sin embargo, sería necesaria la realización de modelamientos moleculares *in silico* de cada una de estas proteínas PBP-3, para conocer más qué tipo de interacciones hay entre la región catalítica y no catalítica.

9. CONCLUSIONES

- Todas las cepas de *H. influenzae* incluidas en este estudio, fueron resistentes a ampicilina aunque con diferentes valores de concentración mínima inhibitoria (8 - 128 µg/ml).
- Las cepas BUAPNan y BUAP172178 (BLPACR), mostraron susceptibilidad disminuida para las cefalosporinas de 3ra y 4ta generación.
- El gen *bla*_{TEM} de las cepas BUAPNan (BLPACR) y BUAP28 (BLPAR) mostró la presencia del promotor Pdel, mientras que el gen de la cepa BUAP172178 (BLPACR) presentó el promotor Pa/Pb.
- Los promotores Pa/Pb y Pdel incrementan la expresión del gen *bla*_{TEM}, independientemente del medio de cultivo; sin embargo, en presencia de ampicilina, el promotor que incrementa más la expresión del gen *bla*_{TEM} es el Pa/Pb con ambos medios de cultivo.
- Independientemente del medio de cultivo, la ampicilina es un factor que influye en la expresión del gen *bla*_{TEM}, a partir de los promotores P3 y Pa/Pb; sin embargo, en las cepas que presentaron el promotor Pdel, los resultados no fueron consistentes.
- La PBP-3 codificada por el gen *ftsI* de las cepas BUAP172178 y BUAPNan (ambas BLPACR), presentaron sustituciones en la región catalítica alrededor del dominio conservado SSN, algunas de ellas no descritas a la fecha.
- La PBP-3 de las cepas ATCC33930 y BUAP28 (ambas BLPAR) y BUAP172178 y BUAPNan (ambas BLPACR) presentaron sustituciones en la región amino terminal, no descritas a la fecha en la bibliografía.

10.PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión del gen *bla*_{TEM} en más cepas de *H. influenzae* con los promotores P_{del} y Pa/P_b para verificar con cual promotor hay mayor o menor expresión y por qué.
- Realizar fusiones transcripcionales con los promotores P_{del}, P₃ y Pa/P_b de *H. influenzae* y medir la expresión del gen *bla*_{TEM} a través de la expresión de un gen reportero en *E. coli*.
- Identificar el inicio de la transcripción a partir de cada promotor.
- Evaluar la afinidad de cada promotor por la RNA polimerasa.
- Evidenciar que el efecto del antibiótico sobre la expresión del transcrito se refleja en la traducción de la β -lactamasa.
- Evaluar el número de copias del plásmido de la β -lactamasa de las cepas BUAP_{Nan}, BUAP28, BUAP172178 y de la ATCC 33930.
- Evaluar si el plásmido de la β -lactamasa de *H. influenzae* se mantiene como plásmido o si se ha integrado al cromosoma.
- Buscar la presencia de β -lactamasas de espectro extendido en las cepas de *H. influenzae* resistentes a los β -lactámicos.
- Modelar cristalográficamente la proteína de unión a penicilina tipo 3 de la cepa BUAP172178 y otras cepas más, para evidenciar alteraciones en el plegamiento que respondan a la variación en la resistencia.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frère, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., Waley, S. G. 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochemical Journal*, 276(Pt 1), 269–270.
- Arlet, G., Goussard, S., & Courvalin, P. 1999. Sequences of the Genes for the TEM-20 , Sequences of the Genes for the TEM-20 , TEM-21 , TEM-22 , and TEM-29 Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24–27.
- Bae, S., Lee, J., Lee, J., Kim, E., Lee, S., Yu, J., & Kang, Y. 2010. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Korea: results of a nationwide acute respiratory infections surveillance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(1), 65–71. doi:10.1128/AAC.00966-09
- Bailey, J. K., Pinyon, J. L., Anantham, S., & Hall, R. M. 2011. Distribution of the *bla*_{TEM} gene and *bla*_{TEM} containing transposons in commensal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66(4), 745–51. doi:10.1093/jac/dkq529
- Barbosa, A. R., Giufrè, M., Cerquetti, M., & Bajanca-Lavado, M. P. 2011. Polymorphism in *ftsI* gene and β -lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of β -lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 66(4), 788–96. doi:10.1093/jac/dkq533
- Belaouaj, A., C. Lapoumeroulie, M. M. Caniça, G. Vedel, P. Nénot, R. Krishnamoorthy, and G. Paul. 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol. Lett.* 120:75-80.

