

Plataformas genéticas involucradas en la adquisición y transferencia de la multirresistencia a antibióticos en *Klebsiella pneumoniae*



Lic. Natalia Echeverría Chagas

Orientadora: Dra. Carolina Márquez

Co-orientadora: Dra. Graciela Borthagaray

2014

Cátedra de Microbiología Clínica
Facultad de Química
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay

Financiación:

**Plataformas genéticas involucradas en la adquisición y
transferencia de la multirresistencia a antibióticos en
*Klebsiella pneumoniae***

Lic. Natalia Echeverría Chagas

**Tesis presentada con el objeto de obtener el título de Magíster en
Ciencias Biológicas, Sub-área Microbiología, en el marco del programa
PEDEDECIBA.**

Orientadora: Dra. QF Carolina Márquez Villalba, Profesor Adjunto

Co-orientadora: Dra. QF Graciela Borthagaray, Profesor Titular

Montevideo

2014

Montevideo, 15 de setiembre de 2014

Departamento de Bedelía

Facultad de Ciencias

Me dirijo a ustedes en carácter de Director de Tesis de Maestría de la estudiante Natalia Echeverría con el fin de comunicar que la mencionada estudiante planea defender su tesis de Maestría en el correr de diciembre del 2014 y sugiero los siguientes integrantes para el Tribunal:

Dra. Fernanda Azpiroz (Investigadora del PEDECIBA)

Dra. Lucía Yim (Investigadora del PEDECIBA)

Dra. Daniela Centrón (Investigadora del Conicet, Universidad de la UBA, Buenos Aires)

Se adjunta por correo electrónico el CV de la Dra. Daniela Centrón para su evaluación.

Desde ya muchas gracias

Dra. Carolina Márquez

Directora de Tesis

Prof Adjunto de Microbiología

I.Q.B. Facultad de Ciencias

A mis abuelas Teresita e Hilda, QEPD, quienes siempre me impulsaron a estudiar y seguir mis sueños...

AGRADECIMIENTOS

No es tarea fácil plasmar los agradecimientos después de tantos años de trabajo y dedicación para sacar esta tesis adelante...muchas gente participó en este camino, y se me hace difícil hacerles justicia a todos, pero creo que en mayor o menor medida muchas personas contribuyeron a que esta tesis se haga realidad.

A mi orientadora, la Dra. Carolina Márquez, por haber confiado en mí para desarrollar este proyecto, por sus ideas constantes para mejorar el trabajo y por haberme brindado el espacio necesario para crecer y producir mis propias ideas.

A mi co-orientadora, la Dra. Graciela Borthagaray por su apoyo técnico y más que nada clínicamente orientado, así como por las cepas colectadas y haberme aceptado para desarrollar este trabajo en el laboratorio que dirige.

A la Cátedra de Microbiología Clínica y todos sus integrantes a lo largo de estos 4 largos años: a la Dra. Ana Acevedo, por estar presente en las tardes de trabajo y responder a mis dudas; a Anita Ingold, por su muy apreciado apoyo en mis inicios, su guía en técnicas y protocolos y su invaluable experiencia en ese laboratorio; y a mis compañeros Gaby, Lu B, Lu T, Lu Á, Flor, Ángela y Jovan, con los cuales supe compartir experiencias, charlas y risas.

A muchos de los integrantes del Departamento de Biociencias, quienes amablemente compartieron sus conocimientos conmigo y fueron apoyo constante en diferentes técnicas.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Virología Molecular del CIN, Vicky, Sabri, Alvarito, Tincho, Pato, Gaby, Pili, Gonza y Juan, por haber sido un gran sostén para mí y ayudarme a sobrellevar la maestría en paralelo a mis tareas docentes, ayudándome a que las 12 hs de trabajo no parecieran tales, y siempre aportando ideas y colaborando en todo lo que estuviera a su alcance.

A las Dras. Daniela Centrón y Sonia Arduino, de la UBA, Argentina, por haberme aceptado para realizar una pasantía breve de entrenamiento en técnicas de cartografía de integrones y Electroforesis en Gel por Campo Pulsante, cuando aún

era bachiller y desconocía en absoluto lo que era viajar al exterior para capacitarme profesionalmente.

Al Dr. Luis Martínez-Martínez, del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España, por haberme invitado a realizar una pasantía en su laboratorio de investigación para así poder finalizar con el último objetivo de mi tesis. A todo su equipo de trabajo que me colaboró incesantemente durante un mes y medio para sacar adelante mis resultados. Especialmente me gustaría agradecerles a tres de esos compañeros: a Belén Ruiz del Castillo, por guiarme y enseñarme la técnica de extracción de proteínas de membrana externa y la técnica de extracción de plásmidos pesados; a Alain Ocampo-Sosa por asistirme en la cuantificación relativa de la expresión de porinas y a Marta Fernández por sus conocimientos respecto de caracterización de genes de resistencia a aminoglucósidos. A todos ellos y a Luis mi enorme agradecimiento por el tiempo que me brindaron, poniéndome a veces antes que sus propias investigaciones de modo de que mi mes y medio pudiera rendirme al máximo.

Obviamente, a toda mi familia – padres, hermanos y tíos – por haber sido el pilar que me sostuvo siempre, que siempre confió en mí, en mi vocación y en mis deseos de investigar, felicitándome siempre en cada uno de los logros y ayudándome y levantándome el ánimo en cada momento de debilidad y complicación. En especial a mis padres, Anna y Omar, por creer ciegamente en mí y empujarme a incursionar más a fondo en la investigación y en la formación académica que tanto me llena, a pesar de las frustraciones que a veces trae aparejadas. Gracias!

A mis amigos de la facu: Luli, Noé, Miri, Tami, Mariano y la Lady, por seguir bancándome después de tantos años y por compartir la vocación, a pesar de las diferencias en nuestras áreas de interés.

A mis amigas de la vida: Pau, Andy, Tefi, Vane, Naza, Wanda, Nadi, Luli y Magda, las que me soportaron todos estos años de poco tiempo para ellas, y aun así siguen al firme ahí, en las buenas y en las malas, poniendo una buena cara siempre, apoyándome y siendo el sostén para equilibrar mi vida.

Finalmente, y no por eso menos importante, a mi novio, por bancarme este último año de puro trabajo y pocas horas de sueño, por su cariño y su soporte, y fundamentalmente por equilibrarme en los momentos de desazón.

A todos, GRACIAS DE CORAZÓN!

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características genotípicas y fenotípicas de aislamientos clínicos de <i>K. pneumoniae</i> estudiados en busca de productores de CTX-M.....	24
Tabla 2. Características genotípicas y fenotípicas de <i>Enterobacterias</i> resistentes o de sensibilidad disminuida a carbapenemes.	25
Tabla 3. Aislamientos clínicos <i>K. pneumoniae</i> seleccionados para el estudio de expresión de porinas. CIMs expresadas en µg/mL.	26
Tabla 4. Controles positivos de amplificación	27
Tabla 5. Cebadores y condiciones de PCR para cumplir con el Objetivo 1: genes de β-lactamasas y otros genes de resistencia.....	36
Tabla 6. Cebadores y condiciones de PCR para cumplir con el Objetivo 2: Integrones atípicos.....	37
Tabla 7. Cebadores y condiciones de PCR para cumplir con el Objetivo 3: Entornos del gen <i>bla</i> _{KPC}	38
Tabla 8. Cebadores y condiciones de PCR para cumplir con el Objetivo 5: Genes de porinas	38
Tabla 9. Perfil de sensibilidad de aislamientos involucrados en los ensayos de conjugación.....	40
Tabla 10. Aislamientos productores de BLEE.....	48
Tabla 11. Aislamientos productores de KPC	51
Tabla 12. Caracterización de integrones en aislamientos productores de CTX-M-15	55
Tabla 13. Genes de resistencia, EGM y regiones RMD analizadas en los aislamientos productores de CTX-M-15.....	59
Tabla 14. Grupos de incompatibilidad plasmídica hallados	64
Tabla 15. Aislamientos clínicos <i>K. pneumoniae</i> seleccionados para el estudio de expresión de porinas. Diferencias genotípicas y fenotípicas entre los enviados a España y los analizados allí.	70
Tabla 16. Genes asociados con la generación de resistencia a diferentes antibióticos pertenecientes a la clase de los aminoglucósidos hallados en los aislamientos estudiados en el HUMV.	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de un integrón clásico de clase 1	8
Figura 2. Estructura generalizada de un integrón de clase 1 <i>Tn402-like</i> clásico o convencional	10
Figura 3. Grupos estructurales de integrones de clase 1 estudiados	33
Figura 4. Representación esquemática de un integrón <i>Tn402-like</i> y los cebadores utilizados para la caracterización de integrones atípicos.	34
Figura 5. Frecuencia de aislamientos productores de CTX-M-15 e integrones dentro de la población bacteriana proveniente del Hospital Militar en el período comprendido entre el 22/03/2011 y el 07/05/2011	49
Figura 6. Resultado de la digestión de <i>aac6'-Ib</i> con <i>FokI</i>	52
Figura 7. Representación esquemática de integrones de clase 1 de acuerdo a sus estructuras genéticas	57
Figura 8. Regiones RMD asociadas al integrón de clase 1, identificadas en el aislamiento U20	57
Figura 9. Caracterización de plataformas que rodean al gen <i>bla</i> _{KPC-2} en los aislamientos estudiados	61
Figura 10. Perfil plasmídico obtenido por extracción de plásmidos pesados	66
Figura 11. Perfil plasmídico de aislamientos empleados en los ensayos de conjugación y sus respectivos transconjugantes	67
Figura 12. Diferente morfología de colonia del aislamiento 19/1 analizado en España en placas de Agar Sangre	71
Figura 13. Perfil plasmídico de aislamientos para estudio de porinas	73
Figura 14. Alineamiento de secuencias del gen <i>ompK35</i>	76
Figura 15. Alineamiento aminoacídico de las secuencias de OmpK36 de los aislamientos estudiados	77
Figura 16. Análisis de secuencias aminoacídicas de OmpK36 en referencia a la estructura secundaria	79
Figura 17. Estructura tridimensional del homotrímero formado por subunidades de OmpK36 mapeando posiciones de sustituciones aminoacídicas	80

Figura 18. Cuantificación de expresión relativa (niveles de ARNm) de las porinas estudiadas	82
Figura 19. Análisis de proteínas de membrana externa por SDS-PAGE	84
Figura 20. Cuantificación de expresión relativa (niveles de ARNm) de <i>bla</i> _{KPC}	85

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AA – Aminoácido/s:

Arg / R – Arginina

Asn / N – Asparagina

Asp / D – Ácido aspártico

Gly / G – Glicina

His / H – Histidina

Met / M – Metionina

Pro / P – Prolina

Val / V – Valina

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ANOVA – Análisis de varianza

APS – Persulfato de amonio

ARN – Ácido ribonucleico

ATB – Antibiótico/s:

AMK – Amicacina

ATM – Aztreonam

CAZ – Ceftazidima

CEP – Cefalotina

CIP – Ciprofloxacina

CTX – Cefotaxima

FEP – Cefepime

FOX – Cefoxitín

GEN – Gentamicina

IPM – Imipenem

MER – Meropenem

NAL – Ácido nalidíxico

SXT – Sulfametoxazol

TZP – Piperacilina-Tazobactam

BGN-NF – Bacilos negativos no fermentadores

BHI – Infusión cerebro corazón

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BLEE – β -lactamasa de espectro extendido

C1G, C2G, C3G, C4G – Cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación

CIM – Concentración inhibitoria mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

C_T – Ciclo umbral

EDTA – Ácido etil diamino tetraacético

EGCP – Electroforesis en gel por campo pulsante

EGM – Elementos genéticos móviles

HUMV – Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

ICE – Elementos conjugativos e integrativos

Inc – Grupo de incompatibilidad plasmídica

IR – Repetido invertido

IS – Secuencia de inserción

LB – Luria-Bertani

MBL – Metallo- β -lactamasa

MH – Müller Hinton

MLST – *Multilocus Sequence Typing*

NB – Caldo nutriente

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

PDB – *Protein Data Bank*

PM – Peso molecular

PME – Proteínas de membrana externa

Q-PCR – PCR cuantitativa

RFLP – Polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción

R, I, S – Resistente, Intermedio, Sensible

RMD – Resistente a múltiples drogas

rpm – Revoluciones por minute

RV – Región variable

SD – Sensibilidad disminuida

SDR – Santander

SDS – Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

TC – Transconjugante/s

TEMED – Tetrametiletilendiamina

THG – Transferencia horizontal de genes

Tn – Transposón

TSA – Agar tripticasa de soja

1OSM – N° de identificación del cristal de OmpK36 en el PDB

5' CS y 3' CS – 5' segmento conservado y 3' segmento conservado

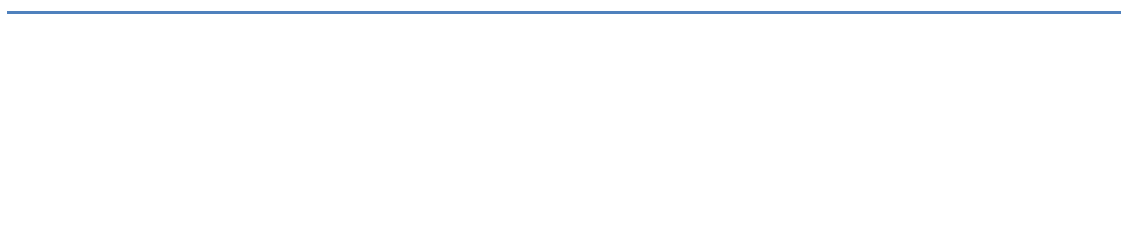
TABLA DE CONTENIDOS

1.	ANTECEDENTES.....	1
1.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a múltiples drogas: un problema global ...	1
1.2	β-lactamasas: Importancia y clasificación.....	2
1.3	Epidemiología de las β-lactamasas de espectro extendido (BLEEs)	4
1.4	Entornos genéticos del gen <i>bla</i> _{CTX-M} involucrados en su movilización y en la generación de patógenos resistentes a múltiples drogas (RMD)	7
1.4.1	Integrones de clase 1	7
1.4.2	Transposones y Secuencias de Inserción (ISs)	11
1.4.3	Elementos conjugativos e integrativos (Integrative and Conjugative Elements – ICE)	12
1.4.4	Plásmidos	13
1.5	Resistencia a los carbapenemes.....	13
1.6	Situación epidemiológica en nuestro país	16
1.7	Relevancia de la investigación propuesta	17
2.	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo General	19
2.2	Objetivos Específicos.....	19
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1	Aislamientos clínicos estudiados.....	20
3.1.1	Parte I: Búsqueda de aislamientos productores de CTX-M.....	20
3.1.2	Parte II: Aislamientos resistentes a carbapenemes.....	21
3.1.3	Parte III: Selección de aislamientos para análisis de porinas	23
3.2	Controles de peso molecular de plásmidos	23
3.3	Control de peso molecular de proteínas para SDS-PAGE	23
3.4	Cepas control.....	23

3.5	Extracción de ADN genómico	28
3.6	Extracción de plásmidos pesados	29
3.7	Amplificación por PCR a tiempo final.....	30
3.7.1	Objetivo 1: Caracterización de genes <i>bla</i> _{CTX-M} y genes <i>bla</i> _{KPC}	31
3.7.2	Objetivo 2: Caracterización de integrones atípicos y sus entornos.....	32
3.7.3	Objetivo 3: Entornos genéticos del gen <i>bla</i> _{KPC}	34
3.7.4	Objetivo 4: Caracterización plasmídica.....	35
3.7.5	Objetivo 5: Análisis de porinas.....	39
3.8	Ensayos de conjugación	40
3.9	Cuantificación de la expresión relativa de porinas y KPC por PCR a tiempo real	41
3.9.1	Extracción de ARN.....	41
3.9.2	Segundo tratamiento con DNasa.....	41
3.9.3	Síntesis de ADN copia	42
3.9.4	Amplificación por PCR en tiempo real	42
3.9.5	Cuantificación relativa por el método comparativo de C_T ($\Delta\Delta C_T$).....	43
3.10	Expresión de porinas a nivel proteico	45
3.10.1	Extracción de proteínas de membrana externa (PME)	45
3.10.2	Preparación de geles de poliacrilamida.....	46
3.10.3	Corrida electroforética.....	47
4.	RESULTADOS.....	48
4.1	Objetivo 1: Caracterización de genes <i>bla</i> _{CTX-M} y genes <i>bla</i> _{KPC}	48
4.1.1	Aislamientos productores de CTX-M	48
4.1.2	Aislamientos productores de KPC.....	49
4.2	Objetivo 2: Caracterización de integrones atípicos y sus entornos	52
4.2.1	Integrones atípicos.....	52

4.2.2	Entornos de integrones atípicos: ISs y regiones RMD	54
4.3	Objetivo 3: Entornos genéticos del gen <i>bla</i> _{KPC-2}	60
4.4	Objetivo 4: Transferencia de <i>bla</i> _{CTX-M-15} y <i>bla</i> _{KPC-2} por conjugación y caracterización de plásmidos	62
4.4.1	Transferencia de <i>bla</i> _{CTX-M-15}	62
4.4.2	Transferencia de <i>bla</i> _{KPC-2}	62
4.4.3	Caracterización de grupos de incompatibilidad plasmídica	63
4.4.4	Extracción de plásmidos pesados	64
4.5	Objetivo 5: Análisis de porinas y expresión de KPC	68
4.5.1	Análisis de secuencias de los genes <i>ompK35</i> y <i>ompK36</i>	74
4.5.2	Expresión relativa de porinas (acumulación de ARNm)	80
4.5.3	Expresión de porinas a nivel proteico	82
4.5.4	Expresión relativa de KPC (acumulación de ARNm)	84
5.	DISCUSIÓN	86
5.1	Caracterización de genes <i>bla</i> _{CTX-M} y <i>bla</i> _{KPC}	87
5.2	Caracterización de otros genes de resistencia	91
5.3	Análisis de integrones atípicos	93
5.4	Detección de otros EGM y plataformas que los contienen	98
5.5	Estudio de los entornos del gen <i>bla</i> _{KPC-2}	101
5.6	Capacidad de transferencia del gen <i>bla</i> _{KPC-2} y análisis plasmídico	102
5.7	Capacidad de transferencia del gen <i>bla</i> _{CTX-M-15} y análisis plasmídico	105
5.8	Diferentes morfotipos y resistotipos	107
5.9	Análisis de porinas	109
5.10	Expresión relativa de KPC	116
6.	PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES	117
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

8.	ANEXO I: Sitio de corte de <i>FokI</i>	137
9.	ANEXO II: Cebadores utilizados para tipificación plasmídica	138
10.	ANEXO III: Resultados de ensayos de microdilución a Aminoglucósidos.....	139
11.	ANEXO IV: Protocolo de ensayo de formación de Biofilms.....	140
12.	ANEXO V: Diferentes morfotipos de colonia	141
13.	APÉNDICE I: Cromatogramas de gen <i>aac6'-Ib</i>	142
14.	APÉNDICE II: Hibridación de cebadores para <i>ompK5</i> (Q-PCR)	143
15.	APÉNDICE III: Resultados de ensayo de formación de <i>biofilms</i>	144
16.	APÉNDICE IV: Publicación (primer reporte de <i>K. pneumoniae</i> productora de KPC)	
	145	



RESUMEN

La rápida emergencia de fenotipos resistentes a múltiples drogas dentro de las Enterobacterias es un serio desafío médico global. A lo largo de los años, no solamente se han incrementado los reportes de detección de diferentes genes de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) asociados a regiones de resistencia a múltiples drogas (RMD), sino que se han hecho cada vez más frecuentes las detecciones de bacterias resistentes a carbapenemes, tanto por la producción de carbapenemasas como por la pérdida de porinas. En general, la fuerza evolutiva que lleva a la generación de organismos multirresistentes es la transferencia horizontal de genes, la que está mediada por diferentes elementos genéticos móviles - EGM (integrones, transposones, plásmidos). Dada la endemia de bacterias productoras de BLEE en nuestro país, así como el reciente reporte de productoras de KPC, los objetivos de esta tesis fueron caracterizar molecularmente las BLEE de la familia CTX-M así como las carbapenemasas de la familia KPC de aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, analizando sus entornos genéticos y los EGM involucrados en su dispersión. Se abordaron dichos objetivos mediante técnicas de PCR, secuenciación, ensayos de conjugación y extracción de plásmidos. Por otra parte, mediante secuenciación, PCR cuantitativa y análisis del perfil de proteínas de membrana externa, se evaluó la expresión de porinas para determinar su contribución en los fenotipos de resistencia observados. Los resultados evidenciaron la diseminación del gen $bla_{CTX-M-15}$ asociado a regiones RMD en los entornos de integrones atípicos portados en plásmidos conjugativos de diferentes tamaños. Estos integrones de estructura atípica sugirieron una alta prevalencia en la población estudiada. Asimismo, el gen bla_{KPC-2} circuló en dos isoformas diferentes del Tn4401, localizándose en la isoforma *a* dentro de un plásmido no conjugativo en aquellos aislamientos pertenecientes al primer brote de KPC, y en la isoforma *b* dentro de un plásmido conjugativo IncN en aquellos pertenecientes al segundo brote. Se reveló la falta de expresión de OmpK35 en todos los aislamientos estudiados, en la mayoría de los casos explicado por un corrimiento del marco de lectura y un codón *stop* prematuro en el gen *ompK35*. La expresión de OmpK36 resultó variable entre los aislamientos, apreciándose una clara disminución en un único aislamiento, productor

de KPC-2, y aislado posteriormente a la antibiótico-terapia del paciente. El gen *ompK36* en este aislamiento no presentó mutaciones que pudieran explicar la disminución en su expresión, lo cual podría sugerir una regulación de la expresión génica pre y/o post-transcripcional impulsada por la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos. En suma, los resultados de esta tesis enfatizan la problemática que representa la multirresistencia a antibióticos, donde ya no puede ser explicada enteramente por la detección de genes individuales sin tener presente el rol que juegan los EGM en su generación y dispersión.

Palabras clave: integrones atípicos, CTX-M-15, KPC-2, porinas

SUMMARY

The rapid emergence of multi-drug resistant phenotypes in Enterobacteriaceae is a major medical challenge. Throughout the years, the reports of different extended spectrum β -lactamase genes (ESBL) associated with regions of multidrug resistance (MDR) have increased. Similarly, detections of carbapenem-resistant bacteria have become increasingly frequent, either due to carbapenemase production and/or the loss of porins. In general, the evolutionary force which leads to the generation of multidrug-resistant organisms is the horizontal gene transfer, which is mediated by different mobile genetic elements - MGE (integrons, transposons, plasmids). Given the endemicity of ESBL-producing and the recent report of KPC-producing bacteria in our country, the objectives of this thesis were to characterise, by molecular approaches, the CTX-M family of ESBLs and the KPC carbapenemase family in clinical isolates of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*, analysing their genetic environments and the MGEs involved in their dispersal. These objectives were addressed by PCR, sequencing, conjugation assays and plasmid extraction. Moreover, by sequencing, quantitative PCR and profile analysis of outer membrane proteins, porin expression was evaluated to determine its contribution to the resistance phenotypes observed. The results showed the spread of *bla*_{CTX-M-15} gene associated with RMD regions embedded in the vicinity of atypical integrons carried in conjugative plasmids of different sizes. These structurally atypical integrons suggested a high prevalence in the bacterial population studied. *bla*_{KPC-2} gene was shown to circulate in two different isoforms of Tn4401. In isolates belonging to the first KPC outbreak, it was located in isoform *a* within a non-transferable plasmid, whereas in those belonging to the second outbreak it was found in isoform *b* within an IncN conjugative plasmid. Lack of expression of OmpK35 was evident in all isolates, in most cases explained by a frameshift mutation causing a premature stop codon in *ompK35* gene. OmpK36 expression was variable among isolates; however a clear decrease in expression was noted in a single KPC-2-producer, recovered from a patient after antibiotic therapy. The *ompK36* gene in this isolate did not present mutations that could explain the decrease in expression, which might suggest a regulation of gene expression at a pre- and / or post-transcriptional level driven by

the selective pressure exerted by antibiotic use. In sum, the results of this study emphasize the problem that multidrug resistance represents, which can no longer be explained entirely by the detection of single genes without bearing in mind the role that MGEs play in its generation and dispersion.

Keywords: atypical integrons, CTX-M-15, KPC-2, porins

1. ANTECEDENTES

1.1 *Klebsiella pneumoniae* resistente a múltiples drogas: un problema global

Klebsiella pneumoniae comprende una especie bacteriana que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Es por lo tanto un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo. En humanos puede encontrarse en el tracto intestinal, en la nasofaringe y sobre la piel y da cuenta de una gran variedad de infecciones nosocomiales así como también adquiridas en la comunidad. Es asimismo responsable de numerosos brotes infecciosos causados mayormente por la diseminación de clones asociados con infecciones oportunistas en individuos con el sistema inmune alterado (diabéticos, pacientes hospitalizados, alcohólicos, entre otros) (Podschun y Ullmann, 1998).

El aumento en el número de infecciones causadas por esta especie así como por otras enterobacterias se encuentra asociado a la rápida emergencia de fenotipos resistentes a múltiples drogas (RMD), especialmente a las cefalosporinas de tercera generación (C3G) y a los carbapenemes, lo cual representa un serio desafío médico global (Chanawong, M'Zali, Heritage, Lulitanond, y Hawkey, 2001; Livermore y Hawkey, 2005) pues aumentan la morbilidad, mortalidad y los costos de salud (Landman *et al.*, 2007).

Los principales problemas de resistencia a antimicrobianos en América Latina, son los bastones Gram-negativos no fermentadores (BGN-NF) multirresistentes y especies de la familia de las Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) (Gales, Castanheira, Jones, y Sader, 2012; Landman *et al.*, 2007; Sader, Jones, Gales, Silva, y Pignatari, 2004). Por lo cual, la resistencia a antimicrobianos es un tema en el cual existe una activa investigación desde el punto de vista de desarrollar estrategias de contención y de nuevas alternativas terapéuticas. La epidemiología de la resistencia es compleja debido a que existe más de un gen que confiere resistencia a un determinado antibiótico (ATB), de modo que su diseminación involucra una serie de evoluciones superpuestas, una para cada gen

involucrado, a lo que se agrega la diseminación de las bacterias que han adquirido estos genes, como se discutirá en secciones posteriores.

1.2 β -lactamasas: Importancia y clasificación

Las β -lactamasas son enzimas producidas por diferentes especies bacterianas que tienen la capacidad de hidrolizar el anillo de los antibióticos β -lactámicos; éstas representan el mecanismo de resistencia más común para esta clase de antibióticos (Bush y Jacoby, 2010).

Existen 2 criterios de clasificación para estas enzimas. Un criterio molecular (comúnmente conocido como clasificación de Ambler) y un criterio funcional (conocido como clasificación de Bush). Este último fue el primero en describirse y utilizarse, a pesar de no reflejar la historia evolutiva de las enzimas clasificadas.

El criterio molecular se basa en la secuencia proteica y la identificación de motivos aminoacídicos conservados y distinguibles y clasifica a las enzimas en clases moleculares: A, B, C o D (Ambler, 1980; Jaurin y Grundstrom, 1981; Ouellette, Bissonnette, y Roy, 1987). Las clases A, C y D comprenden serín-enzimas que hidrolizan sus sustratos a través de un sitio activo que presenta un residuo de serina; la clase B comprende metalo-enzimas que tienen al menos un átomo de Zinc en su sitio activo.

Las β -lactamasas de las familias TEM, SHV, CTXM y KPC se clasifican dentro de la clase A de Ambler; las metalo- β -lactamasas de las familias VIM, IMP, SPM, NDM son ejemplos pertenecientes a la clase B; las enzimas tipo AmpC se clasifican dentro de la clase C mientras que las enzimas tipo OXA son clasificadas dentro de la clase D.

A través de criterios funcionales tales como la capacidad hidrolítica, el punto isoeléctrico, propiedades de inactivación de diferentes inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) propuestos inicialmente (Bush, 1989), y posteriormente extendidos (Bush, Jacoby, y Medeiros, 1995), las β -lactamasas pueden clasificarse en grupos denominados del 1 al 4:

I. Grupo 1: Cefalosporinasas

Corresponden a enzimas de la clase C de Ambler y están codificadas en los cromosomas de varias familias bacterianas, incluidas las enterobacterias (Jacoby, 2009) . Asimismo también las hay de origen plasmídico. Su espectro de acción incluye las penicilinas, las cefalosporinas (siendo más activas contra éstas), cefamicinas (como el cefoxitín - FOX), oxi-iminocefalosporinas (como la ceftazidima – CAZ y la cefotaxima - CTX) y monobactams (como el aztreonam - ATM). Son además pobremente inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Bush y Jacoby, 2010).

II. Grupo 2: Serín - β -lactamasas

Corresponde a las enzimas de las clases moleculares A y D de Ambler y representan el grupo más grande de β -lactamasas debido a la creciente identificación de BLEEs en los últimos años. En base a su espectro de hidrólisis se subdividen en subgrupos denominados 2a, 2b, 2c, 2d, 2e y 2f (Bush y Jacoby, 2010). Las enzimas más frecuentemente encontradas en enterobacterias pertenecen a los subgrupos 2b, 2d y 2f. Dentro de los subgrupos 2b y 2d encontramos tanto enzimas de espectro reducido (hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de primera generación – C1G, enzimas tales como TEM-1 y SHV-1) como BLEEs (tales como TEM-50, SHV-12, CTX-M-15, OXA-11) mientras que dentro del subgrupo 2f se clasifican las serín-carbapenemasas (algunas codificadas a nivel cromosomal – SME e IMI-1, y otras a nivel plasmídico – KPC-2 y algunas variantes de GES); todas ellas con capacidad de hidrólisis de los carbapenemes y en mayor o menor grado, monobactams. Las enzimas miembro de este grupo son inhibidas por ácido clavulánico y por tazobactam.

III. Grupo 3: Metallo - β -lactamasas (MBLs)

Corresponde a las enzimas de la clase B de Ambler y como fue mencionado anteriormente, poseen al menos un átomo de Zinc en su sitio activo. No son inhibidas por ácido clavulánico ni por tazobactam, pero sí por quelantes de iones metálicos como el EDTA o el ácido dipicolínico. En cuanto a su perfil hidrolítico, son capaces de hidrolizar carbapenemes pero tienen una pobre actividad frente a los monobactams. Pertenecen a este grupo las enzimas de las familias VIM e IMP

(codificadas a nivel plasmídico) así como otras codificadas a nivel cromosomal en algunas bacterias gram positivas (Gonzales-Escalante, 2012).

IV. Grupo 4: β -lactamasas no inhibidas por ácido clavulánico.

En la clasificación inicial (Bush *et al.*, 1995), algunas pocas enzimas de espectro reducido (es decir, que hidrolizaban solamente penicilinas) producidas por *Pseudomonas cepacia* estaban incluidas dentro de esta última categoría, y se diferenciaban de otras enzimas por no ser inhibidas por ácido clavulánico. Sin embargo, poco se sabía sobre su estructura o su modo de acción. En el año 2010, Bush y Jacoby intencionalmente omitieron la consideración de este último grupo argumentando que seguramente, si más información estuviese disponible respecto de las enzimas previamente clasificadas dentro de este grupo, éstas pasarían a clasificarse dentro de alguno de los otros grupos bien caracterizados.

1.3 Epidemiología de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)

A pesar de no existir un consenso respecto de lo que implica una BLEE, una definición de uso común describe a las β -lactamasas de espectro extendido como aquellas enzimas capaces de conferir resistencia a las penicilinas, C1G, C2G, C3G y monobactams (pero no a cefamicinas o carbapenemes) mediante la hidrólisis de estos antibióticos, y que además son inhibidas por el ácido clavulánico (en mayor o menor grado) (Paterson y Bonomo, 2005).

Las BLEEs fueron descritas por primera vez a mediados de la década de 1980. En el inicio, la mayoría de los casos descritos correspondieron a variantes alélicas de las penicilinasas TEM-1 (Sougakoff, Goussard, Gerbaud, y Courvalin, 1988) y SHV-1 (Knothe, Shah, Krcmery, Antal, y Mitsuhashi, 1983), portadas en plásmidos, que presentaban una o más sustituciones de aminoácidos, ampliando su espectro de acción a C3G y C4G.

Sin embargo, al presente la epidemiología de las BLEE ha variado debido a la amplia diseminación de las BLEE correspondientes a la familia CTX-M con el consiguiente desplazamiento de las familias TEM y SHV. Esta diseminación explosiva de enzimas

pertenecientes a esta familia ha sido denominada como la “pandemia de CTX-Ms” (Canton y Coque, 2006). La primera enzima descrita fue la CTX-M-1 reportada en 1989 en Alemania a partir de un aislamiento de *Escherichia coli* resistente a CTX (Bauernfeind, Grimm, y Schweighart, 1990).

Hasta la fecha se han reportado 139 variantes alélicas de la familia CTX-M (<http://www.lahey.org/Studies>). Estas enzimas hidrolizan la CTX más rápidamente que la CAZ.

A diferencia de otras BLEEs, la familia de las CTX-M constituye un grupo de enzimas complejo y heterogéneo evidenciado por análisis filogenéticos que muestran la clasificación en al menos 5 *clusters* (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25) (Canton, Gonzalez-Alba, y Galan, 2012). Estos análisis sugieren que los diferentes *clusters* han evolucionado a partir de diferentes genes de β -lactamasas cromosómicos naturales con actividad cefotaximasa presentes en especies de *Kluyvera* (Rodriguez *et al.*, 2004), cuyo hábitat natural es el medio ambiente. Se sugiere que la movilización de estos genes ha sido facilitada por la secuencia de inserción (IS) *ISEcp1* u otras secuencias de inserción relacionadas (Canton *et al.*, 2012; Livermore *et al.*, 2007). Más tarde, las diferentes variantes de cada *cluster* fueron originándose a partir de mutaciones puntuales, probablemente por la presión selectiva del uso de antibióticos.

En contraposición a lo observado para las BLEE TEM y SHV, la diseminación de las CTX-M ocurriría desde la comunidad y el medio ambiente hacia el ambiente hospitalario. Los genes que codifican las β -lactamasas del tipo CTX-M se encuentran insertos en estructuras similares a transposones (Tn), muchas veces portados en plásmidos conjugativos, promoviendo la diseminación de esos genes entre diferentes bacterias (Canton *et al.*, 2012). El éxito en su diseminación, además de estar relacionado con estos elementos móviles en los cuales están insertos, probablemente se deba al hecho de que estas plataformas suelen encontrarse en clones exitosos.

Asimismo, en las últimas dos décadas se han visto diferentes genes de β -lactamasa fuertemente asociados para formar regiones resistentes a múltiples drogas (RMD).

Fundamentalmente, muchos organismos productores de CTX-M han evidenciado el fenómeno de co-resistencia, particularmente a aminoglucósidos y fluoroquinolonas, lo cual además podría estar siendo facilitado por el proceso de co-selección (Canton y Ruiz-Garbajosa, 2011).

La variante alélica CTX-M-2 fue detectada en aislamientos clínicos de *Salmonella spp* en Argentina en 1990 y rápidamente se dispersó en el resto de América del Sur, siendo al presente la variante más frecuente en Uruguay (Marquez *et al.*, 2008; Roy Chowdhury *et al.*, 2011; Vignoli *et al.*, 2006).

Por otra parte la variante alélica CTX-M-15 está más ampliamente diseminada en Europa si bien en nuestro continente se está comenzando a describir con mayor frecuencia en aislamientos con fenotipo RMD (Bado *et al.*, 2010; Damjanova *et al.*, 2008; Garcia-Fulgueiras *et al.*, 2011; Oteo *et al.*, 2009; Vranic-Ladavac *et al.*, 2010). No obstante, poco se sabe acerca de la estructura de la población de *K. pneumoniae* productora de CTX-M-15 que expresan complejos fenotipos de multirresistencia (Oteo *et al.*, 2009).

Para la mayoría de los patógenos la resistencia a drogas está causada fundamentalmente por la adquisición de nuevos genes y en menor medida por mutaciones. El surgimiento de bacterias patógenas resistentes no solo a una familia de drogas, sino a varios tipos de droga no relacionadas químicamente, es un fenómeno progresivo observado en numerosas especies patógenas para el hombre. La evolución hacia la resistencia a múltiples drogas se puede deber a la acumulación de varios mecanismos específicos, a la aparición de mecanismos inespecíficos únicos o a una combinación de ambos. La evolución mediada por la acumulación de mecanismos de resistencia específicos es relativamente rápida ya que la principal fuerza que la ocasiona es la transferencia horizontal de genes (THG), un proceso influenciado por una amplia gama de elementos genéticos móviles (Ochman, Lawrence, y Groisman, 2000). En las bacterias Gram negativas estos elementos incluyen plásmidos, transposones e integrones junto con sus elementos móviles asociados, los *cassettes* génicos. Estos elementos no actúan aisladamente, por el contrario es común que plásmidos conjugativos contengan varios elementos

transponibles, los que a su vez contienen integrones con combinaciones diversas de *cassettes* génicos asociados (Walsh, 2006). Tales combinaciones que colectivamente pueden transferirse por conjugación, transposición o por sistemas de recombinación sitio-específicos, pueden diseminar la resistencia a una variedad de bacterias filogenéticamente muy distantes, muy rápidamente y reorganizar la información de varias maneras en el nuevo huésped antes de volver a transferirse.

1.4 Entornos genéticos del gen *bla*_{CTX-M} involucrados en su movilización y en la generación de patógenos resistentes a múltiples drogas (RMD)

Desde el inicio de la era de los antibióticos se observó resistencia a los mismos, resistencia que se creía causada meramente por mutaciones puntuales. Sin embargo, la emergencia de la RMD no era de esperarse, ya que la ocurrencia de dos o más mutaciones que afecten a distintos tipos de antibióticos es altamente improbable (Toleman y Walsh, 2011).

