

DIFUSIÓ DE LA RESISTÈNCIA ALS ANTIMICROBIANS. DIFERENTS CAMINS AMB UN MATEIX FINAL

AURORA GARCÍA,^{1,2} MONTSERRAT REBOLLO¹ I FERRAN NAVARRO^{1,2}

¹ Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

² Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona.

Adreça per a la correspondència: Ferran Navarro. Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Av. Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. Adreça electrònica: fnavarror@santpau.es.

RESUM

Un dels aspectes més preocupants de l'adquisició de resistències és la seva difusió en el món microbià. L'adquisició dels diferents mecanismes de resistència pot ser originada pel microorganisme mateix, fruit d'errors en la seva replicació, o per l'adquisició de material genètic que codifiqui gens de resistència. En el primer cas parlariem d'una difusió vertical, mentre que en el segon parlariem de difusió horitzontal.

La difusió horitzontal es pot donar per transformació, transducció i conjugació. Potser el més simple d'aquests mecanismes de transferència gènica és la transformació natural, on DNA lliure de l'ambient és adquirit per un bacteri receptor. Aquest DNA serà incorporat a la cèl·lula i, en expressar-se, podrà comportar un canvi fenotípic. En el cas de la transducció el DNA és transferit per bacteriòfags a les noves cèl·lules que infecten. El darrer mecanisme de difusió horitzontal de la resistència és la conjugació, procés de transferència de gens a través de plasmidis entre dues cèl·lules que estan en contacte.

Finalment, trobem unes altres estructures gèniques, *els elements mòbils*, que tenen també un paper molt important en la difusió gènica, com són els gens *cassette*, integrons, seqüències d'inserció, transposons conjugatius i no conjugatius i les illes genòmiques.

Paraules clau: transformació, transducció, conjugació, elements mòbils.

SUMMARY

One of the greatest concerns in acquiring drug resistance is dissemination of resistance genes in the microbial world. Acquisition of various resistance mechanisms could be generated either by the microorganism itself, as the result of replication errors, or by acquisition of genetic material that codes for resistance genes. In the former, we are talking about *vertical diffusion*, whereas the latter is known as *horizontal diffusion*.

Transformation, transduction and conjugation could mediate horizontal dissemination. Perhaps the simplest of these genetic exchanges mechanisms is natural transformation, where free DNA will be acquired by a recipient bacterium. This DNA will be incorporated to the cell and could cause a phenotypic change if it is expressed. In transduction, DNA is transferred by bacteriophages to newly infected cells. The third mechanism is conjugation, where gene transfer is mediated by plasmids between two cells, which are in direct contact.

Finally, other genetic structures, *mobile elements*, also play an important role in genetic diffusion. These mobile elements are cassette genes, integrons, insertion sequences, conjugative and non-conjugative transposons and genomic islands.

Keywords: transformation, transduction, conjugation, mobile elements.

BASES GENÈTIQUES DE LA RESISTÈNCIA

Un dels aspectes més preocupants de l'adquisició de resistències és la seva difusió en el món microbià. L'adquisició dels diferents mecanismes de resistència pot ser originada pel microorganisme mateix, fruit d'errors en la seva replicació, o per l'adquisició de material genètic que codifiqui gens de resistència. En el primer cas estariem parlant de mutacions, que només es difondran verticalment, és a dir, seran transmeses de cèl·lula mare a cèl·lula filla. L'adquisició de la resistència, en aquest cas, pot aparèixer bé en una sola generació, com és el cas de la resistència a rifampicina, o bé en el transcurs de diverses generacions, com en el cas de la resistència a fluoroquinolones. Les mutacions poden tenir lloc per substitució d'una base nucleotídica o per addició o pèrdua d'una o diverses bases. També poden tenir lloc per amplificació o còpia de múltiples segments de DNA, per inserció o escissió d'un segment mòbil de DNA que codifica o regula la seqüència d'un gen, o per inversió d'un segment.

La interacció de l'antibiòtic amb la seva diana sol ser força específica, de manera que un simple canvi de base al gen, que provoqui un canvi d'aminoàcid a la proteïna, pot alterar aquesta interacció entre l'antibiòtic i la seva diana i donar lloc a un fenotipus de resistència a aquest antibiòtic. Aquesta mutació puntual presenta una freqüència relativament eleva-

da en moltes espècies bacterianes. Exemples de resistència «mutacional» són la resistència a estreptomina per mutació ribosòmica (Eliopoulos *et al.*, 1984), a rifampicina per mutacions a l'RNA-polimerasa (Wehrli, 1983), a fluoroquinolones a través de mutacions a les topoisomerases (Martínez *et al.*, 1998) i la resistència al linezolid per mutacions a l'RNA ribosòmic (Prystowsky *et al.*, 2001).

Aquestes mutacions poden aparèixer també en gens reguladors de processos cel·lulars. Un dels exemples més clars és la «desrepressió» de la β -lactamasa cromosòmica d'*Enterobacter* sp. (Jacobs *et al.*, 1997). Mutacions al gen *ampD*, codificador d'una amidasa cel·lular, donen lloc a l'acumulació d'un determinat producte que té com a efecte l'increment de l'expressió del gen cromosòmic *ampC*, que codifica una β -lactamasa.

També, existeixen una sèrie de mecanismes d'adquisició de material genètic mitjançant els quals la resistència pot ser difosa d'una cèl·lula a una altra (de la mateixa espècie o no), cosa que contribueix a la difusió horitzontal de la resistència als antimicrobians. Aquests mecanismes són la transformació, la transducció i la conjugació.

TRANSFORMACIÓ

Potser el més simple d'aquests mecanismes de transferència de gens és la transformació natural, que es va definir originàriament

com l'habilitat d'algunes espècies bacterianes d'absorbir, sota determinades circumstàncies, molècules de DNA nu lliure de l'ambient, provinent d'un bacteri donant. Aquest DNA serà adquirit per un bacteri receptor, que rebrà el nom de *transformant*, serà incorporat a la cèl·lula i, en expressar-se, podrà comportar un canvi fenotípic.

La transformació la va posar en evidència per primera vegada Fred Griffith el 1928, mitjançant experiments amb *Streptococcus pneumoniae* i l'adquisició de virulència, tot i desconèixer llavors quina era la partícula transformant. No va ser fins al 1944 quan Avery, McLeod i McCarty van provar que la partícula transformadora responsable d'aquesta adquisició de virulència en una soca no virulenta era un fragment de DNA (Avery *et al.*, 1944).

Perquè el material genètic s'incorpori al genoma bacterià, després de travessar la membrana citoplasmàtica, i pugui, per tant, comportar un canvi fenotípic, és necessari que existeixin regions de certa homologia entre el nou DNA incorporat per la cèl·lula i el del bacteri en qüestió. Si no existeix aquesta homologia, el DNA incorporat serà degradat; mentre que si existeix homologia, el nou DNA podrà ser incorporat mitjançant un procés de recombinació. De totes maneres, encara que el DNA exogen internalitzat ha d'integrar-se al cromosoma o en un plasmidi, també pot circularitzar-se (si conté un origen de replicació) i establir-se com un replicó autònom. Com a resultat dels fenòmens de recombinació, es poden obtenir gens la seqüència dels quals està formada per múltiples fragments de diferents orígens, i es forma el que es denomina un *mosaic*. Un exemple de gen mosaic és el que confereix resistència a penicil·lina i a cefalosporines en *S. pneumoniae*. S'ha descrit, en soques resistents, una gran varietat de gens mosaic codificadors de la *penicillin-binding protein* (PBP), amb el nivell i grau de resistència determinats pel nombre i la naturalesa de les re-

combinacions gèniques (Hakenbeck i Coyette, 1998).

Els mecanismes pels quals tenen lloc els fenòmens de transformació són variats i encara no molt ben coneguts. Perquè la cèl·lula pugui captar el DNA nu ha de trobar-se en un estat de «competència». Aquest estat de «competència» pot ocórrer naturalment (competència fisiològica) en alguns microorganismes com, per exemple, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* i diverses espècies de cianobacteris com el gènere *Synochococcus* (Snyder i Champness, 1997), o bé pot ser induït artificialment en altres (competència artificial) per diferents mecanismes (CaCl₂, polsos elèctrics, etc.). En qualsevol cas, perquè la transformació tingui lloc és necessari disposar de DNA lliure, principalment de doble cadena, que s'unirà a la cèl·lula mitjançant un receptor localitzat a la seva superfície (Averhoff i Friedrich, 2003).

La transformació pot dividir-se en diferents etapes que són comunes a tots els bacteris (vegeu la figura 1):

a) *Desenvolupament de la competència*. Requereix canvis fisiològics complexos que tenen lloc en determinades etapes del creixement bacterià i està associat a diversos fenòmens com són la producció de feromones o factors de competència en diferents espècies bacterianes.

b) *Unió del DNA*. S'uneix DNA de doble cadena, encara que la cèl·lula receptora pot unir també limitades quantitats de DNA de cadena senzilla. Aquest DNA, provinent de la cèl·lula donant, s'uneix a través d'un receptor localitzat a la superfície cel·lular. L'especificitat del DNA que la cèl·lula pot unir varia segons l'espècie bacteriana. Bacteris grampositius, com per exemple *B. subtilis* i *S. pneumoniae*, poden unir tant DNA homòleg (de la mateixa espècie) com heteròleg (d'altres espècies). En canvi, els gramnegatius, com *H. influenzae* o *N. gonorrhoeae*, només poden unir DNA homòleg o d'espècies molt semblants. En aquests casos, es requereixen unes seqüèn-

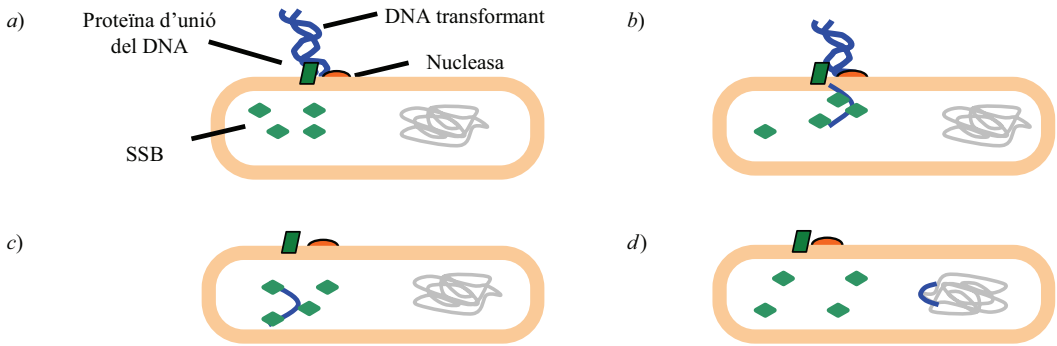


FIGURA 1. *Mecanisme de transformació.* a) Desenvolupament de la competència i unió del DNA transformador. b) Processament i presa del DNA exogen. c) Les proteïnes específiques (SSB) s'uneixen i protegeixen el DNA exogen monocatenari. d) El DNA exogen s'integra al cromosoma bacterià en regions homòlogues mitjançant la proteïna RecA.