- Bergeron, M. G., Simard, P., & Provencher, P. 1987. Influence of growth medium and supplement on growth of *Haemophilus influenzae* and on antibacterial activity of several antibiotics . *J. Clin. Microbiol.* 25(4):650.
- Bogdanovich, T., Appelbaum, P. C., Ad, M., Menderes, A., Tip, U., & Hemother, A. N. A. G. C. 2006. Effect of Efflux on Telithromycin and Macrolide Susceptibility in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 50(3), 893–898. doi:10.1128/AAC.50.3.893
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. 1995. MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(6), 1211–1233.
- Chen, S., Clowes, R. C., Programs, B., & Box, P. O. 1984. Two improved promoter sequences for the β -lactamase expression arising from a single base-pair substitution. *Nucleics Acid Res.* 12(7), 3219–3234.
- Chent, S., & Clowes, R. C. 1987. Nucleotide Sequence Comparisons of Plasmids pHD131, pJB1 , pFA3 , and pFA7 and , β -Lactamase Expression in *Escherichia coli* , *J. Bacteriol.* 169(7), 3124–3130.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, *CLSI* 2013.
- Dabernat, H., Delmas, C., Seguy, M., Faucon, G., Bennamani, S., Pelissier, R., & Pasquier, C. 2002. Diversity of β -Lactam Resistance-Confering Amino Acid Substitutions in Penicillin-Binding Protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (7), 2208-2218. doi:10.1128/AAC.46.7.2208
- Doern, G. V, Brueggemann, A. B., Pierce, G., & Holley, H. P. 1997. Antibiotic Resistance among Clinical Isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and Detection of β -Lactamase-Positive Strains Resistant to Amoxicillin-Clavulanate : Results of a National Multicenter Surveillance Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(2), 292–297.

- Farrell, D. J., Morrissey, I., Bakker, S., Buckridge, S., & Felmingham, D. 2005. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob Chemother*, 56(4), 773–6. doi:10.1093/jac/dki281
- Feklistov, A., & Darst, S. a. 2009. Promoter recognition by bacterial alternative sigma factors: the price of high selectivity?. *Genes & Development*, 23(20), 2371–5. doi:10.1101/gad.1862609
- Fre, M., Poirel, L., & Nordmann, P. 2002. Promoters P3, Pa/Pb, P4, and P5 Upstream from *bla*_{TEM} GENES and Their Relationship to β -Lactam Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*. 46(12), 4035–4037. doi:10.1128/AAC.46.12.4035
- Fuchs, P. C., Barry, A. L., & Brown, S. D. 2001. Influence of Variations in Test Methods on Susceptibility of *Haemophilus influenzae* to Ampicillin, Azithromycin, Clarithromycin and Telithromycin. *J. Clin. Microbiol*. 39(1), 43–46. doi:10.1128/JCM.39.1.43
- ^aGarcía-Cobos, S., Campos, J., Cercenado, E., Román, F., Lázaro, E., Pérez-Vázquez, M., Oteo, J. 2008. Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* decreased, except for β -lactamase-negative amoxicillin-resistant isolates, in parallel with community antibiotic consumption in Spain from 1997 to 2007. *Antimicrob. Agents Chemother*. 52(8), 2760–6. doi:10.1128/AAC.01674-07
- ^bGarcía-Cobos, S., Campos, J., Román, F., Carrera, C., Pérez-Vázquez, M., Aracil, B., & Oteo, J. 2008. Low beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains are best detected by testing amoxicillin susceptibility by the broth microdilution method. *Antimicrob. Agents Chemother*. 52(7), 2407–14. doi:10.1128/AAC.00214-08
- García-Cobos, S., J. Campos, E. Lázaro, F. Román, E. Cercenado, C. García-Rey, M. Pérez-Vázquez, J. Oteo, and F. de Abajo. 2007. Ampicillin-resistant non- β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51:2564–2573.

- Ghuysen, J.-M. 1991. Serine Beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Ann. Rev. Microbiol.* 45:37–67.
- Hasegawa, K., Chiba, N., Kobayashi, R., Murayama, S. Y., Iwata, S., Sunakawa, K., & Ubukata, K. 2004. Rapidly Increasing Prevalence of β -Lactamase-Nonproducing , Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae* Type b in Patients with Meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(5), 1509–1514. doi:10.1128/AAC.48.5.1509
- Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N., Kobayashi R., Nagai K., Jacobs MR., Appelbaum PC., Sunakawa K., and Ubukata K. 2003. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microbial Drug Resistance* 2003; 9: 39–46.
- Jacobs, M. R., Bajaksouzian, S., Windau, a., Appelbaum, P. C., Lin, G., Felmingham, D., Good, C. E. 2002. Effects of Various Test Media on the Activities of 21 Antimicrobial Agents against *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* 40(9), 3269–3276. doi:10.1128/JCM.40.9.3269-3276.2002
- Jansen, W. T. M., Verel, a, Beitsma, M., Verhoef, J., & Milatovic, D. 2006. Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 58(4), 873–7. doi:10.1093/jac/dkl310
- Kaczmarek, F. S., Gootz, T. D., Dib-hajj, F., Shang, W., Hallowell, S., & Cronan, M. 2004. Genetic and Molecular Characterization of β -Lactamase-Negative Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae* with Unusually High Resistance to Ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(5), 1630–1639. doi:10.1128/.48.5.1630
- Karlowsky, J. A., Verma, G., Zhanel, G. G., & Hoban, D. J. 2000. Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemoter.* 45, 871–875.
- Kim, I.-S., Ki, C.-S., Kim, S., Oh, W. S., Peck, K. R., Song, J.-H., Lee, N. Y. 2007. Diversity of ampicillin resistance genes and antimicrobial susceptibility patterns in *Haemophilus*