Los mecanismos involucrados en la generación de RMD - que ha sido definida como la no-susceptibilidad a al menos un antibiótico en tres categorías de antimicrobianos diferentes (Magiorakos *et al.*, 2012) – han sido extensamente estudiados a lo largo de las últimas cinco décadas. Si bien la mutación ha colaborado en la generación de diferentes variantes de enzimas, como se ha mencionado anteriormente, la principal fuerza evolutiva ha sido la THG. Ésta es mediada por diferentes elementos genéticos, algunos móviles y otros movilizables, que en su conjunto se han vuelto muy comunes en diferentes bacterias generando resistencia cruzada a varias clases de antibióticos.

1.4.1 Integrones de clase 1

Entre los diversos elementos genéticos móviles (EGM) involucrados, destacan los integrones de clase 1, conocidos por su contribución a la emergencia de resistencia antibiótica mundial. En los entornos de estos integrones (y en algunos casos enmarcados dentro del integrón mismo) es que pueden encontrarse diferentes genes *bla*_{CTX-M}.

Funcionalmente, los integrones incluyen un sistema de recombinación específica de sitio, capaz de capturar, rearrreglar y expresar genes móviles (Fig. 1). Las unidades de captura se denominan *cassettes* génicos y representan elementos independientes movilizables. Cada uno de estos elementos consiste en un único gen (que normalmente no contiene un promotor) seguido de un sitio de recombinación llamado 59-be (*base element*) o también *attC* que puede tener un tamaño desde 59 pb hasta 144 pb. Gran variedad de determinantes de resistencia a los antibióticos, antisépticos y desinfectantes han sido descritos en estos *cassettes* génicos en aislamientos de origen clínico. En un mismo integrón pueden incorporarse más de un *cassette* de gen para crear un arreglo de diferentes genes y en consecuencia este sistema integrón-*cassette* de gen constituye un factor importante en la generación de resistencia a múltiples drogas.

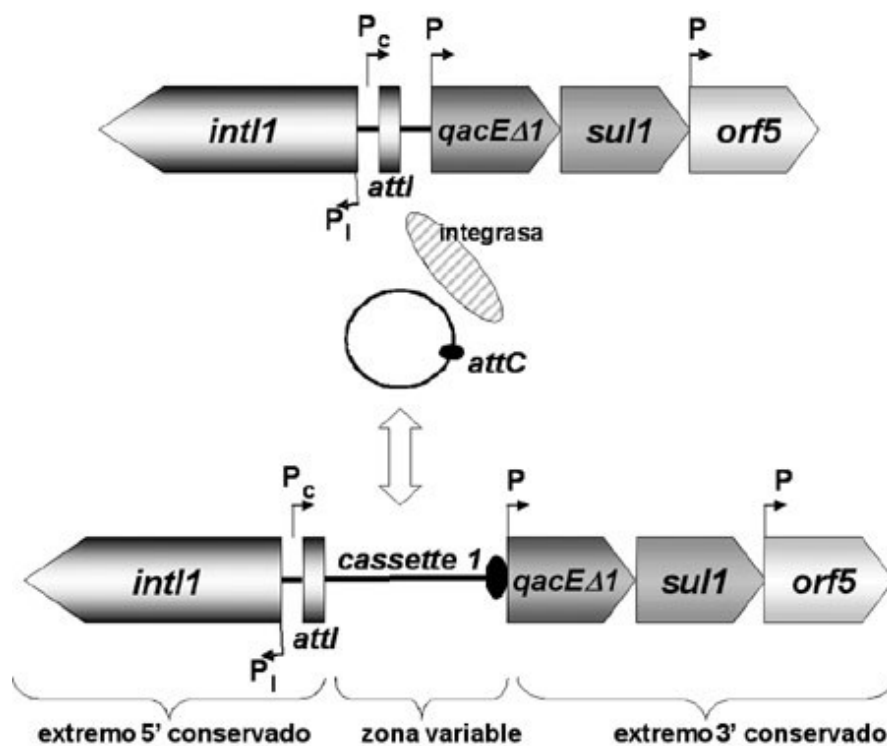


Figura 1. Esquema de un integrón clásico de clase 1. Se indican como *int1* el gen que codifica para la integrasa, como P_c el promotor para la expresión de los *cassettes* génicos y como P_i el promotor para la expresión de la integrasa. *attI* es el sitio de recombinación del integrón y *attC* el correspondiente al *cassette* génico. El extremo 3' CS está conformado por los genes *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5*. Tomado de Mella *et al.* (2004).

Los integrones identificados en aislamientos bacterianos de significancia clínica pertenecen a tres clases diferentes (según la secuencia de la integrasa): Clases 1, 2 y 3. Pueden estar asociados a elementos conjugativos e integrativos o translocarse a plásmidos movilizables o conjugativos y tener la oportunidad de capturar nuevos o depositar los propios *cassettes* génicos en otros organismos. Los integrones de clase 1 están fuertemente asociados a la multirresistencia a antibióticos en patógenos causantes de infecciones intrahospitalarias y en patógenos causantes de infecciones adquiridas en la comunidad (Marquez *et al.*, 2008). La transferencia genética de un *cassette*, cobra un gran significado clínico cuando el nuevo huésped se trata de un microorganismo patógeno causante de infecciones comunitarias y sobre todo cuando los genes transferidos confieren factores de virulencia o resistencia a antibióticos ampliamente utilizados.

Los integrones de clase 1 clásicos (o típicos) contienen un módulo conocido como segmento conservado 5' (5'-CS), compuesto por el gen *intI1* que codifica para una recombinasa sitio específica; un sitio *attI1* en donde se incorpora el *cassette* y un promotor *Pc* que dirige la transcripción del gen codificado. A continuación del último *cassette* de gen o del segmento 5'-CS, se encuentra una región conservada que se conoce como 3'-CS (complejo *qacEΔ1/sul1*) (Stokes y Hall, 1989). Se han descrito asimismo variantes de integrones de clase 1 con el extremo 3'-CS variable (Antunes, Machado, Sousa, y Peixe, 2005). Estructuralmente, los integrones de clase 1 presentan comúnmente una asociación física al módulo de transposición de los transposones *Tn402-like*. Sin embargo, en la mayoría de los casos parte de los genes de transposición están deletados (Fig. 2). Los repetidos invertidos (IRi e IRt) característicos de los transposones *Tn402-like* enmarcan los límites de los integrones de clase 1 movilizables. Dentro de estos límites es que se encuentran los segmentos conservados 5'-CS y 3'-CS. La región delimitada entre ambos segmentos conservados, donde los *cassettes* génicos son capturados por recombinación específica de sitio, se conoce como región variable (RV). Los eventos que originaron el segmento 3'-CS conservado, también provocaron la pérdida de parte del módulo de transposición del *Tn402-like*. Debido a ello, son comunes los reportes de integrones de clase 1 con módulos de transposición defectivos entre el 3'-CS y el IRt,

los cuales impiden una transposición efectiva si no se les provee de las funciones esenciales en *trans* (Brown, Stokes, y Hall, 1996).

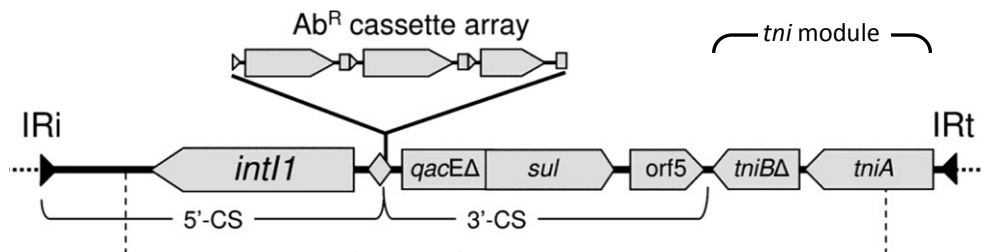


Figura 2. Estructura generalizada de un integrón de clase 1 Tn402-like clásico o convencional. Las flechas y las líneas negras horizontales indican las repeticiones invertidas (IRi e IRt) que definen los extremos de transposones Tn402-like. El diamante sombreado en gris representa el sitio *attI1* en el que se insertan los *cassettes* móviles. Ab^R: resistencia a antibióticos. Se muestra una región variable (VR) de tres *cassettes*, pero el tipo y el número de *cassettes* son variables. Las extensiones de las regiones 5' CS, 3' CS y las correspondientes al módulo *tni* se indican. Adaptado de Gillings *et al.* (2009).

Dentro de los integrones de clase 1 clásicos se ha observado gran variabilidad en sus estructuras genéticas por lo cual se ha propuesto sub-clasificarlos en “típicos” – grupo I (cuando se pueden detectar todas las regiones mencionadas anteriormente) y “atípicos” – grupos II al V (de acuerdo a la presencia o ausencia de diferentes módulos) (Roy Chowdhury *et al.*, 2011). Es así que la mayor diversidad fue encontrada entre los integrones denominados “atípicos”: donde los pertenecientes al grupo II no poseen módulo *tni* ni puede detectarse el IRt; los del grupo III no poseen módulo *tni* ni región 3'-CS; los del grupo IV sí poseen el módulo *tni* pero no la región 3'-CS; mientras que los pertenecientes al grupo V sólo poseen la región 5'-CS (caracterización basada en cartografía por reacción en cadena de la polimerasa - PCR con cebadores específicos para cada módulo/región).

Además, rearrreglos adicionales mediados por otros tipos de elementos han generado una plétora de integrones de clase 1 que muestran un alto grado de diversidad estructural, y que a su vez poseen genes de resistencia en forma de “no *cassettes*” embebidos dentro de los límites del integrón. Estructuralmente, estos integrones presentan una duplicación parcial de su región 3'-CS y codifican para una

recombinasa denominada actualmente ISCR1 (antiguamente conocida como Orf513). Corriente abajo de esta recombinasa es que se encuentra una segunda RV compuesta por genes (con sus respectivos promotores, en vez de *cassettes* génicos) usualmente de resistencia a antibióticos. A estos integrones se los denomina integrones inusuales o complejos (Arduino *et al.*, 2002; Stokes, Tomaras, Parsons, y Hall, 1993).

En relación a los microorganismos multirresistentes, estas variantes de integrones atípicos e integrones inusuales ya han sido descritas en Uruguay por nuestro grupo de trabajo en al menos dos aislamientos de *K. pneumoniae* con fenotipo RMD (aislamientos U20 y 12836, respectivamente) (Marquez *et al.*, 2008; Roy Chowdhury *et al.*, 2011).

1.4.2 Transposones y Secuencias de Inserción (ISs)

Los Tn fueron descritos por primera vez en 1930 como causantes de deleciones, inserciones y traslocaciones en el genoma del maíz por McClintock (Coe y Kass, 2005). Más tarde fueron hallados en bacterias asociados con el movimiento de genes de resistencia. En bacterias, se subdividen en dos grupos: aquellos que llevan genes adicionales (como genes de resistencia a antibióticos), conocidos como transposones propiamente dichos; y aquellos de estructura más simple que solamente se movilizan a ellos mismos, denominados como IS (Toleman y Walsh, 2011).

Si bien el movimiento de los Tn y las IS puede ser perjudicial para la bacteria (llevando a rearrreglos genéticos), en referencia a la resistencia a antibióticos han resultado de gran utilidad. No solamente han contribuido a la THG de varios genes de resistencia a antibióticos embebidos en los contextos de los integrones, sino que también han favorecido mecanismos de resistencia menos específicos, como la pérdida de porinas de la membrana externa de bacterias Gram-negativas debida a la interrupción de los genes que las codifican por la inserción de IS (Kaczmarek, Dib-Hajj, Shang, y Gootz, 2006; Rodriguez-Martinez, Poirel, y Nordmann, 2009).

Algunas IS se encuentran en alto número en los genomas bacterianos, lo cual las hace más efectivas para movilizar genes, tal es el caso de IS26 quien al transponerse

a los lados de un gen de resistencia, en la misma orientación, es capaz de mover toda la estructura en un único paso, movilizándolo todo lo que se encuentre entre las dos copias de la secuencia de inserción. Esta IS fue la responsable de la movilización del gen *bla*_{SHV} cromosómico de *K. pneumoniae* a una localización plasmídica (Ford y Avison, 2004).

Diferentes IS han sido asociadas con la movilización de genes *bla*_{CTX-M}. Todas ellas han sido encontradas corriente arriba del gen. Entre ellas destacan *ISEcp1*, *ISCR1*, *IS10* e *IS26*. Si bien las combinaciones más frecuentemente observadas involucran *ISCR1-bla*_{CTX-M-2} e *ISEcp1-bla*_{CTX-M-15}, *ISEcp1* ha sido reportada en entornos genéticos de variantes de CTX-M pertenecientes a los 5 *clusters* principales (1, 2, 8, 9 y 25) (Canton *et al.*, 2012; Eckert, Gautier, y Arlet, 2006; Poirel, Decousser, y Nordmann, 2003). Cabe destacar que la movilización experimental de genes *bla*_{CTX-M} ha sido demostrada por Lartigue, Poirel, Aubert, y Nordmann (2006). Incluso el efecto del promotor de estas IS genera un aumento de expresión de las enzimas lo cual sugiere que la localización de las IS corriente arriba de estos genes tendría un rol en la selección y la diseminación de las CTX-Ms.

Cabe resaltar que el mecanismo de transposición de *ISCR1* e *ISEcp1* se conoce como “*One-ended*”, y como su nombre lo indica, refiere a la necesidad de únicamente un extremo del transposón en vez de ambos, para la movilización (Motsch *et al.*, 1985).

1.4.3 Elementos conjugativos e integrativos (Integrative and Conjugative Elements – ICE)

Los ICE comprenden diversos elementos que tienen en común la habilidad de escindir del cromosoma e integrarse al mismo de forma similar a los bacteriófagos, y a la vez la capacidad de transferirse entre bacterias por conjugación, como los plásmidos (Pembroke, MacMahon, y McGrath, 2002). La mayoría de los ICE tienen un único sitio de inserción en el cromosoma, el cual usualmente se encuentra en el extremo 3' de un gen para ARN de transferencia (ARNt) o en el 5' de genes bien conservados como *prfC*, y se encuentran flanqueadas por repetidos invertidos. Antiguamente no se creía que los ICE estuvieran implicados en la transferencia de determinantes de resistencia a antibióticos, sin embargo la era genómica ha

permitido evidenciar la presencia de varios transposones y secuencias de inserción que contienen o flanquean, respectivamente, genes de resistencia, dentro de diferentes ICE (Toleman y Walsh, 2011).

1.4.4 Plásmidos

Diferentes tipos de plásmidos han sido asociados con diferentes genes *bla*_{CTX-M}. En particular se ha observado una asociación entre plásmidos del grupo de incompatibilidad FII (IncFII) y *bla*_{CTX-M-15} (Coque *et al.*, 2008). Plásmidos pertenecientes a otros grupos de incompatibilidad plasmídica, como IncN, IncI1, IncK, IncHI2 e IncL/M también han sido asociados a diferentes genes *bla*_{CTX-M}, pero además se los ha relacionado a la diseminación de otros genes de resistencia a antibióticos (Canton *et al.*, 2012).

1.5 Resistencia a los carbapenemes

La gran dispersión de las enterobacterias productoras de BLEE en el mundo, así como la presencia de complejas plataformas genéticas en las que los genes codificantes de las mismas se encuentran embebidos, ha comprometido el uso de cefalosporinas de espectro extendido. Por lo tanto, los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las infecciones por estos microorganismos son los carbapenemes, ya que son estables frente a la mayoría de las β -lactamasas, incluyendo las BLEE. Sin embargo, concomitantemente a su mayor empleo, se ha observado aumento de las tasas de resistencia a estos fármacos (Sader *et al.*, 2004).

En las últimas dos décadas, la resistencia a los carbapenemes se ha convertido en un problema importante entre los BGN-NF (Carvalho *et al.*, 2006; Sader, Reis, Silbert, y Gales, 2005), aunque ha sido poco común entre las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, en los últimos años se ha informado un aumento de las enterobacterias, especialmente *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenemes (Nordmann, Cuzon, y Naas, 2009).

La resistencia a carbapenemes en *K. pneumoniae* se asocia principalmente con la producción de carbapenemasas (β -lactamasas con actividad frente a carbapenemes) que confieren, generalmente, resistencia a carbapenemes, y otros antibióticos β -

lactámicos (Bush y Jacoby, 2010). Asimismo, la pérdida o las alteraciones estructurales de porinas (un tipo de proteínas de membrana externa – PME) por mutaciones en los genes que las codifican pueden contribuir a la resistencia a carbapenemes (Landman, Bratu, y Quale, 2009; Lartigue, Poirel, Poyart, Reglier-Poupet, y Nordmann, 2007; Martínez-Martínez *et al.*, 1996; Martínez-Martínez *et al.*, 2002; Martínez-Martínez *et al.*, 1999; Mena *et al.*, 2006; Oteo *et al.*, 2008). Aislamientos de *K. pneumoniae* no productores de BLEE usualmente expresan las dos porinas principales OmpK35 y OmpK36, mientras que aquellos productores de BLEE suelen expresar solamente una de ellas, o bien ninguna (García-Fernández *et al.*, 2010; Hernández-Alles, Alberti, *et al.*, 1999; Jacoby, Mills, y Chow, 2004; Martínez-Martínez *et al.*, 1999; Mena *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2011). En cuanto a la expresión de dichas proteínas, se han encontrado mutaciones puntuales e inserciones de algunos nucleótidos en sus genes codificantes, a partir de las cuales se predice una terminación prematura de la traducción (Doumith, Ellington, Livermore, y Woodford, 2009; Kaczmarek *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2012), y en otros casos los genes se han visto interrumpidos por diferentes IS tales como IS26, IS1, IS10 e IS903, que estarían impidiendo su expresión (Doumith *et al.*, 2009; Kaczmarek *et al.*, 2006; Mena *et al.*, 2006).

Como fue mencionado anteriormente, las carbapenemasas presentes en Enterobacterias pertenecen a la clase A de Ambler (KPC, Sme, NMC-A, IMI, variantes de GES/IBC), clase B de Ambler (metalo- β -lactamasas) y clase D de Ambler (oxacilinasas) siendo las enzimas KPC las carbapenemasas de clase A más frecuentes. Inicialmente los aislamientos productores de carbapenemasas del tipo KPC fueron detectadas en *K. pneumoniae* en 1996 en Estados Unidos y a partir del 2006 en Argentina, Brasil y Colombia y también en otras bacterias gram negativas (Nordmann *et al.*, 2009; Nordmann y Poirel, 2002; Poirel, Heritier, Tolun, y Nordmann, 2004; Queenan y Bush, 2007). Recientemente detectamos por primera vez en nuestro país la aparición de una bacteria perteneciente a la especie *K. pneumoniae* productora de KPC proveniente de pacientes graves en un centro de tratamiento intensivo. El grupo de investigación participó en la caracterización fenotípica y genotípica de la cepa y

en la caracterización genotípica y bioquímica de la carbapenemasa KPC (Apéndice IV).

Esta situación epidemiológica evidencia la facilidad que presentan los genes *bla*_{KPC} para ser movilizados por transferencia horizontal. Diversos análisis genéticos indican que la movilidad de este gen estaría asociada con la diseminación de diferentes clones, plásmidos y transposones y que a su vez es frecuente su co-transferencia con otros factores de resistencia a antibióticos (Nordmann *et al.*, 2009). Los genes *bla*_{KPC} se han detectado en plásmidos de diversos tamaños y estructuras, pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad, tales como IncFII, IncN e IncL/M que usualmente portan determinantes de resistencia a aminoglucósidos y genes *bla*_{CTXM} (Cuzon *et al.*, 2010).

El control de la diseminación de las bacterias productoras de KPC es un desafío para la salud pública, y se ve obstaculizado por dos factores: la dificultad en la identificación de dichas bacterias (al basarse en ensayos rutinarios de susceptibilidad a los carbapenemes) y la dificultad en la identificación de pacientes cuyos tractos gastrointestinales están colonizados asintóticamente (Pasteran, Lucero, Soloaga, Rapoport, y Corso, 2011).

Asimismo, el tratamiento para pacientes infectados con enterobacterias productoras de KPC está limitado únicamente a antibióticos no β -lactámicos, como la tigeciclina o colistin (Nordmann *et al.*, 2009) ya que estas bacterias generalmente presentan la co-producción de BLEEs y resistencia a otras clases de antimicrobianos. Desafortunadamente, la tigeciclina aún no tiene prueba de sensibilidad estandarizada en la norma del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Hope, Pllana, James, Warner, y Livermore, 2010) y no es recomendada para infecciones del torrente sanguíneo. El colistin también presenta desventajas, en particular su alta toxicidad, así como la reciente emergencia de bacterias resistentes a esta droga en diferentes regiones (Antoniadou *et al.*, 2007; Bogdanovich *et al.*, 2011; Lee, Patel, Huprikar, Calfee, y Jenkins, 2009).

La variante *bla*_{KPC-2} ha sido mayoritariamente identificada dentro de un transposón de 10Kb tipo Tn3, el Tn4401 (Naas *et al.*, 2008). Éste posee genes para una

transposasa (*tnpA*) y una resolvasa (*tnpR*), así como dos IS no relacionadas (*ISKpn6* e *ISKpn7*). Hasta el momento se han descrito cinco isoformas de este transposón (*a*, *b*, *c*, *d* y *e*) las que difieren en la longitud del espacio intergénico entre *ISKpn7* y *bla_{KPC-2}* (Kitchel *et al.*, 2010; Naas *et al.*, 2008). La estructura del *Tn4401a*, que presenta una delección de 100pb río arriba del gen *bla_{KPC-2}*, es la más frecuentemente descrita en Argentina (Gomez *et al.*, 2011).

1.6 Situación epidemiológica en nuestro país

Existen varios estudios sobre la detección individual de genes de resistencia a antibióticos de uso clínico en bacterias patógenas multirresistentes, incluidos los genes *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC}*, *aac6'-Ib* y *qnr* pero son muy escasos los estudios que informan sobre la localización de dichos genes en regiones discretas de RMD y sobre el potencial de los mismos para co-transferirse a otras bacterias en un único evento de transferencia genética. Por otro lado si bien hay varios reportes sobre la detección de integrones de clase 1 en aislamientos clínicos provenientes del ambiente hospitalario, se subestima la extensión de las plataformas genéticas en las cuales se encuentran embebidos los integrones de clase 1 atípicos y los genes ya mencionados. La amplia gama de elementos genéticos móviles que está siendo reclutada en los entornos genéticos de los integrones de clase 1 parece hacerse más frecuente conforme pasa el tiempo. Esto, por tanto, estaría llevando a la evolución de complejas unidades RMD presuntamente móviles lateralmente, lo cual podría complicar aún más la terapia antibiótica.

En nuestro país estamos en una situación de endemia de enterobacterias productoras de BLEE y en particular para *K. pneumoniae* estamos en la etapa de aparición o emergencia de carbapenemasas de la familia KPC, etapa que generalmente es seguida por la amplificación de la resistencia (aumento del número de infecciones por estas bacterias) y luego por la diseminación de la resistencia a otras especies bacterianas. Por todo lo antedicho se evidencia la importancia de abordar la problemática de esta primera etapa de emergencia de la resistencia, desde una visión molecular integrada con los fines de: brindar conocimientos que asistan en la contención de la diseminación de las cepas involucradas, investigar

sobre los posibles orígenes de las mismas y profundizar sobre la co-diseminación de variados determinantes de R a antibióticos. En conclusión: la resistencia antibiótica no puede ser completamente entendida únicamente a través del análisis de aislamientos hospitalarios resistentes definidos, sin tener en cuenta el papel que juegan los EGM en la circulación de los genes involucrados a través de las comunidades bacterianas de patógenos.

1.7 Relevancia de la investigación propuesta

Muy pocos antibióticos nuevos han sido desarrollados últimamente, lo que hace imperativo maximizar la eficacia de los antibióticos existentes como de los que se desarrollen en el futuro. El hallazgo de integrones refleja un riesgo real en la emergencia de la multirresistencia a antibióticos y contar con mecanismos de detección que permitan evidenciar su complejidad estructural (genes y elementos genéticos móviles asociados) sería una herramienta muy valiosa a la hora de predecir futuras resistencias.

Esta tesis pretende contribuir al conocimiento de los elementos genéticos móviles con el potencial de movilizar los genes de resistencia *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{KPC} presentes en aislamientos locales de *K. pneumoniae*. Diferentes aspectos de esta investigación auxiliarán en la comprensión de la diseminación de la multirresistencia en nuestro país, pudiendo dar lugar al desarrollo de estrategias eficaces de contención de esta diseminación. De igual modo tienen el potencial de ser de gran utilidad para comenzar a comprender de un modo más integral la complejidad de mecanismos que conllevan a los diferentes fenotipos de resistencia en los aislamientos clínicos locales de *K. pneumoniae*, posibilitando de este modo la toma de acciones racionales para controlar su diseminación. Los estudios realizados aspiran a enfatizar la importancia de estrategias de vigilancia epidemiológica así como la necesidad de variados enfoques para analizar la multiplicidad de factores que influyen en la multirresistencia a antibióticos y su diseminación. Es importante destacar que algunos de estos enfoques presentan el potencial de ser empleados de rutina en un laboratorio de diagnóstico ante la presunta presencia de un aislamiento multirresistente, lo que a su vez podría directamente derivar en estrategias a nivel

hospitalario que permitan controlar la transmisión de este tipo de patógenos y de este modo reducir los costos destinados a estas áreas de la salud. Adicionalmente se debe acentuar el hecho de que si bien las metodologías planteadas en esta tesis se centran en un solo tipo de microorganismo, podrían ser fácilmente adaptables a la caracterización de resistencias en otros patógenos humanos de importancia epidemiológica y económica para el país.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Contribuir al entendimiento de la epidemiología de la resistencia y de la evolución hacia la multirresistencia en Enterobacterias de origen intrahospitalario.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Caracterizar los genes codificantes de BLEE de la familia CTX-M y de carbapenemasas de la familia KPC por PCR y secuenciación en aislamientos de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes hospitalizados en centros de salud de Uruguay. En aquellos aislamientos fenotípicamente sugestivos de la presencia de otros genes de resistencia a antibióticos, detectarlos por PCR.
- 2- Detectar regiones genéticas marcadoras de la presencia de integrones de clase 1 atípicos y análisis de las plataformas genéticas que los sostienen.
- 3- Analizar el entorno genético donde se encuentran embebidos los genes *bla*_{KPC}.
- 4- Analizar la transferencia genética del gen *bla*_{CTX-M-15} y del gen *bla*_{KPC} a otras Enterobacterias por ensayos de conjugación y caracterización del plásmido transferido.
- 5- Sobre aislamientos con sensibilidad disminuida (SD) o resistencia (R) a los carbapenemes analizar el perfil de proteínas de membrana externa (PME), los genes que codifican para las porinas OmpK35 y OmpK36, y su expresión mediante PCR cuantitativa (Q-PCR). Asimismo, en cepas que sugieran un mismo *background* genético y diferencias fenotípicas en cuanto a las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) a carbapenemes, analizar la expresión de KPC.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente apartado se describen en detalle los objetos de estudio del presente trabajo así como los protocolos utilizados con el fin de cumplir con los objetivos planteados.

3.1 Aislamientos clínicos estudiados

En total se analizaron 39 aislamientos de Enterobacterias, de los cuales 38 fueron identificados como *K. pneumoniae* y uno como *Escherichia coli*. Se estudió la producción de cefotaximasas de la familia CTX-M en 26 de ellos y aquellos que resultaron positivos fueron caracterizados a nivel de los entornos de los integrones de clase 1, haciendo énfasis en la detección de integrones atípicos. Los 13 aislamientos restantes, correspondientes a los dos primeros brotes de bacterias productoras de KPC del Uruguay, fueron estudiados a nivel de la plataforma genética que sostiene el gen que codifica para dicha carbapenemasa.

3.1.1 Parte I: Búsqueda de aislamientos productores de CTX-M

Se analizaron 26 aislamientos de *K. pneumoniae* provenientes de hemocultivos, urocultivos, lesiones, líquido peritoneal, secreciones y catéteres urinarios recolectados de pacientes hospitalizados en el Hospital Militar (Montevideo, Uruguay) durante el período comprendido entre el 22 de marzo y el 07 de mayo del año 2011. Estos aislamientos fueron recolectados consecutivamente durante el período señalado. Esta colección de bacterias fue identificada en el laboratorio del hospital mencionado por procedimientos estándar y se obtuvo su perfil de sensibilidad a los antibióticos que se ensayan de rutina para aislamientos de Enterobacterias mediante el método de microdilución automatizada - VITEK 2, tarjeta GN (Tabla 1). Se categorizó cada aislamiento como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) a cada antibiótico de acuerdo a los criterios interpretativos de la norma CLSI (2013).

Una vez recolectadas, estas muestras bacteriológicas fueron subcultivadas y conservadas en medio BHI – glicerol (infusión cerebro-corazón – glicerol), por

congelación a -20° C hasta el momento de su uso. Se seleccionaron para su posterior estudio, aquellos aislamientos que presentaron un fenotipo consistente con la producción de una BLEE (según resultados del método VITEK) ($n=12$) y dentro de ellos se continuó trabajando solamente con los que evidenciaron la presencia del gen *bla*_{CTX-M-15} mediante su amplificación por PCR ($n=11$). A estos aislamientos se les analizó en búsqueda de la presencia de integrones de clase 1 y aquellos que resultaron positivos fueron evaluados en su región variable y en la presencia de regiones indicadoras de integrones atípicos ($n=10$). Por otra parte, se analizó la capacidad de transferencia de los fenotipos de resistencia y el gen *bla*_{CTX-M-15} así como el grupo de incompatibilidad del plásmido transferido. Paralelamente a mi investigación, y enmarcada dentro de una tesina de grado, la Bach. Gabriela Khalil obtuvo mediante Electroforesis en Gel por Campo Pulsante (EGCP) los diferentes pulstipos de las cepas productoras de CTX-M (Tabla 1). En colaboración con el Laboratorio de Investigación en Infecciones Hospitalarias del Instituto Osvaldo Cruz, Fiocruz, Brasil, se realizó el análisis por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) a algunas de las muestras.

3.1.2 Parte II: Aislamientos resistentes a carbapenemes

Asimismo se analizaron aislamientos resistentes a carbapenemes, y productores de la carbapenemasa KPC (Tabla 2):

- 4 correspondientes al primer brote de bacterias productoras de KPC del Uruguay, todos ellos identificados como *K. pneumoniae* y aislados de dos pacientes hospitalizados en el Sanatorio Mautone (Maldonado, Uruguay) durante los meses de Febrero a Abril del año 2011.
- 9 correspondientes al segundo brote de KPC del Uruguay, 8 de ellos identificados como *K. pneumoniae* y 1 como *Escherichia coli* (*E. coli*), provenientes de un mismo paciente hospitalizado en el Hospital Militar (Montevideo, Uruguay) durante el mes de setiembre del año 2011.

En todos los casos se identificaron los aislamientos en los hospitales de los cuales provinieron y se realizaron los antibiogramas correspondientes mediante el método de microdilución automatizada - VITEK 2, tarjeta GN (Tabla 2). Se categorizó cada

aislamiento como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) a cada antibiótico de acuerdo a los criterios interpretativos de la norma CLSI (2013).

El paciente del cual se recolectaron los aislamientos del segundo brote, era un paciente de 58 años, trasplantado hepático el 1° de setiembre 2011. Como profilaxis quirúrgica le fue administrada ampicilina-sulbactam y cefazolina. Inicialmente presentó buena evolución y se le otorgó el alta a domicilio. Sin embargo, debió ser readmitido al hospital el 12 de setiembre del mismo año por rechazo celular el cual requirió bolos de metilprednisolona. En la readmisión se constató una infección del sitio quirúrgico incisional superficial. A lo largo de dos semanas el paciente fue tratado con meropenem y colistin, y durante este período se recolectaron las muestras analizadas en esta tesis. Al cabo de varias semanas el paciente logró erradicar la infección y fue dado de alta nuevamente.

Cabe mencionar que los aislamientos nombrados como /1 y /2 correspondientes al segundo brote de KPC, refieren a colonias morfológicamente diferentes a partir de una misma muestra. La mayoría (a excepción de las cepas 20/1 y 20/2) resultaron ser el mismo tipo de microorganismo (*K. pneumoniae*) con perfil de sensibilidad diferente. Ambas morfologías fueron reaisladas y conservadas a -20°C como aislamientos diferentes. Así es que a lo largo de esta tesis se mencionarán y estudiarán como cepas distintas.

Ya en el laboratorio se determinó la variante KPC portada (por amplificación por PCR) y se caracterizó el entorno genético en el cual está embebida. Además se analizó la capacidad de transferencia del gen *bla_{KPC}* por ensayos de conjugación. Paralelamente, el grupo de investigación de la Cátedra de Microbiología Clínica (Facultad de Química, UdelaR) analizó el perfil clonal de la mayoría de estas cepas mediante EGCP, y el Departamento de Bacteriología y Virología (Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR) realizó los análisis de MLST a algunos de estos aislamientos, datos que también se indican en la Tabla 2.

3.1.3 Parte III: Selección de aislamientos para análisis de porinas

De la colección de aislamientos estudiados, se seleccionaron algunos para el análisis de la expresión de porinas (Tabla 3). Los criterios de selección se basaron en el perfil de sensibilidad a antibióticos y la caracterización de genes de resistencia de modo de analizar algunos representantes de cada perfil (incluyendo un aislamiento no productor de BLEE ni carbapenemasa – 1104). Estos aislamientos fueron enviados al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España (HUMV), donde, enmarcada en una pasantía de investigación, realicé estos estudios.

3.2 Controles de peso molecular de plásmidos

Se utilizaron dos cepas de *E. coli* con patrón conocido de plásmidos:

- I) V517: 2.1Kb/ 2.7Kb/ 3Kb/ 3.9Kb/ 5.1Kb/ 5.6Kb/ 7.2Kb/ 54Kb
- II) J53 pLac resistente a rifampicina: 152Kb

3.3 Control de peso molecular de proteínas para SDS-PAGE

Precision-Plus Protein Dual Color Standards de BIORAD (Cat. # 161-0374): 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250kD.

3.4 Cepas control

Se utilizaron varios controles positivos de amplificación por PCR de diferentes genes de resistencia a antibióticos así como otros genes y regiones de interés (Tabla 4).

Tabla 1. Características genotípicas y fenotípicas de aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* estudiados en busca de productores de CTX-M.

Nº aislamiento	Toma de muestra	Tipo de muestra	Pulsotipo /MLST	BLEE	CIM (µg/ml)♦												
					TZP	CEP	FOX	CTX	CAZ	FEP	IPM	MER	AMK	GEN	NAL	CIP	SXT
1101	22/03/2011	S/d	A / ST258	(+)	S/d	S/d	R (32)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	S (≤1)	S (≤0,25)	R (≥64)	S (≤1)	S/d	R (≥4)	R (≥320)
1102	27/03/2011	Secr. resp.●	B / ND	(+)	S (16)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R* (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1103	28/03/2011	Líqu. perit.§	B / ST48	(+)	I (32)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1104	28/03/2011	urocultivo	ND / ND	(-)													
1105	28/03/2011	hemocultivo	ND / ND	(-)													
1106	28/03/2011	catéter uri.#	ND / ND	(-)													
1107	29/03/2011	urocultivo	ND / ND	(-)													
1108	29/03/2011	Secr. resp.	ND / ND	(-)													
1109 †	29/03/2011	Secr. resp.	ND / ND	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R* (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1110	30/03/2011	lesión quir.○	ND / ND	(-)													
1111	31/03/2011	catéter uri.	B / ND	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R* (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1112	31/03/2011	Secr. resp.	ND / ND	(-)													
1113 †	31/03/2011	Secr. resp.	B / ND	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (32)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1114	01/04/2011	urocultivo	ND / ND	(-)													
1115	02/04/2011	urocultivo	ND / ND	(-)													
1116	04/04/2011	Secr. resp.	B / ND	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (32)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1117	05/04/2011	urocultivo	ND / ND	(-)													
1118	09/04/2011	urocultivo	ND / ND	(-)													
1119	10/04/2011	Secr. resp.	ND / ND	(-)													
1120	11/04/2011	Secr. resp.	A / ST258	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R* (2)	S (≤1)	S (≤0,25)	R (≥64)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1121	12/04/2011	Secr. resp.	B / ND	(+)	S (16)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R* (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1122	13/04/2011	urocultivo	ND / ND	(-)													
1123	13/04/2011	urocultivo	ND / ND	(-)													
1124	02/05/2011	urocultivo	A / ST258	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (8)	R (≥64)	R (≥64)	R* (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1125	04/05/2011	catéter uri.	A / ND	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (8)	R (≥64)	R (≥64)	R* (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	R (≥64)	S (2)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1126	07/05/2011	urocultivo	A / ND	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R* (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)

S/d: Sin dato; ● Secreción respiratoria; § Líquido peritoneal; # Catéter urinario; ○ lesión quirúrgica; † mismo paciente; ND: No Determinado; R*: Resistente modificado; ♦ CIM obtenida por microdilución automatizada por sistema VITEK

Tabla 2. Características genotípicas y fenotípicas de *Enterobacterias* resistentes o de sensibilidad disminuida a carbapenemes.