cies de «captació» específiques, que solen ser curtes, entre deu i dotze parells de bases (pb), però suficientment llargues perquè gairebé mai puguin trobar-se per casualitat en un altre DNA. En *H. influenzae*, la internalització del DNA requereix una seqüència específica d'11 pb, que es troba repetida unes sis-centes vegades en el seu genoma, mentre que en *N. gonorrhoeae* aquesta seqüència és de tan sols 10 pb (Snyder i Champness, 1997). La unió del DNA transformador involucra una primera fixació reversible, que després es transforma en irreversible (Dubnau, 1999).

c) *Processament i captació del DNA.* Una vegada fixat el DNA de doble cadena a la cèl·lula, tenen lloc diversos processos que porten a la captació de només una de les dues cadenes. Aquests passos són també diferents segons l'espècie bacteriana. En grampositius, una de les cadenes del DNA que s'ha unit és tallada per una endonucleasa en petits fragments. Es creu que aquest enzim forma part del receptor de DNA. Aquest receptor empeny la cadena complementària (no tallada) cap a l'interior de la cèl·lula, mentre que l'altra cadena és degradada a oligonucleòtids per una exonucleasa associada. Aquest DNA de cadena senzilla que s'ha captat s'associa a proteïnes SSB (*single strand-binding proteins*) específiques de la competència, que el protegeixen de l'acció de les endonucleases. En gramne-

gatius, el DNA de doble cadena específic unit és captat per unes vesícules, o compartiments subcellulars, que reben el nom de *transformasomes*. Dins d'aquestes vesícules es degrada una de les dues cadenes i l'altra s'interna mitjançant un procés semblant al del pneumococ (no obstant això, en bacteris com *Haemophilus* no s'han observat intermediaris de DNA de cadena senzilla al citoplasma). En aquest cas són els transformasomes i no les proteïnes SSB els que protegeixen el DNA de les DNAases externes i dels enzims de restricció cel·lulars (Dubnau, 1999).

d) *Integració del DNA per recombinació i expressió.* Tant en grampositius com en gramnegatius el DNA transformant s'integra al DNA cel·lular en regions homòlogues mitjançant un procés anomenat *desplaçament de la cadena*: la nova cadena envaeix la doble hèlix i desplaça la cadena homòloga vella, i aquesta és degradada. Mitjançant reparació i subsegüent replicació, la seqüència del nou DNA incorporat pot reemplaçar la seqüència cromosòmica original en aquestes regions homòlogues. Si les seqüències de DNA donant i receptor difereixen lleugerament, en aquesta regió poden aparèixer recombinants (Snyder i Champness, 1997).

Existeixen nombrosos exemples d'adquisició de resistències en microorganismes naturalment transformables d'interès clínic com

la resistència a β -lactàmics en *S. pneumoniae* (*pbp*), *Helicobacter pylori* (*pbp1A*) i neissèries (*penA*), la resistència a quinolones en *S. pneumoniae* (*gyrA* i *parC*), la resistència a tetraciclina en *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* i altres (*tetM*), la resistència a sulfamides i trimetoprim (*sul* i *dfr*) i potser la resistència a carbapenems en *Pseudomonas aeruginosa* (*oprD*).

TRANSDUCCIÓ

Un altre dels mecanismes de difusió horitzontal de gens de resistència és la transducció. En aquest cas, la situació és semblant a l'anterior, però en lloc d'incorporar DNA lliure del medi, aquest DNA prové d'una cèl·lula prèviament infectada i serà transferit per partícules víriques o bacteriòfags a les noves cèl·lules que seran infectades. Els fags implicats en un procés de transducció reben el nom de *fags transductors* o *partícules transductores*. La soca bacteriana original en la qual aquests fags s'han multiplicat s'anomena *cèl·lula donant*, mentre que la soca bacteriana que serà infectada per aquestes partícules rep el nom de *cèl·lula receptora*. Finalment, les cèl·lules que han rebut el DNA per transducció s'anomenen *transductants* (Snyder i Champness, 1997).

Existeixen dos tipus de transducció:

a) *Transducció generalitzada*. Comença en el moment en què té lloc l'empaquetament accidental d'una porció de DNA bacterià en una partícula vírica normal (vegeu la figura 2). Encara que s'ha descrit que l'empaquetament del DNA víric comença per llocs específics del concatàmer víric, anomenats *pac*, i que aquests no es troben en el genoma bacterià, el fag pot, aparentment, reconèixer seqüències semblants, i es produeix així l'encapsidació errònia de DNA bacterià (Snyder i Champness, 1997). Quan s'indueix la lisi cel·lular, s'allibera aquesta partícula transductora que, tot i que té la totalitat del seu DNA bacterià, és capaç d'adherir-se a una nova cèl·lula i injectar

aquest DNA. Si existeixen regions homòlogues, aquest DNA transductor pot ser incorporat al genoma de la cèl·lula receptora. La quantitat de partícules de transducció generalitzada que poden produir-se a les cèl·lules infectades és molt variable; mentre que en algunes cèl·lules no se'n produeix cap, en altres es pot arribar a encapsidar el 20 % del genoma bacterià. Malgrat que, en un principi, totes les regions del DNA bacterià podrien ser encapsidades, en aquest tipus de transformació s'ha observat que alguns *loci* són transduïts amb major freqüència. S'ha observat que aquest tipus de transducció pot tenir lloc tant amb fags temperats com pseudotemperats, i també mitjançant fags virulents. Aquests últims són els que produeixen el major nombre de partícules transductores. Alguns bacteriòfags que presenten aquest tipus de transducció són el P1 d'*Escherichia coli* i el P22 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

b) *Transducció especialitzada*. Es diferencia de la generalitzada en el fet que només poden transferir-se els gens que es troben flanquejant la regió on el fag temperat o lisogènic s'integra al cromosoma bacterià (vegeu la figura 3). Aquesta regió d'integració sovint es troba en punts concrets del genoma i, per tant, els gens transduïts solen ser uns determinats (Canchaya *et al.*, 2003). Per exemple, el lloc d'inserció del fag λ es troba, en *E. coli*, entre els gens *gal* i *bio* (Snyder i Champness, 1997). No obstant això, la integració d'aquest fag en altres llocs secundaris pot comportar la transducció d'altres marcadors bacterians. L'escissió d'un fag no sempre és «perfecta»: en alguns casos pot tenir lloc una escissió anormal que provoca que part del genoma del fag arrossegui gens bacterians propers al punt on estava, i es formen fags defectius, anomenats fags o partícules *de transducció especialitzada*, que contindran tant DNA víric com bacterià. Aquestes s'obtenen amb una freqüència molt baixa, atès que els errors en l'escissió del fag són extremadament infreqüents, i és un milió de vegades més freqüent l'escissió normal

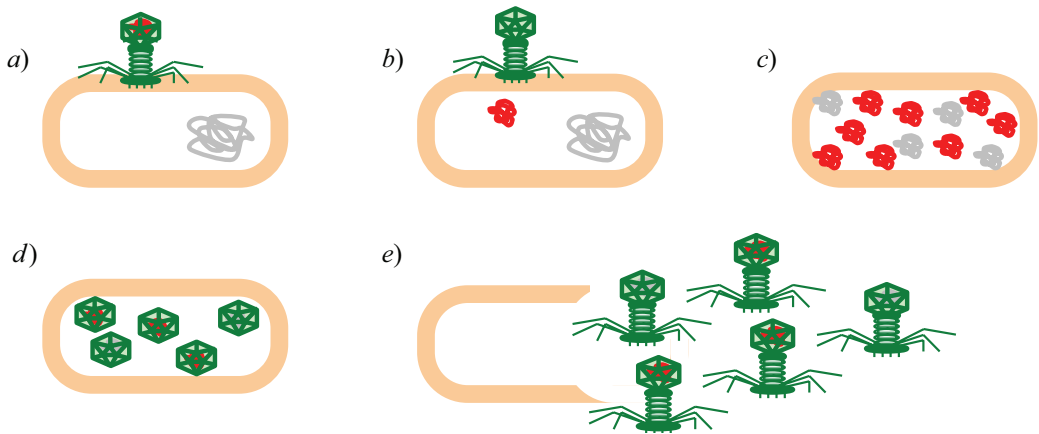


FIGURA 2. *Mecanisme de transducció generalitzada.* a) Fixació del fag a la cèl·lula. b) Injecció del material genètic víric. c) Degradació del DNA bacterià i replicació del genoma víric. d) Síntesi de les capsides i empaquetament del material genètic bacterià i víric. e) Lisi cel·lular i alliberació de les noves partícules víriques.

(Snyder i Champness, 1997). Una vegada el fag injecta el DNA transducció poden donar-se diferents situacions. En tots els casos, però, després de la injecció es produeix la circularització i superenrotllament del DNA transductor. Després, el DNA víric pot produir la replicació vírica mitjançant un cicle lític, pot mantenir-se inactiu i eliminar-se per segregació, o bé pot recombinar-se, per diferents vies, amb el material genètic bacterià.

Un dels primers exemples de transducció detectat en clínica va ser el de la transferència de gens de resistència a penicil·lina en *Staphylococcus aureus*. En aquest cas, però, el bacteriòfag contribueix a la difusió de plasmidis de mida petita, que són encapsidats i transferits a altres bacteris. Així, els plasmidis seran autoreplicats i mantinguts sense necessitat de recombinació. El fet que el responsable d'aquesta resistència sigui un gen codificador d'una β -lactamasa, que aquest s'hagi identificat freqüentment en plasmidis i que durant molt de temps s'hagin descrit amb detall diversos bacteriòfags en aquest grup de microorganismes, ha permès especular que l'elevada prevalença de producció de β -lactamases en estafilococs prové de la transferència d'aquests plasmidis a través de bacteriòfags (Lyon i Skurray, 1987).