- influenzae* strains isolated in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(2), 453–60. doi:10.1128/AAC.00960-06
- Koo, B.-M., Rhodius, V. a, Nonaka, G., deHaseth, P. L., & Gross, C. a. 2009. Reduced capacity of alternative sigmas to melt promoters ensures stringent promoter recognition. *Genes & Development*, 23(20), 2426–36. doi:10.1101/gad.1843709
- Leaves, N. I., Dimopoulou, I., Hayes, I., Kerridge, S., Falla, T., Secka, O., Crook, D. W. M. 2000. JAC Epidemiological studies of large resistance plasmids in *Haemophilus*. *J. Bacteriol.* 599–604.
- Mary, Q., Compound, H., & Kong, H. 1997. Transferable Hyperproduction of TEM-1 β -Lactamase in *Shigella flexneri* Due to a Point Mutation in the Pribnow Box. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(2), 468–470.
- Matic, V., Bozdogan, B., Jacobs, M. R., Ubukata, K., & Appelbaum, P. C. 2003. Contribution of beta-lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in beta-lactamase-positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52(6), 1018–21. doi:10.1093/jac/dkg474
- Millan, S y Rocha-Gracia, R.C. 2012 Caracterización de la resistencia a antibioticos B-lactamicos. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiologicas. BUAP.
- Mirelis, B., & Navarro, F. (n.d.). *Procedimientos en Microbiología Clínica*.
- Molina, J. M., Córdoba, J., Monsoliu, A., Diosdado, N., & Gobernado, M. 2003. Original *Haemophilus influenzae* and betalactam resistance: Description of *bla*_{TEM} gene deletion. *Rev. Esp. Chemother.* 16(Nº 2), 195–203.
- Nguyen-Distèche, M., Fraipont, C., Buddelmeijer, N., & Nanninga, N. 2014. The structure and function of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 3. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, 54(4), 309–316. doi:10.1007/s000180050157

- Osaki, Y., Sanbongi, Y., Ishikawa, M., Kataoka, H., Suzuki, T., Maeda, K., & Ida, T. 2005. Genetic Approach To Study the Relationship between Penicillin-Binding Protein 3 Mutations and *Haemophilus influenzae* β -Lactam Resistance by Using Site-Directed Mutagenesis and Gene Recombinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(7), 2834–2839. doi:10.1128/AAC.49.7.2834
- Pascuzzo, L. C. Colmenares, R. N., Lugo, V. N., Maradei, I. I., Ramírez, S. M., Virgilio, S. N. 2008. Farmacología Básica. Venezuela. UCLA. 280-305.
- Rocha, G. R. C, Lozano, Z. P., Martínez, L. Y. Sergio, B. S. G. 2006. Identificación de las enzimas TEM y ROB-1 en cepas *Haemophilus influenzae* aisladas de portadores prescolares vacunados. *Rev. Latinoam Microbiol.* 40(2): 146-153
- Rocha, G. R. C., Sosa, I. E. G. 1997. Portadores de *Haemophilus influenzae* en guarderías de las ciudades de Puebla y Minatitlán. *Rev. Enf Inf en Ped Méx.* 10(39): 80-86
- Rodriguez, R. S., Mascarenas, C., Conde-Glez, C. J., Inostroza, J., Villanueva, S., Velázquez, M. E., Echániz, G. 2010. Serological protection induced by *Haemophilus influenzae* Type B conjugate vaccine in Mexican children: is a booster dose of the vaccine needed?. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 17(10), 1639–41. doi:10.1128/CVI.00249-10
- Rodríguez, G. V., Vázquez, L. M., Soto, N. G., Rivera, M. E. 2009. Estudio retrospectivo de cepas de *Haemophilus influenzae* serotipificación, biotipificación y susceptibilidad antimicrobiana. *Bioquímica*, 34 (1): 84
- Roma, F., & Canto, R. (2004). Laboratory Detection of *Haemophilus influenzae* with Decreased Susceptibility to Nalidixic Acid , Ciprofloxacin , Levofloxacin , and Moxifloxacin Due to *gyrA* and *parC* Mutations. *J. Clin. Microbiol.* 42(3), 1185–1191. doi:10.1128/JCM.42.3.1185