Nº aislamiento	Hospital #	Toma de muestra	Tipo de muestra	Pulsotipo /MLST	BLEE	CIM (µg/ml)♦												
						TZP	CEP	FOX	CTX	CAZ	FEP	IPM	MER	AMK	GEN	NAL	CIP	SXT
666 (A1) †	Mautone	26/03/2011	urocultivo	C / ND	(-)	R (≥128)	S/d	R (≥64)	R (16)	R (16)	S (8)	R (8)	R (4)	S (16)	R (≥16)	S/d	R (≥4)	S/d
PRE (B1) ●	Mautone	07/04/2011	AT¥	C / ST258	(-)	R (≥128)	S/d	R (≥64)	R (16)	R (16)	S (8)	R (≥16)	R (4)	I (32)	R (≥16)	S/d	R (≥4)	S/d
381 (B2) ●	Mautone	07/04/2011	Catéter ¶	C / ND	(-)	R (≥128)	S/d	R (≥64)	R (16)	R (16)	S (8)	R (≥16)	R (4)	I (32)	R (≥16)	S/d	R (≥4)	S/d
POST (B6) ●	Mautone	28/04/2011	AT	C / ST258	(-)	R (≥128)	S/d	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥64)	R (≥16)	S/d	R (≥4)	S/d
4293 °	Militar	12/09/2011	herida quir.§	D / ST437	(+)	R (≥128)	R (≥64)	I (16)	R (4)	I* (4)	I* (2)	I (2)	S (1)	I* (4)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
54/1 °	Militar	14/09/2011	herida quir.	D	(+)	R (≥128)	R (≥64)	I (16)	R (4)	I (8)	I* (2)	R (4)	S (1)	I* (4)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
54/2 °	Militar	14/09/2011	herida quir.	D / ST437	(+)	R (≥128)	R (≥64)	R* (16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (4)	S (1)	S (≤2)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
19/1 °	Militar	19/09/2011	herida quir.	D	(+)	R (≥128)	R (≥64)	I (16)	R (4)	R (≥64)	I* (2)	I (2)	S (1)	I* (4)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
19/2 °	Militar	19/09/2011	herida quir.	D / ST437	(+)	R (≥128)	R (≥64)	R* (16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (4)	S (1)	I* (4)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
20/1 °	Militar	19/09/2011	Hisop. rectal‡	D	(-)	R (≥128)	R (≥64)	R (≥64)	R (16)	R (16)	I (16)	R (≥16)	R (≥16)	I* (16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
20/2 <i>E.c</i> °	Militar	19/09/2011	Hisop. rectal	N/C	(+)	R (≥128)	R (≥64)	R* (≤4)	R (≥64)	R (16)	I* (2)	I (2)	S (1)	I* (≤2)	S (4)	R* (16)	S (≤0,25)	R (≥320)
66/1 °	Militar	23/09/2011	herida quir.	ND	(+)	R (≥128)	R (≥64)	R* (16)	R (4)	R* (4)	R* (2)	I (2)	S (1)	I* (4)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
66/2 °	Militar	23/09/2011	herida quir.	D	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (8)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	S (≤1)	S (1)	S (4)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)

Primer brote KPC: Hospital Mautone, Segundo brote KPC: Hospital Militar; † Paciente 1; ● Paciente 2; ° Paciente 3; *E.c*: *E. coli*; ¶ Catéter venoso; ¥ Aspirado traqueal; § Herida quirúrgica; ‡ Hisopado rectal; N/C: No Corresponde; ND: No Determinado; S/d: Sin dato; I*: Intermedio modificado; R*: Resistente modificado; ♦ CIM obtenida por microdilución automatizada por sistema VITEK

Tabla 3. Aislamientos clínicos *K. pneumoniae* seleccionados para el estudio de expresión de porinas. CIMs expresadas en µg/mL.

Nº aislamiento	Pulsotipo	BLEE¥	CTX-M-15 §	KPC-2 §	CIM (µg/ml)♦												
					TZP	CEP	FOX	CTX	CAZ	FEP	IPM	MER	AMK	GEN	NAL	CIP	SXT
PRE (B1) ●	C	(-)	(-)	(+)	R (≥128)	S/d	R (≥64)	R (16)	R (16)	S (8)	R (≥16)	R (4)	I (32)	R (≥16)	S/d	R (≥4)	S/d
POST (B6) ●	C	(-)	(-)	(+)	R (≥128)	S/d	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥16)	R (≥64)	R (≥16)	S/d	R (≥4)	S/d
19/1 °	D	(+)	(-)	(+)	R (≥128)	R (≥64)	I (16)	I* (4)	R (≥64)	I* (2)	I (2)	S (1)	I* (4)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
19/2 °	D	(+)	(+)	(+)	R (≥128)	R (≥64)	R* (16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (4)	S (1)	I* (4)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
20/1 °	D	(-)	(-)	(+)	R (≥128)	R (≥64)	R (≥64)	R (16)	R (16)	I (16)	R (≥16)	R (≥16)	I* (16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1101	A	(+)	(+)	(-)	S/d	S/d	R (32)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	S (≤1)	S (≤0,25)	R (≥64)	S (≤1)	S/d	R (≥4)	R (≥320)
1104	ND	(-)	(-)	(-)	S/d	S/d	S/d	S/d	S/d	S/d	S/d	S/d	S/d	S/d	S/d	S/d	S/d

● Mismo paciente (primer brote KPC); ° Mismo paciente (segundo brote KPC); ND: No Determinado; ¥ Resultado obtenido a partir del sistema Vitek; § Resultado obtenido por PCR y confirmado por secuenciación; S/d: Sin dato; I*: Intermedio Modificado; R*: Resistente Modificado.

Tabla 4. Controles positivos de amplificación

	Gen/Región a amplificar	Cepa control	Referencia
Integrones	<i>int1</i>	<i>E. coli</i> R388	N° Acceso en NCBI: U12441
	IRi	<i>K. pneumoniae</i> 296 (Tn1696); <i>K. pneumoniae</i> 12836 (Tn5036); Sin control para Tn21	(Roy Chowdhury <i>et al.</i> , 2011)
	regiones de integrón clase 1 atípico, grupo II	<i>K. pneumoniae</i> U20	(Roy Chowdhury <i>et al.</i> , 2011) N° Acceso en NCBI: HQ419281
	ISCR1	<i>K. pneumoniae</i> 12836	(Marquez <i>et al.</i> , 2008)
Genes de β-lactamasas	<i>bla</i> _{CTXM}	<i>K. pneumoniae</i> U20	(Roy Chowdhury <i>et al.</i> , 2011)
	<i>bla</i> _{TEM} y <i>bla</i> _{SHV}	<i>K. pneumoniae</i> 12836	(Marquez <i>et al.</i> , 2008)
	<i>bla</i> _{KPC}	<i>K. pneumoniae</i> OPS	Organización Panamericana de la Salud
Porinas	<i>ompK35</i> y <i>ompK36</i>	<i>K. pneumoniae</i> transformante de CSUB10S/pSHA16K	(Domenech-Sanchez <i>et al.</i> , 2003)
IncRep	Grupos de incompatibilidad plasmídica	Cepas clínicas de <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i>	Caracterización previa por PCR y secuenciación en el laboratorio
Enzimas modificadoras de Aminoglucósidos	<i>aac6'-Ib</i>	<i>K. pneumoniae</i> U20	Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España
	<i>aph3'-Ia</i>	25.07	
	<i>aph3'-IIa</i>	<i>E. coli</i> 217	
	<i>ant2''-Ia</i>	209 C-3	
	<i>aac3'-IIa</i>	<i>E. coli</i> 216	
	<i>ant4'-IIa</i>	Sin control	
	<i>aac3'-Ia</i>	<i>K. pneumoniae</i> 35.11	
	<i>aac2'-Ia</i>	<i>Providencia spp</i> C11	
	<i>aac3'-IVa</i>	<i>E. coli</i> 215	
<i>aph3-VIa</i>	221		
Genes de resistencia a Quinolonas	<i>qnrA</i> y <i>qnrB</i>	Sin controles	N/C
Genes de resistencia a Macrólidos	<i>locus mphA</i>	<i>K. pneumoniae</i> U20	(Roy Chowdhury <i>et al.</i> , 2011)
Secuencias de Inserción	IS26	<i>K. pneumoniae</i> U20	(Roy Chowdhury <i>et al.</i> , 2011)
	ISEcp1		
	ISCR1	<i>K. pneumoniae</i> 12836	(Marquez <i>et al.</i> , 2008)

N/C: No Corresponde

3.5 Extracción de ADN genómico

A modo de obtener ADN como templado para las amplificaciones por PCR, se procedió a la extracción de ADN genómico mediante el siguiente protocolo:

- I) A partir de un cultivo puro de crecimiento *overnight* en placa de TSA (Agar Tripticasa de Soja), se tomó una ansada y se resuspendió en 600µl de suero fisiológico (de modo que la suspensión fuera equivalente a 3 Mac Farland). Se centrifugó a 9500 g por 10 minutos a 4°C.
- II) El pellet obtenido se resuspendió en 200µl de Buffer TE (pH 8, 10mM Tris, 1mM EDTA) y se le agregó 20µl de lizozima 50mg/ml. Luego de vortexear, se incubó a 37°C por 15 minutos.
- III) Posteriormente se agregaron 250µl de Buffer TE (pH 8), 25µl de SDS 10% y 3µl de proteinasa K 20mg/ml. Se mezcló por inversión y se incubó a 37°C por una hora.
- IV) Se agregó 2,5µl de ARNasa A libre de ADNasa 1mg/ml y se incubó a 37°C por 30 minutos.
- V) Inmediatamente cada tubo fue colocado en hielo durante 5 minutos y luego se agregó 285µl de NaCl 5M frío y se agitó por inversión. Se incubó 10 minutos más en hielo, agitando por inversión 5 veces durante la incubación.
- VI) Se centrifugó a 16000 g por 15 minutos a 4°C.
- VII) El sobrenadante fue transferido a otro tubo. A éste se le agregó igual volumen de isopropanol frío y se agitó por inversión al menos 20 veces.
- VIII) Se centrifugó a 16000 g por 15 minutos a 4°C.
- IX) Se eliminó el sobrenadante por inversión y el precipitado se lavó con 900µl de Etanol 70% frío. Se centrifugó a 16000 g por 2 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante cuidadosamente. El precipitado se dejó secar al aire.
- X) Una vez comprobada la evaporación de restos de etanol, se resuspendió el precipitado en 100µl de agua milli Q incubando a 65°C por 20 minutos.

Posterior a cada extracción de ADN se midió la concentración por Nanodrop y se prepararon diluciones acordes para usar el ADN como templado en las amplificaciones por PCR.

Para verificar que la extracción de ADN fuera exitosa se realizó una PCR de control de amplificación del gen codificante del ARNr 16S con el uso de los cebadores F27: 5'-AGRGTTCGATCMTGGCTCAG - 3' y R1492: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT - 3' (Lane, 1991), obteniéndose un producto de 1400pb. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: pre-desnaturalización a 94°C por 3 minutos, luego 30 ciclos de tres pasos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación de cebadores a 53°C por 25 segundos y extensión a 72°C por 2 minutos) y posteriormente una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Asimismo, además de realizar una corrida electroforética en gel de agarosa 1% para verificar la amplificación, también se comprobó la integridad del ADN extraído sembrando una alícuota en otro gel de similares características.

3.6 Extracción de plásmidos pesados

Con el fin de caracterizar a nivel plasmídico el contenido de ADN extracromosómico de las cepas en estudio, se realizó la extracción de plásmidos pesados por la Técnica de Kado & Liu (1981) modificada:

- I) Partiendo de cultivo puro para cada uno de los aislamientos, se inocularon en 3 ml de caldo LB (Luria Bertani) y se incubaron en agitación a 37°C durante toda la noche.
- II) Se transfirieron 1,5ml del crecimiento a un tubo eppendorf y se centrifugó a 16000 g durante 5 minutos, eliminando posteriormente el sobrenadante.
- III) El botón celular obtenido se secó con el uso de una pipeta, y luego se añadieron 20µl de buffer de Kado (50mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH8). Se homogeneizó con pipeta y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- IV) A la mezcla anterior se le añadieron 100µl de buffer de lisis pH12,6 (SDS 3%, 50mM Tris, ajustado con NaOH), se homogeneizó con pipeta suavemente y se incubó a 58°C durante 27 minutos.

V) Luego se añadieron 100µl de una solución 1:1 de fenol redestilado al 99% y cloroformo al 99%. Se mezcló por inversión, y se centrifugó durante 30 minutos a 16000 g y a temperatura ambiente.

VI) Como resultado del paso anterior, se obtuvo una solución separada en tres fases. De la fase superior, que contiene el ADN plasmídico, se transfirieron 90µl a otro tubo eppendorf, al que previamente se le habían añadido 20µl de buffer de carga (25mg/100ml Azul de bromofenol, 40mg/100ml Sacarosa). Esta mezcla no se resuspendió para evitar la posible degradación mecánica de plásmidos muy pesados.

VII) El producto extraído se conservó 24hs a 4°C para asegurar una correcta resuspensión del mismo con el buffer de carga.

El resultado de la extracción fue analizado mediante una corrida electroforética en gel de agarosa de bajo punto de fusión a una concentración de 0,9% bajo las siguientes condiciones:

1ª Fase: Voltaje – 50V, Tiempo – 25 minutos

2ª Fase: Voltaje – 100V, Tiempo – 120 a 180 minutos

La tinción fue realizada con Bromuro de Etidio a una concentración final de 1mg/L posterior a la corrida y durante 30 minutos. Previo a fotografiar el gel, éste se dejó lavando en agua destilada a 4°C por 24hs.

3.7 Amplificación por PCR a tiempo final

Las reacciones de PCR a tiempo final se llevaron a cabo en diferentes equipos termocicladores automáticos (Labnet – Multi Gene II; Applied Biosystems – 2720 Thermal Cycler; Corbett – Palm Cycler) y las enzimas ADN polimerasas utilizadas fueron: HybriPol (Bioline), Recombinant Taq (Invitrogen – Life Technologies) o Top-Taq (Bioron). Los cebadores utilizados, así como las condiciones de amplificación dependieron del gen o región a amplificar, obedeciendo a cada objetivo perseguido (Tablas 5, 6, 7 y 8). La visualización de los productos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1-2% teñidos o bien con Bromuro de Etidio o bien con Gel Red

(Biotium) incorporado. Posterior a la corrida electroforética, se fotografiaron los geles bajo luz UV con una cámara Kodak Digital Science. En los casos en los cuales los productos amplificados debieron ser purificados previamente a enviarlos a secuenciar a Macrogen Inc., se utilizó el Zymoclean DNA Gel Recovery Kit (Zymo Research) según indicaciones del fabricante.

3.7.1 Objetivo 1: Caracterización de genes *bla*_{CTX-M} y genes *bla*_{KPC}

De los aislamientos recolectados, y teniendo la información proveniente del sistema VITEK, se seleccionaron aquellos cuyo fenotipo indicaba la presencia de una BLEE y/o una carbapenemasa y fueron ensayados para detectar la presencia de los genes que codifican para las cefotaximasas de la familia CTX-M y para las carbapenemasas del tipo KPC. Para el caso de la familia CTX-M, primeramente se utilizaron los cebadores CTXMA1/CTXMA2 que amplifican una región conservada de 543pb de los genes *bla*_{CTX-M} (Saladin *et al.*, 2002). Aquellos productos positivos fueron enviados a secuenciar a Macrogen Inc. (Korea). Una vez analizadas las secuencias utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul, Gish, Miller, Myers, y Lipman, 1990), se evidenció que las mismas no distinguían entre diferentes alelos del grupo 1 de la familia CTX-M, por lo cual a partir del software Primer3 (Koressaar y Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012) se diseñaron cebadores que hibridan con los extremos del gen (Tabla 5), a modo de obtener la secuencia casi completa del mismo y poder así diferenciar las variantes alélicas. Para el caso de las carbapenemasas de la familia KPC los cebadores utilizados (Endimiani *et al.*, 2008) permitieron amplificar un producto de 882pb cuya extensión fue suficiente para diferenciar las variantes de este gen mediante análisis de secuencia.

Asimismo, se realizaron amplificaciones de otros genes de resistencia a antibióticos (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, genes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, genes de *qnr* de resistencia a quinolonas) (Tabla 5).

Para la identificación de los alelos del gen *aac6'-Ib* (Park, Robicsek, Jacoby, Sahm, y Hooper, 2006), se empleó en todos los casos el análisis de los cromatogramas obtenidos por secuenciación directa en búsqueda de la posición 304 que varía dependiendo de qué alelo se trate (T en el caso del alelo *aac6'-Ib* o C/A en el caso del

alelo *aac6'-Ib-cr*). Aquellas cepas que fueron enviadas al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, España), fueron además sometidas a la técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) a partir de los productos de PCR, a modo de corroborar la versatilidad de esta técnica, ampliamente utilizada para diferenciar los alelos sin la necesidad de incurrir en la secuenciación.

Para ello se utilizó la enzima de restricción *FokI* (Biolabs) que digiere el alelo *aac6'-Ib* por poseer una secuencia idéntica a su sitio de reconocimiento de corte (Anexo I), mientras que es incapaz de digerir el alelo *aac6'-Ib-cr* ya que presenta el cambio en uno de los nucleótidos a ser reconocidos. Por lo tanto, de ocurrir una digestión completa, en presencia del alelo *Ib* se observarían dos bandas de 265pb y 217pb respectivamente, mientras que en presencia del alelo *Ib-cr* se observaría una única banda correspondiente al producto de PCR (482pb). Para este ensayo se utilizaron 2 cepas positivas para el alelo *Ib* (4.04 y 208), 2 cepas positivas para el alelo *Ib-cr* (189 y 6.19) y una cepa que porta ambos alelos (43.06); todas ellas Enterobacterias de la colección bacteriana del HUMV.

El volumen de la mix de digestión fue de 20µl y se compuso de 2µl de Buffer4 10X, 1µl de enzima, 5µl de producto de PCR completándose el volumen final con agua milli-Q. Se dejó digiriendo a 37°C por 1h 30min y posteriormente se verificó la digestión en un gel de agarosa al 2% con tinción posterior con Bromuro de Etidio.

3.7.2 Objetivo 2: Caracterización de integrones atípicos y sus entornos

Sobre los aislamientos productores de CTX-M-15 se realizaron los siguientes estudios (Tabla 6):

- I. Análisis de integrones de clase 1 por amplificación por PCR de:
 - Gen *intI1* con los cebadores HS464/HS463 (Stokes *et al.*, 2006). Producto esperado 473pb.
 - Región variable 1 (RV1) con los cebadores HS458/HS459 (Marquez *et al.*, 2008). Este par de cebadores amplifica la región del integrón comprendida entre los extremos conservados 5'-CS y 3'-CS, generando amplicones de

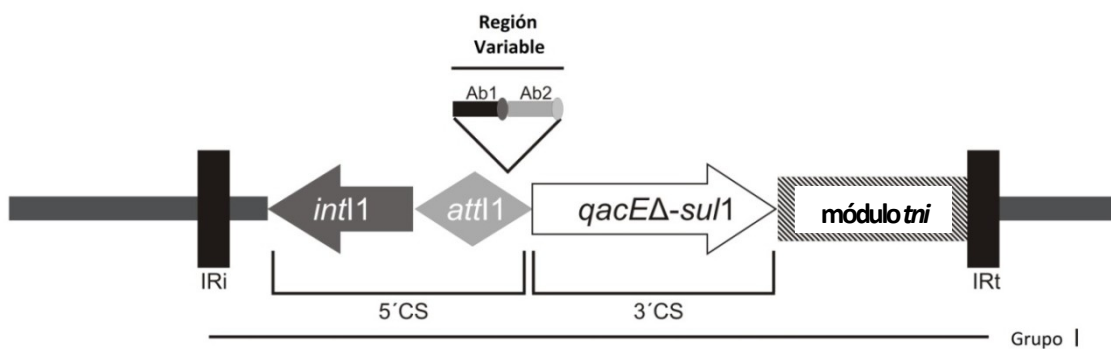
varios tamaños dependiendo de la longitud y el número de los *cassettes* de genes insertados.

- ISCR1 con los cebadores HS819/HS820 (Marquez *et al.*, 2008). La presencia de esta IS permite clasificar a los integrones de clase 1 como inusuales.

II. Detección de integrones de clase 1 atípicos pertenecientes al Grupo II:

Análisis de las diferentes regiones de un integrón típico de clase 1 en búsqueda del patrón que refleje la ausencia del módulo *tni* así como la ausencia del IRT (integrones atípicos Grupo II) (Fig. 3 y 4). Los cebadores utilizados ya fueron descritos (Marquez *et al.*, 2008).

A. Integrón clínico de clase 1 convencional



B. Grupos de integrones de clase 1 atípicos



Figura 3. Grupos estructurales de integrones de clase 1 estudiados. **A.** Esquema de integrón clínico de clase 1 convencional. Los *cassettes* génicos se indican como Ab1 y Ab2. **B.** Grupos de integrones de clase 1 atípicos de acuerdo a los módulos presentes o ausentes en cada grupo (se muestran en líneas negras enteras) según la clasificación propuesta por Roy Chowdhury *et al.*, 2011 (Diagrama modificado).

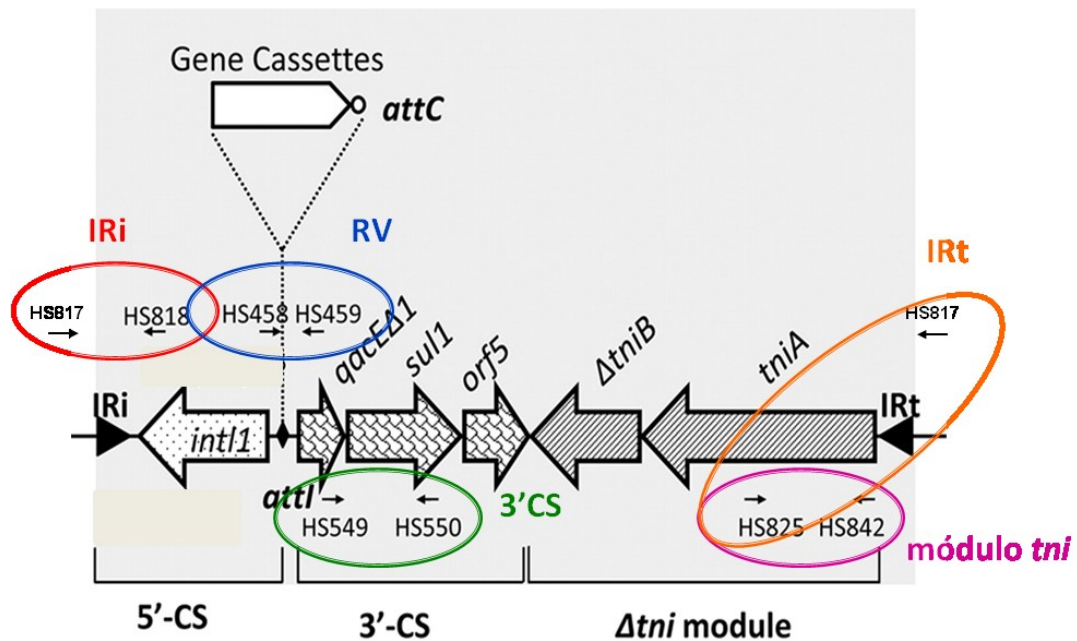


Figura 4. Representación esquemática de un integrón Tn402-like y los cebadores utilizados para la caracterización de integrones atípicos. El cuadro sombreado muestra el integrón de clase 1 delimitado dentro de los repetidos invertidos (IRi e IRt), y sus características estructurales básicas (5'-CS, 3'-CS, los *cassettes* de genes, y el módulo de *tni*). En círculos de diferentes colores se indican las diferentes regiones amplificadas, con sus correspondientes pares de cebadores. Modificado de Betteridge, Partridge, Iredell, y Stokes (2011).

III. Análisis de la plataforma genética en mosaico que flanquea al integrón de clase 1 atípico:

- Se amplificó la región intragénica de *ISEcp1* con los cebadores *ISEcp1A/ISEcp1B* (Poirel *et al.*, 2003) cuyo producto es de 526pb; así como también la asociación *ISEcp1: bla_{CTX-M-15}* con cebadores para ambos elementos.
- Teniendo presente la plataforma genética en mosaico descrita para el aislamiento Kp U020 (Roy Chowdhury *et al.*, 2011), también se buscaron EGM y otros genes de resistencia (locus *mph*, genes *aac6'-Ib*, *IS26*, esqueleto de transposón evidenciado en el IRi).

3.7.3 Objetivo 3: Entornos genéticos del gen *bla_{KPC}*.

Se estudió la plataforma genética en la cual están embebidos los genes *bla_{KPC}* mediante mapeo por PCR. Se utilizaron cebadores específicos (Endimiani *et al.*, 2008;

Naas *et al.*, 2008) para las secuencias *ISKpn6*, *ISKpn7* así como para los genes *tnpA* y *bla_{KPC-2}*, de manera de obtener amplicones que incluyeran parte del gen *bla_{KPC}* así como sus entornos río abajo y río arriba (Tabla 7). Luego de purificados los productos, se estudió su identidad por secuenciación (Macrogen Inc. Korea) y posterior análisis utilizando la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

3.7.4 Objetivo 4: Caracterización plasmídica

Para caracterizar los plásmidos de cada uno de los aislamientos así como de los transconjugantes, se les realizó tipificación del grupo de incompatibilidad plasmídica por PCR con primers y condiciones previamente descritas (Carattoli *et al.*, 2005; Garcia-Fernandez, Fortini, Veldman, Mevius, y Carattoli, 2009) (Anexo II).

Tabla 5. Cebadores y condiciones de PCR para cumplir con el Objetivo 1: genes de β -lactamasas y otros genes de resistencia.

	Cebadores utilizados			Condiciones de PCR							Referencia
	Gen de R●	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Pre-desnat.¥	Ciclos○	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final	Producto (pb)	
β-lactamasas y carbapenemasas	<i>bla_{CTX-M}</i>	CTXMA1	SCSATGTGCAGYACCGAGTAA	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	543	(Saladin <i>et al.</i> , 2002)
		CTXMA2	CCGCRATATGRTTGGTGGTG								
	<i>bla_{CTX-M} grupo 1</i>	CTXM_New_F	CGTCACGCTGTTGTTAGGAA	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	823	Esta tesis
		CTXM_New_R	ACCGTCGGTGACGATTTTAG								
	<i>bla_{KPC}</i>	KPC_fw	ATGTCACGTATCGCCGTC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	60°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	882	(Endimiani <i>et al.</i> , 2008)
		KPC_rv	TTACTGCCGGTTGACGCC								
<i>bla_{TEM}</i>	TEM_fw	ATAAAATCTTGAAGACGAAA	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	50°C - 30seg	72°C - 2min	72°C - 7min	1080	(Mabilat y Goussard, 1993)	
	TEM_rv	GACAGTTACCAATGCTTAATCA									
<i>bla_{SHV}</i>	SHV_fw	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	54°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	928	(Rasheed <i>et al.</i> , 1997)	
Resistencia a quinolonas	<i>qnrA</i>	qnrA	GGGTATGGATATTATTGATAAAG	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	56°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	661	(M. Wang <i>et al.</i> , 2003)
		qnrA'	CTAATCCGGCAGCACTATTA								
<i>qnrB</i>	qnrB_fw	GGCATTGAAATTCGCCACTG	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	46°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	360	(Cano <i>et al.</i> , 2009)	
	qnrB_rv	TTTGCTGCTCGCCAGTCGA									
Enzimas modificadoras de aminoglucósidos	<i>aph(3')-Ia</i>	APH3'-Ia FW	CGAGCATCAAATGAAACTGC	94°C - 5min	30	94°C - 30seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	624	(Miro <i>et al.</i> , 2013)
		APH3'-Ia R	GCGTTGCCAATGATGTTACAG								
	<i>aph(3')-IIa</i>	APH3'-IIa-F	GAACAAGATGGATTGCACGC	94°C - 5min	30	94°C - 30seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	680	(Maynard <i>et al.</i> , 2004)
		APH3'-IIa-R	GCTCTTCAGCAATATCACGG								
	<i>ant(2'')-Ia</i>	F (HUMV)	CGTCATGGAGGAGTTGGACT	94°C - 5min	30	94°C - 30seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	303	HUMV *
		R (HUMV)	CGCAAGACCTCAACCTTTTC								
	<i>aac(3')-IIa</i>	AAC3'-IIa FW	GGCAATAACGGAGGCGCTTCAAA	94°C - 5min	30	94°C - 30seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	563	(Miro <i>et al.</i> , 2013)
		AAC3'-IIa R	TTCCAGGCATCGGCATCTCATACG								
	<i>aac(6')-Ib/cr</i>	AAC6'-Ib-cr-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	94°C - 5min	30	94°C - 30seg	60°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	482	(Park <i>et al.</i> , 2006)
		AAC6'-Ib-cr-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTC								
	<i>ant(4')-IIa</i>	ANT4-F	ATCGTCTGCGAGAAGCGTAT	94°C - 5min	30	94°C - 30seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	356	HUMV
		ANT4-R	CGTGTCTTCCACCTCTGGTT								
<i>aac(3')-Ia</i>	AAC3'-Ia FW	GCAGTCGCCCTAAAAACAAA	94°C - 5min	30	94°C - 30seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	464	(Miro <i>et al.</i> , 2013)	
	AAC3'-Ia R	CACCTTCTCCCGTATGCCCAACTT									
<i>aac(2')-Ia</i>	AAC2'-Ia FW	AGAAGCGCTTTACGATTTATTA	94°C - 5min	30	94°C - 30seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	406	(Miro <i>et al.</i> , 2013)	
	AAC2'-Ia R	GACTCCGCCTTCTTCTTCAA									
<i>aac(3')-IVa</i>	AAC3'-IVa-F	TCGGTCAGCTTCTCAACCTT	94°C - 5min	30	94°C - 30seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	314	(Shaw, Rather, Hare, y Miller, 1993)	
	AAC3'-IVa-R	GATGATCTGCTCTGCCTGTG									
<i>aph(3')-VIa</i>	APH3'-VIa-F	AAAGCGATCAATGCAAAAACC	94°C - 5min	30	94°C - 30seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	310	(Shaw <i>et al.</i> , 1993)	
	APH3'-VIa-F	TATCCGTGATATCGCCATGA									

● Gen de Resistencia; ¥ Pre-desnaturalización; ○ Cada ciclo comprende tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión; * Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

Tabla 6. Cebadores y condiciones de PCR para cumplir con el Objetivo 2: Integrones atípicos

Cebadores utilizados				Condiciones de PCR							Producto (pb)	Referencia
Gen/Región	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Pre-desnat.¥	Ciclos○	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final				
Integrón clase I	<i>intl1</i>	HS463a	CTGGATTCGATCACGGCAGC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	60°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	490	(Labbate, Roy Chowdhury, y Stokes, 2008)	
		HS464	ACATGCGTGTAATCATCGTGC									
	RV	HS458	GTTTGATGTTATGGAGCAGCAACG	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	60°C - 30seg	72°C - 2min	72°C - 7min	Variable§		(Marquez <i>et al.</i> , 2008)
		HS459	GCAAAAAGGCAGCAATTATGAGCC									
	ISCR1	HS819	GGGCCAGGTCTTGAGTATCG	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	58°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	522		(Marquez <i>et al.</i> , 2008)
		HS820	GCTTCGGCCATCACACC									
Módulos de Integrón atípico	3'CS (<i>sul1</i>)	HS549	ACTAAGCTTGCCCTTCCGC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	55°C - 30seg	72°C - 2min	72°C - 7min	1100	(Marquez <i>et al.</i> , 2008)	
		HS550	CTAGGCATGATCTAACCTCG									
	módulo <i>tni</i>	HS825	TGTTTTCGGAATCGTAGTCGC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	58°C - 30seg	72°C - 2min	72°C - 7min	1042		(Marquez <i>et al.</i> , 2008)
		HS842	ATGCTCAATACTCGTGTGCACC									
	IRt	HS825	TGTTTTCGGAATCGTAGTCGC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	58°C - 30seg	72°C - 2min	72°C - 7min	1847		(Marquez <i>et al.</i> , 2008)
		HS826	CTGACCGGCTTGTTTCGTTTC									
Entornos de integrón atípico clase II	IRi	HS817	CCTCCAATTGCCGTTCC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	60°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	360 (Tn1696) 376 (Tn5036) 700 (Tn21)	(Marquez <i>et al.</i> , 2008)	
		HS818	TCCTGGCGGATTCACTACC									
	locus <i>mph</i>	mphA+835	GCTCGACTATAGGATCGTGATCGC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	508	(Noguchi, Takada, Katayama, Emura, y Sasatsu, 2000)	
		mphA-1343	CGTAGAGATCGCCATGCACCAC									
	IS26	IS26_fw	GGCATCAGTTACCGTGAGC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	52°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	339	(Martinez <i>et al.</i> , 2013)	
		IS26_rv	CGTGTTGATGAATCGTGG									
	ISEcp1	ISEcp1A	GCAGGTCTTTTCTGCTCC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	50°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	526	(Poirel <i>et al.</i> , 2003)	
		ISEcp1B	TTTCCGCAGCACCGTTTGC									
	IS26-IRi	HS1001	GATCCCgcgattcatcaaca	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	52°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	575	(Roy Chowdhury <i>et al.</i> , 2011) (Marquez <i>et al.</i> , 2008)	
		HS818	TCCTGGCGGATTCACTACC									

¥ Pre-desnaturalización; ○ Cada ciclo comprende tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión; § el tamaño del fragmento dependerá de la cantidad e identidad de los *cassettes* génicos

Tabla 7. Cebadores y condiciones de PCR para cumplir con el Objetivo 3: Entornos del gen *bla*_{KPC}

Cebadores utilizados			Condiciones de PCR							
Región	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Pre-desnat.¥	Ciclos○	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final	Producto (pb)	Referencia
ISKpn6 - KPC	KPC_fw	ATGTCACTGTATCGCCGTC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	58°C - 30seg	72°C - 2min	72°C - 7min	1532	(Endimiani <i>et al.</i> , (Naas <i>et al.</i> , 2008)
	KPC	4714								
ISKpn7 - KPC	3098U	TGACCCTGAGCGGCGAAAGC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	59°C - 30seg	72°C - 2min	72°C - 7min	~1400 §	(Naas <i>et al.</i> , 2008) (Endimiani <i>et al.</i> ,
	KPC_rv	816U								
tnpA-KPC	KPC_fw	CACCTACACCACGACGAACC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	60°C - 30seg	72°C - 2min	72°C - 7min	~3500	(Naas <i>et al.</i> , 2008) (Endimiani <i>et al.</i> ,
	KPC_rv	816U								

¥ Pre-desnaturalización; ○ Cada ciclo comprende tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión; § El tamaño dependerá de la isoforma del Tn4401 dada por la longitud de la región intergénica entre el gen *bla*_{KPC} y la *ISKpn7* (isoforma *a*: deleción de 100pb; isoforma *b*: sin deleción; isoforma *c*: deleción de 215pb; isoforma *d*: deleción de 68pb ó isoforma *e*: deleción de 250pb)

Tabla 8. Cebadores y condiciones de PCR para cumplir con el Objetivo 5: Genes de porinas

Cebadores utilizados			Condiciones de PCR								
Gen	Nombre	I/E #	Secuencia (5' - 3')	Pre-desnat.¥	Ciclos○	Desnaturalización	Hibridación	Extensión♦	Extensión final	Producto (pb) §	Referencia
<i>ompK35</i>	OmpK35_F1	E	ATGGAAAGATGCCTTCAGACACCA	94°C - 5min	30	94°C - 1min	60°C - 30seg	72°C - tiempo variable	72°C - 7min	1310	Dr. Alain Ocampo-Sosa (HUMV) * Esta tesis
	OmpK35_R1		CGACAAAAGCGCGAAGGTTT							320	
	OmpK35_F2	I	GTCGAAGCGGCAACCGATATG								
	OmpK35_R2		GCTTCGGCTTTGTCGCCATT								
	OmpK35_outF	E	AAGACTACTGGTGTATCGCGACCT								
<i>ompK36</i>	OmpK36_F1	E	CCATTAATCGAGGCTCCTCTACCA	94°C - 5min	30	94°C - 1min	60°C - 30seg	72°C - tiempo variable	72°C - 7min	1312	Dr. Alain Ocampo-Sosa (HUMV) * Esta tesis
	OmpK36_R1		TGGATTATTCTGCATTTTGCAGCAC							394	
	OmpK36_F2	I	GAGTTGCGTTGATAGGCTGG								
	OmpK36_R2		GGCGACACCTACGTTCTGACAA								
	OmpK36_outR	E	CCGGTTGAAATAGGGGTAACAGAC								
	36F5	E	CAGCACAATGAATATAGCCGAC							94°C - 3min	
36R3	GCTGTTGTCGTCCAGCAGGTTG										

I: Internos, E: Externos; ¥ Pre-desnaturalización; ○ Cada ciclo comprende tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión; ♦ Dependiendo de la combinación de cebadores; § productos de otros tamaños fueron esperados dependiendo de la combinación de cebadores utilizados; * Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

3.7.5 Objetivo 5: Análisis de porinas

Se amplificaron los genes *ompK35* y *ompK36* con diferentes cebadores (Tabla 8), obedeciendo a los resultados que se iban obteniendo. En los casos donde los cebadores externos disponibles no generaron producto de amplificación, se procedió a amplificar con cebadores internos, y éstos combinados con los externos, de modo tal de identificar en qué región del gen en cuestión se estaba presentando el presunto problema de hibridación del cebador. Una vez identificada la región, se procedió en primer lugar a realizar amplificaciones con los cebadores externos pero aumentando el tiempo de extensión (presumiendo alguna inserción en el gen) y en segundo lugar se diseñaron cebadores externos alternativos.

En todos los casos los productos fueron enviados a purificar y secuenciar a MacroGen Inc Korea y Holanda. Una vez obtenidas las secuencias, su identidad fue verificada utilizando la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) y posteriormente el análisis de las mutaciones fue realizado por alineamiento en los programas Lasergene MegAlign Pro Software (DNASTAR, Inc.) y Multalin (Corpet, 1988) usando secuencias de referencia para cada uno de los genes estudiados:

- I. *ompK35*: Número de Acceso al NCBI – GU945385.1
- II. *ompK36*: Número de Acceso al NCBI – KC534867.1

El mapeo de las sustituciones de OmpK36 fue realizado a partir de la estructura cristalizada PDB IB: 1OSM (Dutzler *et al.*, 1999), tanto a nivel secundario con el software ESPript (Robert y Gouet, 2014) como a nivel terciario con Protein Workshop (Moreland, Gramada, Buzko, Zhang, y Bourne, 2005).

OmpK35 consta de 359 AA, de los cuales los primeros 22 constituyen el péptido señal; OmpK36 consta de 367 AA, de los cuales los primeros 21 constituyen el péptido señal.