Altres exemples són la detecció de gens que confereixen resistència a β -lactàmics, com són els gens *bla_{OXA}* i *bla_{PSE}*, en DNA fàgic obtingut a partir d'aigües residuals, tant humanes com animals, a la província de Barcelona (Muniesa *et al.*, 2004) o la implicació d'aquests en la transferència de determinants de virulència (Cheetham i Katz, 1995; Ferretti *et al.*, 2001). Els fags tenen un important paper en l'evolució, ja que promouen la transferència horitzontal de gens tant entre membres individuals de la mateixa espècie com entre bacteris força distanciat. El DNA dins les capsides víriques és, normalment, més estable que el DNA nu lliure al medi, i això li permet poder persistir més temps a l'ambient. A més a més, molts fags són capaços d'infectar un ampli rang d'hostes, per la qual cosa aquest DNA pot disseminar-se en un gran nombre d'espècies diferents. Encara que el DNA d'una determinada espècie no sigui capaç de recombinar-se si no troba seqüències homòlogues al cromosoma d'una espècie diferent, quan el DNA transduït és un plasmidi amb un ampli rang d'hostes, capaç d'autoreplicar-se a la cèl·lula receptora, o bé conté un transposó que pot saltar dins el DNA d'aquesta cèl·lula receptora, sí que és possible la transducció estable de

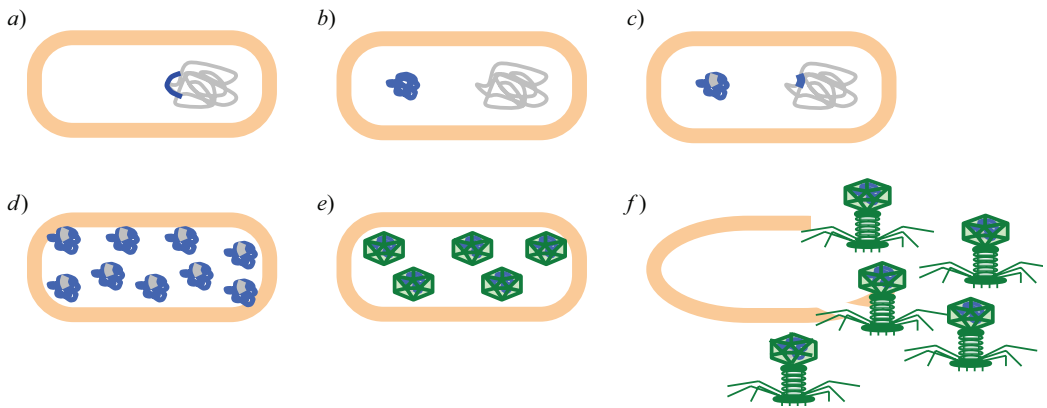


FIGURA 3. *Mecanisme de transducció especialitzada.* a) Cèl·lula lisògena: el DNA del bacteriòfag es troba inserit dins el DNA bacterià. b) Circularització i escissió del DNA del fag. c) Escissió anormal que produeix la pèrdua d'alguns gens del fag, que es mantenen inserits al cromosoma bacterià. En canvi, alguns gens bacterians s'han circularitzat juntament amb el DNA del fag. d) Degradació del DNA bacterià i replicació del genoma víric. e) Síntesi de les càpsides i empaquetament del material genètic bacterià i víric. f) Lisi cel·lular i alliberació de les noves partícules víriques.

gens entre bacteris poc relacionats (Snyder i Champness, 1997).

CONJUGACIÓ

El darrer mecanisme de difusió horitzontal de la resistència és la conjugació, procés de transferència de gens entre dues cèl·lules que estan en contacte (vegeu la figura 4). Aquest tipus de transferència de gens és possible gràcies al fet que els microorganismes poden ser portadors d'estructures genètiques, denominades *plasmidis*. Els plasmidis i el cromosoma bacterià constituïrien el que es coneix amb el nom de *genoma bacterià*.

Els plasmidis són molècules circulars de DNA de doble cadena, superenrotllades negativament (tot i que també se'n troben de lineals en *Borrelia* i alguns actinomicets) (Snyder i Champness, 1997). Són literalment material genètic accessori. No codifiquen funcions essencials per a la cèl·lula i la seva mida pot variar entre poques i centenars de quilobases. Poden transportar des d'únicament els gens necessaris per a la seva replicació fins a centenars de gens addicionals; llavors es

consideren com a «mini-cromosomes» (Cole i Saint-Girons, 1999). En alguns casos la dispensabilitat d'aquests és dubtosa, com en el cas de *Borrelia burgdorferi*, on diferents plasmidis contenen gens que codifiquen lipoproteïnes i altres funcions metabòliques, que en el cas de perdre's serien molt perjudicials per a la cèl·lula (García-de los Santos *et al.*, 1996). Els plasmidis es repliquen autònomament (replicons), independentment del cromosoma de la cèl·lula (Grinsted i Bennet, 1988). Presenten un origen de replicació (*oriV*) i algunes de les proteïnes necessàries per a iniciar la replicació, tot i que dependran de la cèl·lula hoste per a replicar-se, ja que necessitaran l'aport extern de DNA-polimerases, ligases, helicases, etc. S'han observat dos tipus de replicació plasmídica: la replicació en θ , freqüent en bacteris gramnegatius, i la replicació en σ o cercle rodant, freqüent en bacteris grampositius.

Alguns plasmidis presenten un rang d'hostes força estret, mentre que altres són capaços de transferir-se i replicar-se dins una gran varietat d'espècies bacterianes diferents (Rice *et al.*, 2003). Els plasmidis poden també integrar-se dins el cromosoma de la soca receptora (cèl·lules *Hfr*), i incrementen així l'estabilitat de

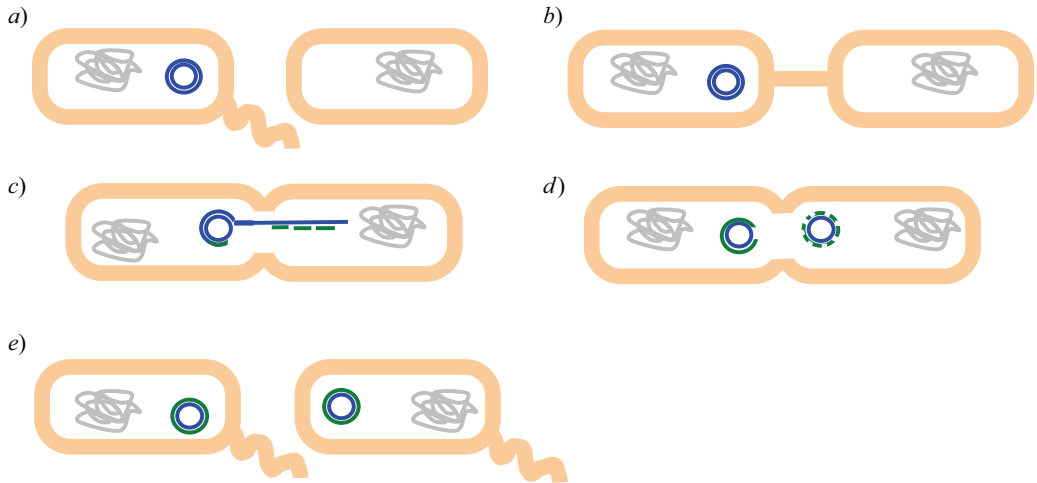


FIGURA 4. *Mecanisme de conjugació.* a) Cèl·lula conjugativa (F+), amb el seu pili sexual, i cèl·lula no conjugativa (F-), sense pili. b) Establiment del contacte entre les dues cèl·lules mitjançant el pili sexual. c) Contracció del pili sexual i contacte cèl·lula-cèl·lula. Formació d'un porus per on passa el DNA de cadena senzilla des de la cèl·lula donant a la receptora. d) Síntesi de les cadenes de DNA conjugatiu: contínua a la cèl·lula donant i discontinua a la receptora. e) Segellament dels porus i separació de les dues cèl·lules. Cadascuna conté una còpia del factor F i poden, per tant, sintetitzar el pili.

la informació genètica que transporten (Rice i Carias, 1998), replicant-se com qualsevol altre caràcter cromosòmic. Aquests plasmidis integrats s'anomenen *episomes*. Els plasmidis conjugatius són potser més freqüents o, com a mínim, més estudiats, en bacteris gramnegatius (gèneres *Escherichia* i *Pseudomonas*) (Snyder i Champness, 1997). El procés de la conjugació s'inicia quan el pili sexual de la cèl·lula donant, format per les proteïnes sintetitzades pels gens *traA* i *traQ*, entra en contacte amb la membrana d'una cèl·lula receptora. El contacte cèl·lula-cèl·lula s'aconsegueix, presumiblement, bé per la contracció o pel desacoblament del pili sexual. L'aparellament entre les dues cèl·lules és, en un principi, inestable, però després s'estabilitza específicament mitjançant les proteïnes TraG i TraN. Posteriorment, altres gens *tra* s'encarregaran de la transferència del plasmidi a través de les membranes, mitjançant la formació d'un relaxosoma (complex format per DNA i proteïnes) al voltant de l'origen de transferència (*oriT*) del plasmidi. Aquest com-

plex realitzarà un tall i és la cadena simple de DNA, creada pel tall, la que es transferirà. Un altre complex de proteïnes connectarà i establirà la cèl·lula receptora amb la donant, i el pili col·laborarà en el manteniment de l'aparellament (Snyder i Champness, 1997; Waters, 1999). En bacteris grampositius (*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* i *Streptomyces*), l'agregació de cèl·lules donants i receptores no està mitjançada pel pili sinó per mitjà d'una sèrie de substàncies d'agregació i feromones, ja que aquests microorganismes no tenen l'elaborada membrana externa dels bacteris gramnegatius (Snyder i Champness, 1997). Es desconeix com es desestabilitza l'aparellament i com se separen les cèl·lules.

La conjugació s'ha estudiat amb més detall en *E. coli* per mitjà del factor F, plasmidi conjugatiu i mobilitzable de 94,5 kb que presenta la capacitat d'integrar-se al cromosoma bacterià. Aquest factor codifica la síntesi i l'acoblament del pili sexual, i també les diferents funcions que porten a la transferència d'una còpia del factor F a la cèl·lula receptora

(Lawley *et al.*, 2003). Els diferents gens que codifiquen les funcions de conjugació i transferència estan agrupats en una regió de 35 kb que rep el nom de *reguló tra*. Aquesta regió conté l'*oriT*, diferent de l'origen de replicació *oriV*, pel qual s'inicia la replicació normal del plasmidi (Snyder i Champness, 1997), que és el lloc on s'inicia la transferència del DNA i està contingut al *locus bom* (*basis of mobility*), conjuntament amb més de vint-i-vuit gens anomenats *tra* i *trb*.