- Sanbongi, Y., Suzuki, T., Osaki, Y., Senju, N., Ida, T., & Ubukata, K. 2006. Molecular evolution of beta-lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(7), 2487–92. doi:10.1128/AAC.01316-05
- Sauvage, E., Derouaux, A., Fraipont, C., Joris, M., Herman, R., Rocaboy, M., Charlier, P. 2014. Crystal structure of penicillin-binding protein 3 (PBP3) from *Escherichia coli*. *PLoS One.* 9(5), e98042. doi:10.1371/journal.pone.0098042
- Sepúlveda, M. E., Jiménez, R. L. V. Espinosa, M. J. E. 2002. Prevalencia de serotipos invasivos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, durante el periodo de 1997-2002. *Boletín Médico del Hospital Infantil.* 59(9): 611-612
- Sevillano, D., Giménez, M.-J., Cercenado, E., Cafini, F., Gené, A., Alou, L., Aguilar, L. 2009. Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to beta-lactam susceptibility, of *Haemophilus influenzae* isolates exhibiting decreased susceptibility to beta-lactam resistance markers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(1), 267–70. doi:10.1128/AAC.00402-08
- Skaare, D., Allum, A., Anthonisen, I. L., Jenkins, A., Lia, A., and Strand, L. Kristiansen, B. 2010. Mutant *ftsI* genes in the emergence of penicillin-binding protein-mediated β -lactam resistance in *Haemophilus influenzae* in Norway. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1117-1124.
- Smith-Vaughan, H. C., Leach, a. J., Shelby-James, T. M., Kemp, K., Kemp, D. J., & Mathews, J. D. 2009. Carriage of multiple ribotypes of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* in Aboriginal infants with otitis media. *Epidemiology and Infection*, 116(02), 177. doi:10.1017/S0950268800052419
- Snell, J. J., Perry, S. F., & Brown, D. F. 1991. Detection of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *J. Clin Pathology*, 44(1), 77–77. doi:10.1136/jcp.44.1.77
- Suárez, C., & Gudiol, F. 2009. Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica.* 27(2), 116–29. doi:10.1016/j.eimc.2008.12.001

- Sutcliffe, J. G. 1978. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Biochemistry*. 75(8), 3737–3741.
- Tristram, S. G., & Burdach, J. G. 2007. Effect of cloned inhibitor-resistant TEM beta-lactamases on the susceptibility of *Haemophilus influenzae* to amoxicillin/clavulanate. *J. Antimicrob Chemother*. 60(5), 1151–4. doi:10.1093/jac/dkm311
- Tristram, S. G., Hawes, R., & Souprounov, J. 2005. Variation in selected regions of *bla*_{TEM} genes and promoters in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother*. 56(3), 481–4. doi:10.1093/jac/dki238
- Tristram, S., Jacobs, M. R., & Appelbaum, P. C. 2007. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin. Microbiol Rev*. 20(2), 368–389. doi:10.1128/CMR.00040-06
- Ubukata, K., Shibasaki, Y., Yamamoto, K., Chiba, N., Hasegawa, K., Takeuchi, Y., Konno, M. 2001. Association of Amino Acid Substitutions in Penicillin-Binding Protein 3 with β -Lactam Resistance in β -Lactamase-Negative Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 45(6), 1693–1699. doi:10.1128/AAC.45.6.1693
- Waltner-Toews, R. I., Paterson, D. L., Qureshi, Z. a, Sidjabat, H. E., Adams-Haduch, J. M., Shutt, K. a., Doi, Y. 2011. Clinical characteristics of bloodstream infections due to ampicillin-sulbactam-resistant, non-extended- spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and the role of TEM-1 hyperproduction. *Antimicrob. Agents Chemother*. 55(2), 495–501. doi:10.1128/AAC.00797-10
- Wissel, M. C., & Weiss, D. S. (2003). Genetic Analysis of the Cell Division Protein FtsI (PBP3): Amino Acid Substitutions That Impair Septal Localization of FtsI and Recruitment of FtsN. *J. Bacterio*. 186(2), 490–502. doi:10.1128/JB.186.2.490-502.2004

12. Anexos

Anexo 1. Preparación de suplementos.

A. Preparación de enriquecimiento Fildes.

1. preparar 150 ml de NaCl al 0.85% en un matraz de 500 ml y esterilizar a 15lb 15 minutos.

En condiciones de esterilidad agregar lo siguiente:

2. 1 g de pepsina en un tubo estéril y adicionarlo al matraz que contiene la solución de NaCl.
3. Agregar 50 ml de sangre de carnero.
4. Agregar 6 ml de HCl concentrado con una pipeta estéril.
5. Poner a baño maría durante toda la noche a 57°C.
6. Refrigerar de 5 – 7 días.
7. Llevar a pH de 6.8 a 7.2 con una solución de NaCl al 20% estéril.
8. Verter en tubos estériles. Logrando viales de 10 ml.