3.8 Ensayos de conjugación

Para cumplir con el objetivo 4, se estudió la transferencia del gen *bla*_{CTX-M-15} y del gen *bla*_{KPC} en aislamientos de *K. pneumoniae* pertenecientes a diferentes pulsotipos. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando como receptora la cepa *E. coli* TOP10 sensible a cefotaxima y que pertenece a la colección bacteriana del laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de Química. Esta cepa es resistente a rifampicina y a azida de sodio. Los ensayos se realizaron según el protocolo descrito en Marquez, Xia, Borthagaray, y Roberts (1999). Como se observa en la Tabla 9, para el caso del gen *bla*_{CTX-M-15} se utilizaron como dadoras 4 ejemplares: 1101, 1125, 1103 y 1113 (los primeros dos pertenecientes al pulsotipo A y los últimos dos al pulsotipo B). Para el caso del gen *bla*_{KPC-2}, del primer brote se seleccionó la cepa 666 como dadora y del segundo brote la cepa 20/2 (*E. coli*). Los transconjugantes se seleccionaron por su capacidad para crecer en medio MHA ó TSA conteniendo 200 ó 100µg/ml de rifampicina más cefotaxima 2 ó 1µg/ml (dependiendo del experimento, ver Tabla 9). Se confirmaron por subcultivo en medio MHA ó TSA conteniendo 100 ó 200µg/ml de Azida de Sodio.

A los efectos de confirmar la transferencia del gen *bla*_{CTX-M-15} y/o *bla*_{KPC} a la cepa receptora, se realizó la extracción de ADN de los transconjugantes y se amplificaron ambos genes.

Tabla 9. Perfil de sensibilidad de aislamientos involucrados en los ensayos de conjugación

Aislamientos	Medio de cultivo	ATB y concentraciones (µg/ml) de selección					
		AzNa	RIF	CTX			
Dadores CTX-M-15 (+): 1101, 1103, 1113 y 1125 *	TSA	S	200	S	100	R	1
Dador 1 ^{er} Brote KPC: Kp666	MHA	S	100	S	200	R	2
Dador 2 ^o Brote KPC: Ec20/2	TSA	S	200	S	100	R	1
Receptor: <i>E.coli</i> TOP	/	R	/	R	/	S	/

* 1101 y 1125: pulsotipo A, 1103 y 1113: pulsotipo B; AzNa: Azida de sodio; RIF: Rifampicina; CTX: Cefotaxima; S: Sensible; R: Resistente; TSA: Trypticase Soja Agar; MHA: Müller-Hinton Agar

3.9 Cuantificación de la expresión relativa de porinas y KPC por PCR a tiempo real

Con el objetivo de cuantificar la expresión relativa de los mensajeros de las porinas OmpK35 y OmpK36, así como para cuantificar la expresión del gen *bla_{KPC}*, se seleccionaron algunos aislamientos según su perfil de sensibilidad a antibióticos y sus características genotípicas (Tabla 3). Cada experimento biológico se realizó por triplicado.

3.9.1 Extracción de ARN

A partir de un cultivo overnight en caldo MH (sin presión antibiótica), se diluyó 1:100 en caldo y se dejó creciendo hasta que la densidad óptica a 600nm fue de 0,6-0,8. Luego se prosiguió con el Kit comercial SV total RNA isolation system (Promega) según indicaciones del fabricante, con la salvedad de que el ARN extraído se eluyó en 50µl de agua libre de nucleasas. Este procedimiento incluye un paso de tratamiento con DNasa a fin de eliminar el ADN contaminante.

A partir de 2µl se midió la concentración de ARN por Nanodrop, otros 2µl fueron corridos en un gel de agarosa al 2%, teñido posteriormente con bromuro de etidio con el fin de verificar la integridad del ARN extraído.

3.9.2 Segundo tratamiento con DNasa

Para asegurar una correcta eliminación de ADN contaminante, el ARN extraído fue sometido a un segundo tratamiento con DNasa (DNA-free Kit, Ambion by Life Technologies) según indicaciones del fabricante. Este tratamiento asegura la eliminación de ADN a partir de preparaciones de ARN, y como paso final elimina la enzima DNasa y cationes divalentes de la muestra.

Posteriormente, el ARN tratado fue utilizado como templado en amplificaciones por PCR a tiempo final de los genes *ompK35* y *ompK36* a modo de verificar que los tratamientos con DNasa hubiesen sido exitosos y no quedase ningún remanente de ADN genómico que pudiese interferir en los estudios de cuantificación relativa.

Posterior a este segundo tratamiento se procedió a medir nuevamente la concentración de ARN por Nanodrop.

3.9.3 Síntesis de ADN copia

Con el fin de sintetizar ADN copia para usar como templado en las amplificaciones por PCR en tiempo real, a partir de aproximadamente 250ng de ARN de cada muestra se realizó una retrotranscripción con el iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.9.4 Amplificación por PCR en tiempo real

La amplificación se realizó en un termociclador BIO-RAD CFX96 Realtime System – C1000 Thermal Cycler, y el software utilizado para el análisis de los resultados fue el CFX Manager (BIO-RAD). Los cebadores utilizados en estos experimentos para *ompK35* y *ompK36*, respectivamente, fueron: *ompK35RTfor* 5'-GTCTGGACCACCAATGGC-3' y *ompK35RTrev* 5'-GATCTGAGTTTCGCCTTTCA-3'; *ompK36RTfor* 5'-GACCAGACCTACATGCGTGTA-3' (producto de 78pb) y *ompK36RTrev* 5'-GTATTCCCACTGGCCGTAAC-3' (producto de 81pb) (Landman *et al.*, 2009). Los cebadores utilizados para el gen *bla_{KPC}* fueron: *kpcRTfor* 5'-CGTGACGGAAAGCTTACAAA-3' y *kpcRTrev* 5'-AGCCAATCAACAAACTGCTG-3' (Landman *et al.*, 2009). La expresión de cada gen se normalizó a la de un gen ribosomal de expresión constitutiva (*rrsB*). Los cebadores utilizados fueron diseñados por el Dr. Alain Ocampo-Sosa del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (*rrsBKP_F*: 5'-CAGGCGGTCTGTCAAGTCGGAT-3' y *rrsBKP_R*: 5'-CGCACCTGAGCGTCAGTCTTG-3') (producto de 184 pb). La expresión relativa de *ompK35* y *ompK36* fue calibrada respecto a la expresión de la cepa CSUB10S (que sólo expresa *OmpK36*) transformante de *K. pneumoniae* conteniendo el plásmido pSHA16K, que codifica para *ompK35* (Domenech-Sanchez *et al.*, 2003). Por lo tanto, la cepa CSUB10S/pSHA16K expresa ambas porinas. La expresión relativa de KPC fue estimada para todas las cepas productoras de esta carbapenemasa, utilizando como calibrador arbitrario a la cepa PRE.

El ciclo fue el mismo para los cuatro genes amplificados:

- Pre-desnaturalización a 95°C durante 5 minutos
- 40 ciclos de dos pasos: desnaturalización a 95°C durante 10 segundos e hibridación/extensión a 55°C durante 30 segundos
- *Melting*: de 65°C a 95°C en incrementos de a 0,5°C.

La mezcla de reacción se realizó siguiendo el protocolo que se indica a continuación (volumen final de reacción: 20µl): 10µl de 2X SYBR Green Premix Ex Taq (Takara, Clontech), 0.4µl de cada cebador a una concentración inicial de 10µM cada uno, 0.4µl de 50X ROX II, 2µl de una dilución 1:100 del ADNc generado por la retrotranscripción, y agua milli-Q hasta completar el volumen final. Cada amplificación se realizó por triplicado en cada uno de los 3 experimentos biológicos.

3.9.5 Cuantificación relativa por el método comparativo de C_T ($\Delta\Delta C_T$)

Este método utiliza la fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para alcanzar los resultados de cuantificación relativa (Livak y Schmittgen, 2001). El software utilizado calculó estos valores para cada una de las muestras y los genes analizados; sin embargo se procedió al análisis manual de cada una de las réplicas y cada uno de los experimentos a modo de verificar que los datos calculados fueran correctos y no fueron considerados aquellos valores que variaban significativamente.

Para ello se calculó en primera instancia el valor de ΔC_T con la fórmula:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ gen blanco}} - C_{T \text{ gen de referencia}}$$

Siendo *ompK35*, *ompK36* ó *bla_{KPC}* los genes blanco, y *rrsB* el gen de referencia.

Finalmente se calculó el $\Delta\Delta C_T$ mediante la fórmula:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ muestra}} - \Delta C_{T \text{ calibrador}}$$

Siendo cada uno de los aislamientos la *muestra* y la cepa CSUB10S/pSHA16K, el *calibrador* para el caso de las porinas y la cepa PRE, el *calibrador* para la expresión de KPC. La expresión relativa del calibrador fue considerada igual a 1.

En todos los casos se calculó además la desviación estándar del valor $\Delta\Delta C_T$ siguiendo las indicaciones de Applied Biosystems ("Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR," 2008).

No se realizaron experimentos de validación de la eficiencia de los genes estudiados dada la falta de tiempo (todos los estudios de porinas, desde la amplificación de los genes, los análisis de secuencias, la expresión de ARNm así como el perfil de PME fueron realizados durante la pasantía en el Servicio de Microbiología del HUMV en un período de un mes y medio). Sin embargo, en lo que refiere a la amplificación de los genes *ompK35*, *ompK36* y *bla_{KPC}*, la eficiencia de los cebadores fue previamente verificada por Landman *et al.* (2009). Por otra parte, la eficiencia de los cebadores para la amplificación de *rrsB* fue verificada mediante la realización de una curva estándar por parte del Dr. Alain Ocampo-Sosa.

Claramente, con el objetivo de determinar si las amplificaciones del gen normalizador o de referencia (*rrsB*) versus el gen blanco (*ompK35*, *ompK36* o *bla_{KPC}*) exhibían la misma eficiencia de amplificación por PCR, se debería de haber analizado cómo variaba el ΔC_T ($C_{T \text{ gen blanco}} - C_{T \text{ gen de referencia}}$) con la dilución del templado. Así, estos ΔC_T deberían de haber sido ploteados en un gráfico versus el logaritmo de la cantidad de ADN del templado para crear una regresión lineal semi-logarítmica. La pendiente de esta gráfica se usaría entonces como el criterio de validación del experimento. Si dicha pendiente fuera <0.1 , entonces el experimento exhibe una eficiencia $>90\%$ indicando que puede continuarse con los análisis de expresión. A pesar de no haber llevado a cabo este procedimiento de validación, se pudo observar que los C_T correspondientes al gen *rrsB* en todos los experimentos fueron similares (13 ± 1 ciclo).

Para detectar la existencia de diferencias significativas entre las medias de una determinada variable cuantitativa (en este caso la expresión relativa) en tres o más grupos de datos (correspondientes a los diferentes aislamientos) se utilizó el test ANOVA de una vía (análisis de varianza de una vía). Como método de corrección se utilizó el test de Bonferroni para comparaciones múltiples y un intervalo de confianza del 95%. En los casos de las cepas PRE y POST, para detectar la existencia

de diferencias significativas entre las medias de la expresión de los genes en estudio se empleó el test *t* de Student de una cola. Se utilizó el software GraphPad versión 5.00 para Windows, San Diego California USA, www.graphpad.com para la realización de las gráficas de expresión y para los cálculos estadísticos.

3.10 Expresión de porinas a nivel proteico

Con el objetivo de visualizar si las porinas en estudio (OmpK35 y OmpK36) se expresaban a nivel proteico en las muestras seleccionadas (Tabla 3), se procedió a la extracción de las PME, y a su posterior corrida electroforética por SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes). Las proteínas son desnaturalizadas por calor en presencia de agentes desnaturalizantes como el β -mercaptoetanol que destruye los puentes disulfuro, y el detergente SDS (dodecil sulfato de sodio) que desnaturaliza y recubre las proteínas, separándolas en cadenas polipeptídicas aisladas.

3.10.1 Extracción de proteínas de membrana externa (PME)

Las porinas OmpK35 y OmpK36 son proteínas de membrana externa, por lo cual para poder visualizarlas es preciso extraer las PME y luego estimar por tamaño y comparación con los controles positivo y negativo, la presencia o ausencia de dichas proteínas. El aislamiento que se utilizó como control positivo de la expresión de ambas porinas es el mismo empleado como control positivo de detección de sus genes por PCR (cepa CSUB10S/pSHA16K transformante de *K. pneumoniae*). Como control negativo se utilizó la cepa CSUB10R que no expresa ninguna de las dos porinas (Domenech-Sanchez *et al.*, 2003).

Se detalla a continuación el protocolo de extracción realizado:

- I) Se inocularon en 15ml de caldo MH (alta osmolaridad) o NB (*Nutrient Broth* – baja osmolaridad) sin antibiótico, cada uno de los aislamientos y se incubaron a 37°C y 65 r.p.m de agitación *overnight*.
- II) Se centrifugaron los inóculos en tubos de centrifuga de 10ml durante 15 minutos a 3100 g.

- III) Se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se secó bien mediante el uso de una pipeta, y posteriormente se lisó con 1ml de buffer Tris-Mg pH7.3 (10mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂).
- IV) Se sonicó cada muestra durante 5 ciclos de 30 segundos (haciendo una pausa de 1 segundo cada 5 segundos).
- V) Luego se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 4400 g a temperatura ambiente, se eliminaron los pellets (células no lisadas) y se pasaron los sobrenadantes a tubos eppendorf estériles.
- VI) Se centrifugaron a 4°C durante 30 minutos a 26000 g. Los sobrenadantes (contenidos citoplasmáticos) fueron eliminados, y se prosiguió el protocolo con los pellets (membranas).
- VII) Los pellets se resuspendieron en 800µl de Sarcosil al 2% y se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente fueron centrifugados a 4°C durante 30 minutos a 26000 g.
- VIII) Los sobrenadantes (proteínas de membrana interna) se descartaron y se resuspendieron los pellets (proteínas de membrana externa) con 1ml de buffer Tris-Mg pH7.3. Luego se centrifugaron a 4°C durante 30 minutos a 26000 g.
- IX) Se eliminaron los sobrenadantes y se secaron los pellets con pipeta, los cuales fueron resuspendidos en 40µl de buffer Tris-Mg pH7.3 y conservados a -20°C hasta su corrida electroforética.

3.10.2 Preparación de geles de poliacrilamida

Considerando que la acrilamida y la bisacrilamida son neurotóxicos previo a polimerizar, la realización de los geles se llevó a cabo en campana de extracción. Primero se procedió a la realización del **gel resolutivo**, el cual contenía una concentración final de 12% de acrilamida-bisacrilamida, 0.2% de SDS, 0.375M de Buffer resolutivo Tris-HCl (pH8.8), 0.2% de TEMED y 0.025% de APS. La mezcla se realizó agregando el TEMED y el APS como últimos componentes ya que son los encargados de comenzar la polimerización de la poliacrilamida. Una vez hecha la mezcla, se introdujo en el soporte de electroforesis (cristales separados por un espesor de 1mm). Previo a la polimerización se agregó 1ml de isopropanol para

evitar el contacto con el aire (las moléculas de oxígeno impiden la polimerización del gel).

Una vez polimerizado, se retiró el isopropanol y se agregó el **gel de apilamiento**, cuya mezcla se realizó en el momento y contenía una concentración final de 4% de acrilamida-bisacrilamida, 0.1% de SDS, 0.125M de Buffer de apilamiento Tris-HCl (pH6.8), 0.1% de TEMED y 0.05% de APS.

Para lograr una mejor resolución de las bandas de proteínas, también se corrieron alícuotas de las PME en geles comerciales al 12% (Mini-PROTEAN TGX, Precast Gels – BIORAD).

3.10.3 Corrida electroforética

El buffer de electroforesis 1X se compuso de 3gr de Tris-base, 14.4gr de Glicina, 10ml de SDS 10X y agua destilada hasta completar un litro.

Las proteínas extraídas en la sección 3.10.1 fueron mezcladas con un buffer de carga comercial (Laemmli Sample Buffer – BIO-RAD) en una proporción 1:1, y se cargaron en total 20 μ l de la mezcla en cada pocillo. No se realizó cuantificación del extracto proteico previo a la corrida electroforética. Del PM se cargaron 10 μ l.

Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 50V por aproximadamente 20 minutos (hasta que las muestras pasaran al gel resolutivo) y luego 100V hasta que el frente de corrida se encontrara cercano al borde inferior del gel.

Posterior a la corrida, el gel fue teñido durante 30 minutos con Azul de Coomasie (0.2gr de Azul de Coomasie, 90ml de 1:1 v:v metanol: agua destilada, 10ml de ácido acético glacial). A continuación fue desteñido con una solución de 45% metanol – 10% ácido acético, en dos lavados de 30 minutos cada uno, en agitación. Luego fueron lavados con agua destilada durante 20 minutos, en agitación. Finalmente fueron secados sumergiéndolos por 20 minutos en Gel-Dry Solution (Invitrogen).

4. RESULTADOS

4.1 Objetivo 1: Caracterización de genes *bla*_{CTX-M} y genes *bla*_{KPC}

4.1.1 Aislamientos productores de CTX-M

De los 26 aislamientos recolectados del Hospital Militar en búsqueda de productores de CTX-M (Tabla 1), 12 sugerían fenotípicamente la presencia de una BLEE. De éstos, 11 resultaron productores de CTX-M-15 (verificación por amplificación y secuenciación del gen). El aislamiento BLEE positivo pero CTX-M negativo resultó ser además negativo para la producción de β -lactamasas del tipo TEM (Tabla 10). No se lo evaluó para la presencia de las de tipo SHV ya que la variante SHV-1 se encuentra presente normalmente en los aislamientos de *K. pneumoniae* y no era relevante su caracterización para los estudios subsiguientes.

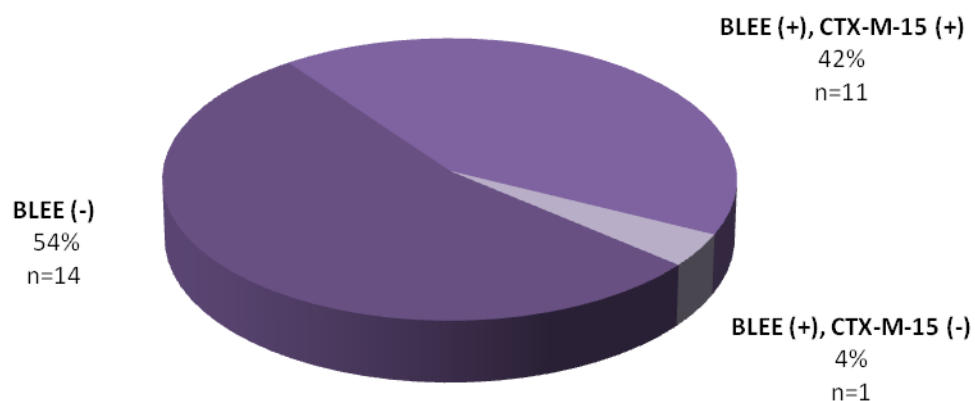
De estos 11 aislamientos, 10 evidenciaron ser además portadores de integrones de clase 1, por lo cual se continuó trabajando con éstos (Fig. 5). Asimismo, 3 de ellos portan el gen *aac6'-lb* que codifica para una enzima modificadora de aminoglucósidos y uno (1126) su variante alélica *aac6'-lb-cr*. Curiosamente, el 1101 mostró un triple patrón de bandas por RFLP lo cual podría sugerir la presencia de ambos alelos del gen (Fig. 6). Sin embargo esta posibilidad se descartó por análisis de secuencias (Apéndice I).

Tabla 10. Aislamientos productores de BLEE

Aislamiento	BLEE §	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>int11</i>	<i>aac6'-lb</i> ♦
1101	(+)	(+)	(+) TEM-1	(+)	(+)
1102	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
1103	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
1109	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
1111	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
1113	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
1116	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
1120	(+)	(+)	(+) TEM-1	(+)	(+)
1121	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
1124	(+)	(+)	(+) TEM-1	(+)	(-)
1125	(+)	(+)	(+) TEM-1	(+)	(+)
1126	(+)	(+)	(+) *	(-) ‡	(+) <i>lb-cr</i>

§ Dato fenotípico obtenido del Vitek; * Sin enviar a secuenciar; ‡ La amplificación del gen de la integrasa resultó negativo, pero la RV dio positivo, evidenciando la presencia de un integrón de clase 1; ♦ Se verificó la identidad por secuenciación, confirmándose el alelo *aac6'-lb-cr* en la cepa 1126.

A.



B.

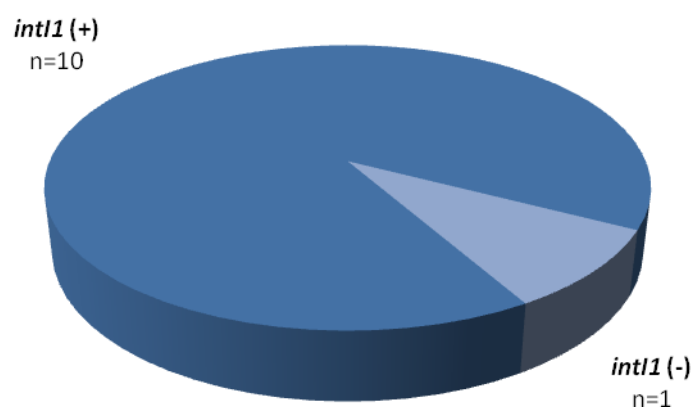


Figura 5. Frecuencia de aislamientos productores de CTX-M-15 e integrones dentro de la población bacteriana proveniente del Hospital Militar en el período comprendido entre el 22/03/2011 y el 07/05/2011. A. Total de aislamientos recolectados durante el período mencionado, frecuencia de productores de BLEE del tipo CTX-M-15 vs. No CTX-M-15 (42% productoras de CTX-M, con un intervalo de confianza de 25,5%-61.5%). B. Aislamientos productores de CTX-M-15 y prevalencia de integrones de clase 1 dentro de éstos.

4.1.2 Aislamientos productores de KPC

Los 13 aislamientos resistentes o con sensibilidad disminuida a los carbapenemes resultaron productores de la carbapenemasa *bla*_{KPC-2} y asimismo poseedores de integrones de clase 1.

Con respecto a la caracterización de otros genes de resistencia, se apreció mayor variabilidad al comparar los aislados de los diferentes brotes de bacterias productoras de KPC.

Si bien ocho de los aislamientos correspondientes al segundo brote de KPC (Hospital Militar) sugerían la presencia de una BLEE según los datos fenotípicos (Tabla 2), solamente cuatro demostraron ser co-productores de una cefotaximasa de la familia CTX-M: tres productores de CTX-M-15 (19/2, 54/2 y 66/2) y uno productor de CTX-M-9 ó CTX-M-51 (20/2). Esta última no pudo ser identificada con precisión ya que la secuencia se obtuvo con los cebadores degenerados que amplifican parcialmente el gen (Tabla 5). Así es que solamente se pudo discriminar que se trataba de una CTX-M del grupo 9, pero no se logró diferenciar entre la variante alélica CTX-M-9 y la CTX-M-51 que solamente se diferencian en el nucleótido 239 generando un cambio en el aminoácido 80 (Alanina en CTX-M-9 versus Valina en CTX-M-51). La secuencia obtenida con los cebadores abarcó la región comprendida entre los nucleótidos 249 y 737 (de un total de 876 nucleótidos que componen el marco abierto de lectura).

Los restantes cuatro aislamientos (4293, 19/1, 54/1 y 66/1), no productores de CTX-M, fueron analizados para verificar la presencia de β -lactamasas de las familias TEM y SHV (Tabla 11). Si bien todos resultaron positivos a ambas familias, el análisis de las secuencias reveló que en todos los casos las variantes presentes (TEM-1 y SHV-11/155) no codifican para β -lactamasas de espectro extendido (Castanheira, Farrell, Deshpande, Mendes, y Jones, 2013; Nuesch-Inderbinen, Kayser, y Hachler, 1997).

Con respecto a la producción de TEM, la única cepa que resultó negativa fue la *E. coli* 20/2. La mayoría de las restantes son portadoras de la variante TEM-1. En cuanto a la producción de SHV, todas las cepas resultaron positivas, confirmándose la variante alélica SHV-11/155 en todos los casos enviados a secuenciar (Tabla 11).

Al analizar genes plasmídicos de resistencia a quinolonas (*qnrA* y *qnrB*) así como el gen *aac6'-Ib* (que confiere resistencia a aminoglucósidos) la variabilidad entre los aislamientos de los diferentes brotes se hizo más evidente. El único aislado poseedor del gen *qnrA* resultó ser el de *E.coli* (20/2), el cual por otra parte dio resultados negativos para *qnrB* y *aac6'-Ib*. Todos los correspondientes al primer brote (Hospital

Mautone) fueron negativos para la presencia de los genes *qnr*, sin embargo amplificaron producto específico para el gen *aac6'-lb* los cuales revelaron coincidir con este alelo por secuenciación.

A diferencia de estos aislamientos, aquellos de *K. pneumoniae* correspondientes al segundo brote evidenciaron la presencia de la variante alélica *aac6'-lb-cr*, la cual confiere resistencia a los aminoglucósidos y a las quinolonas. Por otra parte, la mayoría también mostró poseer el gen *qnrB* y ninguno el gen *qnrA* (Tabla 11).

Tabla 11. Aislamientos productores de KPC

Aislamiento	<i>bla</i> _{KPC-2}	BLEE §	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM} *	<i>bla</i> _{SHV} *	<i>int1</i>	<i>aac6'-lb</i> ♦	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>
666 (A1)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) SHV-11/155	(+)	(+) lb	(-)	(-)
PRE (B1)	(+)	(-)	(-)	(+) TEM-1	(+) SHV-11/155	(+)	(+)	(-)	(-)
381 (B2)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+) SHV-11/155	(+)	(+) lb	(-)	(-)
POST (B6)	(+)	(-)	(-)	(+) TEM-1	(+) SHV-11/155	(+)	(+) lb	(-)	(-)
4293	(+)	(+)	(-)	(+) TEM-1	(+)	(+)	(+) lb-cr	(-)	(+)
54/1	(+)	(+)	(-)	(+) TEM-1	(+) SHV-11/155	(+)	(+) lb-cr	(-)	(+)
54/2	(+)	(+)	(+) CTX-M-15	(+) TEM-1	(+) SHV-11/155	(+)	(+) lb-cr	(-)	(+)
19/1	(+)	(+)	(-)	(+) TEM-1	(+) SHV-11/155	(+)	(+) lb-cr	(-)	(+)
19/2	(+)	(+)	(+) CTX-M-15	(+) TEM-1	(+) SHV-11/155	(+)	(+) lb-cr	(-)	(+)
20/1	(+)	(-)	(-)	(+) TEM-1	(+) SHV-11/155	(+)	(+) lb-cr	(-)	(+)
20/2 <i>E.coli</i>	(+)	(+)	(+) CTX-M-9 ó 51	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
66/1	(+)	(+)	(-)	(+) TEM-1	(+)	(+)	(+) lb-cr	(-)	(-)
66/2	(+)	(+)	(+) CTX-M-15	(+) TEM-1	(+)	(+)	(+) lb-cr	(-)	(+)

§ Dato fenotípico obtenido del Vitek; * Los (+) no se secuenciaron; ♦ Se verificó la identidad por secuenciación, siendo el alelo *aac6'-lb* el que posee una T en la posición 304 y el alelo *aac6'-lb-cr* el que en su lugar posee una C.

Las variantes alélicas del gen *aac6'-lb* fueron corroboradas por RFLP para los aislamientos 19/1, 20/1, PRE y POST. Como se observa claramente en la Figura 6, en los carriles correspondientes a los aislamientos del segundo brote, la enzima no digirió el producto de PCR, indicando el alelo *lb-cr* con la posición 304C (como se reveló por secuenciación – Apéndice I). Por el contrario, en los carriles correspondientes al primer brote se ven claramente dos bandas las cuales indican que la enzima digirió, y que por lo tanto se trata del alelo *lb* con la posición 304T (verificado por secuenciación).

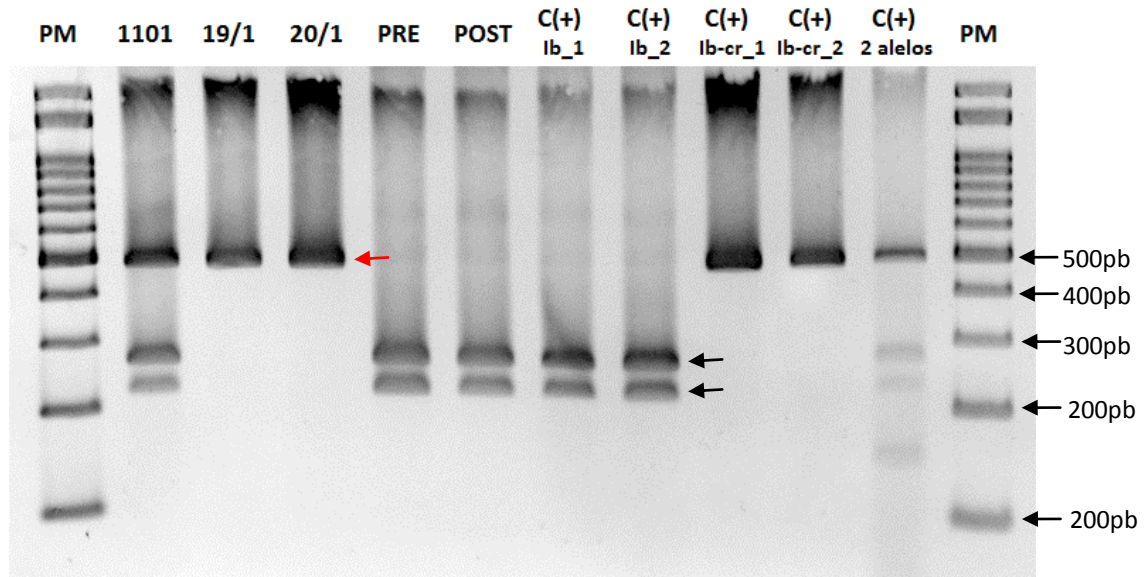


Figura 6. Resultado de la digestión de *aac6'-Ib* con *FokI*. Las digestiones fueron corridas en un gel de agarosa al 2,5%, durante 75min a 110V. El gel fue teñido con bromuro de etidio posterior a la corrida. El PM utilizado fue el 100pb de Nippongenetics (bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 y 3000pb). Con flechas negras se indican los fragmentos de la digestión (265 y 217pb) del alelo *Ib*, con flecha roja se indica el producto de PCR sin digerir (482pb) correspondiente al alelo *Ib-cr*. Como controles positivos se utilizaron Enterobacterias previamente caracterizadas en el HUMV (*Ib_1*: 4.04; *Ib_2*: 208; *Ib-cr_1*: 189; *Ib-cr_2*: 6.19; 2 alelos: 43.06).

4.2 Objetivo 2: Caracterización de integrones atípicos y sus entornos

4.2.1 Integrones atípicos

Las 10 cepas de *K. pneumoniae* productoras de CTX-M-15 (no productoras de KPC) y portadores de integrones de clase 1, provenientes del Hospital Militar fueron evaluadas en profundidad en lo que respecta a los integrones mencionados. Se analizaron sus regiones variables, la presencia o ausencia de *ISCR1* y finalmente se hizo detección de los diferentes módulos que conforman un integrón clásico, en búsqueda de aislamientos que carecieran de alguno/s de estos módulos y que por lo tanto representarían ejemplos de integrones atípicos.

Se encontró gran variabilidad en sus regiones variables, detectándose en 7 de los aislamientos, una única banda (lo cual indica la presencia de un único integrón) pero cuya identidad a nivel de los *cassettes* génicos difirió dependiendo del aislamiento

analizado. En dos de ellos – 1101 y 1120 - se encontró la combinación *dfrA12-aadA2*, *cassettes* que codifican para una dihidrofolato reductasa y una adenilil-transferasa de aminoglucósidos, confiriendo resistencia a trimetoprim y a estreptomina/espectinomicina, respectivamente. En tres – 1124, 1125 y 1126 – la combinación encontrada fue *dfrA12-orfF-aadA2*, la cual es idéntica a la anterior pero con la inserción del *cassette orfF* al que no se le conoce función, pero el cual en sí mismo es un marco de lectura abierto (proteína putativa). El 1113 presentó la combinación *aadB-aadA2*, ambos *cassettes* codificantes de adenilil-transferasas (el primero también es conocido como *ant2''-Ia*). El aislamiento 1121 fue el único que evidenció la presencia de un único *cassette* en la región variable correspondiente al *aadA1* que codifica para otra adenilil-transferasa. Las cepas 1103 y 1116 amplificaron 3 bandas de baja intensidad, lo cual sugiere la presencia de 3 integrones diferentes. No obstante, la identidad de los *cassettes* génicos no pudo ser evaluada ya que no se lograron cantidades de producto suficientes para su secuenciación. Finalmente, la cepa 1102, a pesar de repetidos intentos, no evidenció la presencia de RV. Todos estos datos se resumen en la Tabla 12.

En cuanto a la posibilidad de que estos integrones portaran la recombinasa ISCR1, se analizó por PCR con cebadores específicos. Se reveló de este modo que 9 de los 10 aislamientos son portadores de esta recombinasa, siendo entonces el aislamiento 1103 el único portador de integrones no complejos (y considerando que sugería al menos la presencia de 3 integrones diferentes, este resultado indicaría que ninguno de los tres porta la secuencia de inserción mencionada).

Al analizar los módulos que conforman estructuralmente un integrón clásico (Fig. 3), sorprendentemente se evidenció que todos los aislamientos poseen integrones atípicos, habiéndose encontrado un ejemplar perteneciente al grupo estructural V (1102) por no presentar ni RV, ni región 3'CS, ni módulo *tni* ni IRt; uno correspondiente al grupo estructural III (1103) en el cual no se obtuvo amplificación ni del 3'CS, ni del módulo *tni* ni del IRt; y ocho ejemplares de integrones atípicos del grupo II, en los cuales hay ausencia de módulo *tni* y del IRt (Tabla 12 y Figura 7).

Cierto grado de variabilidad fue encontrado además en la región del IRI de dichos integrones, donde 5 aislamientos parecen estar insertos en el esqueleto de un transposón Tn21-like y uno en el Tn1696-like. Cuatro aislamientos no rindieron producto con los cebadores utilizados, y fueron sometidos a una nueva amplificación con el mismo cebador reverso (HS818) pero utilizando un cebador nuevo (HS1001) “*hacia adelante*” que hibrida en IS26, ya que un extremo IRI con esta secuencia de inserción fue previamente descrito en aislamientos de Sydney, Australia (Roy Chowdhury *et al.*, 2011). De este modo, el aislamiento 1116 amplificó una banda consistente con el tamaño esperado, pero de intensidad insuficiente para su secuenciación. Los restantes aislamientos (1102, 1103 y 1121) tampoco produjeron producto con esta combinación de cebadores.

4.2.2 Entornos de integrones atípicos: ISs y regiones RMD

Tomando como referencia el aislamiento U20 (Roy Chowdhury *et al.*, 2011), proveniente de nuestro país, portador de un integrón atípico grupo II embebido en una plataforma de multirresistencia, y productor de una BLEE CTX-M-15, se decidió evaluar los entornos genéticos de los aislamientos en estudio para verificar si algunas, o todas las regiones allí presentes, también se encontraban en los aislamientos de interés (Fig. 8).

En primera instancia se decidió caracterizar la región río arriba del integrón, es decir, por fuera del IRI. Así es que se evaluaron diferentes plataformas por PCR y la confirmación de las mismas se realizó secuenciando los productos de tamaño esperado y analizando las secuencias posteriormente.

La presencia de las secuencias de inserción IS26 e ISEcp1 se reveló en todos los aislamientos (Tabla 13), no ocurriendo la misma prevalencia en lo que respecta a los genes *mphA* (presente en 5 de 10 aislamientos) localizados río abajo del integrón, *aac6'-Ib* y *bla*_{TEM} (Tabla 10), éstos río arriba del integrón.