El factor F es transfereix des de la cèl·lula donant a la receptora en forma de DNA de cadena senzilla, passant en primer lloc l'extrem 5'. Es creu que en la síntesi del DNA donant conjugatiu estan involucrats els productes de quatre o cinc gens *tra* i que, abans que comenci la síntesi d'aquest DNA, tenen lloc diferents esdeveniments. Un és el trencament d'una de les dues cadenes del factor F a l'*oriT* per mitjà del producte del gen *traI*, que es manté unit a l'extrem 5' de la cadena tallada. La proteïna TraI posseeix també activitat helicasa i ATPasa, amb la que separa la cadena de DNA conjugatiu durant la translocació utilitzant ATP. Fins al moment, encara no es coneix del tot el paper que tenen determinades proteïnes en l'ancoratge i protecció del DNA i en la formació de porus a les membranes, si bé sí que es coneix el sentit en què és transferit el DNA durant la conjugació. Una de les propostes sobre això és que el DNA de cadena senzilla és protegit durant la transferència per les proteïnes SSB, tant a la cèl·lula donant com a la receptora. La transferència de l'extrem 5' s'acompanya de la síntesi contínua de la cadena de DNA complementària a la cèl·lula donant, mentre que a la receptora el DNA de cadena senzilla transferit serveix com a motlle per a la síntesi discontinua de la cadena complementària. Per tant, les dues cadenes senzilles serveixen com a motlle per a la replicació de molècules completes de DNA de doble cadena tant a la cèl·lula donant com a la receptora; després de la transferència, ambdues cèl·lules contenen

una còpia del plasmidi. La cèl·lula receptora que ha rebut DNA com a resultat d'una conjugació rep el nom de *transconjugant* (Snyder i Champness, 1997).

Com ja s'ha comentat, s'han trobat també plasmidis autotransferibles en diversos tipus de bacteris grampositius. Malgrat això, la informació sobre els sistemes de transferència d'aquests bacteris és encara molt menor. Les regions de transferència dels plasmidis de grampositius són sovint molt més petites que les de gramnegatius. Per exemple, la regió de transferència del plasmidi pSN22 de *Streptomyces nigrifaciens* es creu que té menys de 7.000 pb i que deu necessitar només uns cinc gens per a la transferència. Aquestes regions *tra* poden ser més petites, ja que els bacteris grampositius no necessiten un pili sexual per a intercanviar plasmidis (Snyder i Champness, 1997).

Els plasmidis bacterians poden classificar-se segons diferents caràcters (Hardy, 1986):

a) *Segons siguin autotransferibles per conjugació o no:*

— Plasmidis autotransferibles (Tra+, Mob+) o conjugatius. Són plasmidis capaços per si mateixos de conjuguar.

— Plasmidis no conjugatius, dins els quals trobem els plasmidis no mobilitzables (Tra-, Mob-) i els plasmidis mobilitzables (Tra-, Mob+). Els darrers no tenen la regió *tra* però sí la regió *mob*, que pot ser reconeguda per proteïnes Tra de conjugació d'altres plasmidis que sí són conjugatius i poden conjuguar. També trobem els plasmidis que són capaços de realitzar el contacte entre cèl·lules però no poden transferir el seu DNA (Tra+, Mob-). Però fins i tot els plasmidis no mobilitzables poden conjuguar mitjançant un procés anomenat *de conducció*, a través del qual un plasmidi no mobilitzable i un de conjugatiu es recombinen i formen un cointegrat, el qual serà capaç de conjuguar-se i, per tant, de transferir el plasmidi no mobilitzable a la cèl·lula receptora; un cop allà, el cointegrat pot resoldre's i s'obtenen els dos plasmidis per separat.

b) *Segons el control de la replicació vegetativa* (on el nombre de còpies es defineix com el nombre de còpies del plasmidi en una nova cèl·lula immediatament després de la divisió cel·lular):

— Plasmidis de control estricte: mantenen un baix nombre de còpies a la cèl·lula. Normalment són plasmidis de mida mitjana (unes 30 kb) i gran (centenars de kb). Com a exemple tenim el factor F: una o dues còpies per cromosoma.

— Plasmidis de control relaxat: alt nombre de còpies per cromosoma (més de deu). Són plasmidis petits (menys de 10 kb).

c) *Segons el tipus de fenotipus que codifiquen:*

— Plasmidis R, que codifiquen una o més resistències a antibiòtics o metalls pesants. Aquests plasmidis són malleables i evolucionen ràpidament davant la pressió selectiva. Gràcies a l'enginyeria genètica i a la seqüenciació s'ha vist com aquests gens de resistència s'han difós entre espècies i gèneres molt diferents mitjançant difusió horitzontal, ja que el mateix gen pot estar situat en espècies molt llunyanes en plasmidis de diferent tipus i de grups d'incompatibilitat diferents. Tot i que a la natura i independentment de l'acció humana ja existien plasmidis R, l'ús massiu dels antibiòtics ha provocat un augment espectacular de soques portadores de plasmidis R i que, en aquests, cada cop es trobin situats més gens de resistència.

— Plasmidis bacteriocinogènics, que codifiquen una bacteriocina i immunitat davant aquesta. Com a exemple tenim els plasmidis Co1 E1 o Clo DF13 (Elzen *et al.*, 1982).

— Plasmidis de virulència que codifiquen funcions relacionades amb la virulència. Un exemple d'aquests seria la neurotoxina de *Clostridium tetani* (Finn *et al.*, 1984) o la toxina de *Bacillus anthracis* (Koehler, 2002).

— Plasmidis que codifiquen factors de colonització.

— Plasmidis que confereixen la capacitat d'utilitzar rutes metabòliques alternatives, com la degradació de l'octà (plasmidis

OCT), la degradació del toluè i xilè (plasmidis TOL/XYL) o la degradació del naftalè (plasmidis NAF).

— Plasmidis responsables de la fixació de nitrogen als nòduls radicals de les lleguminoses en les soques de *Rhizobium* (Rosenblueth i Martínez-Romero, 2004).

— Plasmidis Ti i Ri d'*Agrobacterium*, responsables de la producció de tumors en moltes plantes dicotiledònies.

d) *Plasmidis segons el grup d'incompatibilitat:*

Molts bacteris contenen més d'un tipus de plasmidi, però no tots els plasmidis poden coexistir en una mateixa cèl·lula. Aquest fenomen s'anomena *incompatibilitat plasmídica*. Dos plasmidis són incompatibles quan no poden coexistir establement a la mateixa cèl·lula perquè comparteixen el mateix sistema de replicació o segregació de les còpies. S'han trobat diferents elements causants de la incompatibilitat plasmídica, tres elements típics dels replicons plasmídics: el *cop* (gen que codifica proteïnes que s'uneixen a l'origen de replicació i inhibeixen la replicació), el *rep/ori* (gen que codifica proteïnes necessàries per a la replicació/origen de replicació) i el *par* (gen que codifica proteïnes que intervenen en la divisió cel·lular) (Novick, 1987). La incompatibilitat pot ser simètrica o vectorial, depenent si els dos plasmidis del mateix grup d'incompatibilitat tenen la mateixa probabilitat de ser eliminats de la cèl·lula o un dels dos té més probabilitats de mantenir-se que l'altre. Hi ha més de trenta grups d'incompatibilitat (IncA, IncH, IncP10, IncQ-like, etc.) (Novick, 1987).

ELEMENTS MÒBILS

En una avaluació recent, utilitzant la seqüència genòmica de dinou espècies diferents, s'ha calculat que aproximadament un 6% del genoma bacterià pot provenir d'esdeveniments de transferència horitzontal (Ochman *et al.*, 2000). La variació és molt àmplia.

Tot i que alguns microorganismes, com *Mycoplasma genitalium* i *Rickettsia prowazekii* pràcticament no mostren seqüències exògenes, n'hi ha d'altres, com *Synechocystis*, que arriben fins a un 16,6%. La transferència horitzontal de material genètic, com ja s'ha comentat prèviament, es dóna gràcies a tres mecanismes: la transformació, la transducció i la conjugació. En els dos últims casos intervenen elements mòbils com són els bacteriòfags, els plasmidis i els transposons conjugatius, respectivament. Però també existeixen uns altres elements mòbils que tenen un paper molt important en la mobilització intracel·lular del material genètic.

El terme *elements mòbils* o *elements genètics mòbils* (*mobile genetic elements*, MGE) fa referència a seqüències de DNA que tenen la capacitat de moure's entre cèl·lules o entre molècules de DNA. Poden ser petits (≈ 1 kb) o grans (centenars de kb). Tradicionalment, els elements genètics mòbils es classificaven en bacteriòfags, plasmidis (ambdós comentats prèviament), transposons, seqüències d'inserció i gens *cassette*. Aquesta classificació s'ha modificat a causa de la identificació d'uns elements quimèrics anomenats *illes genòmiques*. Fer una classificació sistemàtica dels elements mòbils resulta difícil, ja que molts cops és difícil trobar una relació filogenètica entre aquests. Són elements àmpliament distribuïts, extremadament diversos i en contínua evolució. Un subgrup dins els elements mòbils, anomenat *elements transposables*, el formarien les seqüències d'inserció (Mahillon i Chandler, 1998), els transposons i els bacteriòfags transposables (p. ex.: el bacteriòfag Mu) (Pato, 1989), ja que tenen la capacitat de moure's d'un replicó a un altre mitjançant la transposició.

La transposició és una reacció de recombinació de material genètic que es dóna com a resultat de la translocació d'un segment de DNA discret, anomenat *element transposable* o *transposó*, des d'un lloc del genoma a un altre. La transposició és una recombinació no homòloga però sí especialitzada, no necessita

una homologia entre l'element transposable o l'antic lloc d'inserció i el nou lloc d'inserció, però es dóna en llocs específics, dianes reconegudes per unes recombinases especialitzades, anomenades *transposases* (Craig, 1997). La transposasa és un enzim codificat normalment pel mateix element transposable que actua reconeixent específicament els extrems d'aquest i promovent-ne la mobilització cap a una altra diana. Normalment actua conjuntament amb altres proteïnes sintetitzades per l'element transposable i per l'hoste. El fenomen de transposició pot promoure també altres reorganitzacions del material genètic, com són delecions o inversions. És per aquest motiu que les seqüències d'inserció i els transposons són uns potents agents de canvis genètics i les seves accions poden contribuir substancialment a la diversitat genètica.

Es poden donar dos tipus de transposició: la replicativa, com en el cas del transposó Tn3 i del fag Mu, i la no replicativa, com en la majoria de seqüències d'inserció i transposons compostos com el Tn5, Tn9 o Tn10 (Bennet, 2000).