B. Preparación de Stock de Hemina.

1. Preparar 100 ml de KOH 0.2 M.
2. Preparar 100 ml de Na_2HPO_4 0.1 M con pH 7.
3. Pesar 0.3 g de hemina y agregarla a 100 ml de Na_2HPO_4 y disolver.
4. Añadir 1 ml de KOH o hasta que llegue a pH 7 y disolver en agitación.
5. Preparar viales de 33 ml en tubos de plásticos forrados con aluminio.
6. Esterilizar a 15 libras 15 minutos.

C. Preparación de Extracto de Levadura

1. Preparar KH_2PO_4 0.2 M.
2. Pesar 32 g de levadura.
3. Mezclar y calentar a baño maría a 80°C por 20 minutos.

4. Centrifugar a 500 rpm a 4°C por 45 minutos
5. El sobrenadante se esteriliza por filtración con membrana milipore 0.45 μm .
6. Sembrar en TSA para prueba de esterilidad.

Anexo 2. Preparación de medios de cultivo.

D. Preparación de placas de gelosa Fildes al 5%

Para 200 ml/20 placas pequeñas

- 1.- Pesar 7.4 g de caldo BHI.
- 2.- Pesar 2.7 g de agar bacteriológico.
- 3.- agregar tanto el medio como el agar bacteriológico a 200 ml de agua destilada.
- 4.-Esterilizar a 15lb 15 minutos.
- 5.- Se agregaron 10 ml de Fildes al matraz, previamente enfriado.
- 6.- Mezclar y verter en placas chicas.

E. Gelosa Hemina Bacitracina Extracto de Levadura (GHBEL)

Para 200 ml/ 20 placas pequeñas.

- 1.- Pesar 7.4 g de caldo BHI y 2.7 de agar bacteriológico.
- 2.- Agregar a 190 ml e agua destilada
- 3.- Agregar 6 ml de Hemina.
- 4.- Esterilizar a 15lb 15 minutos.
- 5.- Pesar en un tubo estéril 0.03 g de Bacitracina y adicionar 5 ml de agua destilada estéril.
- 6.- Adicionar la solución de Bacitracina al matraz, previamente enfriado.
- 7.- Verter el medio en placas chicas.

F. Mueller-Hinton enriquecido con Fildes al 15%.

Para 200 ml

- 1.- Pesar 8.4 g de caldo Mueller-Hinton.
- 2.- Adicionar a 200 ml de agua destilada.
- 3.- Calentar con mechero para disolverlo completamente.
- 4.- Agregar 12.7o 10.2 ml a tubos de vidrio con tapa.
- 5.- Esterilizar a 15lb 15 minutos y dejar enfriar.
- 6.- Agregar 2.7 o 1.8 ml de Fildes a cada tubo. Mezclar.
- 7.- Adicionar las soluciones de antibióticos a las placas, a manera de tener diluciones seriadas de cada antibiótico.

Para placas grandes: A 15ml de agar se le adicionaran las siguientes cantidades de solución del antibiótico, recordando quitar la misma cantidad de agar cuando el volumen adicionado era mayor a 100 µl.

Concentración µg/ ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
µl	1536	768	384	192	96	48	24	12	6	3	1.5

Para placas chicas: A 12ml de agar se le adicionaran las siguientes cantidades de solución del antibiótico, recordando quitar la misma cantidad de agar

Concentración µg/ ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
µl	1228.8	614.4	307.2	153.6	76.8	38.4	19.2	9.6	4.8	2.4	1.2

G. Caldo BHI con Fildes al 15 %.

Para 200 ml de caldo.

1. Pesar 7.4 g de caldo BHI.
2. Adicionar a 200 ml de agua. Mezclar.
3. Hacer viales de 30 ml en matraces de 50 ml y tapar bien.
4. Esterilizar a 15lb 15 minutos.
5. Adicionar 4.5 ml de Fildes a cada matraz. Mezclar.
6. Filtrar el caldo en campana con material previamente esterilizado (papel filtro, matraz, embudo).
7. Dejar a prueba de esterilidad 24 horas 37°C.

H. Caldo BHI suplementado con Hemina y Extracto de levadura.

Para 200 ml.

- 1.- Pesar 7.4 g de caldo BHI.
- 2.- Adicionar a 200 ml de agua.
- 3.- Adicionar 6 ml de Hemina. Mezclar.
- 4.- Hacer viales de 30 ml en matraces de 50 ml y tapar bien.
- 5.- Esterilizar a 15lb 15 minutos.
- 6.- Agregar 2 ml de extracto de levadura
- 7.- Dejar a prueba de esterilidad 24 horas 37°C.