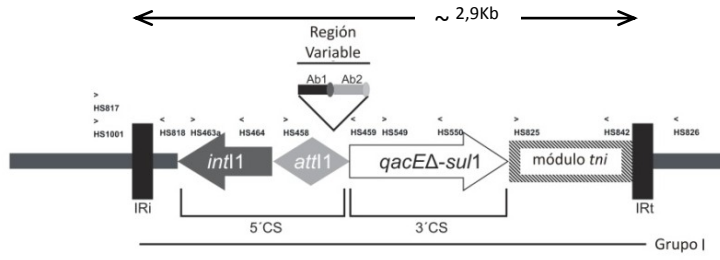
Es importante destacar que por análisis bioinformático se determinó que el alelo que porta la cepa U20 es el *aac6'-Ib-cr* y no el alelo salvaje tal y como fuera publicado, ya que en la posición 304 presenta una C en vez de una T (Roy Chowdhury *et al.*, 2011)

Tabla 12. Caracterización de integrones en aislamientos productores de CTX-M-15

Aislamiento	RV		ISCR1	IRi	Módulos de integrón clásico				Grupo estructural de integrón atípico	
	<i>n</i> *	Cassettes			<i>intI1</i>	RV	3'CS	módulo <i>tni</i>		IRt
1101	1	<i>dfrA12-aadA2</i>	(+)	Tn21	(+)	(+)	(+)	NP	NP	II
1102	(-)	N/C ‡	(+)	(-)	(+)	NP ♦	NP	NP	NP	V
1103	3	N/D §	(-)	(-)	(+)	(+)	NP	NP	NP	III
1113	1	<i>aadB-aadA2</i>	(+)	Tn1696	(+)	(+)	(+)	NP	NP	II
1116	3	N/D	(+)	IS26-IRi #	(+)	(+)	(+)	NP	NP	II
1120	1	<i>dfrA12-aadA2</i>	(+)	Tn21	(+)	(+)	(+)	NP	NP	II
1121	1	<i>aadA1</i>	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	NP	NP	II
1124	1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	(+)	Tn21	(+)	(+)	(+)	NP	NP	II
1125	1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	(+)	Tn21	(+)	(+)	(+)	NP	NP	II
1126	1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	(+)	Tn21	(-) ●	(+)	(+)	NP	NP	II

* Indica el número de bandas amplificadas por PCR; ‡ N/C: No Corresponde; § N/D: No Determinado; # Inferido por el tamaño del producto de PCR, no verificado por secuenciación; ● PCR para *intI1* resultó negativa, pero PCR para RV resultó positiva; ♦ NP: *No Product*, los cebadores utilizados no rindieron productos de amplificación

A. Integrón clínico de clase 1 convencional



B. Integrones atípicos de clase 1 presentes en los aislamientos en estudio

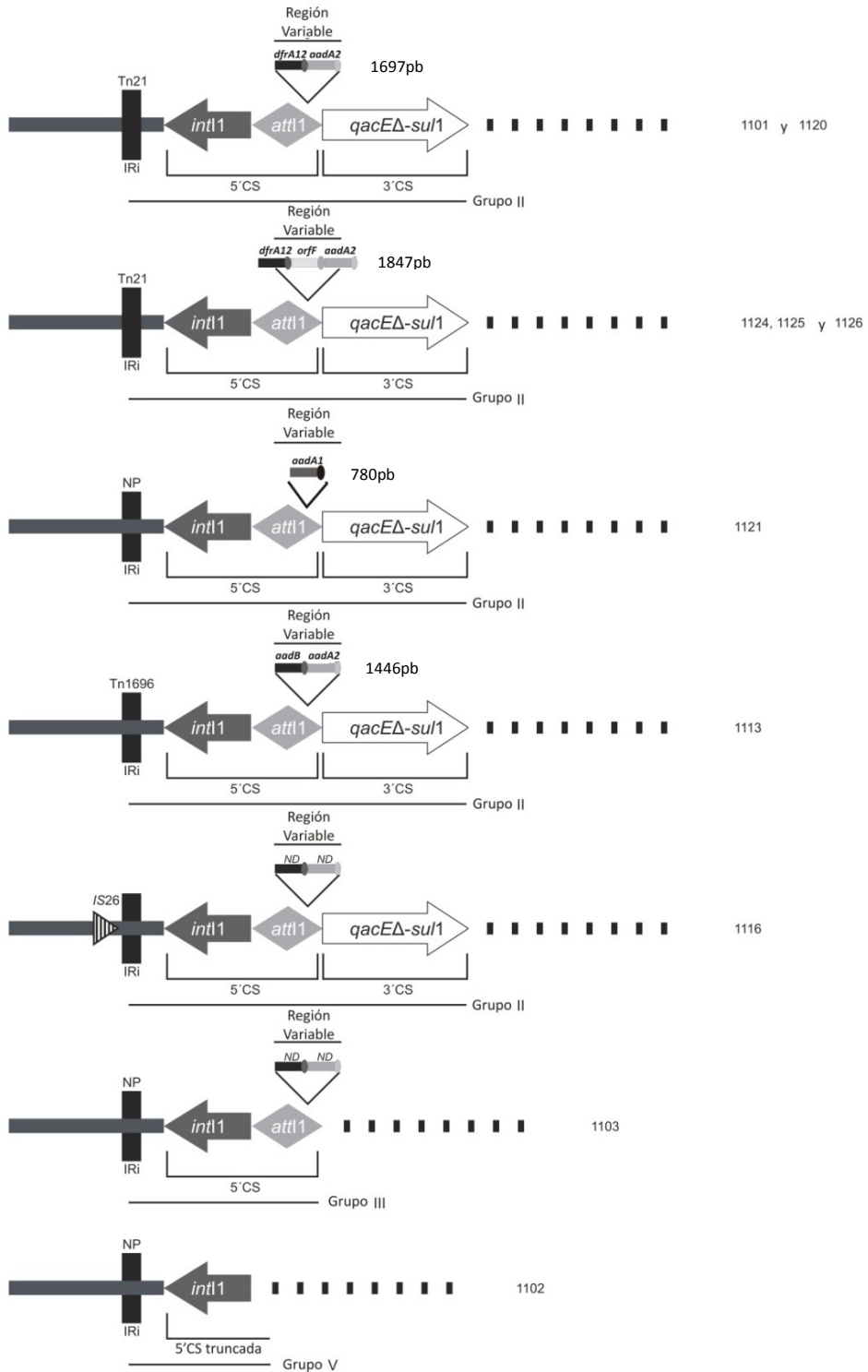


Figura 7. Representación esquemática de integrones de clase 1 de acuerdo a sus estructuras genéticas. A. Integrones clínicos de clase 1 convencionales (Grupo estructural I). Se muestran con flechas negras los cebadores utilizados para caracterizar estructuralmente los integrones en estudio. Arriba del esquema se indica el tamaño total del integrón exceptuando la región variable. **B.** Integrones de clase 1 atípicos presentes en los aislamientos en estudio mostrando los límites IRI determinados, así como los *cassettes* genéticos encontrados en las regiones variables (se indican los tamaños de la combinación de *cassettes* hallados). ND: Identidad de los *cassettes* no determinada ya que cada aislamiento evidenció 3 regiones variables. Los módulos ausentes se indican con barras negras discontinuas en cada esquema de integrón. Los aislamientos se mencionan a los lados de las líneas negras continuas que indican a qué grupo estructural pertenecen.

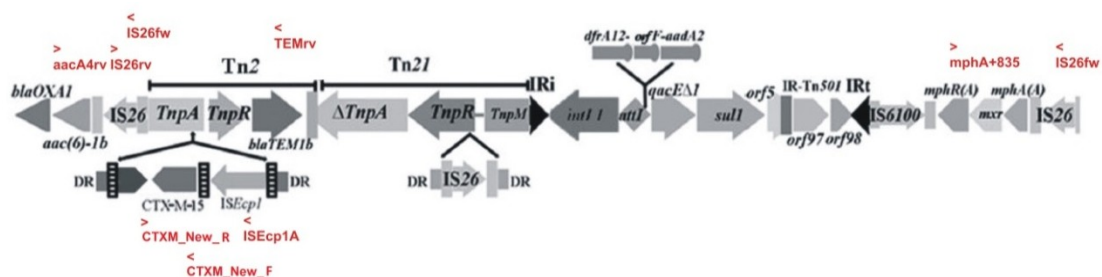


Figura 8. Regiones RMD asociadas al integrón de clase 1, identificadas en el aislamiento U20. Para analizar la presencia de regiones RMD por fuera de los límites del integrón en aislamientos portadores del gen *bla*_{CTX-M-15}, la cepa U20 fue utilizada como control positivo. La plataforma aquí esquematizada comprende aproximadamente 25Kb. Los cebadores utilizados para la búsqueda de estas plataformas se indican en rojo. Adaptado de Roy Chowdhury *et al.* (2011).

En cuanto a las plataformas genéticas en los entornos del integrón, todos los aislamientos evidenciaron la asociación *IS26:bla*_{CTX-M-15} (Tabla 13), con la salvedad de que se apreciaron bandas de otros tamaños además de las de tamaño esperado según el control positivo (aproximadamente 4300pb), lo cual estaría indicando plataformas diferentes además de la presente en la cepa U20. No obstante, si bien la secuencia *ISEcp1* parece ser ubicua en los aislados analizados, su asociación con el gen *bla*_{CTX-M-15} no demostró ser tan frecuente (hallada en la mitad de los ejemplares, los cuales amplificaron un producto del tamaño esperado de aproximadamente 2300pb).

En los 5 casos que presentaron la co-producción de TEM y CTX-M-15 (así como la asociación *ISEcp1:bla*_{CTX-M-15}) se pudo comprobar un único producto de amplificación consistente con el tamaño de aproximadamente 4500pb (Tabla 13), el cual estaría

comprendiendo los genes mencionados además de la secuencia *ISEcp1* y secuencias parciales correspondientes a transposasas del transposón *Tn2-like*.

También se evaluó la plataforma *aac6'-Ib:bla_{CTX-M-15}* que incluye además una copia de *IS26* y parcialmente la secuencia de una transposasa del *Tn2-like*. En todos los aislamientos portadores del gen de resistencia a aminoglucósidos (a excepción del 1126) se obtuvieron 3 productos de amplificación, siendo el de mayor peso molecular (aproximadamente 4800pb) el producto específico (Tabla 13). Los tres productos fueron enviados a secuenciar para verificar la identidad de aquel producto que fuera el correcto. Es de destacar que por la amplificación de productos inespecíficos de menor tamaño, la intensidad del producto específico fue, en todos los casos, menor, por lo que su amplificación debió ser promovida disminuyendo la especificidad de la reacción de PCR (disminución de la temperatura de hibridación y aumento en la concentración de $MgCl_2$). En el caso del aislamiento 1126, se verificó únicamente la presencia de la plataforma *aac6'-Ib:IS26*, la cual por tratarse de un producto de menor tamaño que *aac6'-Ib:bla_{CTX-M-15}* fue más fácilmente amplificable. Por lo tanto, no pudo evidenciarse la asociación *aac6'-Ib:bla_{CTX-M-15}* en este aislamiento.

Finalmente se analizó la región río abajo del integrón, es decir, por fuera del IRt. Es importante destacar en este punto, que si bien con los cebadores utilizados para detectar esta región (ver Tabla 6) la cepa U20 no amplificó, esto se debe a los genes en los cuales estos cebadores hibridan (HS825 en *tniA* del *Tn402-like*; HS826 en *merE* del *Tn21*), los cuales no se encuentran presentes en el IRt modificado que se aprecia en este aislamiento (Fig. 8).

Así es que se estudió la plataforma *mphA:IS26* en todos los aislamientos que hubieran evidenciado la presencia del gen *mphA*, detectándose en todos ellos (Tabla 13).

Tabla 13. Genes de resistencia, EGM y regiones RMD analizadas en los aislamientos productores de CTX-M-15

Aislamiento	Genes de resistencia y EGM *						Regiones RMD * por fuera de los límites de integración					
							Río arriba del IRI			Río abajo del IRT		
	<i>aac6'-Ib</i>	<i>bla</i> _{CTXM-15}	<i>ISEcp1</i>	<i>bla</i> _{TEM}	<i>IS26</i>	<i>mphA</i>	<i>ISEcp1:CTXM</i>	<i>IS26:CTXM</i> ♦	<i>aac6'-Ib:IS26</i>	<i>aac6'-Ib:CTXM</i>	<i>CTXM:TEM</i>	<i>mphA:IS26</i>
U20 #	(+) <i>Ib-cr</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1101	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1102	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	NP¥	(+)	N/C §	N/C	N/C	N/C
1103	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	NP	(+)	N/C	N/C	N/C	N/C
1113	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	NP	(+)	N/C	N/C	N/C	N/C
1116	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	NP	(+)	N/C	N/C	N/C	N/C
1120	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1121	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	NP	(+)	N/C	N/C	N/C	N/C
1124	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	N/C	N/C	(+)	(+)
1125	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1126	(+) <i>Ib-cr</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	NP	(+)	(+)

* Elementos Genéticos Móviles; # Aislamiento utilizado como control positivo el cual se ilumina en anaranjado; ● Resistentes a Múltiples Drogas; ¥ NP: *No Product* – la PCR no rindió productos de amplificación; ♦ Todos los aislamientos amplificaron, siendo banda única del tamaño esperado en el 1101 y 1125, mientras que los aislamientos 1120, 1121 y 1124 amplificaron banda de tamaño esperado, también produjeron otras bandas de tamaños ligeramente menores (los restantes produjeron bandas ligeramente mayores o menores en tamaño pero de intensidad suficiente como para considerarlas productos específicos); § N/C: No Corresponde; en amarillo se iluminan los 3 aislamientos que evidenciaron las mismas plataformas que la cepa U20 (con excepción de portar la variante alélica *aac6'-Ib* salvaje, en vez de la *Ib-cr*).

4.3 Objetivo 3: Entornos genéticos del gen *bla*_{KPC-2}

En base a los estudios realizados por Naas *et al.* (2008), se analizaron los entornos del gen *bla*_{KPC-2} en lo que refiere a secuencias de inserción del Tn4401 en el que se ha visto frecuentemente inserto (Fig. 9A y Tabla 7).

Así es que se decidió amplificar con cebadores que hibridaran tanto con dicho gen como con las IS adyacentes (*ISKpn7* río arriba, *ISKpn6* río abajo) de modo de obtener amplicones que abarcaran el gen de interés y las plataformas a sus extremos. En primera instancia se pusieron a punto las condiciones de PCR para la amplificación de los productos de interés utilizándose únicamente la cepa 666 del primer brote y la cepa *Ec20/2* del segundo brote obteniéndose productos de los tamaños esperados (*bla*_{KPC}:*ISKpn6* – aprox. 1530pb; *ISKpn7:bla*_{KPC} – aprox. 1480pb). Se verificó la identidad de ambos productos en ambas cepas por análisis de secuencias. El producto *bla*_{KPC}:*ISKpn6* mostró una identidad nucleotídica de 99% respecto de la secuencia con N° de acceso al NCBI EU176011.1. Asimismo se evidenció que el producto *ISKpn7:bla*_{KPC} presentaba una diferencia de aprox. 100pb entre los aislamientos, siendo el amplicón del aislamiento 666 el de menor tamaño y sugiriendo la inserción del gen *bla*_{KPC} en la isoforma *a* del Tn4401 que presenta una delección de 100pb río arriba del gen de la carbapenemasa (98% de identidad nucleotídica con N° de acceso EU176011), mientras que en el 20/2 no se detectó ninguna delección (97% de identidad nucleotídica con N° de acceso EU176014), sugiriendo que en este aislamiento el gen estaría inserto en la isoforma *b* del Tn4401 (sin delección).

Una vez verificadas las secuencias, se utilizaron esos mismos aislamientos como controles positivos para analizar la presencia de las mismas plataformas en los restantes aislamientos productores de KPC-2. Esto permitió comprobar que ambas plataformas se encontraban presentes en todos los aislamientos. Asimismo, se observó una diferencia en tamaño de los amplicones correspondientes a *ISKpn7:bla*_{KPC} entre las cepas del primer brote (producto de menor tamaño) y las cepas del segundo brote (Fig. 9B). Dado que la diferencia de tamaño parecía corresponderse con los controles positivos pero es poco apreciable a nivel de la

resolución del gel, se enviaron a secuenciar dos productos más de cada brote (PRE y POST del primer brote; 19/2 y 4293 del segundo brote). El análisis de dichas secuencias permitió corroborar que efectivamente el gen *bla*_{KPC-2} de los aislamientos del Hospital Mautone se encuentra embebido en la isoforma *a* del Tn4401 (con delección de 100pb) mientras que en los correspondientes al Hospital Militar se encuentra en la isoforma *b* (sin delección).

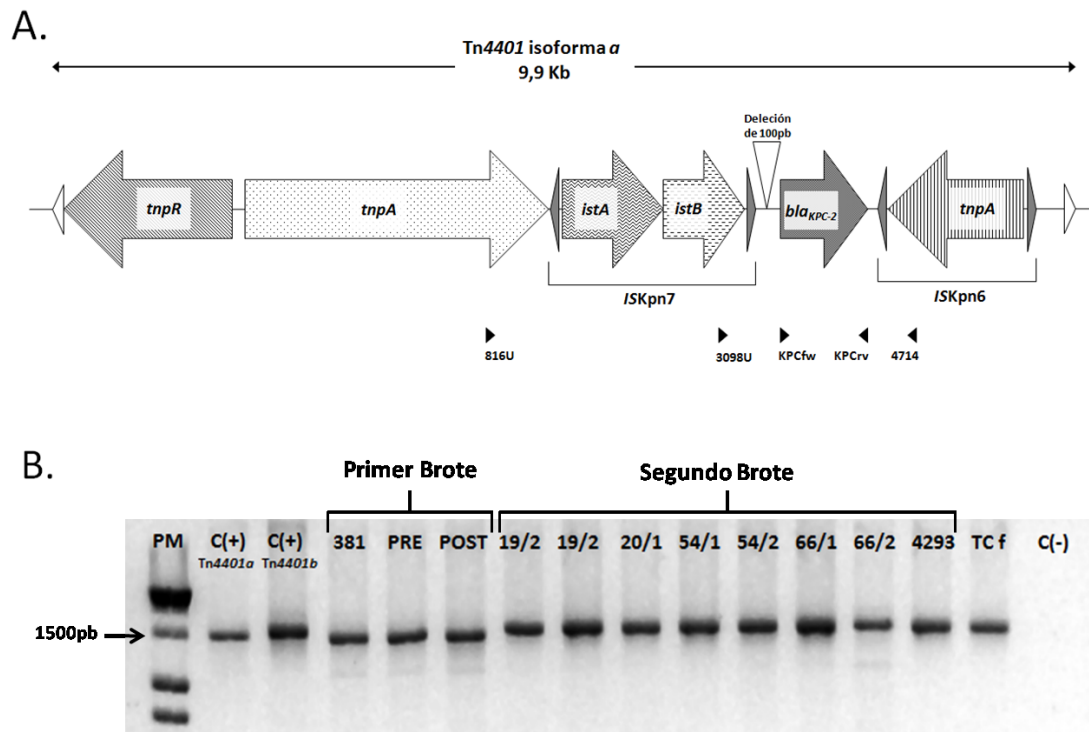


Figura 9. Caracterización de plataformas que rodean al gen *bla*_{KPC-2} en los aislamientos estudiados.
A. Representación esquemática de las estructuras genéticas del Tn4401 isoforma *a* identificadas en los entornos del gen *bla*_{KPC-2}. Los genes y sus orientaciones de transcripción se indican por flechas. Los triángulos blancos representan los repetidos invertidos (IRs) que flanquean el Tn4401. Los triángulos grises representan los IRs de ISKpn7 e ISKpn6. La delección de 100pb característica de la isoforma *a* también se indica. Los cebadores utilizados para la detección de las diferentes plataformas se muestran debajo del esquema con triángulos negros. **B.** Visualización del producto de amplificación ISKpn7:*bla*_{KPC} por electroforesis en gel de agarosa 2,5%. PM: Hyperladder I de Bioline. Los controles positivos corresponden a los cepas *Kp666* del primer brote (Tn4401 *a*) y *Ec20/2* del segundo brote (Tn4401 *b*) previamente caracterizadas por secuenciación. El aislamiento TC f corresponde a una cepa transconjugante cuya cepa dadora fue la *Ec20/2* (Ver apartado 4.4). Como control negativo se utilizó agua milliQ.

Con la información obtenida hasta el momento se puede concluir que el gen *bla*_{KPC-2} se encuentra embebido en dos isoformas diferentes del Tn4401, la isoforma *a* en

aquellos correspondientes al brote del Hospital Mautone, y la isoforma *b* en los correspondientes al brote del Hospital Militar. Sin embargo, se quiso estudiar más allá de las secuencias de inserción con el fin de verificar que se tratara efectivamente del Tn4401, por lo cual se analizó la plataforma que abarcó desde la transposasa *tnpA* hasta el gen *bla*_{KPC} (Tabla 7 y Fig. 9A). Una vez más se puso a punto la PCR con la cepa 666 y se envió a secuenciar una vez obtenido el producto del tamaño esperado (aprox. 3500pb). Al verificarse la identidad del mismo (99% de identidad nucleotídica con N° de acceso EU176011) comprobando que se trataba efectivamente de la transposasa del Tn4401, se utilizó este aislamiento como control positivo para la amplificación de esta plataforma en los restantes aislamientos, obteniéndose producto específico en todos los casos.

4.4 Objetivo 4: Transferencia de *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{KPC-2} por conjugación y caracterización de plásmidos

4.4.1 Transferencia de *bla*_{CTX-M-15}

El gen *bla*_{CTX-M-15} fue exitosamente transferido a la cepa receptora en todos los casos ensayados. No obstante las frecuencias de conjugación difirieron en dos órdenes de magnitud dependiendo del pulsotipo. Los aislamientos 1101 y 1125 caracterizados como pulsotipo A rindieron una frecuencia de conjugación entre 5×10^{-8} y 1×10^{-7} transconjugantes por célula receptora, mientras que los aislamientos 1103 y 1113 caracterizados como pulsotipo B rindieron una frecuencia mayor ($1,6 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ transconjugantes por célula receptora). A todas las transconjugantes se les verificó la presencia del gen mediante PCR. Asimismo, como se vio anteriormente que el gen de CTX-M-15 parecía encontrarse en los entornos del integrón, también se realizó PCR para *int1*, verificándose además la presencia del integrón en el plásmido transferido.

4.4.2 Transferencia de *bla*_{KPC-2}

La conjugación del gen *bla*_{KPC-2} a partir de la cepa *Kp* 666 correspondiente al primer brote de KPC (gen que se determinó embebido en la isoforma *a* del Tn4401) no

rindió transconjugantes, a pesar de haberse ensayado por triplicado en tres experimentos independientes. El hecho de no haber obtenido transconjugantes (TC) indica una frecuencia de conjugación menor a 1×10^{-8} transconjugantes por célula receptora, o bien que el gen *bla*_{KPC-2} no está contenido en un elemento movilizable.

Por el contrario, la conjugación a partir de la cepa *Ec* 20/2 correspondiente al segundo brote de KPC (en la cual el gen se determinó localizado en la isoforma *b* del Tn4401) fue exitosa, alcanzándose una frecuencia de conjugación mayor a 1×10^{-3} transconjugantes por célula receptora. Las TC fueron ensayadas por PCR para verificar la presencia del gen *bla*_{KPC}, y asimismo, como la cepa dadora era portadora de una BLEE de la familia CTX-M y el antibiótico de selección fue la cefotaxima, se analizó a las TC en cuanto a la presencia del gen *bla*_{CTX-M}, dando en todos los casos negativo, y consecuentemente indicando que estos genes de resistencia a β -lactámicos se localizarían en moléculas de ADN diferentes en el aislamiento ensayado.

4.4.3 Caracterización de grupos de incompatibilidad plasmídica

Todos los aislamientos estudiados en el marco de esta tesis fueron evaluados por mapeo por PCR en lo que respecta a los grupos de incompatibilidad plasmídica descritos por Carattoli *et al.* (2005). También se evaluaron los grupos IncR e IncU descritos posteriormente (García-Fernández *et al.*, 2009). De igual forma se evaluó un ejemplar de los transconjugantes obtenidos en cada conjugación biparental.

Como se observa en la Tabla 14, la mayoría de los aislamientos productores de CTX-M-15 no produjeron productos de amplificación para ninguno de los 20 grupos de incompatibilidad plasmídica analizados. En algunos casos puntuales (se indican en la Tabla 14), bandas de muy baja intensidad pero de tamaño esperado se observaron para los grupos IncX e IncB/O (datos no mostrados). La débil amplificación imposibilitó la purificación de los productos para enviar a secuenciar, por lo cual no se pudo verificar la identidad de los mismos. Tampoco amplificaron los ejemplares de TC CTX-M positivos. Por el contrario, todos los aislamientos productores de KPC fueron tipables en uno a tres grupos de incompatibilidad plasmídica por aislamiento, indicando la presencia de múltiples plásmidos en cada uno de ellos (Tabla 14).

Interesantemente, mientras que todas las cepas del primer brote de KPC presentaron el grupo IncFII así como el IncR, el IncFII fue hallado únicamente en cuatro de los aislamientos del segundo brote (3 de ellos en aislamientos co-productores de CTX-M-15), y el IncR no se encontró en ninguno. Sin embargo, el grupo IncN se halló en todos los aislamientos del segundo brote así como también en el transconjugante (Tabla 14), lo cual indica que el plásmido transferido (portando el gen *bla*_{KPC-2}) pertenecería a este grupo de incompatibilidad plasmídica.

Tabla 14. Grupos de incompatibilidad plasmídica hallados

Aislamiento productor de CTX-M-15 ●	Grupo de Incompatibilidad plasmídica	Aislamiento productor de KPC-2 ●	Grupo de Incompatibilidad plasmídica
1101	B *	666 (A1)	FII / R
1102	NP ¥	PRE (B1)	FII / R
1103	B / X *	381 (B2)	FII / R
1113	NP	POST (B6)	FII / R
1116	NP	4293	N
1120	B *	54/1	FII / N
1121	NP	54/2	FII / N
1124	B *	19/1	N
1125	NP	19/2	N
1126	NP	20/1	FII / N
TC a1 (dadora: 1101)	NP	<i>Ec</i> 20/2	N
TC c3 (dadora: 1103)	NP	66/1	FII / N
TC b2 (dadora: 1113)	NP	66/2	N
TC g1 (dadora: 1125)	NP	TC f (dadora: <i>Ec</i> 20/2)	N

● TC: Transconjugante, se indica entre paréntesis la cepa parental; * Estos grupos fueron inferidos (ver apartado 4.4.3); ¥ NP: *No Product* - Sin amplicón para ninguno de los 20 grupos evaluados

4.4.4 Extracción de plásmidos pesados

Otro modo de caracterizar el contenido plasmídico de las cepas objeto del presente estudio es el análisis del perfil plasmídico mediante la extracción de los mismos y posterior corrida electroforética. Comparando el perfil de las cepas dadoras en los ensayos de conjugación con el perfil de alguna cepa transconjugante se puede,

entonces, visualizar el tamaño del plásmido transferido y estimarlo al cotejarlo con un aislamiento con plásmidos de pesos moleculares conocidos.

En los aislamientos productores de CTX-M-15 (no co-productores de KPC) se observan 4 patrones plasmídicos diferentes que con el único propósito de diferenciarlos en esta tesis se nombrarán arbitrariamente α , β , δ y λ (Fig. 10A). El patrón α solamente lo presenta el aislamiento 1101 y exhibe dos bandas plasmídicas, una de aprox. 150Kb y otra de tamaño ligeramente menor. El patrón β , en el cual se distinguen dos bandas plasmídicas, una de aprox. 150kb y otra de aprox. 7Kb, es compartido por los aislamientos 1102, 1103, 1113, 1116 y 1121. El patrón δ , similar al patrón α , presenta claramente 2 bandas (una mayor a 152Kb y otra de menor tamaño, aparentemente de menor tamaño a la del patrón α) y posiblemente 1 a 3 bandas menos definidas que podrían representar conformaciones plasmídicas diferentes (aislamientos 1120, 1124 y 1125). Finalmente, el último patrón (λ) lo presenta el aislamiento 1126 únicamente, el cual parece exhibir un único plásmido. A pesar de utilizar altas temperaturas y condiciones alcalinas (SDS a pH12.6) para eliminar el ADN cromosomal, 3 aislamientos mostraron bandas con aspecto “*feathery*” (Kado y Liu, 1981) consistentes con restos de ADN cromosomal.

Los perfiles de plásmidos revelados por las cepas productoras de KPC resultaron bastante diferentes (Fig. 10B), siendo muy homogéneo para el primer brote (donde se observa una única banda plasmídica de un tamaño mayor a 152Kb idéntica en todos los aislamientos) y más bien heterogéneo en los aislamientos del segundo brote. Todas, a excepción de la *E. coli* 20/2 presentan entre 6 y 7 bandas plasmídicas, de las cuales solamente una exhibe un tamaño mayor a 152Kb, se estima el tamaño de dos entre 54Kb y 151Kb, una ligeramente menor a 54Kb y los restantes todos de bajo peso molecular (menor a 7,2Kb o 4,7MDa aprox.). Para la 20/2 se observa un patrón de solamente 4 bandas, siendo dos de ellas de alto peso molecular (mayor a 50Kb o 33MDa) y dos de bajo peso molecular. En estos aislamientos, algunas de las bandas se observan difusas, pudiendo indicar tanto la presencia de ADN cromosomal no eliminado, o bien conformaciones alternativas de los plásmidos.

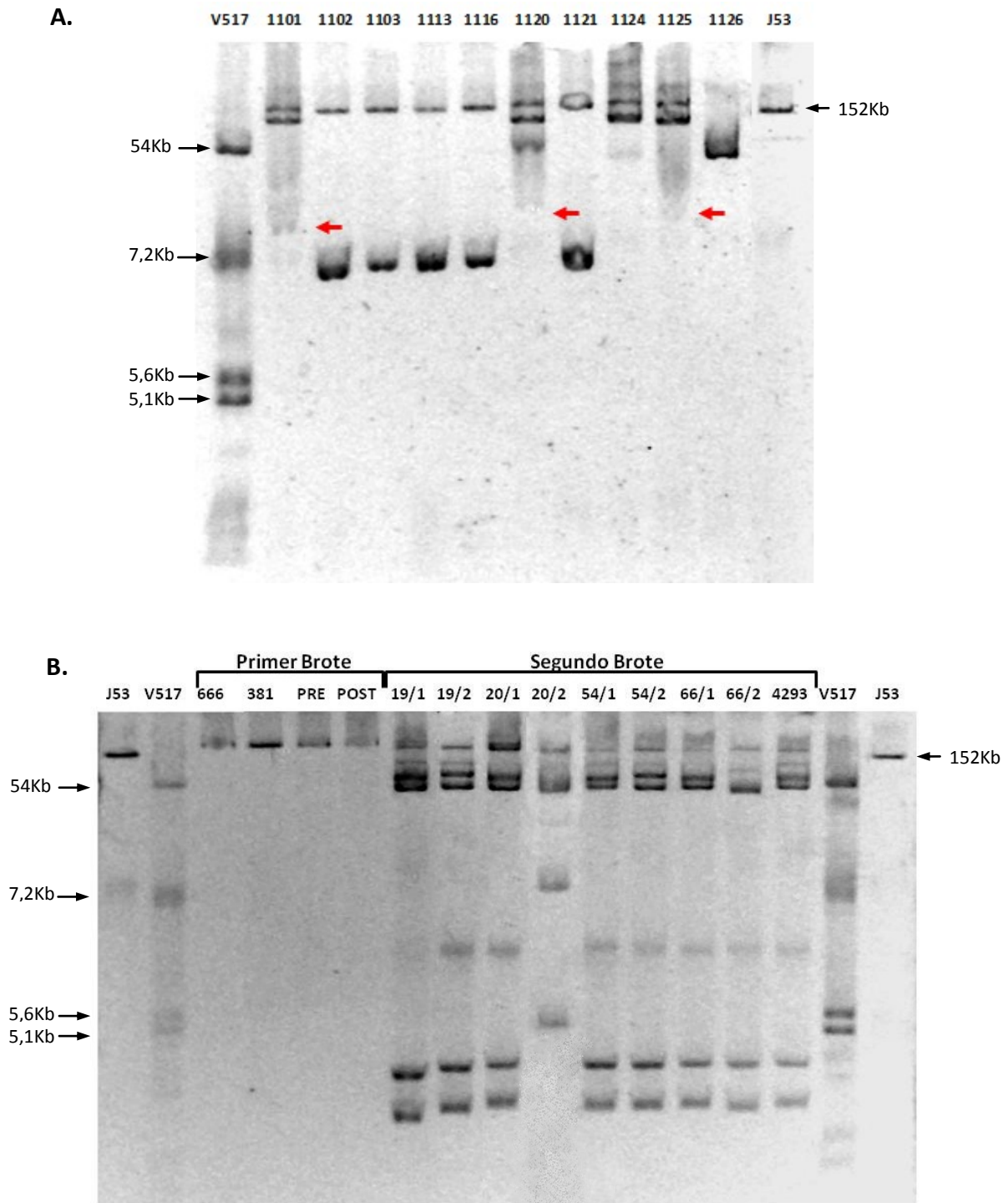


Figura 10. Perfil plasmídico obtenido por extracción de plásmidos pesados. Se muestran geles de agarosa al 0.9% teñidos con bromuro de etidio y fotografiados a las 24hs de permanecer en agua destilada a 4°C. **A.** Aislamientos productores de CTX-M-15. El primer y último carril corresponden a las cepas de *E. coli* utilizadas como controles: V517 (plásmidos de 2.1Kb, 2.7Kb, 3Kb, 3.9Kb, 5.1Kb, 5.6Kb, 7.2Kb y 54Kb); J53 (1 plásmido de 152Kb). Las flechas rojas indican las bandas concordantes con ADN cromosomal. **B.** Aislamientos productores de KPC. Los primeros y los últimos dos carriles corresponden a los controles (Idem 7A).

Al analizar las cepas involucradas en los ensayos de conjugación, se observa claramente que la cepa *E. coli* TOP utilizada como receptora no exhibe plásmidos, mientras que cada una de las TCs evidencia la presencia de un único plásmido, el cual coincide con uno de los provenientes de los aislamientos dadores (Fig. 11).

Teniendo presente que el plásmido transferido pudo ser tipificado por PCR como perteneciente al grupo de incompatibilidad plasmídica IncN, y contemplando el perfil de plásmidos que se obtuvo para la cepa dadora del gen *bla*_{KPC-2} (20/2) y su respectiva transconjugante (TC f) (ver Fig. 11B) se puede concluir que el gen de interés se encuentra localizado en un plásmido de aproximadamente 50Kb.

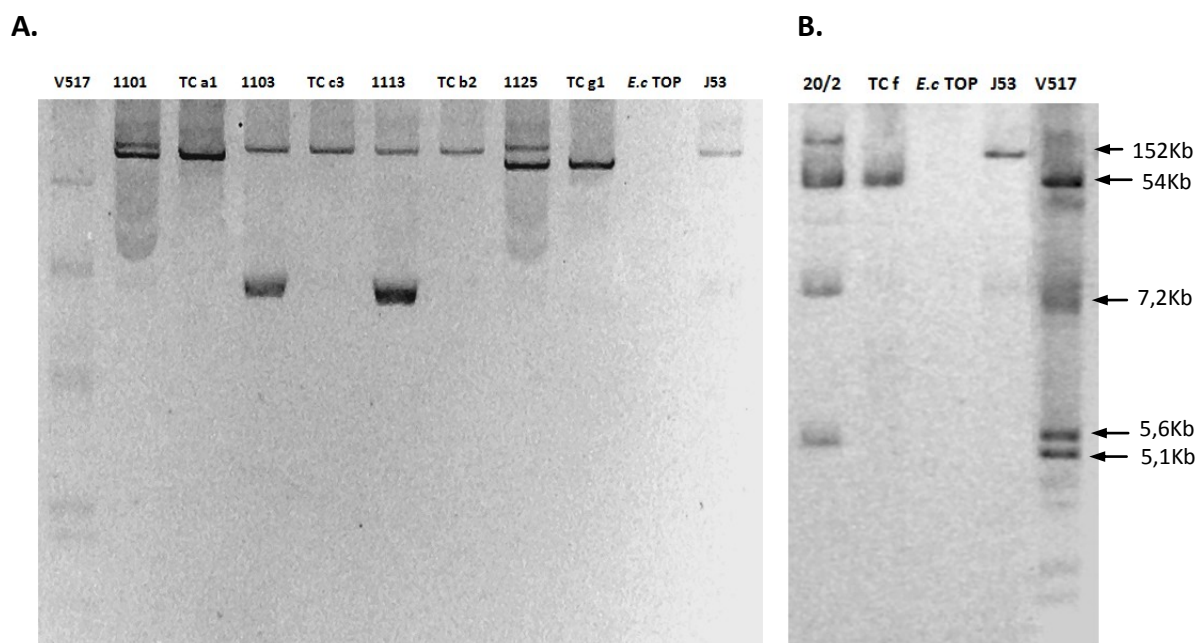


Figura 11. Perfil plasmídico de aislamientos empleados en los ensayos de conjugación y sus respectivos transconjugantes. A. Aislamientos dadores del gen *bla*_{CTX-M-15} (1101, 1103, 1113 y 1125), aislamientos transconjugantes (indicados como TC, cada uno en el carril a la derecha de su correspondiente parental) y aislamiento receptor (*E. coli* TOP). En el primer y último carril se muestran los controles de peso molecular plasmídico (ver sección 3.2 y Fig. 10). **B.** Aislamiento dador del gen *bla*_{KPC-2} (20/2), su correspondiente transconjugante (TC f) y aislamiento receptor (idem 8A). Los últimos dos carriles muestran los controles de peso molecular.

La imposibilidad de tipificar molecularmente los plásmidos de las cepas dadoras de CTX-M-15 tuvo como consecuencia el no poder tipificar tampoco el plásmido transferido. Solamente se puede inferir que en los casos de los aislamientos del pulsotipo B (1103 y 1113) el plásmido transferido parece ser del mismo tamaño, y

rondar los 150Kb. Para los aislamientos del pulsotipo A (1101 y 1125) el plásmido transferido parece diferir ligeramente en tamaño (más pequeño el correspondiente al aislamiento 1125) aunque en ambos casos se trata de un plásmido de alto peso molecular (mayor a 54Kb).

4.5 Objetivo 5: Análisis de porinas y expresión de KPC

Como fue mencionado en la sección 3.9, los experimentos realizados para cumplir con este objetivo de la tesis fueron realizados durante una pasantía de investigación en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España. La selección de los aislamientos a estudiar se realizó en Uruguay teniendo como requisito, que las cepas seleccionadas poseyeran diferentes perfiles de sensibilidad a antibióticos y diferente perfil genético de genes de resistencia a β -lactámicos (Tabla 3).

Al arribar al laboratorio en el hospital mencionado, se me informó que se le habían realizado nuevamente los perfiles de sensibilidad con el sistema Vitek 2 con el fin de verificar que los aislamientos conservaran los mismos perfiles. Lamentablemente los resultados indicaron que algunas de las cepas habían perdido algunos de los genes de resistencia, ya que los perfiles de sensibilidad diferían enormemente de los originales (Tabla 15). Asimismo, una vez allí realicé PCRs confirmatorias para las familias de enzimas CTX-M y KPC, lo cual permitió verificar los datos de sensibilidad.

A este respecto, es importante recordar que los aislamientos nombrados como /1 y /2 correspondientes al segundo brote de KPC, referían a colonias morfológicamente diferentes a partir de una misma muestra. La mayoría resultaron ser el mismo tipo de microorganismo (*K. pneumoniae*) con perfil de sensibilidad diferente. Ambas morfologías fueron reaisladas y conservadas a -20°C como aislamientos diferentes. Como fuera explicitado en el apartado de Materiales y Métodos, por este motivo, a lo largo de esta tesis se han mencionado como cepas distintas.