La transposició replicativa (vegeu la figura 5) dóna com a resultat una duplicació del transposó i, per tant, un increment del nombre de còpies d'aquest dins la cèl·lula. El resultat d'aquesta acció és una regeneració del replicó donador, amb una còpia del transposó, i l'aparició d'una nova còpia del transposó al replicó receptor, limitada per dues còpies en la mateixa orientació de la seqüència diana. Cada còpia del transposó mantindrà una cadena original i una de nova formació.

En canvi, en la transposició no replicativa el transposó s'escindeix del DNA d'origen sense deixar cap còpia i s'insereix a la nova diana (vegeu la figura 6). No hi haurà un augment del nombre de còpies del transposó. En aquest tipus de transposició la replicació només es donarà per a unir el transposó al lloc diana. En aquest cas la cadena de DNA donadora pot ser reparada o degradada.

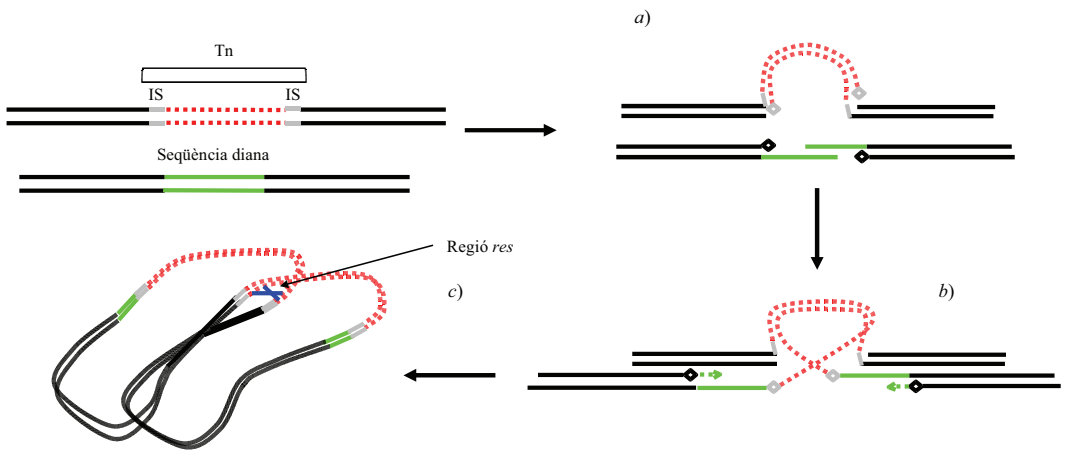


FIGURA 5. *Transposició replicativa.* a) La transposasa talla les cadenes de DNA del transposó a l'alçada de cada IR i també fa dos talls a la seqüència diana. b) S'han format dos extrems 5'PO₄ i dos extrems 3'OH lliures al transposó; aquests últims s'uniran amb els dos 5'PO₄ lliures de la seqüència diana. Els dos extrems 3'OH lliures de la seqüència diana actuaran d'iniciadors per a la replicació, que en aquest cas es donarà bidireccionalment, i replicarà la totalitat del transposó. Un cop finalitzada, els extrems 3'OH de la nova cadena sintetitzada s'uniran als extrems 5'PO₄ lliures del transposó i formaran un cointegrat. c) L'últim pas és la resolució del cointegrat; es dona una recombinació específica conservativa a la regió *res* de les dues còpies del transposó gràcies a la resolvasa (TnpR) sintetitzada per aquest.

SEQÜÈNCIES D'INSERCIÓ

Els transposons més petits són les seqüències d'inserció (IS). Oscillen entre 760 i 2.500 pb. Tenen dues repeticions invertides (IR) curtes (9-41 pb) a cada extrem (amb l'excepció de les famílies IS91, IS110 i IS200/605) i un o diversos *open reading frames* (ORF) o *pautes obertes de lectura*, que codifiquen la transposasa (Chalmers i Kleckner, 1994) i, en alguns casos, també com a funció reguladora de la transcripció d'aquesta (Reznikoff, 1993). Dues IS poden formar un transposó compost i ser capaces de mobilitzar els gens situats entre aquestes. Normalment es troben múltiples còpies d'una mateixa IS al mateix genoma (Galas i Chandler, 1989). Una característica pròpia de les IS és la generació de seqüències repetides directes (DR) al lloc diana on s'insereixen (Craig, 1997). La llargada de les DR, entre 4 i 14 pb, és característica de cada IS, tot i que també existeixen excepcions com la IS91, que no forma repeticions directes en inserir-se a la nova diana (Mendiola *et al.*, 1994) o com

les IS1549, IS1634 o IS1630, que formen llargues DR amb llargades variables (Plikaytis *et al.*, 1998; Calcutt *et al.*, 1999; Vilei *et al.*, 1999).

La transposició de les IS normalment és mantinguda en una baixa freqüència, per tal d'evitar un efecte letal per a la cèl·lula (Doolittle *et al.*, 1984). En moltes ocasions s'ha vist com una IS pot actuar com a activadora de l'expressió del gen del costat. Alguns exemples serien la IS21 (Reimann *et al.*, 1989), la IS30 (Dalrymple, 1987) o la IS257 (Leelaporn *et al.*, 1994).

El 1998, més de cinc-centes IS van ser agrupades en diferents famílies segons quatre criteris (Mahillon i Chandler, 1998): l'organització genètica, la transposasa, les IR i les dianes d'inserció. Es van crear disset famílies: IS1, IS3, IS4, IS5, IS6, IS21, IS30, IS66, IS91, IS110, IS200/605, IS256, IS630, IS982, IS1380, ISAs1 i ISL3. Tot i això, encara resten elements per classificar. Una nova classificació dels elements mòbils proposada per Raphaël Leplae *et al.* (2004) pot trobar-se a la web <http://aclame.ulb.ac.be>, on es vol intentar classificar

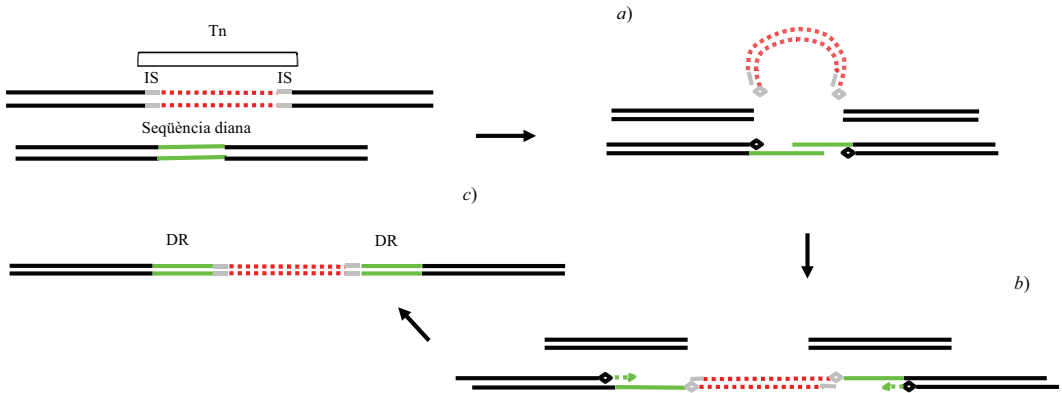


FIGURA 6. *Transposició no replicativa.* a) La transposasa talla ambdues cadenes de DNA als extrems del transposó (IS) i es creen dos extrems 3'OH lliures al transposó que s'uneixen als dos extrems 5'PO₄ lliures de la seqüència diana formats també per l'acció de la transposasa. b) Seguidament, els extrems 3'OH que romanen lliures a la seqüència diana faran d'iniciadors i començarà la replicació per a omplir els petits buits deixats a la seqüència diana fins arribar a l'extrem 5'PO₄ del transposó inserit. c) Formació de dues repeticions directes (DR) a banda i banda d'aquest. Aquestes DR seran una duplicació de la diana reconeguda per la transposasa i poden variar entre quatre i tretze bases. El lloc diana és característic de cada transposó, ja que reflecteix la geometria de tall de la transposasa.

tots els tipus d'elements mòbils descrits fins avui.

TRANSPOSONS

Els transposons (Tn) es caracteritzen per la seva capacitat de moure's dins el genoma bacterià mitjançant recombinació no homòloga, i poden saltar d'un lloc a un altre del cromosoma o del plasmidi. Aquest moviment s'anomena *transposició* i es dona gràcies a la transposasa. Aquesta activitat transposasa roman molt regulada, ja que, igual que passava amb la transposició de les seqüències d'inserció, un elevat índex de transposició seria letal per a la cèl·lula. Els transposons depenen de la replicació del seu hoste, ja que són incapaçs de replicar-se autònomament. Poden deixar o no una còpia del seu DNA a la cadena d'origen, depenent si fan una transposició replicativa o no.

Els transposons es classifiquen en transposons compostos o de classe 1 i transposons no compostos o de classe 2.

Els transposons compostos són segments de

DNA flanquejats per dues seqüències d'inserció iguals o molt similars, que poden estar orientades en el mateix sentit o invertides (vegeu la taula 1). Perquè es pugui portar a terme la transposició només cal que una de les dues IS codifiqui una transposasa (TnpA). Entre les dues IS es troben diferents gens amb funcions molt variades. Els transposons de classe 1 poden tenir diverses IS a la seva estructura i diferents gens que normalment codifiquen resistència a antimicrobians o funcions metabòliques. La transposició dels transposons de classe 1 pot ser complexa, ja que la transposasa pot activar la transposició de les seqüències d'inserció independentment de l'estructura del transposó o bé la recombinació entre les IS pot donar lloc a reorganitzacions en l'estructura del transposó.

Els transposons no compostos o de classe 2 no tenen seqüències d'inserció als extrems. Es caracteritzen per tenir a banda i banda repeticions invertides (*inverted repeats*, IR) que oscil·len entre 30 i 50 pb (vegeu la taula 1). Entre aquestes es troben una sèrie de gens que codifiquen una o més funcions necessàries per a la transposició (*tnp*), però, a més a més, igual

TAULA 1. Exemples de transposons compostos i no compostos

<i>Transposons compostos:</i>			
<i>Transposó</i>	<i>Mida (kb)</i>	<i>Elements terminals</i>	<i>Diana (pb)</i>
Tn5	5,7	IS50 (RI)	9
Tn9	2,5	IS1 (RD)	9
Tn10	9,3	IS10 (RI)	9
Tn903	3,1	IS903 (RI)	9
Tn1525	4,4	IS15 (RD)	8
Tn1681	4,7	IS1 (RI)	9
Tn2350	10,4	IS1 (RD)	9
<i>Transposons no compostos:</i>			
<i>Transposó</i>	<i>Mida (kb)</i>	<i>Repeticions invertides terminals</i>	<i>Diana (pb)</i>
Tn1	5	38/38	5
Tn3	4,957	38/38	5
Tn21	19,6	35/38	5
Tn501	8,2	35/38	5
Tn1000	5,8	36/37	5
Tn2501	6,3	45/48	5
Tn3926	7,8	36/38	5
Tn4651	56	32/38	5

RI: Repeticions invertides. RD: Repeticions directes.

que els transposons compostos, tenen també altres gens addicionals.

