

**ELEMENTOS GENÉTICOS  
TRANSFERIBLES: PLÁSMIDOS,  
TRANSPOSONES E  
INTEGRONES**

# DISEMINACION DE GENES DE RESISTENCIA

## 1 PLASMIDOS

- DNA CIRCULAR
- ELEMENTO REPLICATIVO AUTÓNOMO
- PROPIEDADES:
  - TRANSFERENCIA DE GENES DE RESISTENCIA
  - MOBILIZACIÓN DE OTROS ELEMENTOS CON GENES DE RESISTENCIA

## 2 TRANSPOSONES

- PUEDE MOVERSE DE UN SEGMENTO DE DNA A OTRO
- PROPIEDADES:
  - LLEVAN GENES DE RESISTENCIA DESDE LOS PLASMIDOS AL CROMOSOMA Y VICEVERSA
  - TIPOS 1 (IS, Tn5), 2 (Tn3), 3 (Bacteriófago  $\mu$ )  
Y 4 (CONJUGATIVOS: CARACTERÍSTICAS SIMILARES A LOS PLASMIDOS AUTOTRANSMISIBLES)

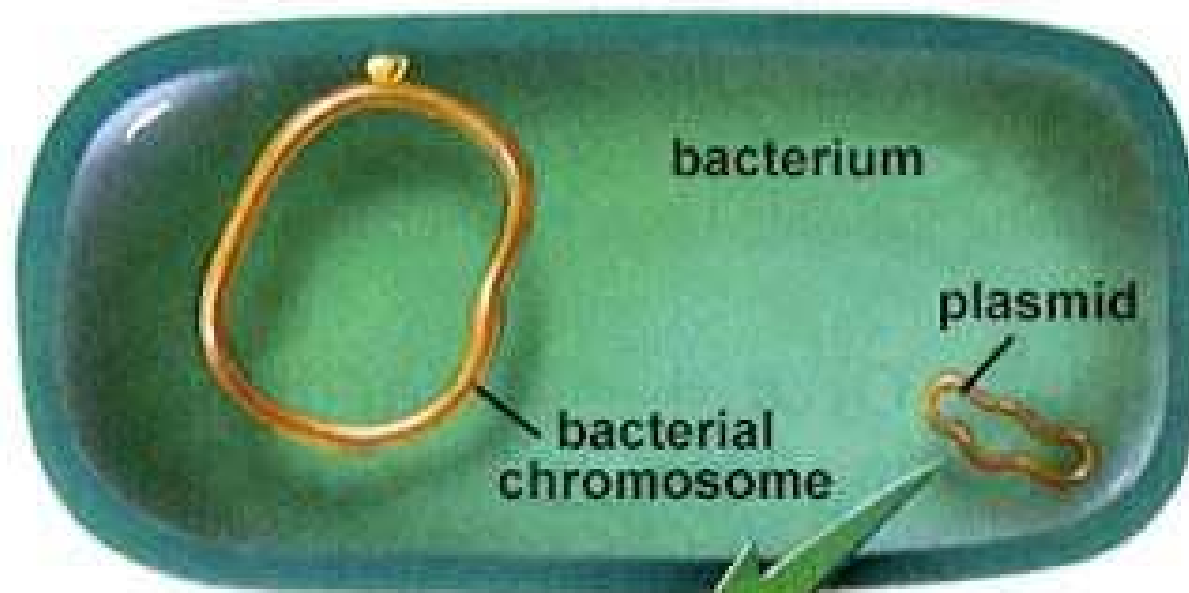
# DISEMINACION DE GENES DE RESISTENCIA

## 3 INTEGRONES

- SEGMENTO DE DNA INTEGRADO QUE CONTIENE:
  - INTEGRASA
  - PROMOTOR
  - SITIO DE INTEGRACION PARA CASSETTES DE GENES
- PROPIEDADES: FORMA CLUSTERS DE GENES DE RESISTENCIA  
(TODOS BAJO EL CONTROL DEL PROMOTOR DEL INTEGRON)
- TAMAÑO: 800-3900 bp.

- contienen información genética necesaria para expresar una proteína implicada en la captura y liberación de ciertos elementos móviles IS (se incluyen genes de resistencia a los antibióticos)
- integración: recombinación genética sitio-específica
- promotores:
  - P1
  - P2: incrementa el grado de transcripción

# PLÁSMIDOS



1  $\mu$ m

## PLÁSMIDOS: CARACTERÍSTICAS

- MOLÉCULAS CIRCULARES DE DNA DE DOBLE CADENA
- REPLICACIÓN INDEPENDIENTE DEL CROMOSOMA
- PRESENTES EN TODO TIPO DE BACTERIAS
- UNA BACTERIA PUEDE PRESENTAR VARIOS PLÁSMIDOS
- TAMAÑO VARIABLE (DE POCOS MILES A CIENTOS DE MILES DE PARES DE BASES)
- NÚMERO DE COPIAS VARIABLE
- TIENEN UN PAPEL CLAVE EN LA ADAPTACIÓN Y EVOLUCIÓN BACTERIANA

## PLÁSMIDOS: MÉTODOS DE ESTUDIO Y VISUALIZACIÓN

·VISUALIZACIÓN EN ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y *PULSED FIELD GEL ELECTROFORESIS*

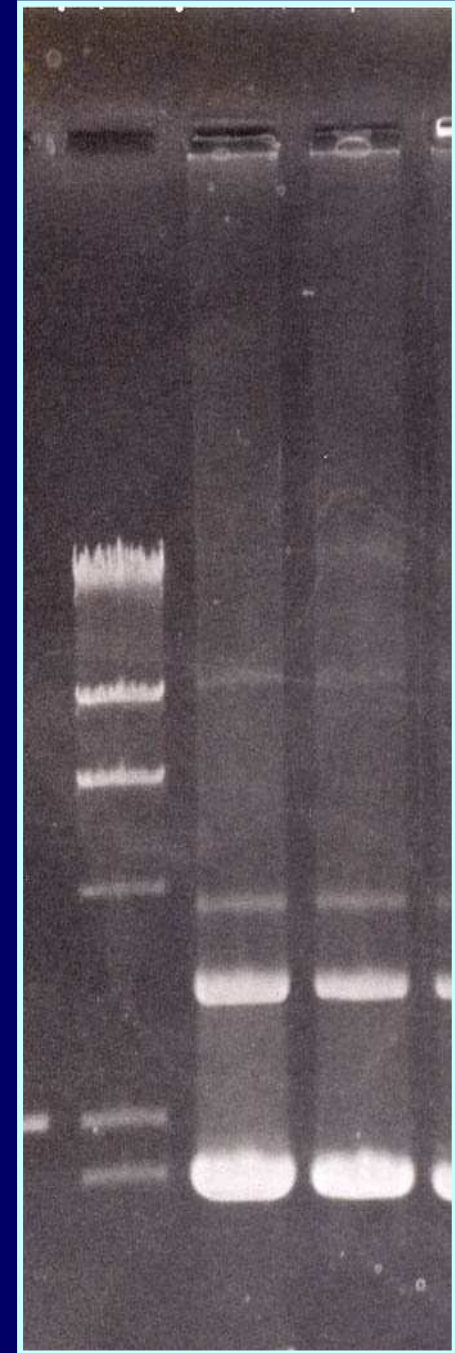
·DEPENDIENDO DEL TAMAÑO APARECEN POR ARRIBA O DEBAJO DEL CROMOSOMA

·FORMAS: CCC, OC Y L (circular covalentemente cerrado, abierto y lineal)