Una vez con los aislamientos en el laboratorio receptor, además de la peculiaridad de demostrar perfiles de sensibilidad a antibióticos y genes de resistencia diferente a los originalmente caracterizados en Uruguay, se evidenció nuevamente la

diferenciación morfológica de colonias a partir del cultivo puro del aislamiento 19/1. Esta diferenciación fue evidente en placas de Agar Sangre con más de 72hs de sembradas, y mantenidas a temperatura ambiente. Primeramente se pensó en una contaminación, a pesar de que esta posibilidad parecía poco probable ya que la doble morfología se hacía evidente debajo de una colonia aislada, tal y como fuera reportado anteriormente. Se decidió por tanto reaislar ambas morfologías, las cuales a las 24hs de sembradas en Agar Sangre mantuvieron morfologías diferentes (Fig. 12). Una de estas morfologías, parecía involucrar colonias más brillantes y de bordes definidos, con forma de cúpula, y se le denominó 19/1B. La otra morfología reflejaba colonias más claras, achatadas y de bordes más irregulares, y se le denominó 19/1C. A partir de esta siembra de 24hs se las sometió al análisis por el sistema Vitek 2 y se demostró que a pesar de categorizarse como el mismo bionúmero y la misma especie y sub-especie, la sensibilidad a antibióticos difería (Tabla 15) aunque ambas exhibían un fenotipo resistente a los carbapenemes (y por PCR se corroboró la presencia del gen *bla_{KPC}*). Si bien el aislamiento ahora denominado 19/1B presentó un perfil de sensibilidad muy similar al 19/1 de Uruguay, el 19/1C difería enormemente del 19/2 en tanto que este último era resistente a la mayoría de los β -lactámicos, incluidos los carbapenemes mientras que el 19/1C sólo evidenció resistencia a carbapenemes. Esto descartaría que se tratara de la misma diferenciación morfológica observada inicialmente en el Hospital Militar.

El aislamiento 19/2 parece ser el que sufrió mayores cambios fenotípicos ya que el caracterizado en Uruguay poseía las enzimas CTX-M-15 y KPC-2 y concordantemente presentaba un perfil de resistencia a β -lactámicos (incluidos los carbapenemes), mientras que el caracterizado en Santander (19/2 SDR) evidenció ser sensible a todos ellos y carecer de los genes codificantes para ambas enzimas (Tabla 15).

Si bien los aislamientos mencionados fueron los que presentaron mayores diferencias (iluminadas en anaranjado y rojo en la Tabla 15), otras variaciones menores se observaron en cuanto a los datos de sensibilidad en las cepas PRE, 19/1, 19/2 y 20/1 (iluminadas en amarillo en la Tabla 15). No obstante, los cambios iluminados en amarillo y naranja, se encuentran dentro de la reproducibilidad de la técnica de microdilución.

Tabla 15. Aislamientos clínicos *K. pneumoniae* seleccionados para el estudio de expresión de porinas. Diferencias genotípicas y fenotípicas entre los enviados a España y los analizados allí.

Aislamiento #	Pulsotipo	BLEE §	PCR			Sensibilidad a ATB (CIMs expresadas en µg/mL) ●									
			CTX-M	KPC	TZP	FOX	CTX	CAZ	FEP	IPM	AMK	GEN	NAL	CIP	SXT
PRE (B1)	C	(-)	(-)	(+)	R (≥128)	R (≥64)	R (16)	R (16)	S (8)	R (≥16)	I (32)	R (≥16)		R (≥4)	
PRE SDR	ND ¥	(-)	(-)	(+)	R (≥128)	R (≥64)	R (16)	R (≥64)	I (16)	R (≥16)	S (16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (80)
POST (B6)	C	(-)	(-)	(+)	R (≥128)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	R (≥64)	R (≥16)		R (≥4)	
POST SDR	ND	(-)	(-)	(+)	R (≥128)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥16)	S (16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (80)
19/1	D	(+)	(-)	(+)	R (≥128)	I (16)	R (4)	R (≥64)	I* (2)	I (2)	I* (4)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
19/1B SDR	ND	(+)	(-)	(+)	R (≥128)	R* (16)	R (4)	R (16)	R* (2)	R (8)	S (4)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
19/1C SDR	ND	(-)	(-)	(+)	R (≥128)	S (≤4)	S (≤1)	S (4)	S (≤1)	R (≥16)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	S (≤20)
19/2	D	(+)	(+)	(+)	R (≥128)	R* (16)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	R (4)	I* (4)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
19/2 SDR	ND	(-)	(-)	(-)	S (8)	S (8)	S (≤1)	S (≤1)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	S (≤20)
20/1	D	(-)	(-)	(+)	R (≥128)	R (≥64)	R (16)	R (16)	I (16)	R (≥16)	I* (16)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
20/1 SDR	ND	(+)	(-)	(+)	R (≥128)	I (16)	R (4)	I (8)	I* (2)	R (8)	S (≤2)	R (≥16)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1101	A	(+)	(+)	(-)		R (32)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	S (≤1)	R (≥64)	S (≤1)		R (≥4)	R (≥320)
1101 SDR	ND	(+)	(+)	(-)	R (≥128)	R (32)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	S (≤0,25)	R (≥64)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1104	ND	(-)	(-)	(-)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1104 SDR	ND	(-)	(-)	(-)	S (≤4)	S (≤4)	S (≤1)	S (≤1)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	S (4)	S (≤0,25)	S (≤20)

Aislamientos con el sufijo SDR son los analizados en España; ¥ No Determinado; § Resultado del Vitek 2; ● Iluminados en amarillo y anaranjado se muestran los perfiles de sensibilidad a β-lactámicos con cambios de CIM (amarillo: cambios de un orden o dentro de una misma categoría; anaranjado: cambios de categoría); Iluminación en rojo: Indica cambios genotípicos; I*: Intermedio modificado; R*: Resistente modificado

A.**B.**

Figura 12. Diferente morfología de colonia del aislamiento 19/1 analizado en España en placas de Agar Sangre. A. Aislamiento 19/1B, morfología de colonia brillante, con cúpula y bordes definidos. **B.** Aislamiento 19/1C, morfología de colonia clara, de superficie achatada y bordes irregulares.

Las diferentes morfologías de colonia, que evidenciaron diferencias claras a nivel genotípico y fenotípico, fueron entonces tratadas como aislamientos independientes. Se les extrajo ADN para los estudios genéticos, y se los subcultivó periódicamente para conservar los distintos fenotipos. Asimismo la morfología de colonia fue verificada previamente a la extracción plasmídica y a la extracción de proteínas de membrana externa.

Adicionalmente a los estudios de caracterización plasmídica y de porinas de estos aislados, se realizó la caracterización por detección mediante PCR de otras enzimas modificadoras de aminoglucósidos ya que en el Servicio de Microbiología del HUMV contaba con los cebadores para ello. A partir de resultados de microdilución llevados a cabo por un estudiante de dicho servicio (Anexo III), realicé las PCRs correspondientes a fin de corroborar el fenotipo de resistencia a aminoglucósidos con el genotipo. Así es que se encontró el gen *aph(3')-Ia* en casi todos los aislamientos a excepción del 1104; el gen *aac(3)-IIa* únicamente en los productores de KPC del segundo brote mientras que el *aac(3)-IVa* se halló solamente en los del primer brote. Estos resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Genes asociados con la generación de resistencia a diferentes antibióticos pertenecientes a la clase de los aminoglucósidos hallados en los aislamientos estudiados en el HUMV.

Aislamiento	Genes de resistencia a Aminoglucósidos									
	K,Nm	K, G, T	K, G, T, Nt	K, T, Ak, Nt	K, T, Ak	G	G, T, Nt, Nm	G, T, Nt	K, Nm, Ak	
	<i>aph(3')-Ia</i>	<i>aph(3')-IIa</i>	<i>ant(2')-Ia</i>	<i>aac(3)-IIa</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>ant(4')-IIa</i>	<i>aac(3)-Ia</i>	<i>aac(2')-Ia</i>	<i>aac(3)-IVa</i>	<i>aph(3')-VIa</i>
1101	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>aac(6')-Ib</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1104	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
19/1B	(+)	(-)	(-)	(+)	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
19/1C	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
19/2	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
20/1	(+)	(-)	(-)	(+)	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PRE	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>aac(6')-Ib</i>	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
POST	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>aac(6')-Ib</i>	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)

K: Kanamicina; Nm: Netilmicina; G: Gentamicina; T: Tobramicina; Ak: Amicacina

Con el fin de corroborar que las variaciones en los fenotipos, tanto entre los diferentes aislados de la cepa 19/1, como entre los de Uruguay y los analizados en España, pudieran verse reflejadas por pérdida de genes contenidos en plásmidos, se realizó la extracción de plásmidos pesados de todas las cepas involucradas. En primera instancia se realizó la técnica en el laboratorio receptor (Fig. 13A), donde se pudieron apreciar bandas plasmídicas más definidas en todos los casos, a excepción de las cepas PRE y POST que, a pesar de repetir la técnica en varias ocasiones, no se observó banda alguna. Comparando el perfil de bandas para los aislamientos 1101 y 20/1 de la Figura 10A y 10B respectivamente, versus el perfil que se observa en la Figura 13A, se puede concluir que son idénticos. En el caso del aislamiento 19/2 ocurre todo lo contrario, apreciándose una disminución en la cantidad de bandas del aislamiento de España (Fig. 13A).

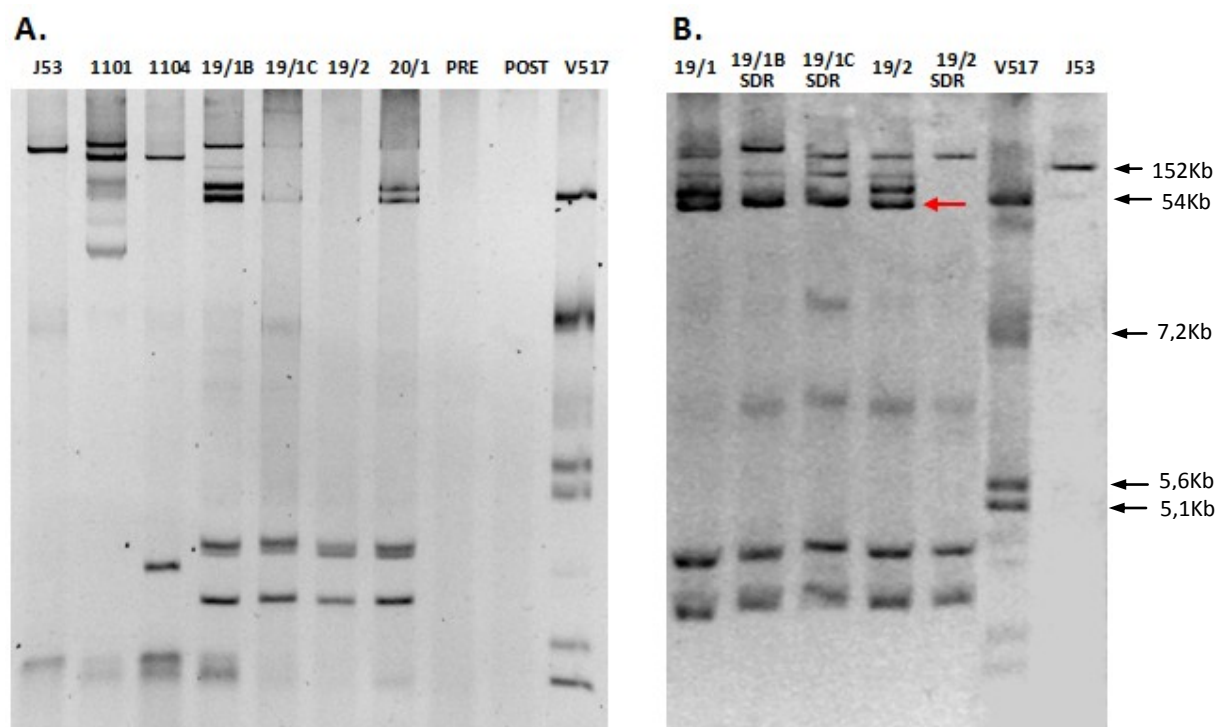


Figura 13. Perfil plasmídico de aislamientos para estudio de porinas. **A.** Plásmidos extraídos en España y corridos en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0,9%, con tinción posterior con bromuro de etidio. En el primer y último carril se observan los controles de peso molecular plasmídico. **B.** Plásmidos extraídos en Uruguay a partir de cepas discordantes enviadas desde España. La corrida electroforética se realizó en un gel de agarosa al 0,9% y fue también teñido posterior a la corrida con bromuro de etidio. En los últimos dos carriles se muestran los controles de peso molecular plasmídico. Con una flecha roja se indica el plásmido que probablemente sea el portador de *bla*_{KPC-2}.

En segunda instancia, y habiendo enviado los aislamientos 19/1B, 19/1C y 19/2 SDR hacia Uruguay, realicé la misma extracción en la Cátedra de Microbiología Clínica en conjunto con las cepas “originales” a modo de poder compararlas (Fig. 13B). Claramente se observa que las cepas 19/2 son diferentes en el contenido plasmídico, conteniendo la 19/2 SDR cuatro bandas menos que su “parental” de Uruguay. La banda de alto peso molecular que se observa en la Fig. 13B correspondiente a la cepa 19/2 SDR y que no se observó en la misma cepa en la extracción de España (Fig. 13A) puede reflejar un tratamiento de la muestra menos cuidadoso en el segundo caso y coincide con no haber podido recuperar plásmidos de peso similar en las cepas PRE y POST.

Con respecto a las cepas 19/1B y 19/1C analizadas en Uruguay, los perfiles parecen ser similares, con la única diferencia de que la 19/1B evidenció un plásmido de alto peso molecular con una migración más lenta en el gel, que el de mayor peso molecular de la cepa 19/1C. Asimismo, parecen diferenciarse de su correspondiente cepa “parental” (19/1) en un único plásmido (Fig. 13B). Curiosamente, esta banda sí se observa en la extracción realizada en España, lo cual podría sugerir, por una parte, que se haya degradado en la extracción en Uruguay, o bien que ese plásmido se haya perdido.

4.5.1 Análisis de secuencias de los genes *ompK35* y *ompK36*

El gen ***ompK35*** no pudo ser amplificado en los aislamientos 19/1B, 19/1C, 19/2 SDR y 20/1 SDR. Con los cebadores externos F1 y R1 solamente se amplificaron exitosamente los aislamientos 1101, 1104, PRE y POST (todos SDR). Es así que se utilizaron los cebadores internos F2 y R2, en combinación con los externos para determinar qué región podría estar interfiriendo con una correcta amplificación. Los resultados evidenciaron que el inconveniente se encontraba en el extremo 5' del gen (de acuerdo a su dirección de transcripción), ya fuera porque el cebador F1 no hibridaba correctamente, o porque se encontrara una secuencia de inserción en dicha región que no fuera detectada con la extensión utilizada en la PCR (2 minutos). Por lo tanto, primeramente se decidió incrementar el tiempo de extensión hasta 5 minutos, lo cual de todos modos no rindió amplicones. En segundo lugar, en

colaboración con el Dr. Alain Ocampo-Sosa, diseñamos un cebador externo alternativo (outF) para descartar la opción de que el cebador F1 fuera el que no hibridaba. Sin embargo, una vez más los resultados fueron desalentadores (no ocurrió amplificación).

El análisis de las secuencias correspondientes al gen *ompK35* de los aislamientos 1101, PRE y POST reveló una inserción de una G en la posición 123, la cual genera un corrimiento del marco abierto de lectura y consecuentemente un codón STOP prematuro en la posición 89 - nucleótidos 265-267 (Fig. 14). La secuencia correspondiente a la cepa 1104 reveló únicamente tres mutaciones silenciosas (nucleótidos 294, 303 y 786) sin corrimiento del marco de lectura.

El gen ***ompK36*** se pudo amplificar exitosamente en todos los aislamientos estudiados. Con los cebadores F1 y R1 se amplificaron todos los aislamientos a excepción del 1101. En este caso se procedió como para el gen *ompK35*, en cuanto a que se optó por mapear con cebadores internos las regiones amplificables, determinando así una vez más, que la región que no amplificaba era la 5' del gen. Frente a este resultado, se decidió incrementar la extensión de la PCR, y al dar éste resultado negativo, se diseñó para este caso también otro cebador externo alternativo (outR). Esta PCR arrojó asimismo resultados negativos. Por tanto, ya en Uruguay, se utilizó otro set de cebadores, reportados previamente (Kaczmarek *et al.*, 2006), pudiéndose amplificar sin problemas el gen correspondiente a la cepa faltante (1101).

A excepción de la secuencia correspondiente al aislamiento 1104 (se discutirá más adelante), en las restantes se evidenciaron mutaciones no sinónimas. Dos de ellas fueron encontradas en todos los aislamientos (Pro157Val y Arg328His). Otras dos fueron exclusivas del aislamiento 19/2 SDR (Asp336Asn y Val337Met), en tanto que la sustitución Val343Gly fue hallada en las cepas 19/1B, 19/1C y 19/2 SDR (Fig. 15).

Con excepción de la sustitución de un ácido aspártico (D) por una asparagina (N) en el aminoácido 336 de OmpK36 del aislamiento 19/2 SDR, las demás implican todas ellas cambios por aminoácidos con similares propiedades fisicoquímicas

	10	20	30	40												
1	M	M	K	R	N	I	L	A	V	V	I	P	A	L	L	GU945385.1
1	ATG	ATG	AAG	CGC	AAT	ATT	CTG	GCA	GTG	GTG	ATC	CCT	GCC	CTG	CTG	1104_ompK35_gene
1	M	M	K	R	N	I	L	A	V	V	I	P	A	L	L	PRE_ompK35_gene
1	ATG	ATG	AAG	CGC	AAT	ATT	CTG	GCA	GTG	GTG	ATC	CCT	GCC	CTG	CTG	1101_ompK35_gene
1	M	M	K	R	N	I	L	A	V	V	I	P	A	L	L	POST_ompK35_gene
1	ATG	ATG	AAG	CGC	AAT	ATT	CTG	GCA	GTG	GTG	ATC	CCT	GCC	CTG	CTG	
1	M	M	K	R	N	I	L	A	V	V	I	P	A	L	L	
1	ATG	ATG	AAG	CGC	AAT	ATT	CTG	GCA	GTG	GTG	ATC	CCT	GCC	CTG	CTG	
	50	60	70	80	90											
46	V	A	G	A	A	N	A	E	I	Y	N	K	N	G		GU945385.1
46	GTA	GCC	GGT	GCA	GCC	AAC	GCT	GCA	GAA	ATC	TAT	AAC	AAA	AAC	GGC	1104_ompK35_gene
46	V	A	G	A	A	N	A	E	I	Y	N	K	N	G		PRE_ompK35_gene
46	GTA	GCC	GGT	GCA	GCC	AAC	GCT	GCA	GAA	ATC	TAT	AAC	AAA	AAC	GGC	1101_ompK35_gene
46	V	A	G	A	A	N	A	E	I	Y	N	K	N	G		POST_ompK35_gene
46	GTA	GCC	GGT	GCA	GCC	AAC	GCT	GCA	GAA	ATC	TAT	AAC	AAA	AAC	GGC	
46	V	A	G	A	A	N	A	E	I	Y	N	K	N	G		
46	GTA	GCC	GGT	GCA	GCC	AAC	GCT	GCA	GAA	ATC	TAT	AAC	AAA	AAC	GGC	
	100	110	120	130												
91	N	K	L	D	F	Y	G	K	M	V	G	E	H	V	W	GU945385.1
91	AAC	AAA	CTG	GAC	TTC	TAT	GGA	AAA	ATG	GTC	GGC	GAG	CAC	GTC	TGG	1104_ompK35_gene
91	N	K	L	D	F	Y	G	K	M	V	G	E	H	V	W	PRE_ompK35_gene
91	AAC	AAA	CTG	GAC	TTC	TAT	GGA	AAA	ATG	GTC	GGC	GAG	CAC	GTC	TGG	1101_ompK35_gene
91	N	K	L	D	F	Y	G	K	M	V	G	R	A	R	L	POST_ompK35_gene
91	AAC	AAA	CTG	GAC	TTC	TAT	GGA	AAA	ATG	GTC	GGG	CGA	GCA	CGT	CTG	
91	N	K	L	D	F	Y	G	K	M	V	G	R	A	R	L	
91	AAC	AAA	CTG	GAC	TTC	TAT	GGA	AAA	ATG	GTC	GGG	CGA	GCA	CGT	CTG	
	140	150	160	170	180											
136	T	T	N	G	D	T	S	S	D	D	T	T	Y	A	R	GU945385.1
136	ACC	ACC	AAT	GGC	GAC	ACC	AGC	AGC	GAC	GAT	ACC	ACC	TAT	GCC	CGT	1104_ompK35_gene
136	T	T	N	G	D	T	S	S	D	D	T	T	Y	A	R	PRE_ompK35_gene
136	ACC	ACC	AAT	GGC	GAC	ACC	AGC	AGC	GAC	GAT	ACC	ACC	TAT	GCC	CGT	1101_ompK35_gene
136	D	H	Q	W	R	H	Q	Q	R	R	Y	H	L	C	P	POST_ompK35_gene
136	GAC	CAC	CAA	TGG	CGA	CAC	CAG	CAG	CGA	CGA	TAC	CAC	CTA	TGC	CCG	
136	D	H	Q	W	R	H	Q	Q	R	R	Y	H	L	C	P	
136	GAC	CAC	CAA	TGG	CGA	CAC	CAG	CAG	CGA	CGA	TAC	CAC	CTA	TGC	CCG	
136	D	H	Q	W	R	H	Q	Q	R	R	Y	H	L	C	P	
136	GAC	CAC	CAA	TGG	CGA	CAC	CAG	CAG	CGA	CGA	TAC	CAC	CTA	TGC	CCG	
	190	200	210	220												
181	I	G	L	K	G	E	T	Q	I	N	D	Q	L	I	G	GU945385.1
181	ATC	GGC	CTG	AAA	GGC	GAA	ACT	CAG	ATC	AAC	GAT	CAG	CTG	ATC	GGC	1104_ompK35_gene
181	I	G	L	K	G	E	T	Q	I	N	D	Q	L	I	G	PRE_ompK35_gene
181	ATC	GGC	CTG	AAA	GGC	GAA	ACT	CAG	ATC	AAC	GAT	CAG	CTG	ATC	GGC	1101_ompK35_gene
181	Y	R	P	E	R	R	N	S	D	Q	R	S	A	D	R	POST_ompK35_gene
181	TAT	CGG	CCT	GAA	AGG	CGA	AAC	TCA	GAT	CAA	CGA	TCA	GCT	GAT	CGG	
181	Y	R	P	E	R	R	N	S	D	Q	R	S	A	D	R	
181	TAT	CGG	CCT	GAA	AGG	CGA	AAC	TCA	GAT	CAA	CGA	TCA	GCT	GAT	CGG	
181	Y	R	P	E	R	R	N	S	D	Q	R	S	A	D	R	
181	TAT	CGG	CCT	GAA	AGG	CGA	AAC	TCA	GAT	CAA	CGA	TCA	GCT	GAT	CGG	
	230	240	250	260	270											
226	Y	G	Q	W	E	Y	N	M	D	A	S	N	V	E	G	GU945385.1
226	TAC	GGC	CAG	TGG	GAA	TAC	AAC	ATG	GAC	GCG	TCC	AAT	GTT	GAA	GGT	1104_ompK35_gene
226	Y	G	Q	W	E	Y	N	M	D	A	S	N	V	E	G	PRE_ompK35_gene
226	TAC	GGC	CAG	TGG	GAA	TAC	AAC	ATG	GAC	GCG	TCC	AAT	GTT	GAA	GGT	1101_ompK35_gene
226	L	R	P	V	G	I	Q	H	G	R	V	Q	C	R		POST_ompK35_gene
226	CTA	CGG	CCA	GTG	GGA	ATA	CAA	CAT	GGA	CGC	GTC	CAA	TGT	TGA	AGG	
226	L	R	P	V	G	I	Q	H	G	R	V	Q	C	R		
226	CTA	CGG	CCA	GTG	GGA	ATA	CAA	CAT	GGA	CGC	GTC	CAA	TGT	TGA	AGG	
226	L	R	P	V	G	I	Q	H	G	R	V	Q	C	R		
226	CTA	CGG	CCA	GTG	GGA	ATA	CAA	CAT	GGA	CGC	GTC	CAA	TGT	TGA	AGG	

Figura 14. Alineamiento de secuencias del gen *ompK35*. La secuencia de referencia corresponde al número de acceso al NCBI GU945385.1 (359 AA). Se muestra el alineamiento hasta el nucleótido 270 (aminoácido 80). En amarillo se ilumina la región con secuencia diferente a la referencia. El recuadro rojo indica la inserción en la posición 123 y el recuadro azul indica el codón STOP prematuro. Alineamiento obtenido utilizando Lasergene MegAlign Pro Software (DNASTAR, Inc.).

(hidrofóbicos por hidrofóbicos, hidrofílicos cargados positivamente por hidrofílicos de igual carga). En este caso se sustituye un aminoácido polar ácido (D) por uno polar neutro (N).

En lo que respecta a la secuencia aminoacídica de OmpK36 del aislamiento 1104, sorprendentemente parece ser dos aminoácidos más corta que la secuencia de referencia (número de acceso al NCBI: KC534867.1). Si solamente tomamos en cuenta la proteína sin los primeros 21 aminoácidos, que corresponden al péptido señal, la del 1104 carece de 3 aminoácidos en las posiciones 163-165. Asimismo, y más extraordinario aún es la falta de conservación de 10 de los residuos a partir de la posición 171 así como la inserción de una arginina (R) en posición 288 (Fig. 15)

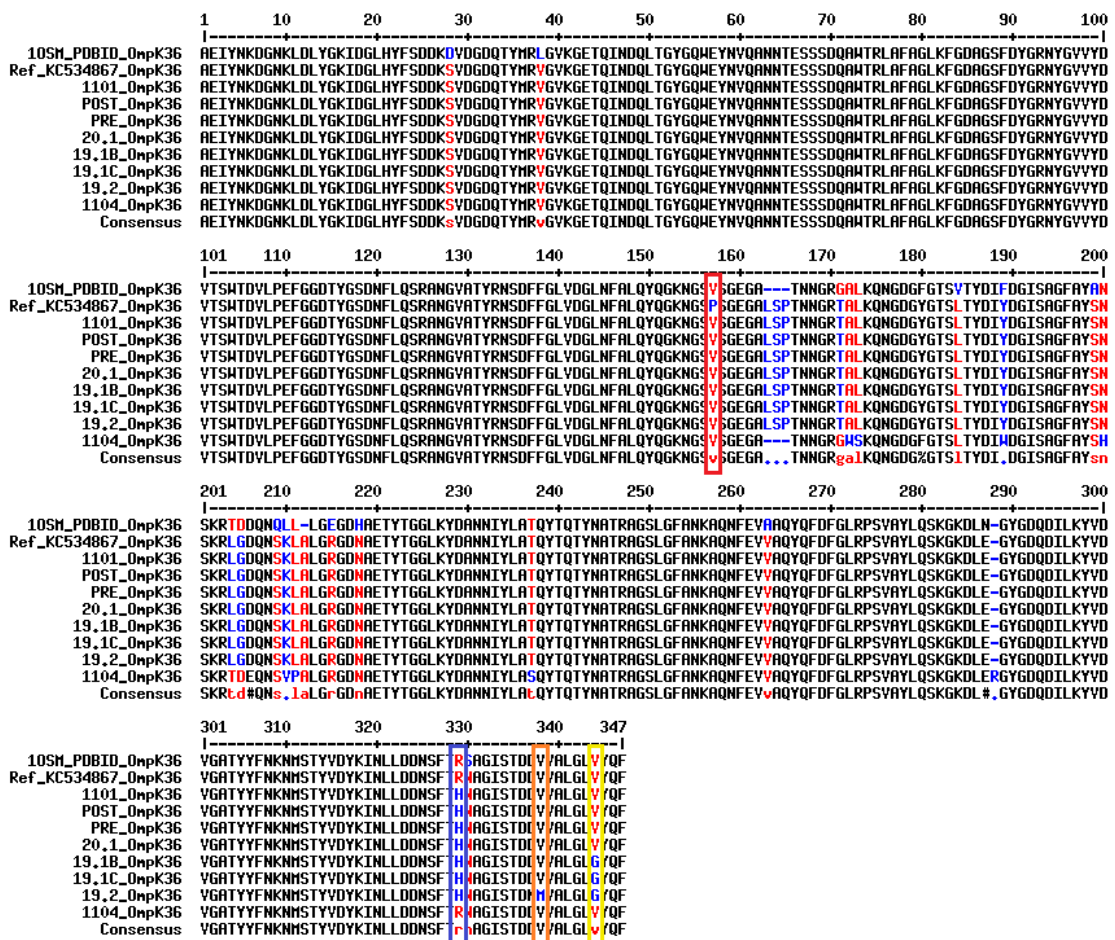


Figura 15. Alineamiento aminoacídico de las secuencias de OmpK36 de los aislamientos estudiados. La secuencia Ref_KC534867 es la secuencia utilizada como referencia de gen funcional (Shoma, Kamruzzaman, Ginn, Iredell, y Partridge, 2014). 10SM_PDBID corresponde a la secuencia de la proteína cristalizada. En negro se muestran las posiciones que son altamente conservadas (>90%), aquellas que exhiben baja conservación se muestran en rojo (<50%), y en azul las posiciones neutras. En la secuencia consenso (“Consensus”) se muestran en mayúsculas las posiciones altamente conservadas, en minúscula aquellas poco conservadas y con un punto las que no presentan residuos conservados. Los recuadros indican las sustituciones mencionadas en el texto (rojo: Pro157Val; azul: Arg328His; anaranjado: Val337Met; amarillo: Val343Gly). La proteína consta de 367AA; aquí se muestra la secuencia sin el péptido señal. El software utilizado fue el MultAlin (Corpet, 1988).

Si se analiza en qué región de la proteína mapean estas sustituciones comparando con la secuencia correspondiente al ejemplar cristalizado (PDB ID: 1OSM), se observa que la mitad de ellas se localizan en estructuras secundarias definidas, como α -hélices (Arg328His) u hojas- β (Val337Met y Val343Gly) (Fig. 16).

Asimismo, mapeando en la estructura tridimensional (Fig. 17A y 17B) se puede observar que aquellas posiciones con aminoácidos hidrofóbicos (Pro157Val en rojo, Val337Met en anaranjado y Val343G en amarillo) se localizan en regiones en contacto con las otras subunidades del homotrímero, o bien internas en el barril β . Por el contrario, la posición 328 se encuentra más expuesta hacia el borde del poro, lo cual es consistente con su naturaleza hidrofílica (Arg328His en azul). Esto se puede observar tanto en una vista superior (Fig.17A) como en una vista lateral (Fig.17B) de la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína.

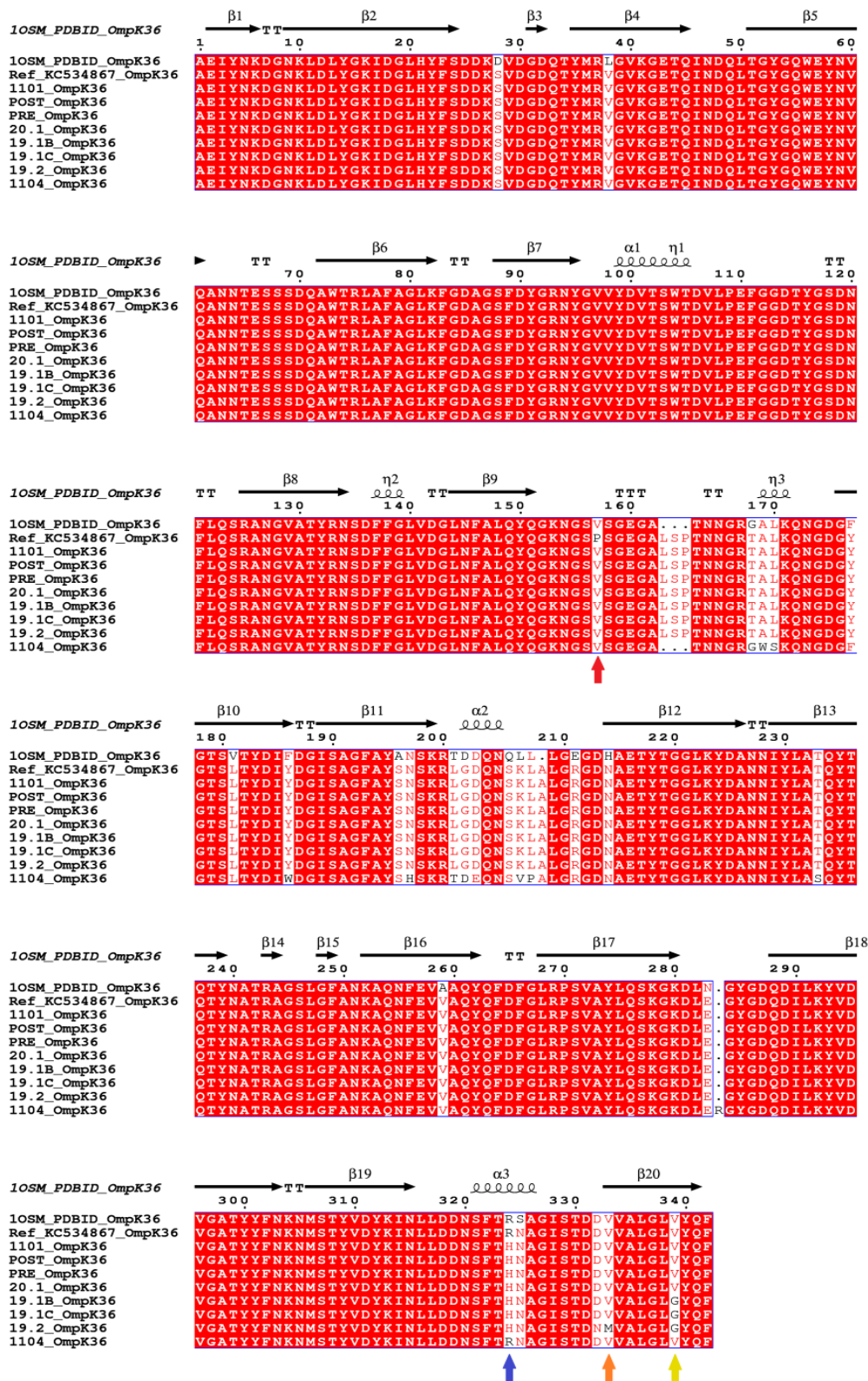


Figura 16. Análisis de secuencias aminoacídicas de OmpK36 en referencia a la estructura secundaria. La secuencia de referencia así como la correspondiente a la estructura cristalizada son iguales a las de la Fig.15. Las flechas de colores indican las posiciones mencionadas en el texto y presentan concordancia de color con los recuadros de la Fig. 15. Las hojas β se mencionan como tales y se indican con flechas negras; las hélices α y 3-10 se indican con ondas y como α ó η , respectivamente. TT indica giros β estrictos (“ β -turns”); TTT indica giros α estrictos (“ α -turns”). Alineamiento realizado con el software en línea ESPript (Robert y Gouet, 2014).

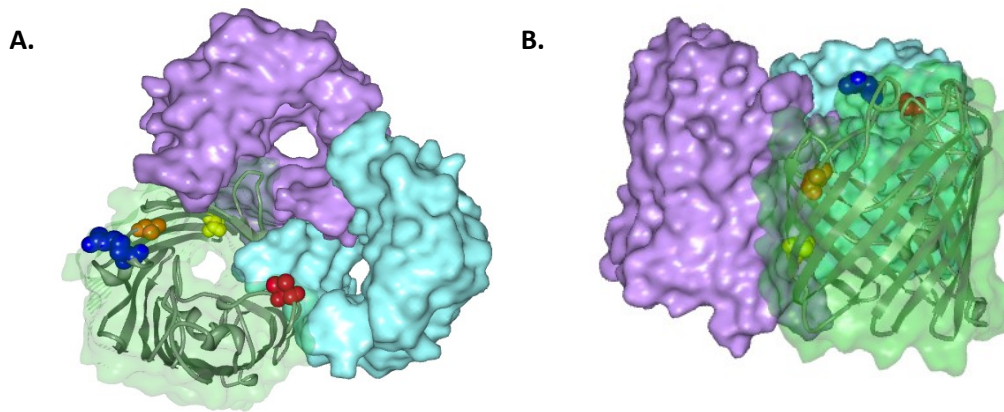


Figura 17. Estructura tridimensional del homotrímero formado por subunidades de OmpK36 mapeando posiciones de sustituciones aminoacídicas. Cada cadena polipeptídica se indica como estructuras de superficie de diferentes colores, mostrándose una de las cadenas con la superficie traslúcida y el esqueleto como cintas reflejando la estructura secundaria de hojas β y hélices α . Se muestran en esferas de colores los átomos correspondientes a los aminoácidos sustituidos en los aislamientos estudiados. Los colores corresponden a los indicados en las Figs. 15 y 16. **A.** Vista superior. **B.** Vista lateral. Imagen de 1OSM (Dutzler *et al.*, 1999), porina OmpK36 de *Klebsiella pneumoniae*, creada con el software Protein Workshop (Moreland *et al.*, 2005).

4.5.2 Expresión relativa de porinas (acumulación de ARNm)

La expresión relativa de cada una de las porinas se calculó con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde el $\Delta\Delta Ct$ es la diferencia de los promedios de Ct's entre el aislamiento estudiado y la muestra empleada como calibrador (control positivo de expresión de ambas porinas: Kp transformante de CSUB10S/pSHA16K), tomando a esta última como expresión arbitraria = 1. Los resultados se muestran como los promedios de los valores obtenidos en los 3 experimentos biológicos con sus correspondientes desviaciones estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con barras y asteriscos en la figura correspondiente, o bien se mencionan en el pie de figura. Es importante destacar que los experimentos se realizaron a partir de crecimiento bacteriano en un medio de alta osmolaridad (MH).