També trobem un tipus de transposons capaços de conjuguar. Són els anomenats *transposons conjugatius*, els quals poden transferir-se per si mateixos d'una cèl·lula a una altra, ja que disposen dels gens necessaris per a dur a terme aquesta funció. Per a transferir-se d'una cèl·lula a una altra primer s'escindeixen i es circularitzen, una de les cadenes és transferida a l'altra cèl·lula des de l'*oriT* i un cop allà se sintetitza la cadena complementària i forma de nou una estructura circular capaç d'integrar-se al genoma del nou hoste. Sembla ser que aquesta classe de transposons conjugatius són els principals responsables de la disseminació de resistències a antibiòtics en soques d'estreptococs i en altres bacteris grampositius. Un exemple de transposons conjugatius molt ben estudiats són el Tn916 (Franke i Clewell, 1981) i el Tn1545 (Courvalin i Carlier, 1987).

INTEGRONS I GENS CASSETTE

Formant part d'estructures mòbils o situats al cromosoma trobem unes altres estructures que tenen un paper molt important en la captació i mobilització gènica: els integrons (In). S'han trobat molt freqüentment formant part de transposons com el Tn21, el Tn1403, el Tn1404, el Tn1696, el Tn1412 i el Tn2000 (Fluit i Schmitz, 2004). Aquests transposons poden estar localitzats tant al cromosoma com en plasmidis. Aquests plasmidis normalment són grans (més de 100 kb) i conjugatius, i normalment pertanyen als grups d'incompatibilitat IncFI, IncFII o IncL/KM (Fluit i Schmitz, 2004). Els integrons foren descrits a començaments dels anys vuitanta, quan la seqüenciació de diferents gens de resistència va revelar una seqüència comuna a la regió 5' que contenia un promotor i un gen codificador d'una integrasa, similar a les descrites en els bacteriòfags. Els integrons s'han disseminat àmpliament entre moltes espècies de

microorganismes. Estan formats per tres elements necessaris per a la captura i expressió de gens exògens: un gen que codifica una integrasa (*intI*), un lloc de recombinació específic (*attI*) i un promotor (P_{ant}) per a l'expressió dels gens *cassette* adjacents. A vegades contenen un segon promotor més fort (P_2), localitzat adjacentment al primer. Els gens que són incorporats als integrons tenen una estructura particular i han estat denominats *gens cassette*. La integració es produeix per un mecanisme de recombinació específica de lloc a l'*attI* (format per 65 pb i que inclou el lloc de recombinació i dues regions corresponents als llocs d'unió fort i dèbil de la integrasa), en el qual els gens capturats són integrats gràcies a l'acció de la integrasa IntI. Aquesta integrasa sembla que pertany a la família de les recombinases, ja que presenta les dues regions *consensus* trobades en la integrasa del fag λ i en altres recombinases (Stokes i Hall, 1989).

Els gens *cassette* capturats pels integrons són molècules de DNA no replicatives que es troben com a DNA circular lliure, i són, per tant, un altre tipus d'element mòbil, però també es poden trobar integrats, formant part d'una molècula de DNA (plasmidi o cromosoma) com a seqüències lineals. En aquest darrer cas, majoritàriament estan inclosos en integrons. Aquests gens *cassette*, generalment, inclouen un únic gen i en posició posterior presenten una seqüència de recombinació específica, coneguda com a *attC* o element de cinquanta-nou bases (59-be), la qual permet el seu reconeixement i mobilització per part de la integrasa de l'integró (Stokes *et al.*, 1997). Normalment no contenen promotors; per tant, un cop integrats, s'expressen utilitzant el promotor de l'integró. La transcripció dels gens *cassette* inserits a l'integró s'inicia a partir d'un mateix promotor i tots són transcrits en un mateix RNA missatger, i es dona una relativa disminució de la transcripció als gens més distals (vegeu la figura 7). La inserció o escissió dels *cassettes* dins l'integró té un paper important en la disseminació i la

formació de noves combinacions de gens de resistència als antibiòtics. El fet que molts integrons posseïxin més d'un gen *cassette* de resistència, juntament amb el fet que molts estan localitzats en elements genètics, com per exemple transposons o plasmidis, que porten determinants de resistència, fa que la selecció a través d'un d'aquests determinants de resistència antimicrobiana seleccioni els altres (selecció en *autostop*) (Eliasson *et al.*, 1986).

La classificació dels integrons es basa en la seqüència codificadora de la integrasa. Actualment se'n coneixen deu classes (Correia *et al.*, 2003), tot i que la denominació de les integrases a partir de la *IntI4* és confusa (Fluit i Schmitz, 2004). Els integrons de classe 1 (vegeu la figura 7) són els que es troben amb major freqüència en soques clíniques. Es caracteritzen per tenir una seqüència 5' conservada (5'-CS) que conté el gen codificador de la integrasa. També tenen una seqüència 3' conservada (3'-CS) que inclou el gen que dona resistència a components d'amoni quaternari (*qacE Δ 1*) i el gen de resistència a sulfamida (*sul1*); aquests dos gens de resistència no són *cassettes*, sinó que es troben fixos a l'integró. La longitud d'aquesta regió anomenada 3'-CS és variable al seu extrem 3', com s'ha descrit en In1, In5 i In10. També s'han caracteritzat integrons de la classe 1 que presenten delecions en aquesta regió 3'-CS, com per exemple els integrons localitzats al Tn5086 i al Tn5090. Així doncs, el contingut i l'extensió del segment 3'-CS pot diferir en cada integró (Hall *et al.*, 1994).

Mentre que la majoria dels integrons de la classe 1 tenen l'estructura descrita anteriorment, darrerament s'han descrit integrons inusuals: l'In6, l'In7 (Stokes *et al.*, 1993), un integró descrit al plasmidi pSAL-1 de *S. enterica* serovar Enteritidis que conté el gen de resistència a β -lactàmics *bla*_{DHA-1} i el seu regulador *ampR* (Verdet *et al.*, 2000), l'In60 portador de la β -lactamasa CTX-M-9 (Sabaté *et al.*, 2002), l'In35 portador de la β -lactamasa CTX-M-2 (Arduino *et al.*, 2002), l'In36 i l'In37 portadors

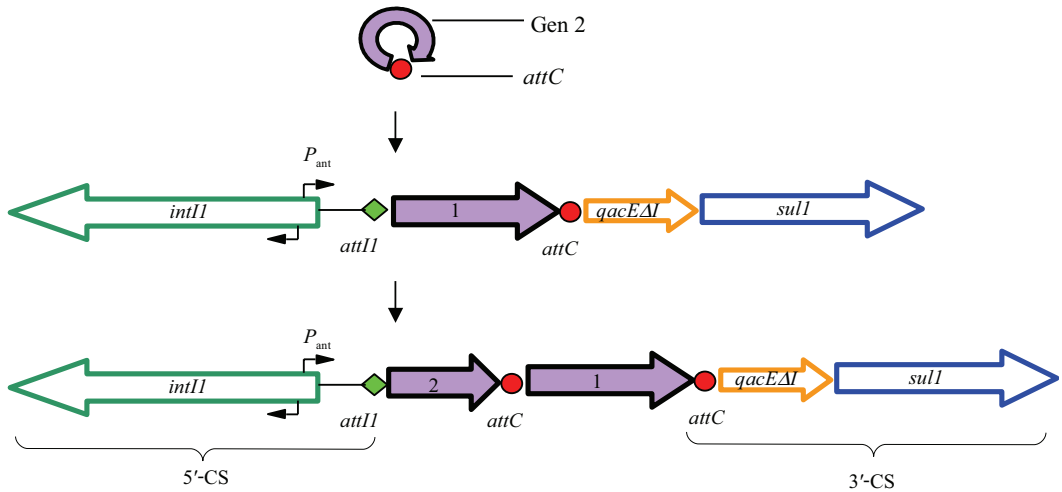


FIGURA 7. Integró de classe I. Format per dues zones conservades anomenades 5'CS i 3'CS i per una part variable on es localitzen els gens *cassette*. La integrasa codificada per l'integró reconeix l'*attC* del gen *cassette* i el lloc receptor *attI* de l'integró, on el gen *cassette* serà incorporat. Els gens *cassette* s'aniran incorporant d'esquerra a dreta; per tant, els primers a ser transcrits seran els últims que s'han incorporat.

del gen de resistència a quinolones *qnr* i el gen *bla*_{DHA-1} (Wang *et al.*, 2003), etc. Aquests integrons són inusuals perquè contenen una segona còpia del segment 3'-CS (vegeu la figura 8). Tots aquests integrons tenen un segment comú de 2,1 kb localitzat entre les dues repeticions 3'-CS, que conté l'*orf513*, raó per la qual s'anomenen *integrans compostos de classe 1* o *integrans portadors de l'orf513*. Les diverses classes d'integrans són capaces d'adquirir els mateixos gens *cassette*, la qual cosa indica que el *pool* d'aquests és compartit. Fins avui, en bacteris gramnegatius s'han descrit més de seixanta gens *cassette* de resistència (White *et al.*, 2001). Clark *et al.* (1997) van descriure al cromosoma de *Vibrio cholerae* una regió de 126 kb amb característiques d'un integró, on s'havien donat més de cent setanta-nou captures de gens *cassette*, i es va anomenar *superintegró* (Rowe-Magnus *et al.*, 1999).

La importància dels integrans rau en la seva versatilitat, és a dir, en l'habilitat de reconèixer una alta varietat de seqüències de recombinació i en la seva aparentment illimitada capacitat d'intercanvi de gens *cassette*. Aques-

ta flexibilitat permet una ràpida adaptació al flux impredecible dels nínxols ecològics. S'ha observat que els gens *cassette* examinats sembla que codifiquen funcions adaptatives més que no pas funcions indispensables. Tot i que l'origen dels integrans i dels gens *cassette* no és clar, hi ha evidències que mostren que els integrans continuen evolucionant.