Anexo 3. Stock de antibióticos

Tabla 10. Preparación del stock de antibióticos para la determinación de la CMI por dilución en placa.

ANTIBIOTICO	SOLVENTE	STOCK
Ampicilina	Disolverla en buffer fosfatos pH 8, 0.1 M, solución madre: buffer fosfato pH:6, 0.1M	10 000 µg/ ml
Ampicilina / sulbactam	Agua inyectable	10 000 µg/ ml
Amoxicilina / clavulánico	Agua inyectable	10 000 µg/ ml
Cefalotina	Agua inyectable	10 000 µg/ ml
Cefaclor	Agua inyectable	10 000 µg/ ml
Cefixime	buffer fosfato pH:7, 0.1M	8 µg/ ml
Cefuroxima	Agua inyectable	8 µg/ ml
Cefotaxima	Agua inyectable	8 µg/ ml
Ceftriaxona	Agua inyectable	8 µg/ ml
Ceftazidima	Agua inyectable	8 µg/ ml
Cefepime	Agua inyectable	8 µg/ ml

Anexo 4. Sustituciones aminoacidicas en la PBP-3

G R U P O	Motivo STVK				Motivo SSN																	SUSTITUCIONES AMINOACIDICAS														
	Ala	Lys	Ile	Asp	Lys	Leu	ser	Ala	Met	Ser	Leu	Met	Pro	Glu	Ile	Val	Ala	Ile	Ile	Ile	Val	Gly	Ala	Val	Arg	Ile	Asn	Ala	Phe	Thr	Val	Ala	Val	Asn	Thr	
	343	344	348	350	355	356	357	368	377	385	389	391	392	398	414	436	437	442	449	475	488	490	502	511	517	519	526	530	531	532	547	554	562	569	574	
	Val	Arg	Val	Asn	Thr	Val	Asp	Pro	Ile	Thr	Phe	Ile	Ser	ASP	Val	Ala	Ser	Phe	Val	Leu	Ile	Glu	Thr/ Val	Ala	His	Leu	Lys	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr/ Arg	Leu	Ser	Ala	
I				Asn			Asp		Ile	Thr															His His					Ser	Ile Ile			Ser		
I I a	Val Val			Asn Asn Asn					Ile Ile	Thr											Ile Ile	Glu		Ala			Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ser Ser Lys	Ser Ser Ser			Ile Ile Ile Ile			Ser		
I I b				Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn					Ile Ile Ile Ile								Ser Ser					Glu Glu Gly Glu	Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val			Leu	Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys				Ile Ile Ile Ile Ile Ile			Ser Ser Ser Ser Ser Ser		
I I c				Asn Asn Asn Asp			Asp		Ile								Ser						Thr Thr Thr Thr Thr					Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys				Ile Ile Ile			Ser Ser Ser	
I I d				Asn Asn					Pro Pro Pro Pro								Ser		Val Val Val Val				Thr					Lys Lys Lys Lys	Ser			Ile Ile Ile			Ser Ser Ser	

Anexo 5. Análisis en Blast para las cepas secuenciadas para el gen *bla*_{TEM}.

a- Cepa ATCC 33930

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Serratia marcescens tniC_intl3_blaIMP_aac6'-lb_parA_blaTEM_genes_partial_and_complete_cds	1975	1975	100%	0.0	99%	AB070224.1
Acinetobacter baumannii strain AbH120-A2_complete genome	1973	1973	99%	0.0	99%	CP009534.1
Acinetobacter baumannii strain AB030_complete genome	1973	1973	99%	0.0	99%	CP009257.1
Klebsiella pneumoniae plasmid pKp848CTX_complete sequence	1973	1973	99%	0.0	99%	LM994717.1
Uncultured bacterium plasmid pRSB225_complete sequence	1973	1973	99%	0.0	99%	JX127248.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. SL476_complete genome	1973	1973	99%	0.0	99%	CP001120.1
Proteus mirabilis beta-lactamase TEM-1 gene_complete cds	1973	1973	99%	0.0	99%	AY729027.1
Haemophilus influenzae plasmid ICEhin1056	1973	1973	99%	0.0	99%	AJ627386.1
Uncultured bacterium pRSB107 plasmid	1973	1973	99%	0.0	99%	NG_036091.1
Neisseria meningitidis plasmid pAB6 Tn3 resolvase (Tnp3)_beta-lactamase precursor (TEM-1)_anc	1973	1973	99%	0.0	99%	NG_035171.1