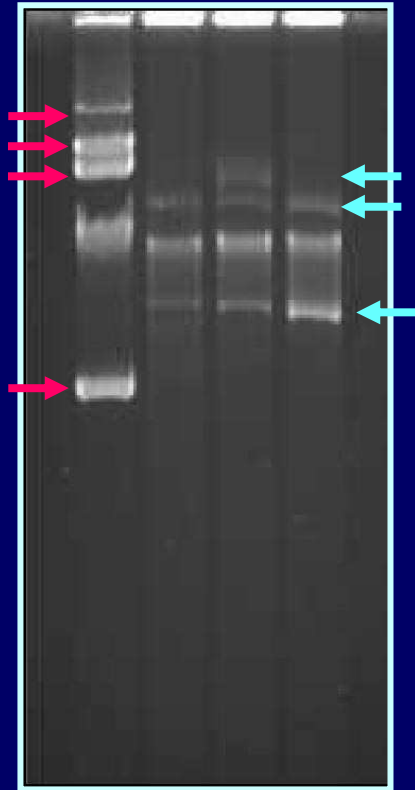
DNA cromosómico



1. DNA de fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III  
2 y 3. DNA del plásmido pSU615



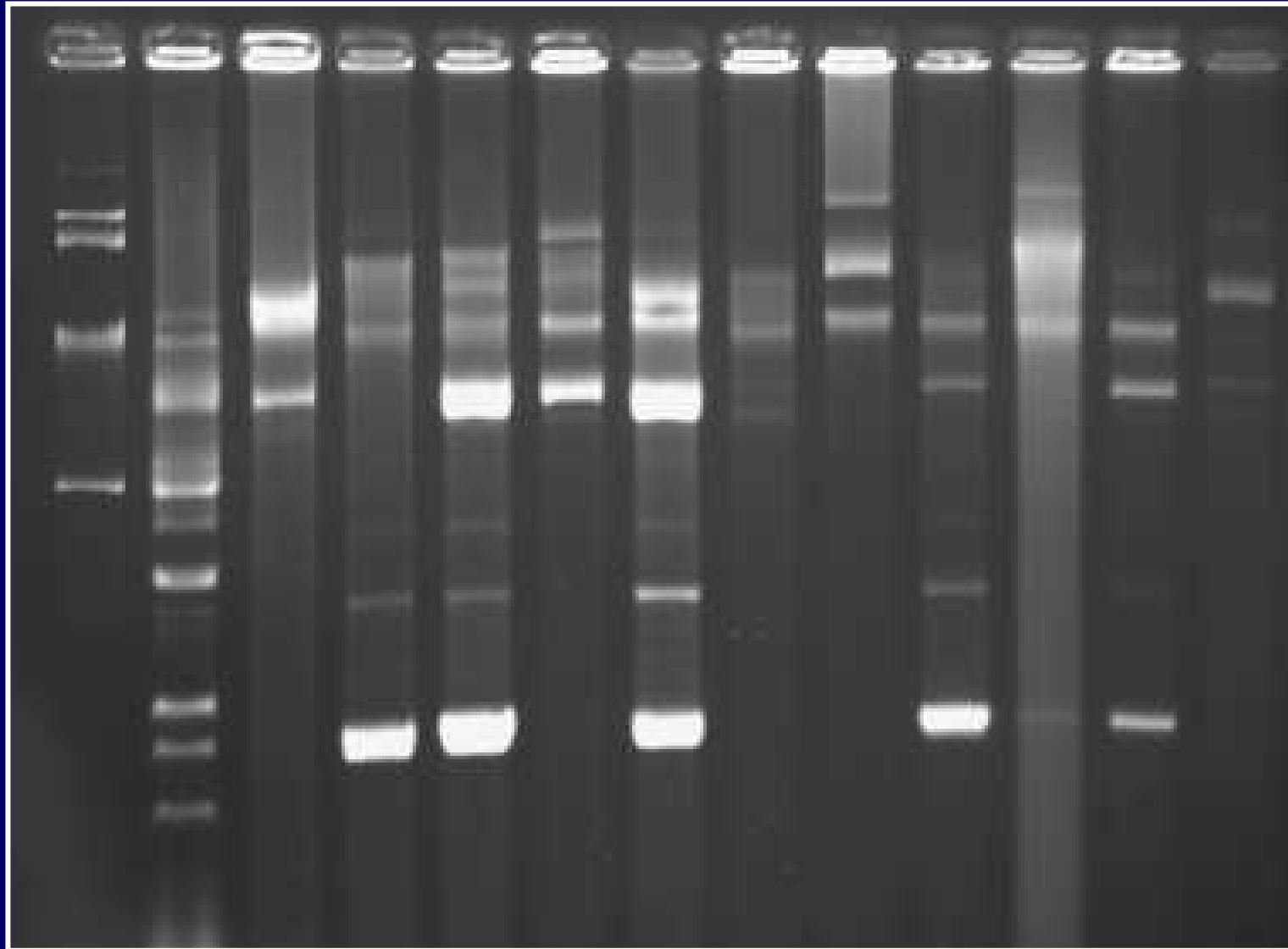


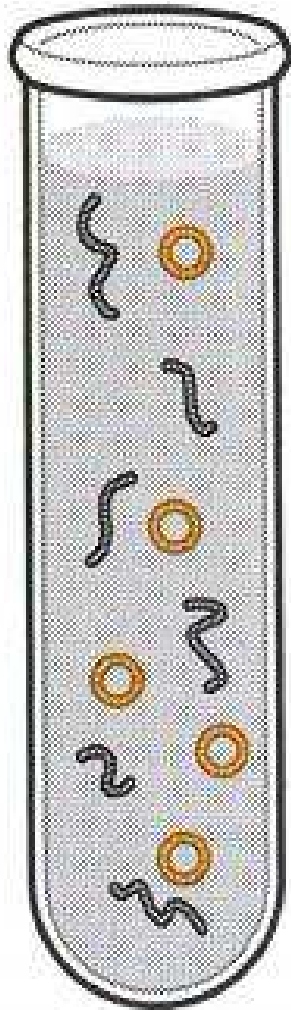


→ Plásmidos en *E. coli*  
→ Plásmidos en *A. baumannii*

# PERFILES PLASMÍDICOS EN DIFERENTES AISLAMIENTOS BACTERIANOS Y SUS CORRESPONDIENTES TAMAÑOS EXPRESADOS EN Kb

163.3  
70  
39.8  
  
8.6  
7.6  
  
5.8  
  
2.8  
2.5  
  
2





Before  
centrifugation



Protein and membrane

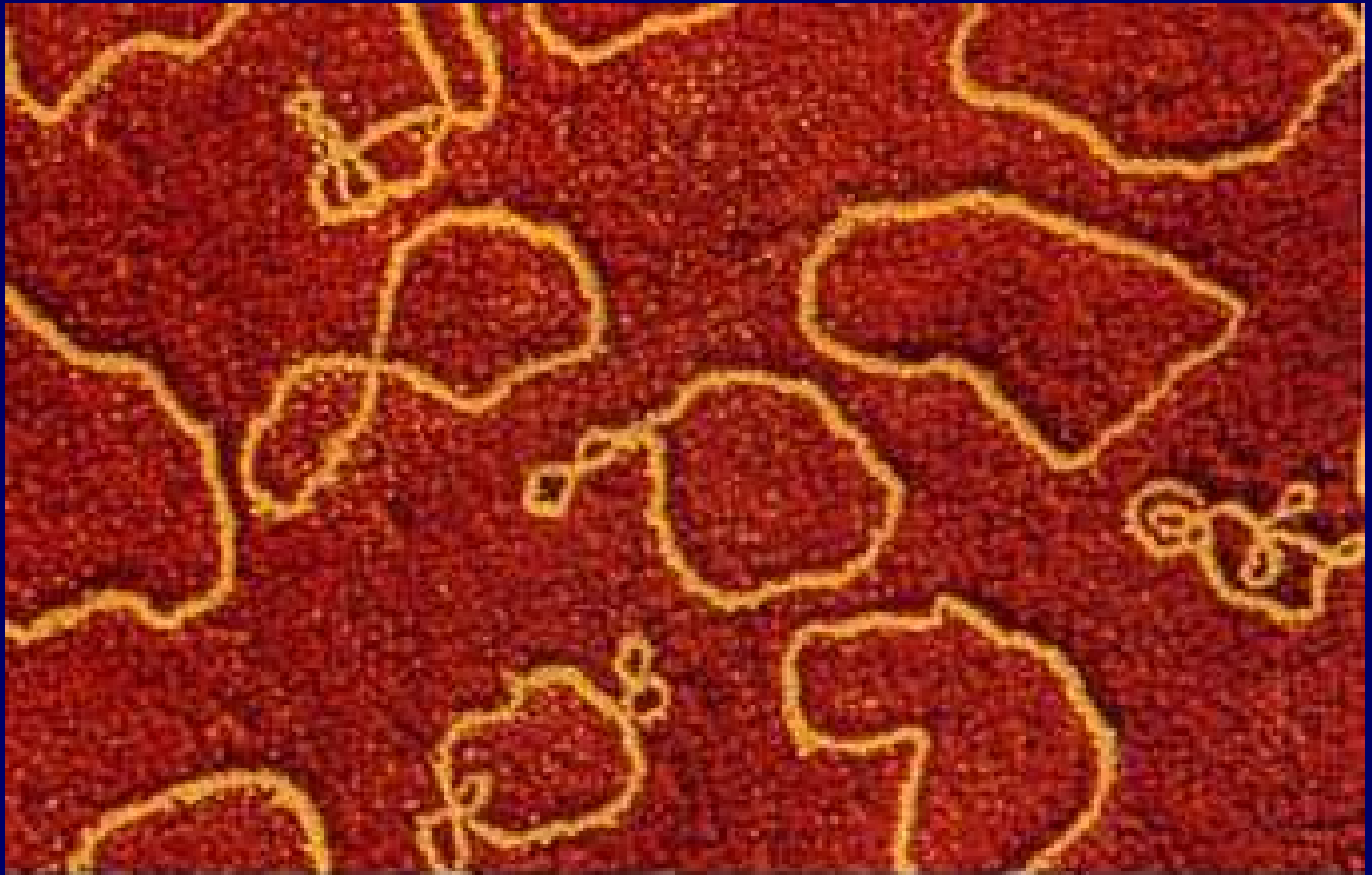
Linear and nicked  
circular DNA

Covalently closed  
circular DNA

RNA

After  
centrifugation

**MÉTODO DE GRADIENTES EN CLORURO DE CESIO PARA LA EXTRACCIÓN DE  
DNA PLASMÍDICO DE ALTA CALIDAD**



0,05  $\mu\text{m}$