Como se observa en la Figura 18A, la expresión relativa de OmpK35 (medida como la acumulación de mensajeros) evidenció ser muy baja (casi nula) para todos los aislamientos, en comparación con el aislamiento utilizado como calibrador. La diferencia de expresión entre cada uno de los aislamientos versus el calibrador resultó estadísticamente significativa, con un valor $p < 0.0001$ (test de ANOVA de una vía, corrección por test de Bonferroni). Por el contrario, no se observaron diferencias

significativas de expresión entre las medias de pares de aislamientos. En los casos de los aislamientos 1101, PRE y POST esto podría estar relacionado con la alteración del marco de lectura y el codón STOP prematuro, a pesar de que los cebadores hibridan dentro de la región codificante (antes del codón STOP), la estabilidad de esos mensajeros podría verse disminuida por una carencia de ribosomas asociados a los mismos y consecuentemente alterar los niveles de acumulación de mensajeros. Por otra parte, en todos los casos podría estar ocurriendo una represión de la expresión de este ARNm considerando que ya se han reportado casos de disminución de la expresión de OmpK35 en medios de alta osmolaridad.

La variabilidad en los niveles de expresión (acumulación de mensajeros) de OmpK36 resultó ser mayor, y cada aislamiento evidenció niveles comparables al calibrador (Fig. 18B). Realizando el análisis de varianza de una vía, no se detectaron diferencias significativas entre las medias de los aislamientos. Sin embargo, se apreció una diferencia de expresión notoria entre los aislamientos PRE y POST, y considerando que fueron aislados del mismo paciente y mismo sitio de infección (el primero pre-tratamiento antibiótico y el segundo, posterior a la antibiótico-terapia), se decidió analizar si existían diferencias significativas entre las expresiones de ambos independientemente de los demás aislamientos. Para ello se utilizó el test *t* de Student de una cola, el cual reveló que la diferencia de expresión es efectivamente significativa ($p = 0.0098$).

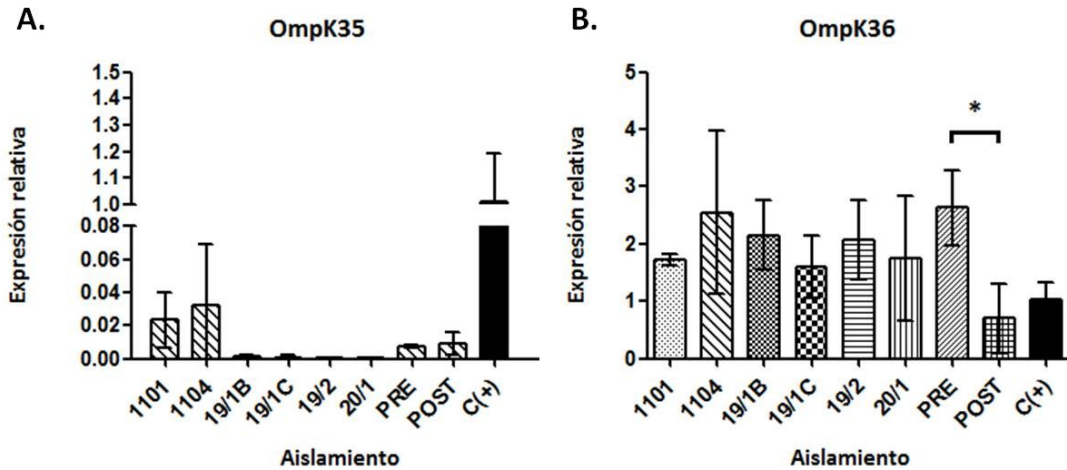


Figura 18. Cuantificación de expresión relativa (niveles de ARNm) de las porinas estudiadas. Se muestran los promedios de las 3 réplicas, de los 3 experimentos y sus desviaciones estándar. Como C(+) se indica el aislamiento utilizado como calibrador. Se utilizó el software GraphPad Prism para la realización gráfica. **A.** Niveles de ARNm de OmpK35. La diferencia de acumulación de mensajeros entre cada uno de los aislamientos y el calibrador resultaron significativas ($p < 0.0001$), no se indican en la figura. El eje de las Y se muestra como dos segmentos que representan rangos de valores diferentes. **B.** Niveles de ARNm de OmpK36. Se indica con una barra horizontal y un asterisco la diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0098$).

4.5.3 Expresión de porinas a nivel proteico

La expresión de las porinas a nivel proteico fue evaluada a partir de crecimiento bacteriano en dos medios de cultivo de diferente grado de osmolaridad: MH (alta osmolaridad) y NB (baja osmolaridad). La decisión de evaluar ambas condiciones se basa en reportes previos que indican una diferencia de expresión de OmpK35 dependiendo de la concentración de solutos en el medio (Domenech-Sanchez *et al.*, 2003; Hernandez-Alles, Alberti, *et al.*, 1999).

Luego de extraer las proteínas de membrana externa, se sembraron alícuotas de 20µl de cada uno de los aislamientos en geles de poliacrilamida al 12%, sin cuantificar el contenido de proteínas totales extraídas. Una vez obtenidos los resultados (datos no mostrados) se evidenció que la concentración proteica era elevada y por lo tanto se dificultaba la discriminación de algunas de las bandas. Consecuentemente, con el objetivo de obtener bandas definidas, se decidió cargar la mitad del volumen sembrado en el caso anterior, y además utilizar geles comerciales al 12%. Como controles positivo y negativo de expresión de ambas porinas se

utilizaron los aislamientos Kp transformante de CSUB10S/pSHA16K y CSUB10R, respectivamente (Domenech-Sanchez *et al.*, 2003).

Como se observa en los geles de la Figura 19, el control positivo expresa ambas porinas, siendo éstas las de mayor producción dentro de la variedad de proteínas de membrana externa, dada la intensidad de las bandas. Se advierte, asimismo, similar nivel de expresión de otra porina, la cual sí es producida por el control negativo. Esta porina no fue objeto de estos estudios (OmpA).

Así es que para el ensayo a partir de crecimiento en medio de alta osmolaridad (MH), se aprecia la carencia de la banda superior en todos los aislamientos, mientras que la banda inmediatamente inferior se observa en casi todos los casos con una gran intensidad (Fig. 19A). La excepción parece ser en la cepa POST, en la cual la banda es muy tenue. Prácticamente el mismo patrón de expresión se visualiza para los aislamientos crecidos en medio de baja osmolaridad (NB), con la única diferencia exhibida por el aislamiento 1104, el cual parece expresar la banda superior (Fig. 19B).

Teniendo en consideración los datos de secuencia de los genes *ompK35* y *ompK36*, así como la acumulación de sus mensajeros, podemos inferir que la banda superior corresponde a la porina OmpK35 y la banda inmediatamente inferior a la porina OmpK36.

Algunos aislamientos (1104 y el 19/1C) reflejaron la expresión de algunas proteínas de bajo peso molecular que parecen no expresarse en los restantes. Su identidad así como su significancia para los fenotipos de resistencia no fue estudiada.

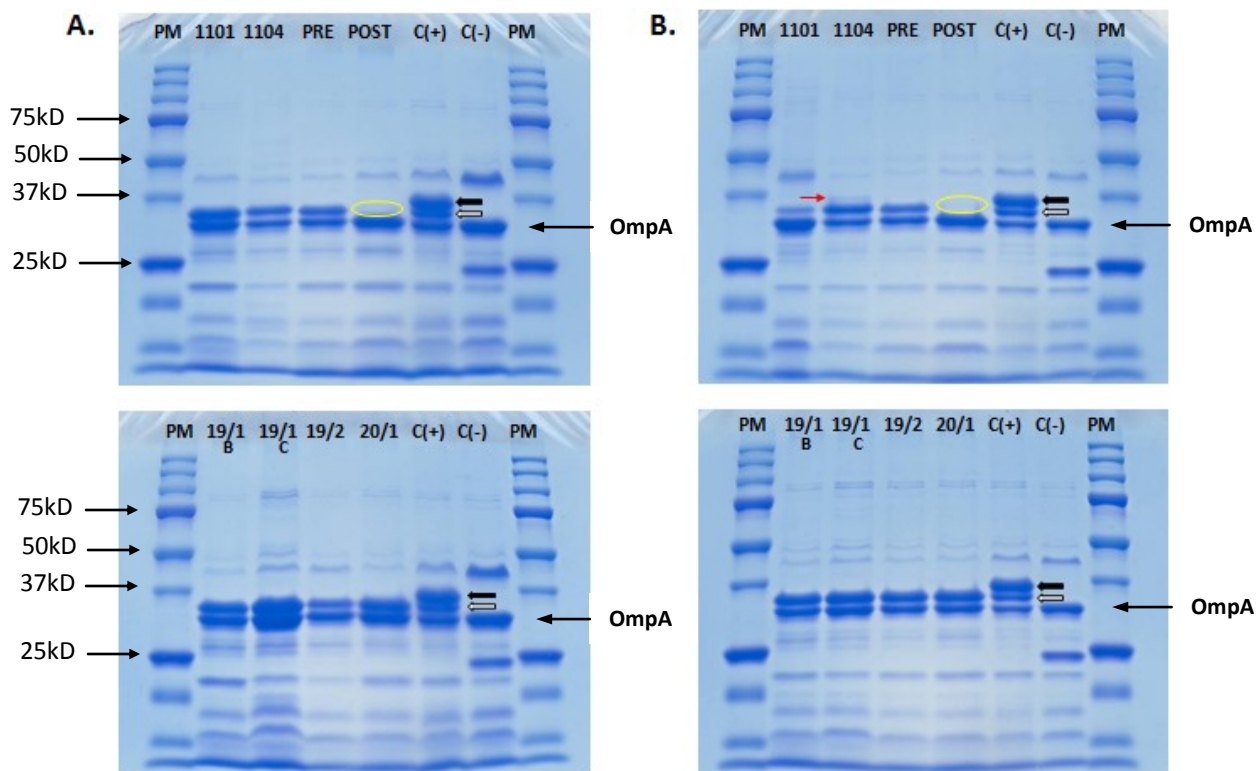


Figura 19. Análisis de proteínas de membrana externa por SDS-PAGE. La corrida se realizó en geles comerciales de poliacrilamida al 12% (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, BIORAD). El revelado se realizó por tinción posterior con Azul de Coomassie. El PM empleado fue el Precision-Plus Protein Dual Color Standards (BIORAD): 250kD, 150kD, 100kD, 75kD, 50kD, 37kD, 25kD, 20kD, 15kD. Como control positivo se utilizó la cepa transformante de CSUB10S/pSHA16K y como control negativo la cepa CSUB10R. Las presuntas porinas OmpK35 (36kDa) y OmpK36 (38kD) se indican con flechas, negra y blanca, respectivamente. También se indica la posición de OmpA (32kD). Los óvalos amarillos indican la banda correspondiente a la porina de expresión reprimida en la cepa POST. **A.** Proteínas extraídas a partir de crecimiento bacteriano en medio de cultivo de alta osmolaridad (MH). **B.** Proteínas extraídas a partir de crecimiento bacteriano en medio de baja osmolaridad (NB). Con una flecha roja se indica la porina cuya expresión aumentó considerablemente en este medio.

4.5.4 Expresión relativa de KPC (acumulación de ARNm)

A pesar de no contar con un calibrador para la cuantificación de la acumulación de mensajeros de *bla_{KPC}*, se decidió igualmente calcular la expresión relativa entre los aislamientos PRE y POST - SDR productores de esta carbapenemasa con el objetivo de analizar otro aspecto que podría influir en el perfil de sensibilidad a β -lactámicos de estas cepas. A estos efectos, se utilizó como calibrador a la cepa PRE.

Cabe mencionar que los estudios de análisis de acumulación del ARNm de *bla_{KPC}* se realizaron también a las otras tres cepas productoras de carbapenemasa (19/1B,

19/1C y 20/1), pero comparar la expresión de éstas contra la de la PRE no sería lo correcto ya que el *background* genético es muy diferente. Sin embargo, a efectos de tener una noción respecto a los niveles de expresión, igualmente se calculó la expresión relativa utilizando la cepa PRE como calibrador. Los datos en su conjunto, obtenidos a partir de tres réplicas en tres experimentos independientes, demostraron una gran desviación estándar (Fig. 20A). Por lo tanto, verificando los valores correspondientes al $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de cada uno de los experimentos, se observó que el primer experimento exhibió valores considerablemente mayores a los de los otros dos experimentos. Removiendo los datos del primer experimento en todos los aislamientos, la desviación estándar se reduce y la tendencia de expresión cambia, mostrando niveles de acumulación de ARNm mayores para las cepas del primer brote de KPC (Fig. 20B). Sin embargo, las diferencias entre las medias no son estadísticamente significativas (ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni, comparando todas las columnas). No se pudo realizar el test *t* de Student entre las cepas PRE y POST ya que con dos réplicas el test no es posible.

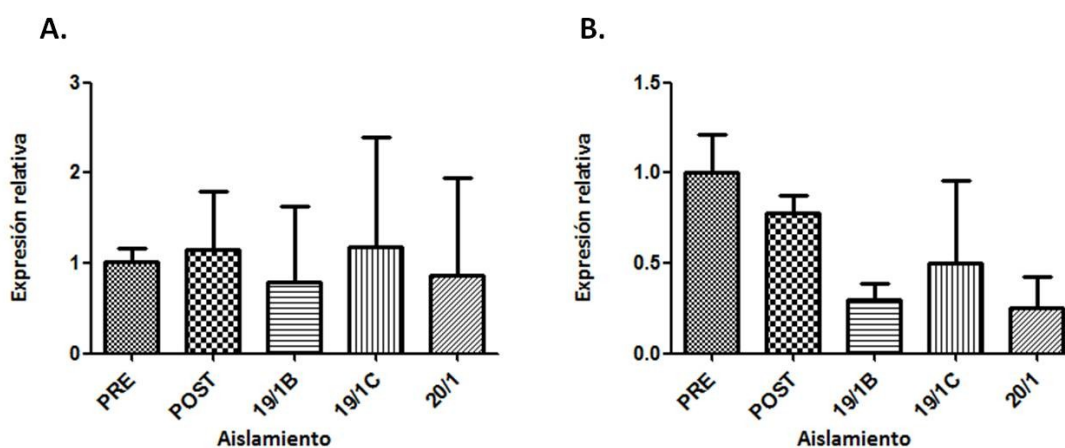


Figura 20. Cuantificación de expresión relativa (niveles de ARNm) de *bla*_{KPC}. **A.** Se muestran los promedios de las 3 réplicas, de los 3 experimentos y sus desviaciones estándar. **B.** Se muestran los promedios de las 3 réplicas, de los experimentos 2 y 3 y sus desviaciones estándar. Las diferencias de las medias no resultaron estadísticamente significativas (valor $p = 0,0796$). En ambos casos se utilizó la cepa PRE como calibrador y el software GraphPad Prism para la realización gráfica.

5. DISCUSIÓN

Como se mencionó en el capítulo 1, existen varios estudios sobre la detección individual de genes de resistencia a antibióticos pero son escasos los que informan sobre la localización de dichos genes en regiones discretas de RMD y sobre el potencial de éstos para co-transferirse a otras bacterias en un único evento de transferencia genética independiente de la co-transferencia mediada por la conjugación o movilización plasmídica. Con el surgimiento de patógenos cada vez más resistentes, se han comenzado a indagar los entornos genéticos de los diferentes genes de resistencia en todo el mundo con el fin de identificar y caracterizar elementos genéticos y regiones que puedan estar involucradas en la amplificación de la multirresistencia a antibióticos. Aún así, el estudio de plataformas genéticas discretas que tengan el potencial de movilizar varios genes de resistencia conjuntamente entre Enterobacterias, no han sido exhaustivamente estudiadas en nuestro país, existiendo unos pocos reportes de aislamientos determinados (Marquez *et al.*, 2008; Roy Chowdhury *et al.*, 2011). Por otra parte, los estudios epidemiológicos sobre BLEEs y carbapenemasas en Enterobacterias provenientes de pacientes hospitalizados en Uruguay se centran en la prevalencia de estas enzimas y su asociación con la presencia de otros genes de resistencia, en algunos casos enmarcados dentro de los extremos de integrones, pero no indagan sobre la asociación física entre éstos por fuera de los entornos del integrón (Bado *et al.*, 2010; Robino *et al.*, 2013).

Es importante recalcar que si bien en nuestro país existe un sistema de vigilancia global en lo que respecta a la emergencia de patógenos multirresistentes, no contempla una caracterización detallada por especie y mecanismos de transferencia de la resistencia, como sí cuentan otros países como Argentina, México, Brasil y Chile (Gales *et al.*, 2012). Nuestro país se encuentra en una situación de endemia de enterobacterias productoras de BLEE y en particular para *K. pneumoniae* estamos también en la etapa de aparición o emergencia de carbapenemasas de la familia KPC. Por lo tanto, esta tesis se planteó con el objetivo último de contribuir al entendimiento de la epidemiología local en lo que refiere a *K. pneumoniae*

productoras de BLEE y/o KPC haciendo énfasis en un abordaje desde un punto de vista molecular integrado que permita aportar conocimientos básicos en lo que respecta a diferentes factores que pueden influir en la diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos en aislamientos locales.

5.1 Caracterización de genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{KPC}

A pesar de que no existen datos publicados sobre la prevalencia de *K. pneumoniae* productoras de BLEE en Uruguay, se ha reportado que la frecuencia de éstas en Latinoamérica varía entre un 33,3% - 60,4% dependiendo del país, siendo Argentina aquel con la tasa de detección más alta (Gales *et al.*, 2012). Hasta el momento en nuestro país, un único estudio realizado a partir de un total de 14 aislamientos de *K. pneumoniae* ha indicado una frecuencia de producción de BLEE cercana al 57% (Robino *et al.*, 2013). Sin embargo este estudio no indaga sobre los contextos genéticos en los cuales está embebido el gen, ni si se asocia físicamente a otros genes de resistencia. Teniendo este reporte como antecedente, y la información regional, se esperaba detectar una frecuencia similar en los aislamientos estudiados. De hecho, nuestros resultados sugieren una frecuencia de *K. pneumoniae* productoras de BLEE de un 46% (Fig. 5) a partir de aislamientos seriados en el tiempo y provenientes de un único centro hospitalario (Hospital Militar). La diferencia que se aprecia con respecto al estudio de Robino *et al.* (2013) puede deberse a diferentes motivos. En primer lugar, al centro hospitalario del cual provinieron los aislamientos (Hospital Pereira Rossell) y en segundo lugar, a las características de los pacientes enrolados en los estudios. En el estudio mencionado la selección de pacientes se restringe únicamente a aquellos pediátricos admitidos o de la unidad de cuidados intensivos, mientras que en el presente trabajo se incluyen pacientes de todas las edades y admitidos en diferentes unidades hospitalarias. Si bien el período del estudio de Robino *et al.* (2013) abarcó un lapso de un año (desde mayo de 2009 a abril de 2010) y uno estaría tentado a pensar que por ello es más representativo, el estudio de esta tesis se ciñó únicamente a un período de 2 meses del año 2011 dada la cantidad de *Klebsiellas* aisladas durante ese período (n=26). La poca cantidad de aislamientos de *K. pneumoniae* recuperados del estudio del Hospital Pereira Rossell probablemente se deba al sesgo de los pacientes seleccionados para el mismo. Estos

factores podrían influenciar la diferencia observada entre las frecuencias. Sin embargo, en ambos casos las frecuencias parecen encontrarse dentro del rango reportado para otros países latinoamericanos, aunque es claro que se debería de contar con un programa de vigilancia adecuado que provea de valores representativos de la población general de nuestro país.

La prevalencia de BLEEs pertenecientes a la familia CTX-M parece mantenerse en valores muy altos en comparación con las BLEEs de otras familias tal y como fuera reportado anteriormente para América Latina (Gales *et al.*, 2012).

Es de destacar que, en lo que refiere a las bacterias productoras de carbapenemasas, la selección de aislamientos fue sesgada a aquellos que provenían de los centros hospitalarios con la sospecha de ser productores de las mismas, por lo cual no se puede inferir ningún tipo de prevalencia. Sin embargo, y como fue mencionado en el capítulo 1 de esta tesis, los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de KPC estudiados correspondieron a las primeras detecciones en nuestro país, y de ahí la importancia de su estudio, a modo de poder generar conocimientos sobre sus modos de transmisión y poder contener los brotes evitando la diseminación de la resistencia.

En lo que respecta al primer objetivo de esta tesis, la caracterización molecular de los genes codificantes para las enzimas CTX-M y KPC reveló la presencia de las variantes CTX-M-15 y KPC-2 respectivamente. La variante CTX-M-15, ampliamente distribuida en Europa, se ha venido reportando en América del Sur cada vez más frecuentemente. En Uruguay fue identificada por primera vez en un aislamiento de *E. coli* del año 2006 (Bado *et al.*, 2010; Cordeiro *et al.*, 2008), mientras que en *K. pneumoniae* fue reportada en aislamientos correspondientes a los años 2008 (Roy Chowdhury *et al.*, 2011) y 2009/2010 (Robino *et al.*, 2013). Hasta el 2008 la variante alélica que pareció predominar en los aislamientos de Enterobacterias en Uruguay fue la CTX-M-2, encontrándose tanto en *E.coli* como en *K. pneumoniae*, y en esta última se detectó el gen embebido en un integrón inusual en 3 aislamientos (Marquez *et al.*, 2008; Vignoli *et al.*, 2006). Otras variantes alélicas tales como CTX-

M-8 y CTX-M-9 también fueron encontradas, aunque en menor proporción, en aislamientos de *K. pneumoniae* (García-Fulgueiras et al., 2011; Robino et al., 2013).

En este contexto, el hallazgo de que todos los aislamientos productores de CTX-M analizados evidenciaran la presencia de la variante CTX-M-15 es sorprendente ya que parece estar sugiriendo una dispersión de dicha variante en nuestro medio. Incluso las 3 cepas productoras de KPC, co-productoras de CTX-M portaron el gen *bla*_{CTX-M-15}. La importancia de este hecho radica en que, tal y como fue estudiado por el grupo de investigación, el mismo gen parece estar circulando en tres clonas diferentes (pulsotipos A, B y D) lo cual descarta un posible sesgo de detección introducido por el análisis de genes preferencialmente diseminados gracias a la circulación de una única clona exitosa. Asimismo, si tenemos en cuenta el dato de los secuencio-tipos obtenidos por MLST, se aprecia que para los aislamientos productores de CTX-M-15, no productores de KPC, la cefotaximasa estaría circulando en los secuencio-tipos ST258 y ST48 (Tabla 1), mientras que en los co-productores estaría circulando en el secuencio-tipo ST437 (Tabla 2). Lo interesante de este hallazgo es el hecho de que el ST258 ha sido asociado comúnmente con aislamientos productores de KPC (Woodford, Turton, y Livermore, 2011) y no con aislamientos productores de CTX-M. Sin embargo, en relación a productores de CTX-M, hasta el momento ha sido descrito en tan solo unos pocos aislamientos productores de CTX-M-2 y CTX-M-25 de los años 2008-2010 en Israel (Adler *et al.*, 2012) y en un productor de CTX-M-15 del año 2012 en Estados Unidos (G. Wang *et al.*, 2013). Asimismo, recientemente fueron reportados varios aislamientos uruguayos de *K. pneumoniae* productores de CTX-M-15 y otras variantes alélicas provenientes del Hospital Pereira Rossell correspondientes al año 2011, como pertenecientes al secuencio-tipo ST258 y otros al ST48 (Bado *et al.*, 2014) (Congreso IAAC 2014). Estos antecedentes estarían indicando que la clona perteneciente al ST258 no solamente podría ser exitosa en la diseminación del gen *bla*_{KPC} sino que también estaría contribuyendo, a nivel local y en conjunto con la clona perteneciente al ST48, a la dispersión de la variante *bla*_{CTX-M-15}, como apoyan asimismo los resultados de esta tesis y de nuestro grupo de investigación.

En cuanto a la variante de la carbapenemasa, como se mencionó anteriormente, tanto en lo que refiere al primer brote como al segundo brote de KPC, resultó ser el mismo alelo codificante para KPC-2. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos aportados por el MLST, se puede concluir que circularon dos clonas diferentes (pulsotipos C y D) correspondientes a dos secuencio-tipos distintos: ST258 ampliamente distribuido a nivel global, y el ST437 (variante en un solo *locus* respecto al ST258), diseminado ampliamente en Brasil (Seki *et al.*, 2011). En lo que refiere al primer brote (ST258), los aislamientos resultaron ser resistentes a colistin además de productores de KPC-2 (Apéndice IV). Otros casos de aislamientos productores de KPC, colistin resistentes pertenecientes al ST258 se han reportado en los últimos años en otros países (Bogdanovich *et al.*, 2011; Kontopoulou *et al.*, 2010; Toth *et al.*, 2010). Aunque poco se conoce sobre las bases genéticas de la resistencia a colistin, al menos en *Salmonella* (un género perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*) parece involucrar mutaciones en un sistema de dos componentes que regula modificaciones de los lipopolisacáridos (Gunn, 2008), por lo cual estaría codificado a nivel cromosomal. Se podría hipotetizar que la clona ST258 estaría dispersa en Uruguay y tendría el potencial de adquirir o perder plásmidos con diferentes genes de resistencia a β -lactámicos y carbapenemes, y ante la presión selectiva del uso de colistin y otras polimixinas podríamos estar favoreciendo la emergencia de aislamientos resistentes a colistin por mutaciones a nivel cromosómico. Sin embargo, aunque esta posibilidad es atractiva, no correspondería a lo ocurrido con los aislamientos del primer brote de KPC, los cuales eran resistentes aún sin haber sometido a los pacientes a un tratamiento con dicha droga. Considerando que el paciente cero o *index* había tenido contacto con el sistema de salud de Estados Unidos, se estima probable una importación de la cepa desde dicho país, donde ya se han reportado casos de *K. pneumoniae* productora de KPC resistente a colistin (Bogdanovich *et al.*, 2011). Sin embargo, no puede descartarse la presencia de aislamientos resistentes en nuestro medio, y que hayan adquirido el gen *bla*_{KPC} de *novo*.

5.2 Caracterización de otros genes de resistencia

Los 12 aislamientos productores de BLEE fueron además evaluados respecto de la presencia de otros genes de resistencia tales como *bla*_{TEM} y *aac6'-Ib* (Tabla 10). De este modo se obtuvo que 5 de ellos codificaban además para *bla*_{TEM-1} (4 de las variantes verificadas por secuenciación y la otra inferida por la plataforma genética detectada de similares características a la cepa U20) y 4 para *aac6'-Ib* (1101, 1120 y 1125 para el alelo salvaje mientras que la 1126 codifica para la variante alélica *aac6'-Ib-cr*). Curiosamente, solamente los tres que portaban el alelo salvaje exhibieron un fenotipo resistente a amicacina (1101, 1120 y 1125) (Tabla 1), sugiriendo que la actividad como enzima modificadora de aminoglucósidos estaría reducida en el aislamiento 1126 que resultó ser sensible o bien que la producción de la enzima no sería suficiente para clasificar al aislamiento como resistente según los criterios clínicos. Esto es consistente con lo ya descrito para este gen, el cual al adquirir la capacidad de acetilar quinolonas como la ciprofloxacina, reduce levemente su actividad frente a los aminoglucósidos (Robicsek *et al.*, 2006). Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de una regulación negativa de la expresión de esta proteína, ya sea por inserciones/deleciones en la región codificante no abarcada con los cebadores utilizados, o bien por modificaciones en la secuencia promotora, entre otros motivos.

Cabe mencionar que el aislamiento 1101 exhibió un patrón de bandas por RFLP (Fig. 6) del gen *aac6'-Ib* consistente con la presencia de ambos alelos (tres bandas: la de mayor peso molecular correspondiente al producto sin digerir, es decir, el alelo *aac6'-Ib-cr*; y dos bandas de menor peso correspondientes al alelo *aac6'-Ib* digerido). Sin embargo, la secuenciación reveló una T en la posición 304, y no un doble pico en el cromatograma (lo cual indicaría la presencia de ambos alelos). Ante la duda, se amplificó el gen nuevamente y se lo envió a secuenciar una segunda vez, obteniéndose nuevamente los mismos resultados (Fig. Apéndice I.1). Por lo tanto, considerando que el protocolo de restricción ya fue utilizado por otros anteriormente (Hee Young Kang, Tamang, Seol, y Kim, 2009) y que estaba puesto a punto en el Servicio de Microbiología del HUMV, es probable que la concentración

del producto de PCR fuera muy alta y por lo tanto la cantidad de enzima utilizada no fuera suficiente para digerirlo completamente, provocando una digestión parcial con un remanente del alelo *aac6'-Ib* quedando sin digerir (confundiéndose así con la otra variante alélica).

La presencia simultánea de CTX-M-15 y las variantes alélicas de *aac6'-Ib* han sido ampliamente documentadas alrededor del mundo (incluido nuestro país), principalmente en aislamientos de *E.coli* (Coque *et al.*, 2008; Cordeiro *et al.*, 2008; Smet *et al.*, 2010); sin embargo no existen hasta el momento reportes de *K. pneumoniae* portadores de ambos genes en Uruguay, a excepción del estudio comparativo realizado por Roy Chowdhury *et al.* (2011). Por lo tanto, los resultados de esta tesis dan a conocer que la asociación de estos genes parece ser más frecuente de lo previamente encontrado, y consecuentemente pareciera constituir una asociación exitosa en diferentes especies de Enterobacterias.

En cuanto a los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC, la mayoría resultaron co-productores de *bla*_{TEM-1} y *bla*_{SHV-11/155} (Tabla 11), ambos genes codificantes para β -lactamasas de espectro ampliado (no BLEE). Para las secuencias codificantes de la enzima SHV, se obtuvo la región que comprende hasta el nucleótido 836 (AA 279) de los 858 que abarca el gen (excluyendo el codón STOP). A nivel nucleotídico, la posición 324 de los aislamientos estudiados presentaba una T, consistente con la variante SHV-11; mientras que la posición 705 presentaba una A y la 795 una T, ambas posiciones consistentes con la variante SHV-155 (datos no mostrados). Sin embargo, esas posiciones no generan cambios aminoacídicos, por lo cual hasta el último nucleótido secuenciado, la secuencia primaria de la enzima es igual tanto para la variante SHV-11 como para la variante SHV-155. El único cambio entre ellas corresponde al último aminoácido de la proteína el cual no fue abarcado en la región analizada. A pesar de ello, ya es sabido que SHV-11 no posee actividad BLEE (Nuesch-Inderbinnen *et al.*, 1997) y se predice que SHV-155 tampoco la posea ya que el cambio en el último aminoácido no estaría ampliando el espectro de acción de la enzima pues no se localiza cercano al sitio activo (Castanheira *et al.*, 2013). Esto es concordante con los resultados obtenidos ya que al menos los aislamientos del

primer brote de KPC no exhibían fenotipo consistente con la producción de una BLEE.

A pesar de la poca variabilidad en cuanto a las variantes de β -lactamasa halladas entre los dos brotes de KPC, se observó un patrón diferente en lo que refiere a genes plasmídicos de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos (Tabla 11). En primer lugar, los aislamientos del primer brote evidenciaron la presencia del alelo salvaje del gen *aac6'-Ib*, mientras que las *Klebsiellas* del segundo presentaron todas la variante *aac6'-Ib-cr* (en la *E. coli* 20/2 no se encontró el gen). En segundo lugar, los genes *qnrA* y *qnrB* no se hallaron en los aislados del primer brote, mientras que las *Klebsiellas* del segundo brote fueron portadoras de *qnrB* solamente, mientras que la *E. coli* presentó el gen *qnrA1*. Asimismo, es importante destacar la heterogeneidad genética que presentaron los aislamientos KPC (+) del segundo brote, existiendo co-producción de KPC y CTX-M en la mitad de ellos.

Por otra parte, de acuerdo a la bibliografía disponible esta tesis constituiría el primer reporte de aislamientos multirresistentes productores de KPC de Uruguay co-productores de al menos tres enzimas modificadoras de aminoglucósidos. También en este aspecto, parecen diferenciarse los brotes de KPC, donde los aislamientos del primero portarían los genes *aph3'-Ia*, *aac6'-Ib* y *aac3'-IVa*; mientras que los del segundo compartirían solamente el *aph3'-Ia*, y portarían el alelo *aac6'-Ib-cr* y el gen *aac3'-IIa* (Tabla 16).

5.3 Análisis de integrones atípicos

El análisis de los integrones correspondientes a las cepas productoras de CTX-M-15 (no productoras de KPC) reveló una gran variabilidad en lo que refiere a sus regiones variables y los extremos IR del integrón (Tabla 12 y Fig. 7). Sin embargo, todos los *cassettes* génicos encontrados dentro de sus regiones variables generan resistencia para trimetoprim y aminoglucósidos principalmente. En tres aislamientos (1124, 1125 y 1126) se encontró la combinación *dfrA12-orfF-aadA2*, la cual ya había sido encontrada en la especie *K. pneumoniae* en otros aislados de Uruguay, pero en diferentes contextos genéticos. En uno de los casos se trataba de un integrón inusual

portador del gen *bla*_{CTX-M-2} en la segunda región variable (Marquez *et al.*, 2008), mientras que en el otro, el integrón resultó categorizarse como perteneciente a un integrón atípico del grupo II, en el cual la región variable comprendía la combinación de *cassettes* descripta; este último aislamiento (U20) era portador de la recombinasa ISCR1 aunque no se le pudo detectar segunda región variable, y en este caso portaba también el gen *bla*_{CTX-M-15}. Éste se mapeó por fuera de los extremos del integrón, embebido en una plataforma RMD compuesta por diferentes genes de resistencia y elementos genéticos móviles (Roy Chowdhury *et al.*, 2011). En cuanto a la distribución de esta combinación de *cassettes* hasta el momento ha sido descripta en variadas especies de enterobacterias (*Shigella sonnei*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*), tanto de origen animal como de origen humano en diferentes países de Europa y Asia (Kadlec y Schwarz, 2008; H. Y. Kang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2013; Mokracka, Koczura, Pawlowski, y Kaznowski, 2011; Peng, Lee, Fu, Chen, y Hsu, 2007; Seol *et al.*, 2006; Yao, Qian, Chen, Wang, y Huang, 2007).

Por otra parte, en los aislamientos 1101 y 1120 se encontró el mismo arreglo de *cassettes*, pero sin incluir el *orfF* (*dfrA12-aadA2*). Este arreglo no se había descrito en Uruguay hasta el momento, pero sí en otros países, mayoritariamente en aislamientos de *Salmonella enterica* proveniente de suinos de Tailandia y Kenia (Onyango, Ndeda, Wandili, Wawire, y Ochieng, 2014; Padungtod, Tribuddharat, y Chuanchuen, 2011), aunque también fue descrito en unos pocos aislamientos de *K. pneumoniae* co-productores de varias β -lactamasas en China (Yao *et al.*, 2007) y en cepas de *E. coli* aisladas de peces y mariscos en Corea (Ryu *et al.*, 2012).

En cuanto al arreglo *aadB-aadA2* (genes de resistencia a gentamicina y kanamicina, y estreptomomicina y espectinomomicina, respectivamente) presente únicamente en el aislamiento 1113, ya había sido descrito para enterobacterias de origen humano en Uruguay. En uno de los casos, en un integrón inusual portador del gen *qnrA* en la segunda región variable, en una cepa de *E. cloacae* productora de CTX-M-9 (Bado *et al.*, 2010); en el otro caso en un aislamiento de *K. pneumoniae* también productor de CTX-M-9 (Robino *et al.*, 2013). Esta tesis constituiría el primer reporte de esta combinación de *cassettes* génicos en *K. pneumoniae* productora de CTX-M-15. Con respecto a este arreglo, cabe destacar que a excepción de aislamientos bacterianos

de origen humano provenientes de nuestro país y de Polonia (Mokracka *et al.*, 2011), solamente ha sido encontrado en otros tres países en bacterias de origen animal: *S. enterica* en pavos de Alemania (Beutlich *et al.*, 2010), *E. coli* en peces de Corea (Ryu *et al.*, 2012) y *Proteus mirabilis* en gaviotas de Italia (Gionechetti *et al.*, 2008).

El *cassette aadA1*, que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomicina, fue el único *cassette* hallado en el aislamiento 1121. Hasta el año 2008 había sido descrito únicamente en enterobacterias (*E. coli*, *Salmonella spp*) provenientes de animales de granja y domésticos de Alemania, Corea y Chile (Kadlec y Schwarz, 2008; H. Y. Kang *et al.*, 2005; Lapierre, Cornejo, Borie, Toro, y San Martin, 2008; San Martin, Lapierre, Cornejo, y Bucarey, 2008). A partir de ese año comenzó a reportarse en Uruguay en aislamientos de *E. coli*, *E. cloacae* y *Enterobacter intermedium* de origen humano (Bado *et al.*, 2010; Marquez *et al.*, 2008), mientras que recién en el año 2013 se reportó en un aislamiento de *K. pneumoniae* de origen humano (Li *et al.*, 2013).

Globalmente pareciera que la mayoría de los arreglos encontrados en las regiones variables de los integrones estudiados, se han hallado previamente en aislamientos provenientes de diferentes animales, ya sean domésticos, de granja o de consumo. Asimismo estarían presentando en su mayoría resistencia a diferentes drogas clasificadas dentro de la clase de los aminoglucósidos. En cuanto a la primera observación, en la literatura se ha sugerido que los animales serían reservorios para estos *cassettes* de genes, sin embargo, eso implica en sí mismo un orden de flujo de genes desde los animales a los humanos, cuando en realidad no puede excluirse el flujo en el sentido contrario. Por tal motivo, Stokes y Gillings (2011) han sugerido que un término más apropiado sería el de “*conduits*” (conductores o canales) de flujo génico, lo cual *a priori* no establece un sentido de dispersión. En cuanto a la segunda observación referida a la resistencia a aminoglucósidos, es de destacar que algunas de las drogas de esta clase, como son la espectinomicina y la estreptomicina/kanamicina, se utilizan casi exclusivamente para el tratamiento de patógenos específicos como *Neisseria gonorrhoeae* o *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente. Por el contrario, la gentamicina sí se utiliza para combatir variados tipos de infecciones, principalmente ocasionadas por bacterias gram negativas, como

lo son las enterobacterias ("P. R. Vademécum,")(http://uy.prvademecum.com). El uso de estos antibióticos podría haber llevado a la dispersión de estos *cassettes* génicos, los cuales podrían mantenerse en una población dada aún en ausencia de la presión selectiva ejercida por los antibióticos. Si originalmente conformaron la estructura básica de los integrones hallados en los huéspedes humanos o en huéspedes animales, no se puede predeterminar con la información obtenida.