b- Cepa BUAP172178

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Acinetobacter baumannii strain AbH120-A2_complete genome	1459	1459	99%	0.0	99%	CP009534.1
Acinetobacter baumannii strain AB030_complete genome	1459	1459	99%	0.0	99%	CP009257.1
Klebsiella pneumoniae plasmid pKp848CTX_complete sequence	1459	1459	99%	0.0	99%	LM994717.1
Uncultured bacterium plasmid pRSB225_complete sequence	1459	1459	99%	0.0	99%	JX127248.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. SL476_complete genome	1459	1459	99%	0.0	99%	CP001120.1
Proteus mirabilis beta-lactamase TEM-1 gene_complete cds	1459	1459	99%	0.0	99%	AY729027.1
Haemophilus influenzae plasmid ICEhin1056	1459	1459	99%	0.0	99%	AJ627386.1
Uncultured bacterium pRSB107 plasmid	1459	1459	99%	0.0	99%	NG_036091.1
Neisseria meningitidis plasmid pAB6 Tn3 resolvase (Tnp3)_beta-lactamase precursor (TEM-1)_anc	1459	1459	99%	0.0	99%	NG_035171.1
Serratia marcescens tniC_intl3_blaIMP_aac6'-lb_parA_blaTEM_genes_partial_and_complete_cds	1459	1459	99%	0.0	99%	AB070224.1
Serratia marcescens strain ES-71 TEM-1 beta-lactamase (blaTEM-1) gene_partial cds	1456	1456	99%	0.0	99%	AY538702.1

c- Cepa BUAPNan.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Haemophilus influenzae R2866_complete genome	1917	1917	100%	0.0	100%	CP002277.1
Haemophilus influenzae 10810 genome	1917	1917	100%	0.0	100%	FQ312006.1
Haemophilus influenzae parA gene for chromosome partitioning protein_strain 8f	1917	1917	100%	0.0	100%	AM884335.1
Haemophilus influenzae parA gene for chromosome partitioning protein_strain 299	1917	1917	100%	0.0	100%	AM884334.1
Haemophilus influenzae 86-028NP_complete genome	1917	1917	100%	0.0	100%	CP000057.2
Klebsiella pneumoniae strain ST48 plasmid pKP09085_complete sequence	1912	1912	100%	0.0	99%	KF719970.1
Klebsiella pneumoniae JM45 plasmid p1_complete sequence	1912	1912	100%	0.0	99%	CP006657.1
Escherichia coli plasmid pXD2 Insertion sequence ISCR3 transposase A (tnpA) gene_complete cd	1912	1912	100%	0.0	99%	NG_041453.1
Klebsiella pneumoniae transposon Tn3 transposase (tnp)_TnpR (tnpR)_TEM-1 (bla)_and 16S rRn	1912	1912	100%	0.0	99%	FJ410927.1
Serratia marcescens tnpR_blaTEM_rmtB_orfA genes for resolvase_beta-lactamase TEM-1_16S r	1912	1912	100%	0.0	99%	AB103506.1

d- Ceba BUAP28

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Haemophilus influenzae R2866, complete genome	1958	2015	99%	0.0	99%	CP002277.1
Haemophilus influenzae 10810 genome	1958	2015	99%	0.0	99%	FQ312006.1
Haemophilus influenzae parA gene for chromosome partitioning protein, strain 8f	1958	2015	99%	0.0	99%	AM884335.1
Haemophilus influenzae parA gene for chromosome partitioning protein, strain 299	1958	2015	99%	0.0	99%	AM884334.1
Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome	1958	2015	99%	0.0	99%	CP000057.2
Haemophilus parainfluenzae strain 25861, complete sequence	1941	1998	99%	0.0	99%	KC292504.1
Klebsiella pneumoniae strain ST48 plasmid pKP09085, complete sequence	1936	1936	99%	0.0	99%	KF719970.1
Klebsiella pneumoniae JM45 plasmid p1, complete sequence	1936	2049	99%	0.0	99%	CP006657.1
Escherichia coli plasmid pXD2 insertion sequence ISCR3 transposase A (tnpA) gene, complete cds	1936	1992	99%	0.0	99%	NG_041453.1
Klebsiella pneumoniae transposon Tn3 transposase (tnp), TnpR (tnpR), TEM-1 (bla), and 16S rRNA	1936	1936	99%	0.0	99%	FJ410927.1
Serratia marcescens tnpR, blaTEM, rmtB, orfA genes for resolvase, beta-lactamase TEM-1, 16S rR	1936	1936	99%	0.0	99%	AB103506.1

Anexo 6. Análisis en Blast para las cepas secuenciadas para el gen *ftsI*.