ILLES GENÒMIQUES

A més dels bacteriòfags, els plasmidis, els transposons, les seqüències d'inserció, els integrans i els gens *cassette*, trobem uns altres elements que tenen un paper molt important en el moviment del material genètic: són les illetes genòmiques (< 10 kb) o illes genòmiques (GEI) (> 10 kb). Tots aquests elements mòbils formen part d'un *pool* flexible de gens que es caracteritzen per codificar funcions no essencials per a la cèl·lula però que li confereixen avantatges enfront de condicions particulars. Normalment, tenen un contingut de G+C i una pauta de lectura diferents respecte

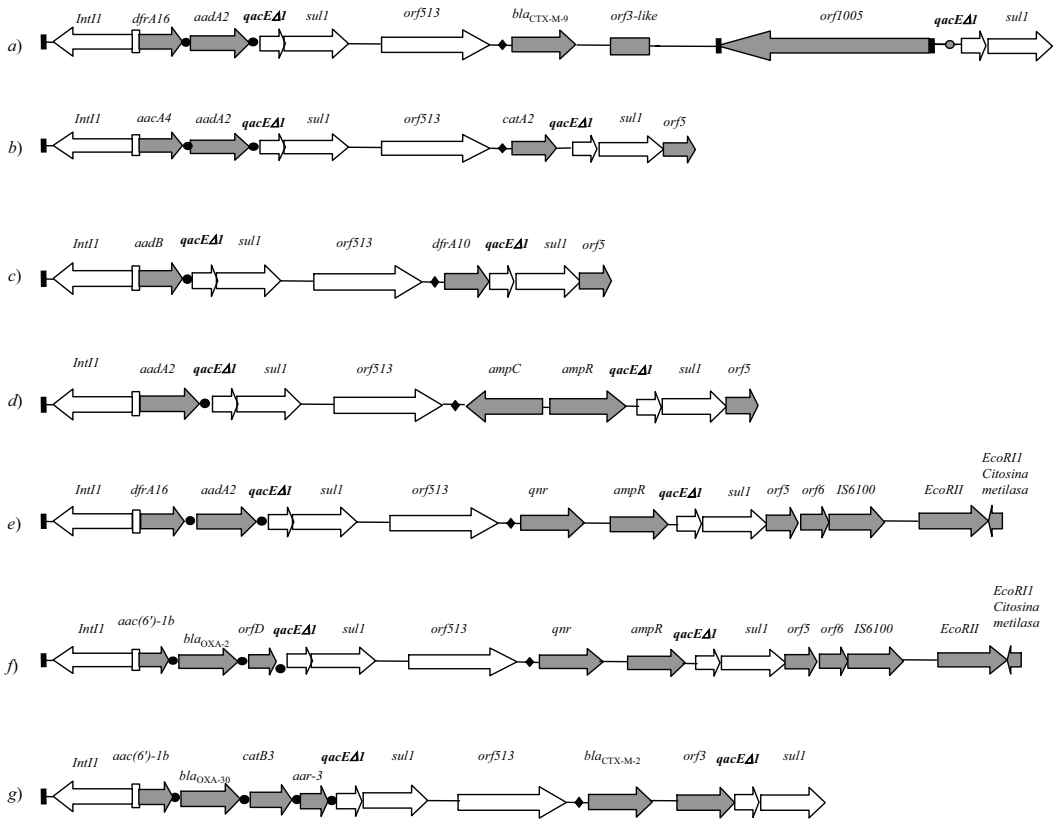


FIGURA 8. Comparació de diferents integrons compostos de classe I. a) In60 (AF174129) (Sabaté *et al.*, 2002). b) i c) In6 i In7 (Stokes *et al.*, 1993). d) pSAL-1 (Verdet *et al.*, 2000). e) i f) In36 i In37 (Wang *et al.*, 2003). g) In35 (Arduino *et al.*, 2002).

al cromosoma bacterià. Les illes genòmiques transporten *clusters* de gens amb funcions específiques que són incorporats al nou DNA en bloc. Aquests blocs de DNA tan particulars es troben molt sovint al costat o inserits dins gens tRNA o tmRNA (molècula que combina les funcions de l'mRNA i el tRNA) (Hacker *et al.*, 1997) del cromosoma de l'hoste: per tant, serà molt freqüent trobar a banda i banda de les illes genòmiques els dos fragments de tRNA. Aquesta característica ha estat utilitzada per autors com Mantri per a detectar aquests tipus d'elements mòbils dins el genoma bacterià (Mantri i Williams, 2004). Les illes genòmiques poden subdividir-se en diferents grups segons els avantatges que confereixen al nou

hoste: illes ecològiques en els microorganismes ambientals, illes saprofítics, illes de simbiosi o illes de patogenicitat (PAI) en microorganismes que interaccionen amb el seu hoste. S'han localitzat al cromosoma bacterià, tot i que també s'han descrit casos de localització plasmídica. Es creu que provenen de plasmidis o bacteriòfags que han perdut els gens necessaris per a la replicació autònoma i la transferència (Dobrindt *et al.*, 2004), encara que també s'ha vist que en moltes ocasions transporten gens que els confereixen activitats de transferència, recombinació i restricció. La vida hipotètica d'una illa genòmica, descrita segons Dobrindt *et al.* (2004), podria iniciar-se amb la integració d'un element mòbil, com

pot ser un plasmidi o un bacteriòfag, al cromosoma bacterià, mitjançant una recombinació específica de lloc. Un cop allà, el plasmidi, per fenòmens de recombinació, delecions o insercions, perd o queda amb els gens necessaris per a la seva replicació autònoma, mobilització o transferència desactivades, i es crea una illa genòmica. Aquesta pot veure's sotmesa a constants reorganitzacions, delecions i insercions, que faran que evolucioni. Però pot donar-se la inserció d'un element mòbil que supleixi la mancança o desactivació d'aquells gens que s'havien perdut, cosa que provocaria l'escissió de l'illa genòmica del cromosoma i la inserció d'aquesta en una altra diana o, fins i tot, la seva transferència a una altra cèl·lula. Una illa genòmica típica està flanquejada per DR i normalment transporta diverses IS, ja siguin funcionals o fragmentades. Poden transportar també transposases (Hacker *et al.*, 1997) o integrases que actuaran en la integració i escissió de l'illa genòmica (Dobrindt *et al.*, 2004). S'ha vist però, que en algunes illes genòmiques el gen de la integrasa pot estar deleccionat o no ser funcional, i per tant són illes genòmiques no mòbils (Osborn i Boltner, 2002). A part d'aquests gens que els confereixen la capacitat de mobilitzar-se, les illes genòmiques es caracteritzen per transportar gens que confereixen avantatges adaptatius o de patogenicitat a la cèl·lula on s'insereixen, com poden ser la producció de toxines, factors d'adherència, la degradació de fenols, la resistència a antibiòtics com la meticil·lina (SCC*mec*), la fixació de nitrogen, l'expressió d'adhesines, etc. Tot i que en la majoria de casos es desconeix el mètode exacte de transferència d'aquestes illes, una variant de particular interès és l'illa que conté el gens que codifiquen la toxina del xoc tèrmic en *S. aureus*, que pot ser transferida entre soques mitjançant un fag auxiliador (Lindsay *et al.*, 1998). Altres exemples en què la transferència de l'illa genòmica encara és més clara és en el cas de l'element SXT de *V. cholerae* (que confereix la resistència a quatre antibiòtics diferents) (Hochhut

i Waldor, 1999) i l'anomenada illa simbiòtica de *Mesorhizobium loti* (que conté gens per a la simbiosi fixadora de nitrogen) (Sullivan i Ronson, 1998). Ambdós elements són integratius i autotransferibles per conjugació, raó per la qual s'ha suggerit anomenar-los CONSTIN (*conjugal self-transmissible integrating element*) (Hochhut i Waldor, 1999).

BIBLIOGRAFIA

- ARDUINO, S. M.; ROY, P. H.; JACOBY, G. A.; ORMAN, B. E.; PINEIRO, S. A.; CENTRON, D. (2002). «*bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, pàg. 2303-2306.
- AVERHOFF, B.; FRIEDRICH, A. (2003). «Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria». *Arch. Microbiol.*, vol. 180, pàg. 385-393.
- AVERY, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M. (1944). «Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III». *J. Exp. Med.*, vol. 79, pàg. 137-158.
- BENNET, P. (2000). «Transposable elements». A: LEDERBERG, J. [ed.] *Encyclopaedia of Microbiology*. San Diego, Ca: Academic Press, vol. 4, pàg. 704-724.
- CALCUTT, M. J.; LAVRRAR, J. L.; WISE, K. S. (1999). «IS1630 of *Mycoplasma fermentans*, a novel IS30-type insertion element that targets and duplicates inverted repeats of variable length and sequence during insertion». *J. Bacteriol.*, vol. 181, pàg. 7597-7607.
- CANCHAYA, C.; FOURNOUS, G.; CHIBANI-CHENNOUFI, S.; DILLMANN, M. L.; BRUSSOW, H. (2003). «Phage as agents of lateral gene transfer». *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 6, pàg. 417-424.
- CHALMERS, R. M.; KLECKNER, N. (1994). «Tn10/IS10 transposase purification, activation, and in vitro reaction». *J. Biol. Chem.*, vol. 269, pàg. 8029-8035.
- CHEETHAM, B. F.; KATZ, M. E. (1995). «A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants». *Mol. Microbiol.*, vol. 18, pàg. 201-208.
- CLARK, C. A.; PURINS, L.; KAEWRKON, P.; MANNING, P. A. (1997). «VCR repetitive sequence elements in the *Vibrio cholerae* chromosome constitute a mega-integron». *Mol. Microbiol.*, vol. 26, pàg. 1137-1138.
- COLE, S.; SAINT-GIRONS, I. (1999). «Bacterial genomes: all shapes and sizes». A: CHARLEBOIS, R. L. [ed.] *Organization of the Prokaryotic Genome*. Washington, DC: ASM Press, pàg. 35-62.