## PLÁSMIDOS: FUNCIONES

CODIFICAN PROTEINAS (NO ESENCIALES PARA LA CÉLULA) QUE BENEFICIAN LA SUPERVIVENCIA, GENERALMENTE GENES DE VIRULENCIA NECESARIOS PARA LA PATOGENICIDAD:

1. ENZIMAS PARA UTILIZACIÓN DE FUENTES INUSUALES DE CARBONO (EJ. TOLUENO)
2. RESISTENCIA A METALES PESADOS Y ANTIBIÓTICOS
3. SÍNTESIS DE ANTIBIÓTICOS
4. SÍNTESIS DE TÓXINAS Y PROTEINAS QUE PERMITEN INFECCIONES A ORGANISMOS SUPERIORES

## PLÁSMIDOS: REPLICACIÓN

- \* INDEPENDIENTE DEL CROMOSOMA
- \* ORIGEN DE REPLICACIÓN ori
- \* MECANISMOS GENERALES:
  - oriV: VEGETATIVO
  - oriT: CONJUGACION
- \* REPLICACION THETA ( $\theta$ ) (UNI O BIDIRECCIONAL):
  - EL MAS COMUN EN GRAM-NEGATIVOS
  - ColE1, RK2, F, P1, CROMOSOMA
- \* REPLICACION EN CIRCULO RODANTE:
  - TIPICA DE FAGOS
  - GRAM-POSITIVOS Y GRAM-NEGATIVOS
  - EN PLASMIDOS RC

# PLÁSMIDOS: FUNCIONES DE LA REGION *ori*

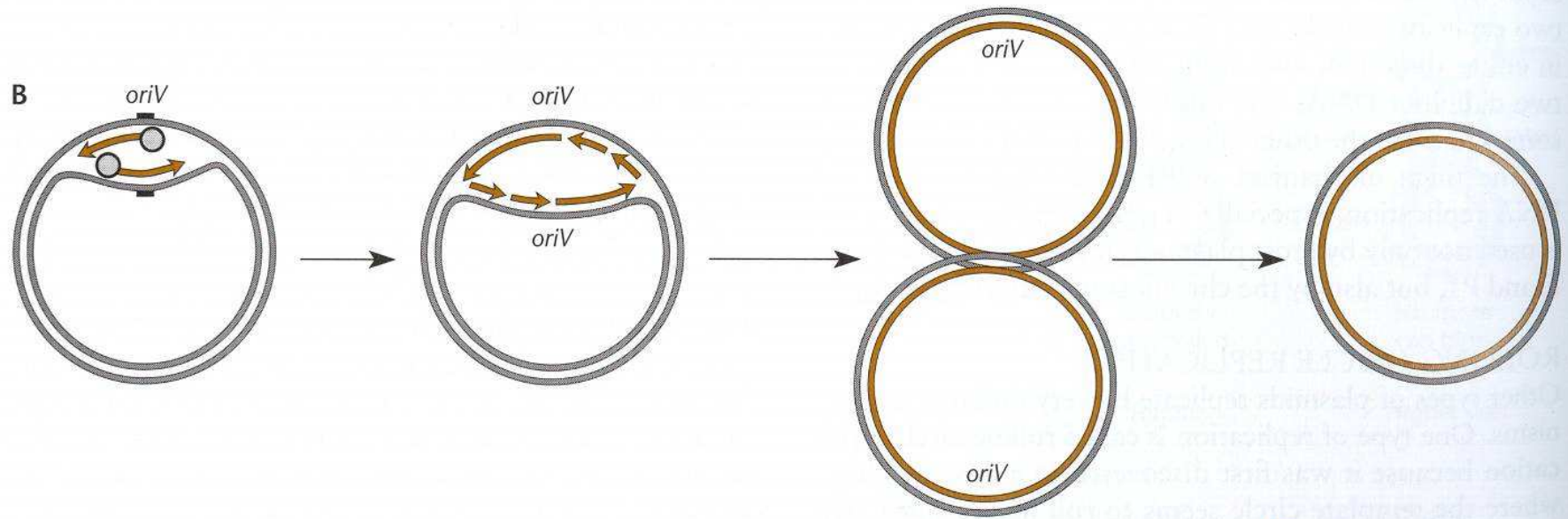
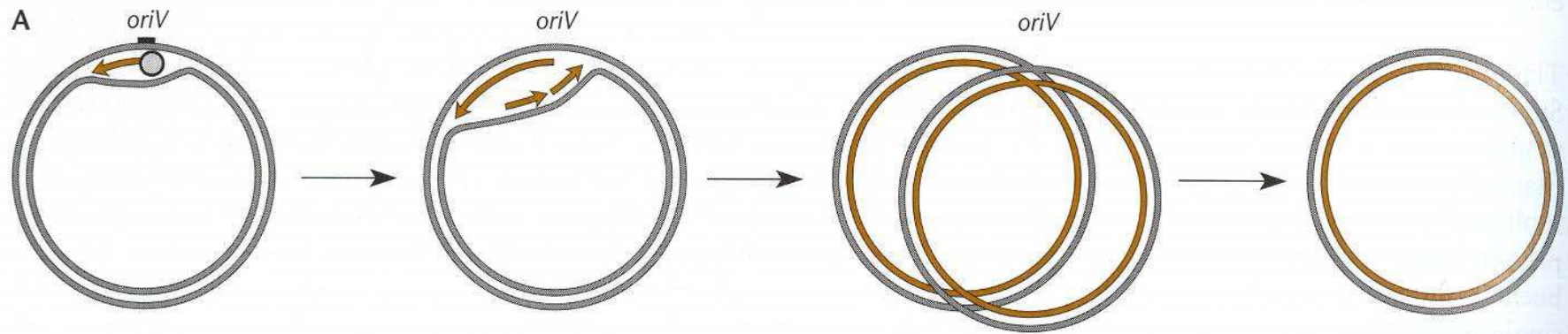
## 1. RANGO DE HUESPED:

- ColE1: RANGO ESTRECHO (*E. coli* y cercanos)
- RK2: RANGO AMPLIO (MAYORIA DE GRAM NEGATIVOS)
- RSF1010: GRAM-POSITIVOS Y NEGATIVOS
- LA MAYORIA DE PLÁSMIDOS EN GRAM-POSITIVOS NO SE REPLICAN EN GRAM-NEGATIVOS Y VICEVERSA

## 2. REGULACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS:

PLÁSMIDOS RELAJADOS: ALTO NUMERO (Ej. ColE1)

PLÁSMIDOS ASTRINGENTES: BAJO NUMERO (Ej. F)





## PLÁSMIDOS: INCOMPATIBILIDAD

- \* ALGUNOS PLASMIDOS NO PUEDEN COEXISTIR DE FORMA ESTABLE EN LA MISMA CELULA
- \* SI SE INTRODUCE INTERFIERE EN LA REPLICACION HASTA QUE UNO DE ELLOS SE PIERDA

DOS PLASMIDOS QUE NO PUEDAN COEXISTIR EN LA MISMA CELULA SON MIEMBROS DEL MISMO GRUPO DE INCOMPATIBILIDAD (Inc)

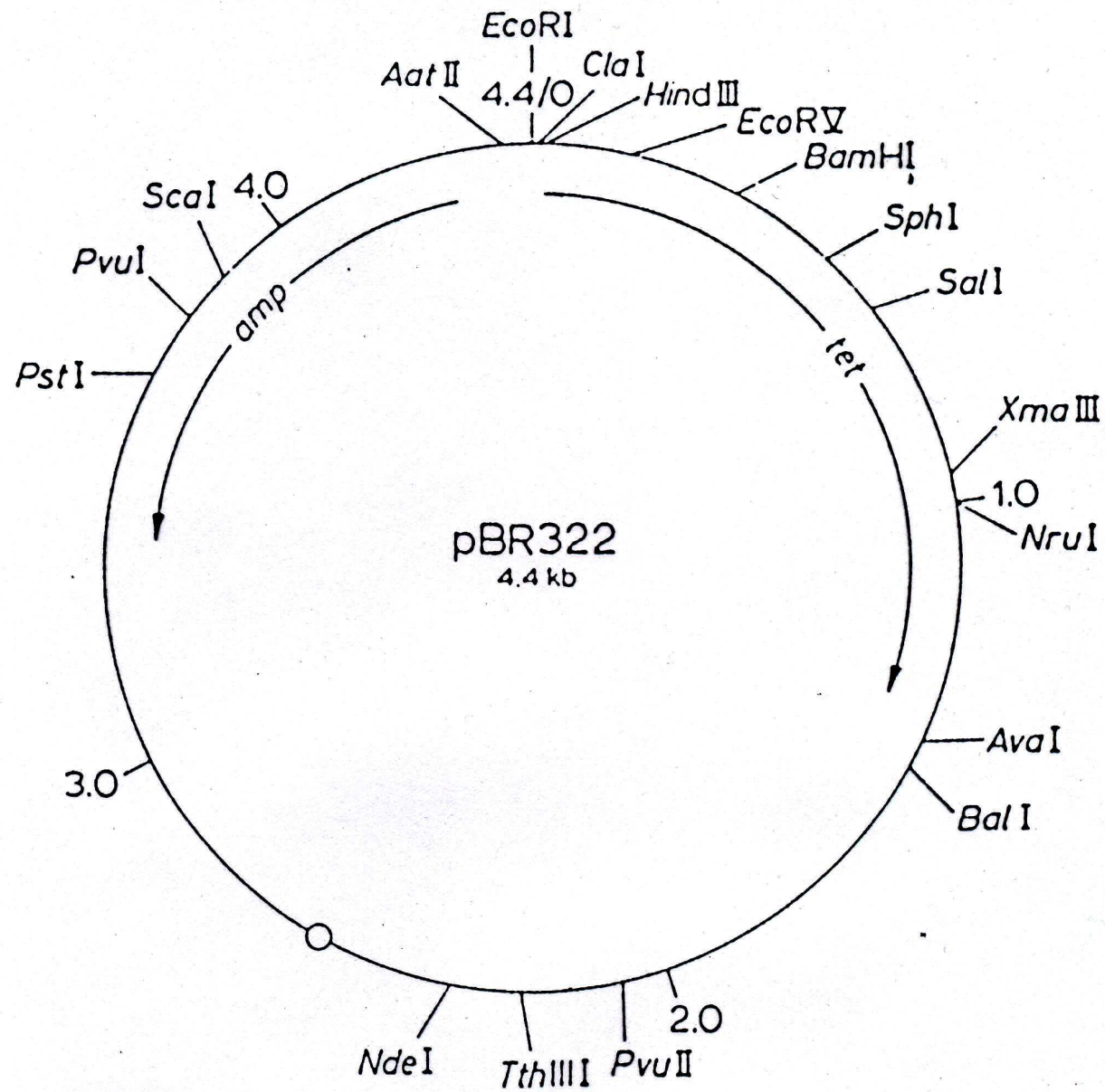
- \* LOS PLASMIDOS SON INCOMPATIBLES PORQUE COMPARTEN EL MISMO MECANISMO DE CONTROL DE LA REPLICACION Y/O DE FUNCIONES DE PARTICION (*par*)