a- Ceba BUAPNan

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Haemophilus influenzae strain HI375, complete genome	2545	2545	100%	0.0	94%	CP009610.1
Haemophilus influenzae R2846, complete genome	2545	2545	100%	0.0	94%	CP002276.1
Haemophilus influenzae strain HCM0042 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	2540	2540	100%	0.0	94%	JX861248.1
Haemophilus influenzae 10810 genome	2540	2540	100%	0.0	94%	FQ312006.1
Haemophilus influenzae strain T081 penicillin binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	2534	2534	100%	0.0	94%	JN979456.2
Haemophilus influenzae strain J138 penicillin binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	2529	2529	100%	0.0	94%	JN979440.2
Haemophilus influenzae strain L97 penicillin binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	2473	2473	100%	0.0	93%	KF576326.1
Haemophilus influenzae strain HCM0071 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	2473	2473	100%	0.0	93%	JX861249.1
Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome	2473	2473	100%	0.0	93%	CP000057.2
Haemophilus influenzae Rd KW20, complete genome	2473	2473	100%	0.0	93%	L42023.1
Haemophilus influenzae strain L26 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	2468	2468	100%	0.0	93%	KC867172.1

b- Ceba BUAP172178

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Haemophilus influenzae strain HCM0042 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	3356	3356	100%	0.0	99%	JX861248.1
Haemophilus influenzae 10810 genome	3356	3356	100%	0.0	99%	FQ312006.1
Haemophilus influenzae strain HI375, complete genome	3350	3350	100%	0.0	99%	CP009610.1
Haemophilus influenzae strain T081 penicillin binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	3350	3350	100%	0.0	99%	JN979456.2
Haemophilus influenzae strain L240 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	3256	3256	100%	0.0	99%	KC867182.1
Haemophilus influenzae strain L26 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	3256	3256	100%	0.0	99%	KC867172.1
Haemophilus influenzae strain T011 penicillin binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	3256	3256	100%	0.0	99%	JN979451.2
Haemophilus influenzae strain HCM0030 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	3256	3256	100%	0.0	99%	JX861252.1
Haemophilus influenzae Rd KW20, complete genome	3256	3256	100%	0.0	99%	L42023.1
Haemophilus influenzae strain L275 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene, complete cds	3251	3251	100%	0.0	99%	KC867183.1
Haemophilus influenzae R2866, complete genome	3284	3284	100%	0.0	99%	CP002277.1

c- Ceba ATCC 33930

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Haemophilus influenzae strain HCM0011 PBP3 (ftsI) gene complete cds	3306	3306	100%	0.0	99%	JN944451.1
Haemophilus influenzae strain HCM0040 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene complete cds	3295	3295	100%	0.0	99%	JX861253.1
Haemophilus influenzae PittGG complete genome	3295	3295	100%	0.0	99%	CP000672.1
Haemophilus influenzae Rd KW20 complete genome	3290	3290	100%	0.0	99%	L42023.1
Haemophilus influenzae strain L64 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene complete cds	3284	3284	100%	0.0	99%	KC867174.1
Haemophilus influenzae strain T062 penicillin binding protein 3 (ftsI) gene complete cds	3278	3278	100%	0.0	99%	JN979454.2
Haemophilus influenzae strain J005 penicillin binding protein 3 (ftsI) gene complete cds	3273	3273	100%	0.0	99%	JN979443.2
Haemophilus influenzae 86-028NP complete genome	3273	3273	100%	0.0	99%	CP000057.2
Haemophilus influenzae strain HCM0088 PBP3 (ftsI) gene complete cds	3269	3269	99%	0.0	99%	JN944455.1
Haemophilus influenzae strain HCM0065 PBP3 (ftsI) gene complete cds	3267	3267	100%	0.0	99%	JN944449.1

d- Ceba BUAP28

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Haemophilus influenzae strain HCM0042 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene complete cds	3350	3350	100%	0.0	99%	JX861248.1
Haemophilus influenzae 10810 genome	3350	3350	100%	0.0	99%	FQ312006.1
Haemophilus influenzae strain HI375 complete genome	3345	3345	100%	0.0	99%	CP009610.1
Haemophilus influenzae strain T081 penicillin binding protein 3 (ftsI) gene complete cds	3345	3345	100%	0.0	99%	JN979456.2
Haemophilus influenzae R2846 complete genome	3345	3345	100%	0.0	99%	CP002276.1
Haemophilus influenzae strain J138 penicillin binding protein 3 (ftsI) gene complete cds	3339	3339	100%	0.0	99%	JN979440.2
Haemophilus influenzae strain HCM0030 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene complete cds	3251	3251	100%	0.0	99%	JX861252.1
Haemophilus influenzae Rd KW20 complete genome	3251	3251	100%	0.0	99%	L42023.1
Haemophilus influenzae strain L275 penicillin-binding protein 3 (ftsI) gene complete cds	3245	3245	100%	0.0	99%	KC867183.1
Haemophilus influenzae strain T062 penicillin binding protein 3 (ftsI) gene complete cds	3245	3245	100%	0.0	99%	JN979454.2
Haemophilus influenzae R2866 complete genome	3278	3278	100%	0.0	99%	CP002277.1