- CORREIA, M.; BOAVIDA, F.; GROSSO, F.; SALGADO, M. J.; LITO, L. M.; CRISTINO, J. M.; MENDO, S.; DUARTE, A. (2003). «Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, pàg. 2838-2843.
- COURVALIN, P.; CARLIER, C. (1987). «Tn1545: a conjugative shuttle transposon». *Mol. Gen. Genet.*, vol. 206, pàg. 259-264.
- CRAIG, N. L. (1997). «Target site selection in transposition». *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 66, pàg. 437-474.
- DALRYMPLE, B. (1987). «Novel rearrangements of IS30 carrying plasmids leading to the reactivation of gene expression». *Mol. Gen. Genet.*, vol. 207, pàg. 413-420.
- DOBRINDT, U.; HOCHHUT, B.; HENTSCHEL, U.; HACKER, J. (2004). «Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms». *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, pàg. 414-424.
- DOOLITTLE, W. F.; KIRKWOOD, T. B.; DEMPSTER, M. A. (1984). «Selfish DNAs with self-restraint». *Nature*, vol. 307, pàg. 501-502.
- DUBNAU, D. (1999). «DNA uptake in bacteria». *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 53, pàg. 217-244.
- ELIASSON, I.; KAMME, C.; PRELLNER, K. (1986). «Beta-lactamase production in the upper respiratory tract flora». *Eur. J. Clin. Microbiol.*, vol. 5, pàg. 507-512.
- ELIOPOULOS, G. M.; FARBER, B. F.; MURRAY, B. E.; WENNERSTEN, C.; MOELLERING JR., R. C. (1984). «Ribosomal resistance of clinical enterococcal isolates to streptomycin». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 25, pàg. 398-399.
- ELZEN, P. J. VAN DEN; MAAT, J.; WALTERS, H. H.; VELTKAMP, E.; NIJKAMP, H. J. (1982). «The nucleotide sequence of the bacteriocin promoters of plasmids Clo DF13 and Co1 E1: role of *lexA* repressor and cAMP in the regulation of promoter activity». *Nucleic Acids Res.*, vol. 10, pàg. 1913-1928.
- FERRETTI, J. J.; MCSHAN, W. M.; AJDIC, D.; SAVIC, D. J.; SAVIC, G.; LYON, K.; PRIMEAUX, C.; SEZATE, S.; SUVOROV, A. N.; KENTON, S.; LAI, H. S.; LIN, S. P.; QIAN, Y.; JIA, H. G.; NAJAR, F. Z.; REN, Q.; ZHU, H.; SONG, L.; WHITE, J.; YUAN, X.; CLIFTON, S. W.; ROE, B. A.; MCLAUGHLIN, R. (2001). «Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 98, pàg. 4658-4663.
- FINN JR., C. W.; SILVER, R. P.; HABIG, W. H.; HARDEGREE, M. C.; ZON, G.; GARON, C. F. (1984). «The structural gene for tetanus neurotoxin is on a plasmid». *Science*, vol. 224, pàg. 881-814.
- FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. (2004). «Resistance integrons and super-integrons». *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 10, pàg. 272-288.
- FRANKE, A. E.; CLEWELL, D. B. (1981). «Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid». *J. Bacteriol.*, vol. 145, pàg. 494-502.
- GALAS, D. J.; CHANDLER, M. (1989). «Bacterial insertion sequences». A: BERG, D.; HOWE, M. M. [ed.] *Mobile DNA*. Washington, DC: American Society for Microbiology, pàg. 109-162.
- GARCÍA-DE LOS SANTOS, A.; BROM, S.; ROMERO, D. (1996). «Rhizobium plasmids in bacteria-legume interactions». *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 12.
- GRINSTED, J.; BENNET, P. M. (1988). *Plasmid Technology*. Londres: Academic Press.
- HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MUHLDOERFER, I.; TSCHAPE, H. (1997). «Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution». *Mol. Microbiol.*, vol. 23, pàg. 1089-1097.
- HAKENBECK, R.; COYETTE, J. (1998). «Resistant penicillin-binding proteins». *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 54, pàg. 332-340.
- HALL, R. M.; BROWN, H. J.; BROOKES, D. E.; STOKES, H. W. (1994). «Integrans found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends». *J. Bacteriol.*, vol. 176, pàg. 6286-6294.
- HARDY, K. (1986). *Bacterial plasmids*. Washington, DC: ASM Press.
- HOCHHUT, B.; WALDOR, M. K. (1999). «Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*». *Mol. Microbiol.*, vol. 32, pàg. 99-110.
- JACOBS, C.; FRERE, J. M.; NORMARK, S. (1997). «Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria». *Cell*, vol. 88, pàg. 823-832.
- KOEHLER, T. M. (2002). «*Bacillus anthracis* genetics and virulence gene regulation». *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 271, pàg. 143-164.
- LAWLEY, T. D.; KLIMKE, W. A.; GUBBINS, M. J.; FROST, L. S. (2003). «F factor conjugation is a true type IV secretion system». *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 224, pàg. 1-15.
- LEELAPORN, A.; FIRTH, N.; BYRNE, M. E.; ROPER, E.; SKURRAY, R. A. (1994). «Possible role of insertion sequence IS257 in dissemination and expression of high- and low-level trimethoprim resistance in staphylococci». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, pàg. 2238-2344.
- LEPLAE, R.; HEBBRANT, A.; WODAK, S. J.; TOUSSAINT, A. (2004). «ACLAME: a classification of mobile genetic elements». *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, pàg. D45-D49.
- LINDSAY, J. A.; RUZIN, A.; ROSS, H. F.; KUREPINA, N.; NOVICK, R. P. (1998). «The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*». *Mol. Microbiol.*, vol. 29, pàg. 527-543.
- LYON, B. R.; SKURRAY, R. (1987). «Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis». *Microbiol. Rev.*, vol. 51, pàg. 88-134.
- MAHILLON, J.; CHANDLER, M. (1998). «Insertion sequences». *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, pàg. 725-774.
- MANTRI, Y.; WILLIAMS, K. P. (2004). «Islander: a database of integrative islands in prokaryotic genomes, the associated integrases and their DNA site specificities». *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, pàg. D55-D58.
- MARTÍNEZ, J. L.; ALONSO, A.; GOMEZ-GOMEZ, J. M.; BAQUERO, F. (1998). «Quinolone resistance by mutations in

- chromosomal gyrase genes. Just the tip of the iceberg?» *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 42, pàg. 683-688.
- MENDIOLA, M. V.; BERNALES, I.; CRUZ, F. DE LA (1994). «Differential roles of the transposon termini in IS91 transposition». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 91, pàg. 1922-1926.
- MUNIESA, M.; GARCÍA, A.; MIRÓ, E.; MIRELIS, B.; PRATS, G.; JOFRE, J.; NAVARRO, F. (2004). «Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes». *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 10, pàg. 1134-1137.
- NOVICK, R. P. (1987). «Plasmid incompatibility». *Microbiol. Rev.*, vol. 51, pàg. 381-395.
- OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. (2000). «Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation». *Nature*, vol. 405, pàg. 299-304.
- OSBORN, A. M.; BOLTNER, D. (2002). «When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative and mobilizable-transposons as a mosaic continuum». *Plasmid*, vol. 48, pàg. 202-212.
- PATO, M. (1989). «Bacteriophage Mu». A: BERG, D.; HOWE, M. M. [ed.] *Mobile DNA*. Washington, DC: ASM Press, pàg. 23-52.
- PLIKAYTIS, B. B.; CRAWFORD, J. T.; SHINNICK, T. M. (1998). «IS1549 from *Mycobacterium smegmatis* forms long direct repeats upon insertion». *J. Bacteriol.*, vol. 180, pàg. 1037-1043.
- PRYSTOWSKY, J.; SIDDIQUI, F.; CHOSAY, J.; SHINABARGER, D. L.; MILLICHAP, J.; PETERSON, L. R.; NOSKIN, G. A. (2001). «Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, pàg. 2154-2156.
- REIMMANN, C.; MOORE, R.; LITTLE, S.; SAVIOZ, A.; WILLETTS, N. S.; HAAS, D. (1989). «Genetic structure, function and regulation of the transposable element IS21». *Mol. Gen. Genet.*, vol. 215, pàg. 416-424.
- REZNIKOFF, W. S. (1993). «The Tn5 transposon». *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 47, pàg. 945-963.
- RICE, L. B.; CARIAS, L. L. (1998). «Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*». *J. Bacteriol.*, vol. 180, pàg. 714-721.
- RICE, L. B.; SAHM, D.; BONOMO, R. A. (2003). «Mechanisms of resistance to antibacterial agents». A: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. A.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. [ed.] *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press, vol. 1, pàg. 1074-1101.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2004). «*Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization». *Arch. Microbiol.*, vol. 181, pàg. 337-344.
- ROWE-MAGNUS, D. A.; GUEROUT, A. M.; MAZEL, D. (1999). «Super-integrans». *Res. Microbiol.*, vol. 150, pàg. 641-651.
- SABATÉ, M.; NAVARRO, F.; MIRÓ, E.; CAMPOY, S.; MIRELIS, B.; BARBÉ, J.; PRATS, G. (2002). «Novel complex *sul1*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-9}». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, pàg. 2656-2661.
- SNYDER, L.; CHAMPNESS, W. (1997). *Molecular Genetics of Bacteria*. Washington, DC: ASM Press.
- STOKES, H. W.; HALL, R. M. (1989). «A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons». *Mol. Microbiol.*, vol. 3, pàg. 1669-1683.
- STOKES, H. W.; O'GORMAN, D. B.; RECCHIA, G. D.; PARSEKHIAN, M.; HALL, R. M. (1997). «Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes». *Mol. Microbiol.*, vol. 26, pàg. 731-745.
- STOKES, H. W.; TOMARAS, C.; PARSONS, Y.; HALL, R. M. (1993). «The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin». *Plasmid*, vol. 30, pàg. 39-50.
- SULLIVAN, J. T.; RONSON, C. W. (1998). «Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 95, pàg. 5145-5149.
- VERDET, C.; ARLET, G.; BRNAAUD, G.; LAGRANGE, P. H.; PHILIPPON, A. (2000). «A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*_{DHA-1} gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, pàg. 222-225.
- VILEI, E. M.; NICOLET, J.; FREY, J. (1999). «IS1634, a novel insertion element creating long, variable-length direct repeats which is specific for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type». *J. Bacteriol.*, vol. 181, pàg. 1319-1323.
- WANG, M.; TRAN, J. H.; JACOBY, G. A.; ZHANG, Y.; WANG, F.; HOOPER, D. C. (2003). «Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, pàg. 2242-2248.
- WATERS, V. L. (1999). «Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance». *Front. Biosci.*, vol. 4, pàg. D433-D456.
- WEHRLI, W. (1983). «Rifampin: mechanisms of action and resistance». *Rev. Infect. Dis.*, vol. 5 (supl. 3), pàg. S407-S411.
- WHITE, P. A.; McIVER, C. J.; RAWLINSON, W. D. (2001). «Integrans and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, pàg. 2658-2661.