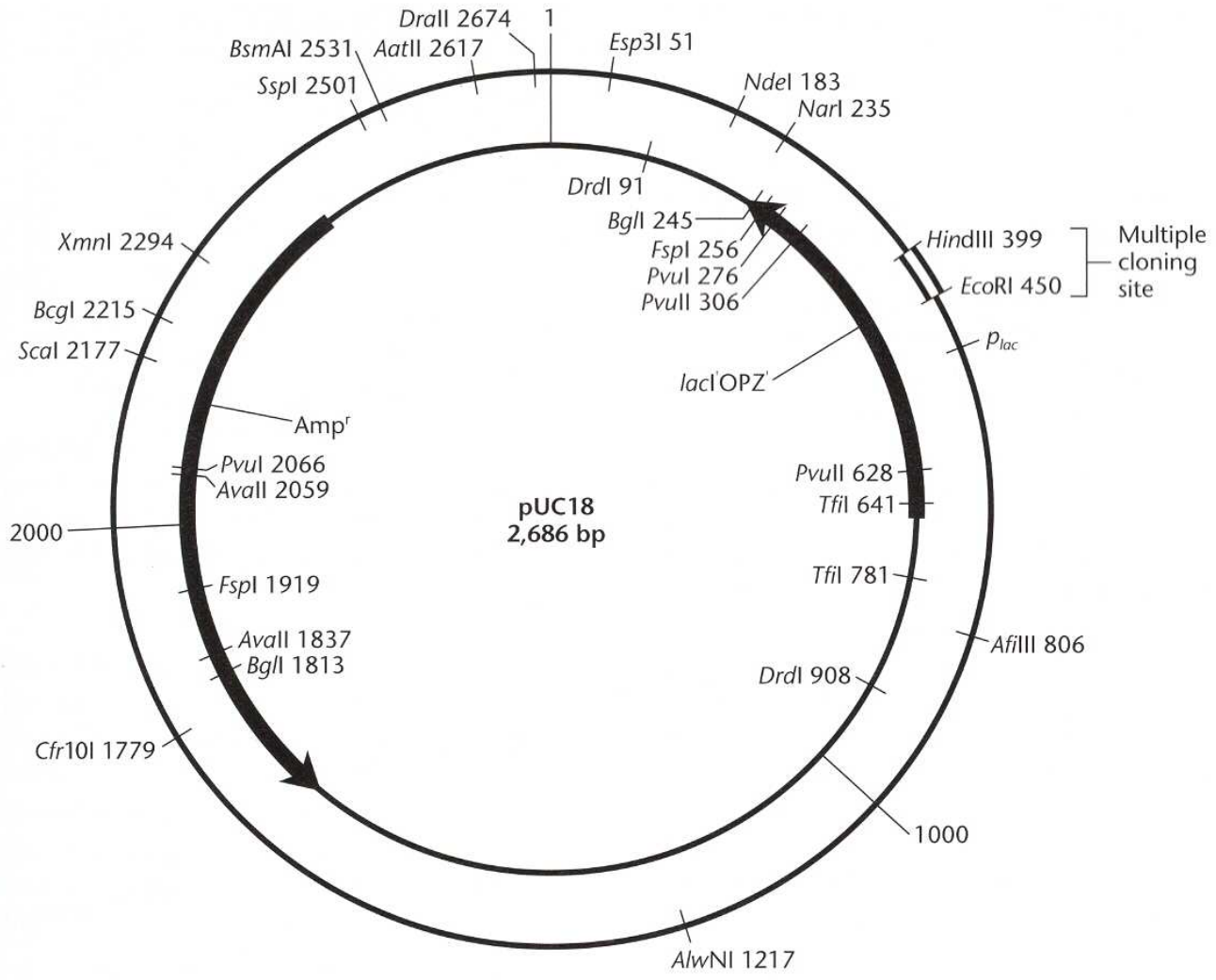
# PLÁSMIDOS: VECTORES DE CLONADO EN TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE

VECTOR: DNA DE REPLICACION AUTONOMA (REPLICÓN)  
DENTRO DEL CUAL PUEDEN SER INSERTADOS OTROS DNAs

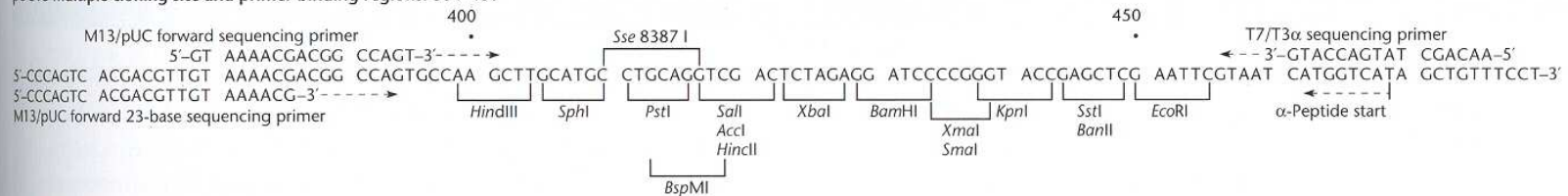
## VENTAJAS DE LOS PLÁSMIDOS COMO VECTORES:

- PUEDEN SER FABRICADOS A MEDIDA
- NO MATAN LA CELULA HUESPED
- SON FACILES DE PURIFICAR
- PUEDEN SER MUY PEQUEÑOS



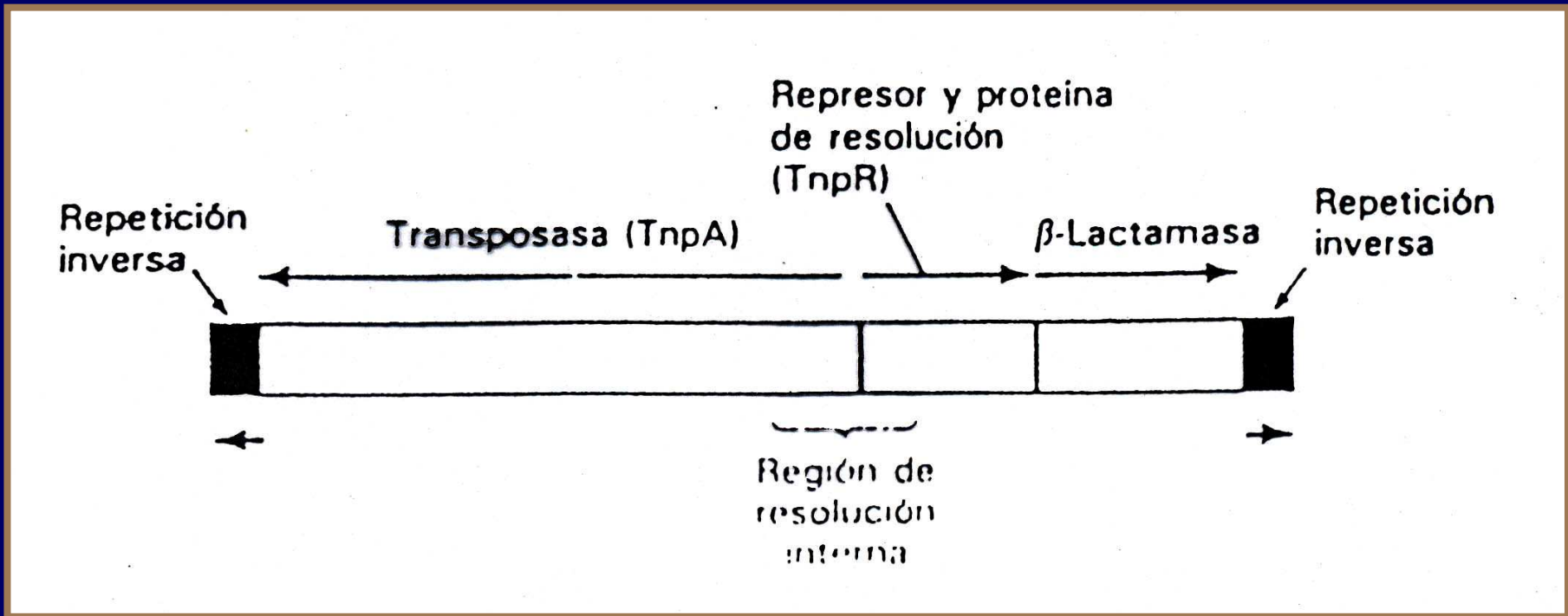


pUC18 multiple cloning site and primer binding regions: 364-480



# TRANSPOSONES

# TRANSPOSONES-ESTRUCTURA



# INTEGRONES

NUEVOS MECANISMOS  
DE RESISTENCIA A LOS  
ANTIBIOTICOS

# INTEGRONES-ESTRUCTURA

## EXTREMO 5'

- LONGITUD: 1,3 Kb
- COMPONENTES:
  - PROMOTOR DE LA INTEGRASA
  - GEN *int* QUE CODIFICA UNA INTEGRASA O RECOMBINASA  
(CATALIZA UNA RECOMBINACION SITIO-ESPECIFICA)
  - ZONA *attI* (DONDE SE INSERTAN LAS IS)
  - PROMOTOR (UNO O DOS) PARA LOS GENES DE RESISTENCIA INSERTADOS



# INTEGRONES-ESTRUCTURA

## EXTREMO 3'

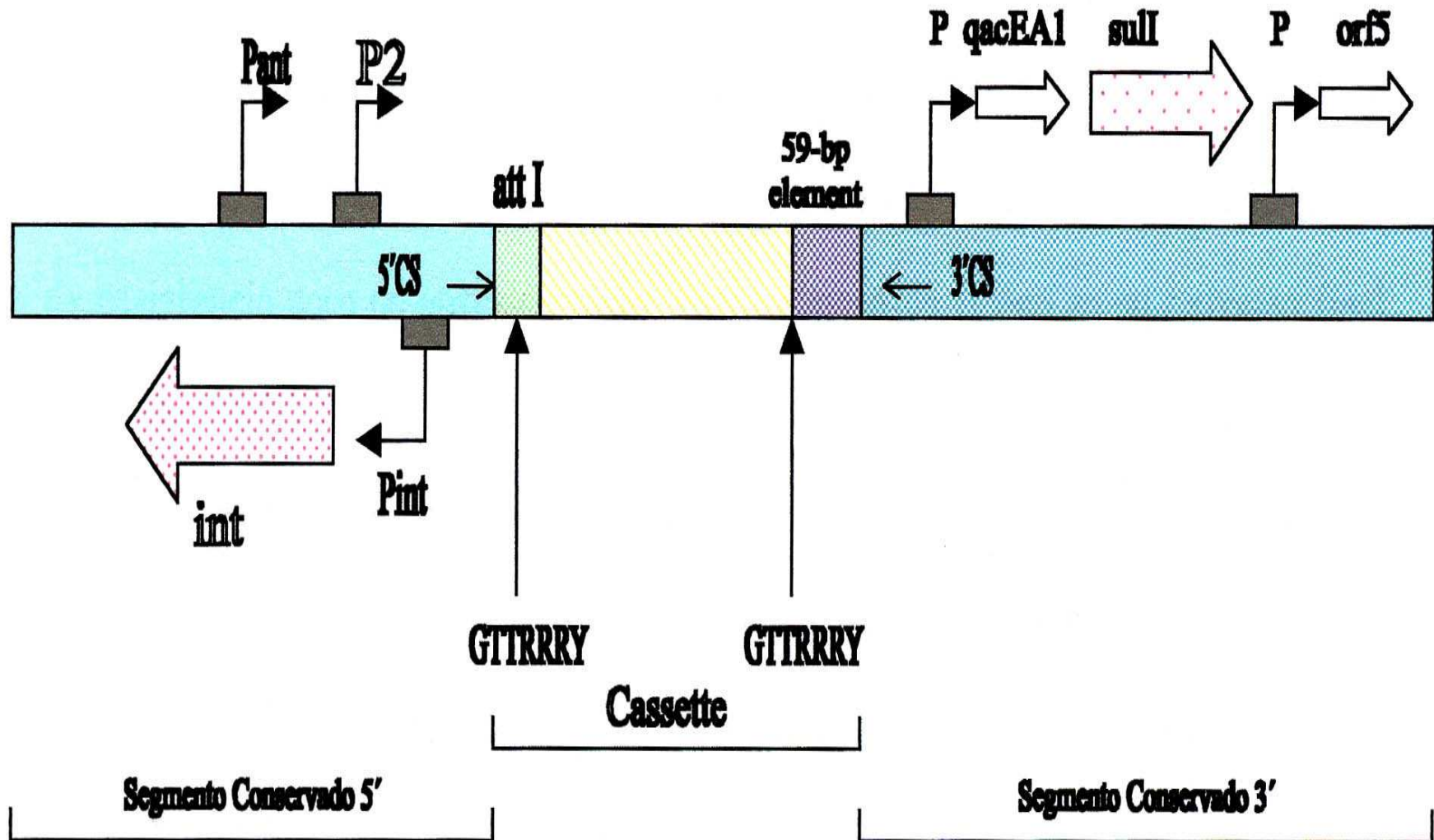
- LONGITUD: AL MENOS 2 Kb
- COMPONENTES:
  - GEN *qacEAI* (RESISTENCIA A COMPUESTOS DE AMONIO CUATERNARIOS)
  - GEN *suI* (RESISTENCIA A SULFONAMIDAS)
  - ZONA DE LECTURA ABIERTA *orf 5* (FUNCION DESCONOCIDA)

# INTEGRONES-ESTRUCTURA

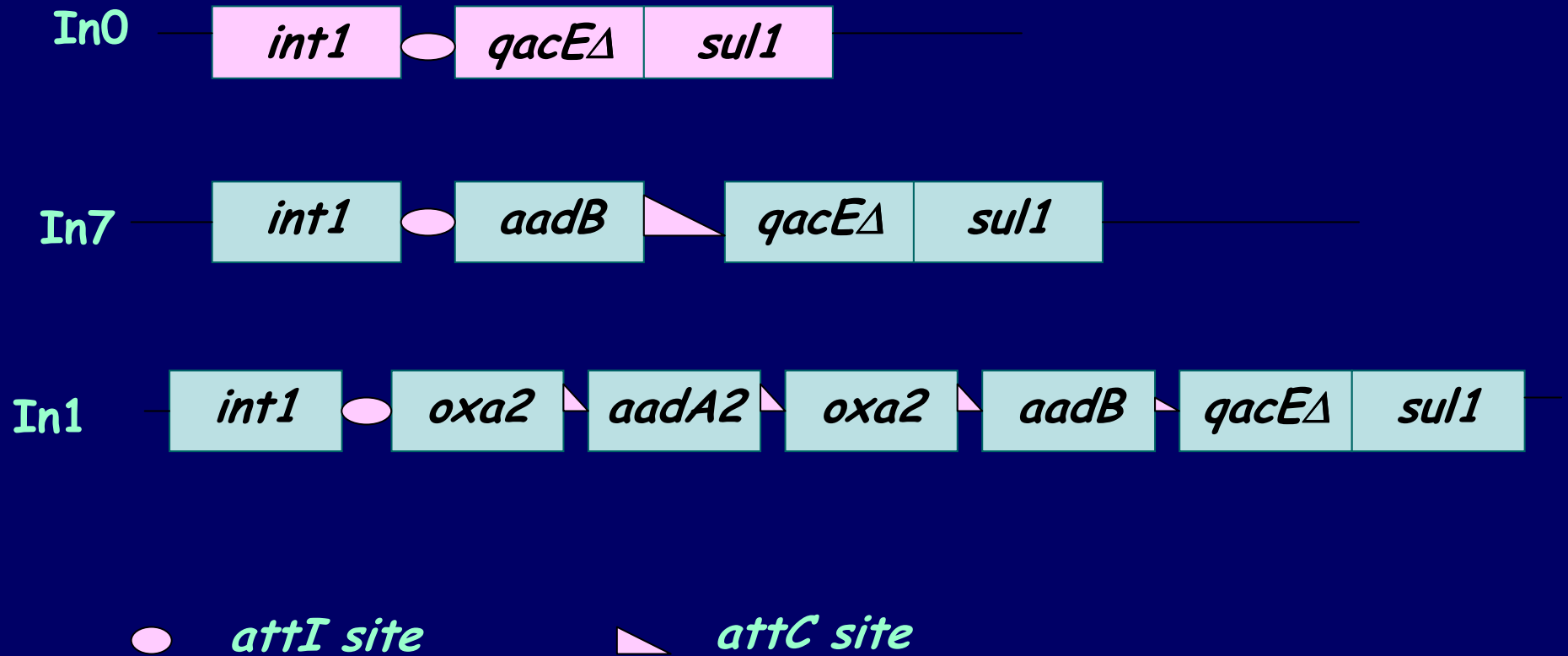
## SECUENCIAS INSERTADAS/CASSETTES GENETICOS

- TAMAÑO: POCOS CIENTOS DE BASES
- GEN SIN PROMOTOR Y CON UN SITIO DE RECOMBINACION EN SU EXTREMO 3' DE 59 pb. (*attC*)
- PUEDEN EXISTIR LIBRES COMO DNA CIRCULAR (SIN CAPACIDAD DE REPLICACION O TRANSCRIPCION)
- INSERCIÓN:
  - \* SIEMPRE EN LA MISMA DIRECCION
  - \* EL GEN SE INSERTA EN LA PRIMERA POSICION
  - \* UNA VEZ INSERTADOS LOS GENES PUEDEN INTERCAMBIAR POSICION
- GENES SITUADOS EN LA ZONA MAS DISTAL TIENEN EXPRESION MAS BAJA

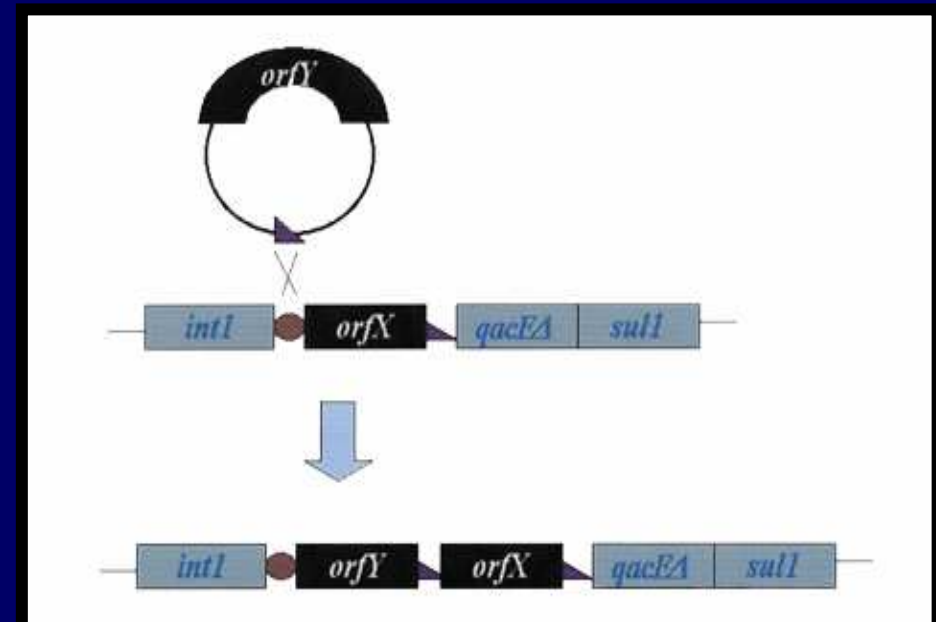
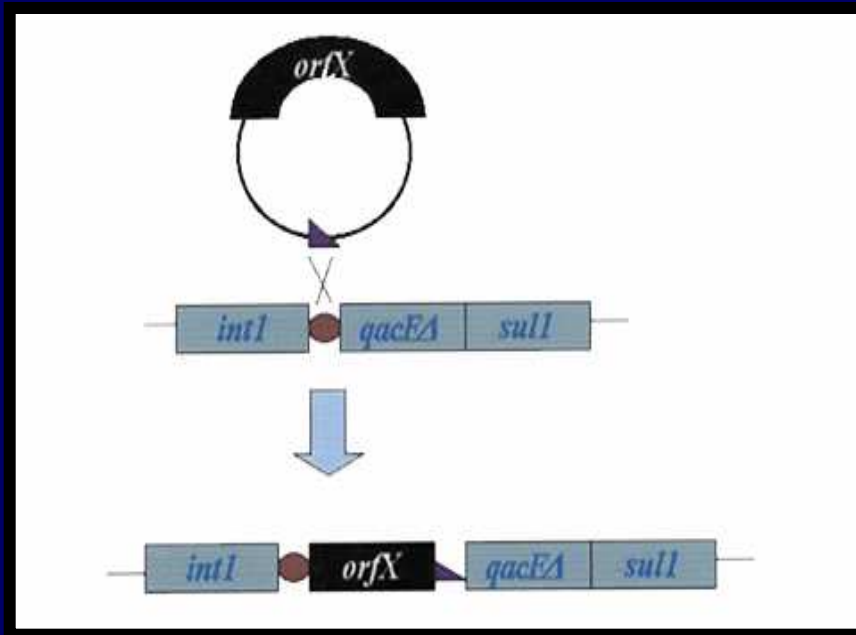
# ESTRUCTURA



# INTEGRONES



# INTEGRONES-ESTRUCTURA



# INTEGRONES-CLASES

## CLASE 1

- LOS MAS FRECUENTES EN AISLAMIENTOS CLINICOS
- INTEGRASA DE TIPO 1 (*intI*)

## CLASE 2

- INTEGRASA DE TIPO 2 (*intI* 2)
- 40% DE HOMOLOGIA CON EL GEN *int I*
- SOLO SE HA ENCONTRADO EN Tn7 Y SEMEJANTES

## CLASE 3

- INTEGRASA DE TIPO 3 (*intI* 3)
- 61% DE HOMOLOGIA CON EL GEN *int I*

# GENES DE RESISTENCIA EN INTEGRONES

## 1. AMINOGLICÓSIDOS

*aadA* (SPECTINOMICINA Y ESTREPTOMICINA)  
*aadB* (KANAMICINA, GENTAMICINA Y TOBRAMICINA)  
*aacA7* (AMIKACINA Y TOBRAMICINA)

## 2. BETALACTÁMICOS

BETALACTAMASAS TIPO OXA, IMP Y VIM

## 3. ERITROMICINA

GENES *ereA*

## 4. TRIMETOPRIM

GENES *dhfrV*

## 5. CLORANFENICOL

GENES *catB3*

## 6. ANTISÉPTICOS, DESINFECTANTES

# BACTERIAS PORTADORAS

## GRAM NEGATIVOS

- ENTEROBACTERIAS: *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp...*
- BNF: *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*

## GRAM POSITIVOS

*Staphylococcus aureus*  
Enterococos

**MICOBACTERIAS:** *Mycobacterium fortuitum*



# DETECCIÓN DE INTEGRONES:PCR

## CLASE 1

5'CS (-GGCATCCAAGCAGCAAG-)  
3'CS (-AAAGCAGACTTGACCTGA-)  
(secuencias conservadas)

## CLASE 2

INT72 (-GCACTCCATGGAATATCCAGGGCCATTCCCG-)  
INT74 (-GCTTGCTTGCAGGGATATAATCAATATCGC-)  
(gen de la dihydrofolato reductasa)

## CLASE 3

INT3L (-GCAGGGTGTGGACGAATACG-)  
INT3R (-ACAGACCGAGAAGGCTTATG-)  
(específicos para la integrasa *intI3*)

# CARACTERIZACIÓN DE INTEGRONES A PARTIR DE LA MUESTRA AMPLIFICADA

## 1. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

DNA MOLDE: 5  $\mu$ l DNA AMPLIFICADO (vol. final 25  $\mu$ l)

ENZIMAS: *Hinf I*, *HaeIII*, *BstEII* .....

## 2. SECUENCIACIÓN DE DNA

1. PURIFICACIÓN DE LA BANDA AMPLIFICADA

2. KIT DE SECUENCIACIÓN

# DETECCIÓN DE INTEGRONES: HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE DNA

## CLASE 1

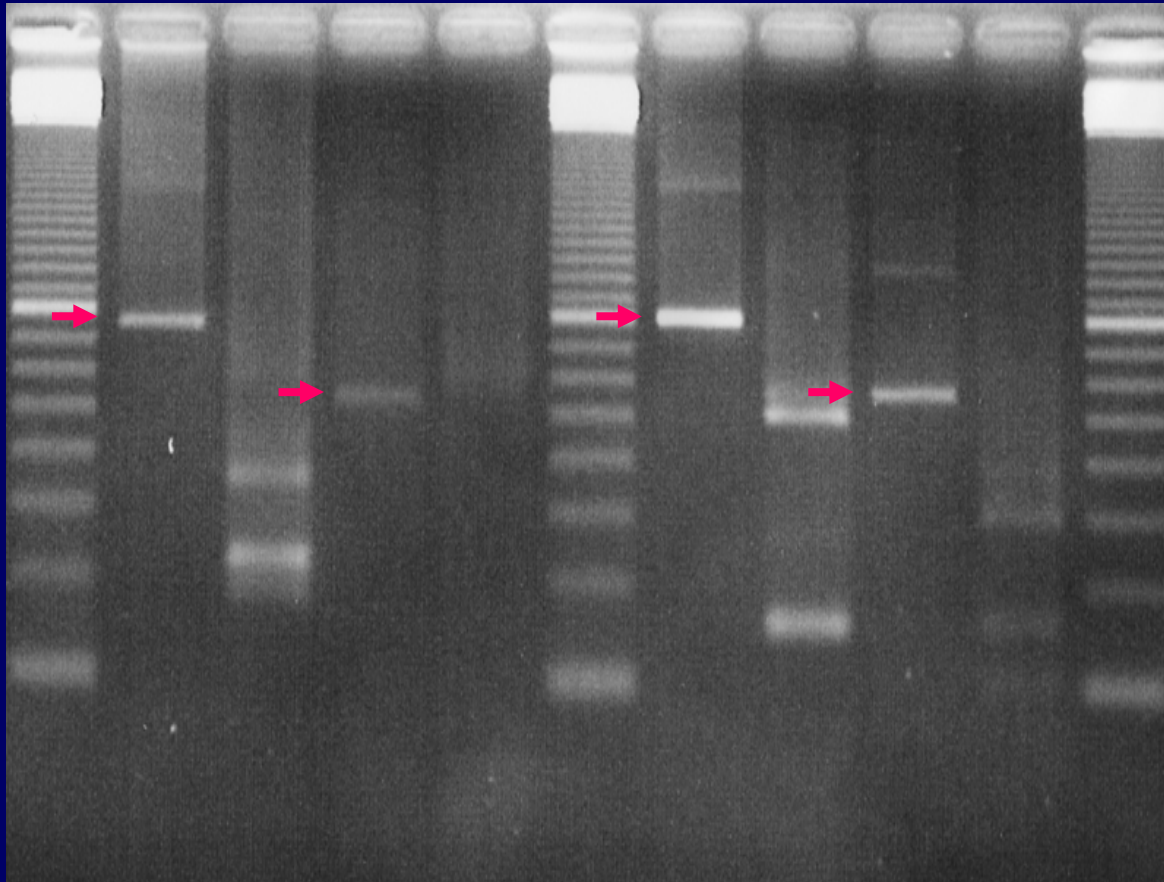
SONDA int21 (específica para *intI1*)  
(-CCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGC-)

## CLASE 2

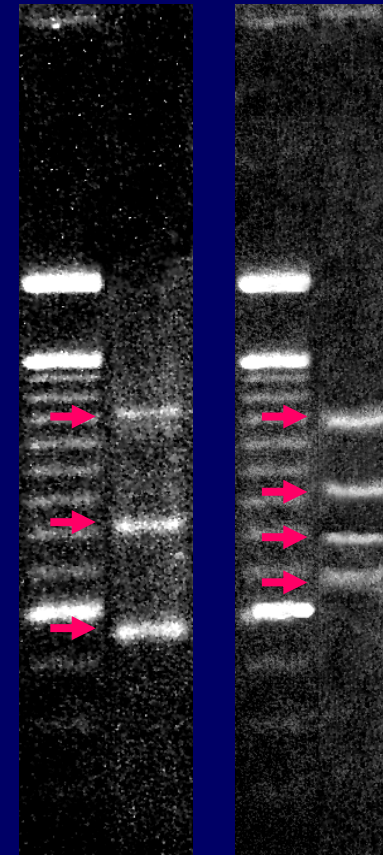
SONDA int7 (específica para *intI2*)  
(-GCGATATTGATTATCCCTGCAAGCAAGC-)

# INTEGRONES PRESENTES EN AISLAMIENTOS DE *A. baumannii*

AÑO 1999



AÑOS 2002-05



<b>Tipo Integrón</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Digestión con Hinf I</b>	<b>Genotipos (nº aislamientos)</b>	<b>Secuenciación</b>
<b>a</b>	760	350, 220, 190	I <sub>(21)</sub> , XI <sub>(3)</sub>	aadB, OXA7
<b>b</b>	550	550	II <sub>(50)</sub> , V <sub>(1)</sub> , VI <sub>(2)</sub> , VIII <sub>(1)</sub> , IX <sub>(1)</sub> , X <sub>(1)</sub>	No definitivo
<b>c</b>	800	550	III <sub>(11)</sub> , VII <sub>(1)</sub>	aacA4
<b>d</b>	600	550, 170	IV <sub>(1)</sub>	No definitivo
<b>e</b>	1200	300, 170, 110	II <sub>(50)</sub> , IV <sub>(1)</sub> , V <sub>(1)</sub> , VI <sub>(1)</sub> , VIII <sub>(1)</sub> , IX <sub>(1)</sub> , X <sub>(1)</sub>	-
<b>f</b>	1300	110	VI <sub>(1)</sub>	-
<b>g</b>	1600		I <sub>(1)</sub> , II <sub>(1)</sub> , III <sub>(1)</sub> , V <sub>(1)</sub>	-