En lo que respecta a la variabilidad de los esqueletos de transposón en los cuales parecen estar embebidos estos integrones, se describen en este trabajo, por primera vez en Uruguay, aislamientos de *K. pneumoniae* cuyos integrones parecen localizarse dentro de transposones Tn21-like (Tabla 12), tanto para aquellos casos donde rindió producto específico como para el putativo caso de IRI-IS26, que de ser como el aislamiento de Sydney (Roy Chowdhury *et al.*, 2011), la secuencia de inserción se habría fijado en el esqueleto de un Tn21-like. Previamente se habían descrito en aislamientos de *E. coli* como el esqueleto predominante, mientras que el Tn5036-like parecía ser el más distribuido dentro de la especie *Klebsiella* en los aislamientos de nuestro país (Marquez *et al.*, 2008; Roy Chowdhury *et al.*, 2011). Por lo tanto sugiere un cambio a lo largo de los años y los aislamientos locales parecen asemejarse en estructura a lo reportado previamente para otros países de la región, donde el Tn21 y el Tn1696 son los más frecuentemente descritos (Roy Chowdhury *et al.*, 2011). Por consiguiente, pueden suponerse varias vías por las cuales comienzan a detectarse estas plataformas en aislamientos de *K. pneumoniae* en Uruguay: en primer lugar puede inferirse una diseminación de alguna clona desde países vecinos; en segundo lugar podría haber ocurrido una transferencia desde otras enterobacterias (en este caso específicamente desde *E. coli*); y en tercer lugar pueden hipotetizarse rearrreglos nuevos que hayan llevado a la evolución hacia estos esqueletos, así como otros no tipables (tal como fue el caso para los aislamientos 1102, 1103 y 1121).

Un hecho sorprendente que se desprende del presente estudio es la aparente alta prevalencia de integrones "atípicos" dentro de los aislados estudiados. Los diez productores de CTX-M-15 y portadores de integrones exhibieron alguna clase de

integrón atípico, según la clasificación sugerida por Roy Chowdhury *et al.* (2011), y ningún integrón clásico (Tabla 12 y Fig. 3, 4 y 7).

Específicamente, ocho evidenciaron la ausencia de los módulos *tni* y del extremo IRt del integrón. Claramente no podemos olvidar que el IRt seguramente se encuentre presente, pero modificado y no pueda detectarse con los cebadores utilizados los cuales tienen como regiones blanco el gen *merE* del Tn21 y el gen *tniA* del Tn402-like (Marquez *et al.*, 2008) (ver Fig. 4). Esta estrategia sesga la detección de los módulos del integrón a los cebadores ya descritos, teniendo presente que hasta la fecha el IRt parecía detectarse en la mayoría de los aislamientos. Sin embargo, en los estudiados no amplificó en ninguno de ellos.

Por otra parte, también se describen dos aislamientos que no parecen poseer la región 3'CS clásica (*qacEΔ1/sul1*) ya que con cebadores específicos no rindieron producto de amplificación. A uno de ellos, además, fue imposible amplificarle alguna banda correspondiente a la región variable. Y en este punto hay que ser cuidadosos, debido a que esto no significa que no posea ningún *cassette* génico, ya que de ser así el integrón sería un In0, y de todas formas, dado los sitios de hibridación de los cebadores, obtendríamos un amplicón de 465pb (Fig. 4). Dadas las características de este aislamiento (1102), fue entonces clasificado como perteneciente al grupo V de los integrones atípicos. Este grupo podría representar uno de los dos tipos de regiones 3'CS modificadas atípicas que ya se han reportado en la literatura: *qacH/sul3* (Antunes, Machado, y Peixe, 2007; Moura *et al.*, 2014; Saenz *et al.*, 2010; Soufi *et al.*, 2009; Wannaprasat, Padungtod, y Chuanchuen, 2011) o bien *tniC* (Moura, Pereira, Henriques, y Correia, 2012; Santos, Caetano, Ferreira, y Mendo, 2010). De ser así, tendría sentido el no haber podido recuperar ningún amplicón con el par de cebadores HS458 y HS459 ya que este último hibrida con una región del *qacEΔ1*. No obstante, se debería de verificar con cebadores alternativos. El aislamiento 1103 constituiría un caso diferente ya que en esta cepa se detectaron tres regiones variables (la identidad de sus *cassettes* no fue verificada), y sin embargo ningún amplicón para el módulo 3'CS clásico (*qacEΔ1/sul1*), lo cual parecería indicar que ninguno de los integrones posee este tipo de región. Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, el cebador HS459 que permite

detectar la RV, híbrida en *qacEΔ1*. Esto me lleva a pensar que en estos integrones ocurrieron rearrreglos adicionales a nivel del *su1*, los cuales puedan haber impedido una correcta hibridación del cebador que detecta esta región (HS550).

En suma, el abordaje realizado para detectar integrones atípicos fue satisfactorio en tanto se pudo evidenciar la presencia de diferentes ejemplares. Sin embargo, estos estudios deberían de profundizarse con estrategias alternativas que permitan seguir discriminando las estructuras no clásicas al punto de poder identificarlas. De todos modos, no caben dudas de que las técnicas moleculares clásicas de detección de integrones mediante la identificación de genes de integrasa o *cassettes* génicos subestima enormemente la diversidad existente actualmente.

5.4 Detección de otros EGM y plataformas que los contienen

Otro aspecto a destacar respecto a los resultados obtenidos, es que nueve aislamientos evidenciaron ser portadores de *ISCR1* (Tabla 12) lo cual podría sugerir que los integrones hallados corresponderían a ejemplares de integrones inusuales, además de ser clasificados como atípicos. No obstante, se debería de haber continuado con la caracterización de la segunda región variable, lo cual no fue abordado en esta tesis. De hallarse efectivamente estas regiones, entonces podría confirmarse la afirmación de que estaríamos tratando con integrones inusuales; en caso contrario, dos opciones serían válidas: en primer lugar que la *ISCR1* se encuentre inserta en otra región del genoma bacteriano, no asociada con el integrón, o bien que rearrreglos ocurridos en la segunda región 3'CS prevengan la hibridación de los cebadores que detectan la RV2. Cabe destacar que el aislamiento U20, del cual se conoce toda la plataforma donde se encuentra embebido el integrón, es portador de dicha secuencia de inserción, y sin embargo la PCR para la RV2 dio resultados negativos. Considerando esta información en conjunto con la plataforma conocida (donde no se halló la *ISCR1*) (ver Fig. 8) esta cepa (U20) constituiría probablemente un ejemplo de la primera opción (*ISCR1* no asociada al integrón).

Al analizar otros elementos genéticos móviles así como diferentes plataformas que los contengan, se evidenció una amplia dispersión de las secuencias de inserción IS26 e *ISEcp1* las que se encontraron en todos los aislamientos, tanto en los productores de CTX-M-15 (Tabla 13) como en los productores de KPC-2 (datos no mostrados).

Dos resultados fueron los más interesantes al respecto. En primer lugar el hecho de que la asociación *ISEcp1:bla*_{CTX-M-15} no fue constatada para todos los aislamientos, y en segundo lugar la variabilidad de productos de amplificación de la plataforma IS26:*bla*_{CTX-M-15} (Tabla 13). En referencia al primer hecho, solamente cinco de los diez aislamientos amplificaron producto específico, no obteniéndose ningún producto para los restantes. Considerando los frecuentes reportes de esta asociación (Coelho *et al.*, 2010; Karim, Poirel, Nagarajan, y Nordmann, 2001; Poirel *et al.*, 2003; Smet *et al.*, 2010; Zong, Partridge, y Iredell, 2010), esto podría significar que en esos cinco aislamientos restantes *ISEcp1* y *bla*_{CTX-M-15} no se encuentran físicamente asociados en una región discreta, y por lo tanto que el gen codificante de la BLEE esté siendo dispersado y expresado gracias a otros elementos móviles presentes río arriba del gen, como ISCR1 o IS26 (Canton *et al.*, 2012). Otra explicación sería que se haya insertado alguna otra secuencia de inserción dentro de *ISEcp1* haciendo que el producto de amplificación no fuera detectado con la extensión dada en el ciclo de PCR. Casos de inserción de IS1, IS10, ISCR1 e IS26 dentro de *ISEcp1* ya han sido reportados (Bae *et al.*, 2008; Eckert *et al.*, 2006). En cuanto a la variabilidad de productos obtenidos para la plataforma IS26:*bla*_{CTX-M-15}, esto refleja, claramente, la multiplicidad de veces que se encuentra IS26 en los genomas de dichos aislamientos (todos a excepción del 1101 y 1125, los cuales amplificaron banda única con los cebadores IS26_rv y CTX-M_New_fw). IS26 tendría, entonces, el potencial de provocar rearrreglos genéticos varios, ya sea conformando transposones compuestos por una IS26 en cada extremo y mediando los rearrreglos por transposición, o bien dada la homología de secuencias con otras IS26 presentes en otras regiones, siendo blancos para la recombinación homóloga (Smet *et al.*, 2010). Asimismo, podría estar implicado en la conformación de regiones RMD más extensas de lo estudiado en la presente tesis. Ya existen antecedentes en otras enterobacterias, de regiones RMD

flaqueadas por secuencias de inserción tales como IS26 (Doublet, Praud, Weill, y Cloeckaert, 2009; Miriagou, Carattoli, Tzelepi, Villa, y Tzouvelekis, 2005).

También se analizaron otras plataformas río arriba del integrón, a modo de cartografiar la mayor extensión posible, verificando si se encontraban los componentes hallados en la cepa U20 (Fig. 8). Así es que se verificó que en todos los aislamientos portadores de alguna de las variantes alélicas del gen *aac6'-Ib*, éste se encontraba asociado a una copia de IS26; similarmente, en todos los aislamientos productores de TEM, se encontró la plataforma que abarcaba desde *bla*_{CTX-M-15} a *bla*_{TEM}, y por el tamaño de la misma (y por secuenciación) se verificó la presencia de los siguientes elementos genéticos: *bla*_{CTX-M-15} – *ISEcp1* – Δ *tnpA* – *tnpR* - *bla*_{TEM}. Por análisis bioinformático utilizando la herramienta BLAST, esta última plataforma (aproximadamente 4500pb), también se encontró en al menos un aislamiento de *E. coli* perteneciente al ST131 (99% de similaridad nucleotídica con N° de acceso al NCBI: EU935738), la clona internacional más ampliamente distribuida globalmente, así como también en un aislamiento de *S. enterica* (99% de similaridad nucleotídica con N° de acceso al NCBI: LK056646). Si bien en ambos casos se encontró que la IS26 río arriba de la plataforma también compartía homología entre estas secuencias, la IS26 río abajo no se encontraba en la plataforma en igual posición que en la cepa U20. Esto sugeriría una vez más un rol muy importante de IS26 como elemento evolutivo que media rearrreglos genéticos llevando a la variabilidad de estas plataformas. Diferentes mecanismos podrían estar contribuyendo a estas combinaciones, ya sea la transferencia de una plataforma mayor (otro transposón compuesto o bien un plásmido determinado) desde otras especies de enterobacterias a *Klebsiella*, la cual sufriría posteriormente rearrreglos por la inserción de IS26 o incluso una transposición del tipo *one-ended* dirigida por una única secuencia de IS26.

La presencia de la asociación *aac6'-Ib*:IS26 no aseguraba que ésta se encontrara físicamente asociada con *bla*_{CTX-M-15}, por lo cual se decidió amplificar la plataforma que abarcaba desde *aac6'-Ib* a *bla*_{CTX-M-15}. El producto específico, de muy alto peso molecular (aproximadamente 4800pb) se evidenció en tres de los cuatro aislamientos portadores del gen de resistencia a aminoglucósidos. Dado que la

intensidad del producto era muy baja, no puede descartarse su presencia en el caso del aislamiento 1126, para el cual no se observó tal banda en el gel de agarosa. A pesar de ello, la posibilidad de que exista una inserción en alguno de los genes que componen esta región no puede descartarse.

La región río abajo del integrón se estudió en la búsqueda del locus *mph* y la IS26 presentes en el aislamiento U20. Sin embargo, tal y como ocurrió para el gen *bla*_{TEM}, el gen *mphA* sólo fue detectado en la mitad de los aislamientos. En todos ellos se verificó la asociación de este locus con la secuencia de inserción mencionada. La idea de que los integrones atípicos pudieran comportarse como marcadores de regiones RMD en sus entornos, es en sí misma atractiva, ya que metodológicamente implicaría detectar regiones clásicas, y ante su ausencia, se podría inferir que el integrón se encuentra embebido en plataformas más complejas donde predominan genes de resistencia a diferentes clases de antibióticos, así como diferentes elementos genéticos móviles. Sin embargo, la variabilidad evidenciada en los diez aislamientos estudiados en el marco de esta tesis permite inferir que el mapeo de regiones que componen el integrón (más allá de la RV) no sería el abordaje más completo y correcto para detectar regiones RMD. Posiblemente las nuevas tecnologías de secuenciación masiva sean la metodología con mayor capacidad descriptora hasta la fecha. No obstante, no podemos olvidar que sus costos aún son muy elevados para su empleo rutinario en nuestro país, y por lo tanto estrategias alternativas, si bien no cien por ciento efectivas, podrían resultar de utilidad si existe una buena comunicación entre el sector básico y el sector clínico.

5.5 Estudio de los entornos del gen *bla*_{KPC-2}

Como se mencionó anteriormente, la variante *bla*_{KPC-2} se ha encontrado mayoritariamente dentro del transposón Tn4401 (Naas et al., 2008), aunque un híbrido de este transposón con un Tn801-like también ha sido descrito como esqueleto para este gen en aislamientos de *K. pneumoniae* de China (Shen et al., 2009). Con el objetivo de verificar el contexto genético en el cual se encontraban embebidos los genes *bla*_{KPC-2} de las cepas en estudio, se decidió en primera instancia la búsqueda por PCR de las IS*Kpn6* e IS*Kpn7* que conforman parte del Tn4401, ya que

se esperaba encontrarlos en este transposón por ser el más frecuentemente descrito en la región (Gomez *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013). Los resultados confirmaron, en todos los casos, la presencia del gen para la carbapenemasa en el transposón buscado. Sin embargo, una clara diferencia se observó en lo que respecta a la isoforma de dicho transposón y el brote de KPC analizado. Así es que, los aislamientos del primer brote indicaron que el gen se encontraba embebido en la isoforma *a* (que presenta una delección de 100pb en la región intergénica entre *ISKpn7* y *bla_{KPC}*) mientras que el segundo se encontraba en la isoforma *b* (sin delección) (Fig. 9). Los brotes no solamente se diferenciaron a nivel de la estructura genética que rodea al gen para la carbapenemasa, sino que también presentaron claras diferencias a nivel de la sensibilidad a carbapenemes (ver Tabla 2); en tanto los del primer brote son todos resistentes, los del segundo brote exhiben incluso fenotipos sensibles e intermedios a meropenem e imipenem, respectivamente. Esta diferencia podría explicarse por un distinto número de copias del gen (lo cual no fue analizado en el marco de esta tesis, si bien más adelante discutiré respecto del análisis de expresión del gen) o bien por la delección en la región intergénica mencionada (Kitchel *et al.*, 2010). Se ha descrito que la secuencia promotora -35 para *bla_{KPC}* difiere en las isoformas *a* y *b* del Tn4401 (Gootz *et al.*, 2009), y más recientemente diferentes autores han comprobado que en aquellos casos donde existe una delección de 100pb, la expresión de KPC es más fuerte y concomitantemente los valores de CIMs son mayores (Kitchel *et al.*, 2010; Naas, Cuzon, Truong, y Nordmann, 2012). Los resultados moleculares de esta tesis, en conjunto con los datos de sensibilidad de los aislamientos estudiados, concuerdan con lo observado por los mencionados autores ya que las cepas del primer brote en las cuales el gen *bla_{KPC-2}* se encontró en la isoforma *a* del Tn4401 exhibieron un fenotipo más resistente a carbapenemes que las correspondientes al segundo brote.

5.6 Capacidad de transferencia del gen *bla_{KPC-2}* y análisis plasmídico

La capacidad de transferencia por conjugación también fue evaluada para un representante de cada brote KPC. A pesar de repetidos intentos, la conjugación no tuvo éxito cuando la cepa dadora fue la 666 (primer brote – Hospital Mautone). Analizando el perfil de plásmidos pesados, se observó una única banda ligeramente

mayor a 152Kb para los cuatro aislamientos del brote del Hospital Mautone (Fig. 10). Sin embargo, si tenemos en cuenta la tipificación de grupos de incompatibilidad plasmídica (Tabla 14) que indicó la presencia de IncFII e IncR, es claro que hay algún otro plásmido que no se detecta en la corrida electroforética, ya sea porque se degradó mecánicamente por el tratamiento de la muestra durante la extracción, o bien porque su tamaño es muy grande y el tiempo de corrida no fue suficiente para que el plásmido migrara por el carril, quedando sin salir del pocillo del gel. En apoyo a esta última posibilidad, en el Laboratorio de Investigación en Infecciones Hospitalarias del Instituto Osvaldo Cruz, mi orientadora realizó la misma extracción plasmídica y posteriormente un *Southern Blot* con sonda para el gen *bla*_{KPC} (datos no mostrados), experimento que mostró señal de hibridación muy cercana al pocillo. Esto estaría indicando que el gen *bla*_{KPC-2} del aislamiento 666 estaría localizado en un Tn4401 isoforma *α* inserto en un plásmido de muy alto peso molecular. Efectivamente se han descrito genes codificantes para KPC en plásmidos no transferibles, que bien han resultado rondar en los 50Kb (Yigit *et al.*, 2001), o no se ha analizado su tamaño (Gomez *et al.*, 2011). Es importante destacar que plásmidos no movilizables pueden llegar a tener tamaños mayores a 300Kb (Smillie, Garcillan-Barcia, Francia, Rocha, y de la Cruz, 2010), lo cual concuerda con el hecho de no haber visualizado ninguna otra banda plasmídica aparte de la ligeramente mayor a 152Kb, y que por lo tanto dicho plásmido pueda haber quedado retenido en el pocillo. Interesantemente, se ha reportado que plásmidos conjugativos, normalmente expresan factores que inducen a bacterias planctónicas a formar *biofilms*, lo cual favorece la transferencia de estos plásmidos (Ghigo, 2001). En lo que respecta a los aislamientos del primer brote de KPC, durante la pasantía en el HUMV, realicé ensayos de formación de *biofilms* (Anexo IV), cuyos resultados sugieren que las cepas PRE y POST del primer brote poseen una baja capacidad de formación de biopelículas (Fig. Apéndice III.1). La diferencia respecto a una cepa utilizada como control positivo resultó estadísticamente significativa. Por tanto, los datos recabados me permiten inferir que el gen *bla*_{KPC-2} de los aislamientos del brote KPC del Hospital Mautone circularon en la clona ST258, colistin resistente, embebidos en un Tn4401 isoforma *α*, el cual se encontraba inserto en un plásmido no conjugativo de muy alto

peso molecular (probablemente > 300Kb), posiblemente perteneciente al grupo de incompatibilidad plasmídica IncFII o IncR.

Contrario a lo sucedido con el aislamiento 666 del primer brote de KPC, el Ec20/2 correspondiente al segundo brote fue exitosamente transferido por conjugación (con una eficiencia de 1×10^{-3} TC/célula receptora). En este caso se pudo tipificar el plásmido transferido, tanto a nivel del grupo de incompatibilidad plasmídica como estimando su tamaño a partir de la extracción de plásmidos pesados. Asimismo, esta cepa dadora era co-productora de una BLEE de la familia CTX-M, y se pudo comprobar que el gen codificante para esta enzima no se co-transfirió con el gen *bla*_{KPC-2}, indicando su localización en una molécula de ADN diferente. Adicionalmente es importante destacar, que si bien la transferencia se realizó a partir del único aislamiento de *E. coli*, el perfil plasmídico permite inferir que un plásmido de similar tamaño se encuentra en los restantes aislamientos del segundo brote (Fig. 10B y 11B) y considerando que todos los aislamientos dieron positivos para IncN, esto sugiere que el plásmido presente en todos ellos, incluyendo el de *E. coli*, pertenece a dicho grupo de incompatibilidad plasmídica. Por lo tanto, estos resultados, conjuntamente con los obtenidos respecto al entorno genético del gen para la carbapenemasa me permiten concluir que en el segundo brote, el gen *bla*_{KPC-2} circuló en la isoforma *b* del Tn4401, embebido en un plásmido conjugativo IncN de un tamaño aproximado < 50Kb. Dentro de los aislamientos analizados por *Southern Blot* en el Instituto Osvaldo Cruz, también se analizaron algunos representantes del segundo brote, entre ellos algunas *Klebsiellas* (4293 y 19/1) revelando por hibridación de sonda para *bla*_{KPC} y sonda para IncN que el gen codificante de la carbapenemasa se hallaba efectivamente en el plásmido con señal IncN, y cuyo tamaño estimaron en 40Kb. Esto concuerda con los datos obtenidos en esta tesis. Creo importante destacar el hecho de que estos aislamientos presentan similares características genotípicas (ST437, Tn4401 isoforma *b*, plásmido IncN de 40Kb portador del gen *bla*_{KPC-2}) a otros aislados de los estados de Santa Catarina, Espírito Santo y Rio de Janeiro (Brasil) (Pereira *et al.*, 2013) que se encuentran próximos a la frontera con Uruguay, lo cual podría significar la importación de la clona desde este país vecino. A pesar de ello, la alta eficiencia de conjugación estaría indicando una

gran facilidad para la transferencia de este plásmido entre otras enterobacterias. Probablemente esto haya sucedido con el aislamiento Ec20/2 el cual se aisló de un hisopado rectal, conjuntamente con el aislamiento Kp20/1. Si la hipótesis de la importación de la clona de *K. pneumoniae* ST437 desde Brasil fuese correcta, entonces podría haber ocurrido una transferencia del plásmido portador del gen *bla*_{KPC-2} en el ambiente gastrointestinal del paciente, desde una *K. pneumoniae* a una *E. coli*.

Por otra parte, además de su facilidad de transferencia, el plásmido parece haber exhibido una gran facilidad para perderse en ausencia de presión selectiva, como se evidenció con el aislamiento 19/2 enviado a España (denominado en esta tesis 19/2 SDR), el cual perdió el fenotipo de multirresistencia (Tabla 15) y asimismo demostró la pérdida del plásmido < 50Kb (Fig. 13B). Otros reportes ya han sugerido la pérdida de plásmidos portadores del gen *bla*_{KPC} durante pasajes *in vitro* (Kitchel *et al.*, 2010; Siu, Lin, Gomez, Eng, y Chiang, 2012; Tofteland, Naseer, Lislevand, Sundsfjord, y Samuelsen, 2013), por lo cual lo sucedido en España no correspondería a un caso aislado. Análisis de estabilidad plasmídica así como de costo biológico asociado a la conservación del plásmido deberían ser llevados a cabo para determinar las posibles causas que llevan a la pérdida de este EGM y de otros.

Los aislamientos 19/1B, 19/1C y 20/1, portadores del gen *bla*_{KPC-2} también fueron evaluados en lo que respecta a su capacidad de formar *biofilms* (Fig. Apéndice III.1), hallándose que se asemejaban al control positivo. A este respecto, exhibieron resultados opuestos a los de los aislamientos del primer brote, lo cual podría sugerir una evidencia más de que plásmidos conjugativos portan factores que colaboran en la adherencia para formar biopelículas (Ghigo, 2001).

5.7 Capacidad de transferencia del gen *bla*_{CTX-M-15} y análisis plasmídico

En referencia a la transferencia del gen *bla*_{CTX-M-15}, fue exitosa en los cuatro ensayos realizados, si bien se apreciaron diferencias importantes en lo que refiere a la eficiencia de conjugación, la cual fue mayor para los dadores pertenecientes al

pulsotipo B (1103 y 1113). Asimismo, si bien la mayoría de los plásmidos no pudo ser tipificado a nivel de su grupo de incompatibilidad (Tabla 14), la extracción de plásmidos pesados de las cepas dadoras así como de sus respectivas transconjugantes (Fig. 11A) sugiere que el gen *bla*_{CTX-M-15} se encuentra en plásmidos de diferente tamaño en las diferentes clonas. Además es interesante remarcar que, aunque todos los ejemplares del pulsotipo B (1102, 1103, 1113, 1116, 1121) mostraron un perfil plasmídico idéntico, el perfil de plásmidos de los ejemplares correspondientes al pulsotipo A (1101, 1120, 1124, 1125 y 1126) fue más heterogéneo (Fig. 10A).

Curiosamente, en la literatura se ha reportado al gen *bla*_{CTX-M-15} asociado a plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncFII, IncFIA/FIB e IncFIIA, tanto en *K. pneumoniae* como en *E. coli* (Montesinos *et al.*, 2010; Naseer *et al.*, 2009; Oteo *et al.*, 2009; Roy Chowdhury *et al.*, 2011; Smet *et al.*, 2010; Woodford *et al.*, 2009; Zhuo, Li, Zong, y Zhong, 2013). Sin embargo, a pesar de repetir las PCRs multiplex para detectar los diferentes grupos F, así como realizando PCRs simples, en ningún caso se obtuvo producto indicando que en los aislamientos en estudio el gen *bla*_{CTX-M-15} estaría circulando en plásmidos no tipables por los métodos clásicos. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que se trate de un replicón fusionado entre IncFII e IncFIA, como se ha encontrado por análisis de secuenciación de plásmidos completos en aislamientos de *E. coli* (Smet *et al.*, 2010; Woodford *et al.*, 2009).

En referencia a la capacidad de formar *biofilms*, el aislamiento 1101 demostró una baja capacidad, y la diferencia en comparación con el control positivo resultó estadísticamente significativa (Fig. Apéndice III.1). Sin embargo la densidad óptica a 620nm fue más del doble que la exhibida por los aislamientos PRE y POST. Si la capacidad de formar *biofilms* efectivamente se correlaciona con una mayor eficiencia de conjugación, estos resultados podrían dar cuenta de la baja eficiencia rendida con la cepa 1101 como dadora.

El último aspecto que me gustaría mencionar en lo que respecta a la transmisión del gen *bla*_{CTX-M-15} refiere a su co-transferencia con el/los integrones estudiados. Claramente, en los aislamientos 1101 y 1125, donde se evidenció la presencia de

*bla*_{CTX-M-15} en la misma plataforma RMD que el integrón, era de esperarse que pasaran en el mismo evento de conjugación plasmídica a la cepa receptora. Sin embargo, para los aislamientos 1103 y 1113 no se pudo determinar la plataforma en la cual estaba/n embebido el/los integron/es por lo cual *a priori* no se sabía si el gen para la BLEE estaba codificado en la misma región. A pesar de que los resultados no indican una asociación física discreta entre estos elementos, claramente se co-localizan en el mismo plásmido ya que las PCRs para *intI1* y CTX-M-15 dieron positivas para los transconjugantes.

5.8 Diferentes morfotipos y resistotipos

La diferente morfología de colonia observada originalmente por los laboratoristas del Hospital Militar en los aislamientos productores de KPC, y posteriormente observada en el aislamiento 19/1 enviado a España, demostraron que existían variaciones que afectaban no solo el fenotipo de la colonia sino también el fenotipo de sensibilidad a los antibióticos (lo cual posteriormente fue confirmado molecularmente al detectar diferentes genes de resistencia en los diferentes aislados). Estos morfotipos diferentes en *K. pneumoniae* han sido descritos desde la década del '30 (Randall, 1939) como resultado del surgimiento de colonias translúcidas y otras rugosas a partir de las colonias mucoides típicas. Estas distintas morfologías de colonia demostraron estabilidad al ser cultivadas por separado, a pesar de que en algunos casos, luego de varios años volvían a exhibir un fenotipo mixto. Asimismo, el crecimiento de las colonias translúcidas fue evidenciado de 36 a 72 hs posteriores a la siembra, diferenciándose aún posteriormente las rugosas. Esto sugirió una tasa de crecimiento más lenta de estos morfotipos en presencia del morfotipo mucoide. La diferencia principal hallada entre las diferentes morfologías era la presencia de cápsula y el tamaño de los bacilos: las mucoides se originaban a partir de bacilos cortos y encapsulados; las translúcidas a partir de bacilos cortos no encapsulados y las rugosas a partir de bacilos largos no encapsulados. Otros casos de la bibliografía consultada reportan cambios en los aspectos de la colonia y los relacionan a mutaciones en determinados genes que codifican para la cápsula (Lawlor, Hsu, Rick, y Miller, 2005) así como en genes para la nitrogenasa (Streicher, Gurney, y Valentine, 1971). Por otra parte, Matatov *et al.* (1999) reportaron la

diferenciación de colonias translúcidas a partir de colonias mucoides, donde las primeras se originaron a partir de bacterias no encapsuladas (varias productoras de fimbrias) y las últimas a partir de encapsuladas no productoras de fimbrias. La asociación de la falta de fimbrias en presencia de cápsula se relaciona con el rol de las fimbrias en lo que refiere a la capacidad invasiva de *K. pneumoniae*, donde los aislados capsulados y sin fimbrias circularían por el torrente sanguíneo, mientras que aquellos no encapsulados y productores de fimbrias infectarían el tracto urinario. Similarmente, Hsueh *et al.* (2002) reportaron diferentes morfotipos a partir de aislamientos de un mismo cultivo, que también exhibían perfiles de resistencia a antibióticos diferentes. Los aislamientos /1 y /2 obtenidos de los diferentes cultivos del segundo brote de KPC parecieron mostrar un comportamiento similar.

Si bien las colonias translúcidas (consideradas en esta tesis como la cepa 19/1C) se originaron a las 72hs de sembrar el cultivo del aislamiento 19/1 (en la placa se veían como las reportadas por Matatov *et al.* 1999, foto que se adjunta en el Anexo V), una vez subcultivadas por separado, crecieron a tasas de crecimiento similares y a las 24hs no exhibieron fenotipos mixtos (Fig. 12). Como se mencionó en el apartado de Resultados, se subcultivaron estos morfotipos periódicamente por separado para conservarlos y a partir de ellos se hicieron los subsiguientes estudios. En cuanto a los recibidos del Hospital Militar, se tomaron similares precauciones y por tal motivo se trató a los diferentes morfotipos como cepas distintas.

En todos los casos, se encontraron diferencias en los genes de resistencia a antibióticos portados por una u otra variante y en lo que refiere al contenido plasmídico, reveló ser de características muy similares, con alguna banda plasmídica de tamaño ligeramente mayor en los aislados /2 versus su contraparte en los aislados /1. Visto que hay diferencias en los genes, y que la mayoría de ellos se han visto asociados a plásmidos, puede especularse la inserción de estos genes mediados por algún evento de transposición, lo cual no solo permitiría a la bacteria ampliar su repertorio de genes sino que también haría que el plásmido al cual “saltara” el transposón migrara más lento en el gel de agarosa. Resta por ser dilucidado si los aislamientos además difieren en la presencia de cápsula y/o fimbrias, lo cual pudiera explicar las diferencias en los morfotipos de colonia.

5.9 Análisis de porinas

Con el fin de determinar si las CIMs a β -lactámicos y carbapenemes de diferentes aislamientos se debían exclusivamente a ser portadores de los genes codificantes para BLEEs y/o carbapenemasas, se procedió al estudio de las dos porinas principales en *K. pneumoniae*: OmpK35 y OmpK36.

En primera instancia se amplificaron los genes codificantes de ambas porinas, luego se analizó su expresión mediante la cuantificación relativa de la acumulación de sus mensajeros y en tercera instancia se realizó la extracción de dichas proteínas. De este modo se cubrieron todos los pasos de la cascada de expresión génica.

Para el gen *ompK35*, se encontró una inserción de un nucleótido en la posición 123 que por análisis bioinformático predice un corrimiento del marco de lectura, el cual provocaría un codón STOP prematuro (Fig. 14). Esta inserción ya fue descrita anteriormente por lo cual parece frecuente la detección de estos mutantes en aislamientos clínicos (Adler *et al.*, 2012; Clancy *et al.*, 2013; Garcia-Fernandez *et al.*, 2012; Mataseje *et al.*, 2011). El gen del aislamiento 1104 solamente reveló mutaciones sinónimas.

Lamentablemente, a pesar de utilizar diferentes estrategias para poder amplificar dicho gen en los restantes aislamientos (19/1B, 19/1C, 19/2 y 20/1), los resultados fueron en todos los casos negativos. Con cebadores internos se pudo evidenciar que cualquiera fuera el motivo, refería a cambios en la primera mitad del gen (extremo 5') o bien en su región promotora, fuera de la región codificante. Se podrían suponer inserciones en la región codificante (a pesar de que hubiese esperado poder amplificar un fragmento de mayor tamaño al aumentar la extensión de la PCR, lo cual no sucedió) ya que se ha reportado a las secuencias de inserción IS1 e IS10 interrumpiendo el gen (Doumith *et al.*, 2009). Sin embargo, es más probable que la inserción haya ocurrido al inicio del gen o en su región río arriba, afectando de este modo no sólo la actividad de su promotor (como se sugerirá a continuación) sino también posiblemente la hibridación de los diferentes cebadores utilizados. La IS1 se

ha detectado recientemente en la región mencionada, separando al promotor de su gen e impidiendo su transcripción (Shoma *et al.*, 2014).

En lo referente a la expresión relativa del ARNm de *ompK35*, en todos los aislamientos reveló una muy baja acumulación de transcritos (Fig. 18A). Esta baja expresión resultó estadísticamente significativa en comparación al control positivo. Como se mencionó en la sección de Resultados, en los aislamientos 1101, PRE y POST esto podría estar relacionado con la alteración del marco de lectura y el codón STOP prematuro, a pesar de que los cebadores hibridan dentro de la región codificante (antes del codón STOP) (Fig. Apéndice II.1). La estabilidad de esos mensajeros podría verse disminuida y consecuentemente alterar sus niveles de acumulación; esta inestabilidad podría relacionarse con una menor cantidad de ribosomas en estos mensajeros, producto del codón STOP prematuro. En lo que respecta a los aislamientos restantes, como fue sugerido anteriormente, podría tratarse tanto de una inserción en la región codificante que pueda impedir la correcta transcripción del gen, o bien una inserción en la región promotora que afecte el evento transcripcional y no el ARNm en sí mismo. El único caso que por su secuencia primaria no se esperaba tan baja producción de mensajeros, es el del aislado 1104, cuya secuencia aminoacídica resultó igual a la secuencia de referencia. A este respecto, la literatura da cuenta de que la producción de OmpK35 estaría reprimida en medios de alta osmolaridad, como el MH utilizado para el crecimiento bacteriano en los ensayos de Q-PCR (Hernandez-Alles, Alberti, *et al.*, 1999), por lo cual se puede inferir que esta podría ser una de las posibilidades que explique la baja expresión a nivel de ARNm.

El gen para *ompK36* pudo amplificarse y secuenciarse exitosamente en todos los casos, no revelándose ninguna secuencia de inserción interrumpiendo ninguno de ellos, a pesar de que los reportes de IS1, IS2, IS5, IS10, IS26 e IS903 son muy frecuentes en aislamientos con sensibilidad disminuida o resistencia a carbapenemes (Hernandez-Alles, Benedi, *et al.*, 1999; Kaczmarek *et al.*, 2006; Mena *et al.*, 2006; Sho *et al.*, 2013).

Sin embargo, al analizar las secuencias, se ven claras diferencias, fundamentalmente entre la secuencia aminoacídica del aislamiento 1104 comparada con las restantes (Fig. 15). Cabe mencionar que se utilizó como secuencia de referencia una previamente publicada como “sin defectos aparentes” - KC534867 (Shoma *et al.*, 2014), y también se comparó el alineamiento con la secuencia correspondiente a la proteína cristalizada (Dutzler *et al.*, 1999). Varias posiciones revelaron sustituciones al comparar estas dos secuencias de referencia. Análisis utilizando la herramienta BLAST indicaron alto porcentaje de homología nucleotídica entre ambas secuencias con otras presentes en la base de datos del NCBI al realizar el análisis con cada secuencia por separado. Una desventaja de dicha base de datos, que resultó inconveniente para los estudios llevados adelante en esta tesis, es el hecho de que las secuencias, en muchos casos, no incluyen información respecto a la funcionalidad de las proteínas que codifican.

Hasta la fecha, y según la literatura consultada, la gran mayoría de las sustituciones reportadas no se han asociado a ningún tipo de impedimento en la función proteica y mayoritariamente se han reportado en aislamientos que producen la porina a nivel polipeptídico, según revelado en ensayos de extracción de PME (Landman *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

Para el propósito de esta tesis entonces, se consideró a la secuencia KC534867 como la referencia, y cuando se mencionan sustituciones, éstas refieren a la variación respecto de esta secuencia. Varias de las sustituciones indicadas en la Figura 15 (que se indican en rojo y azul, dependiendo el grado de conservación entre las secuencias alineadas) fueron reportadas en diferentes aislamientos por Zhang *et al.* (2014), en donde los autores también notan diferencias importantes entre la secuencia correspondiente a la proteína cristalizada (Z33506.1) y la secuencia que ellos utilizan como referencia (NTUH-K2044). Lamentablemente, los estudios llevados a cabo por dichos autores se limitan a describir las sustituciones y a mapearlas a las estructuras secundarias putativas, sin realizar un análisis posterior de los resultados.

En un intento por determinar si las sustituciones halladas en los aislamientos estudiados (a excepción del 1104 que pareció ser el que exhibió una secuencia más

divergente en comparación con las demás) podrían influir en la estructura tridimensional de la proteína, y de ese modo afectar su funcionalidad, se decidió en primera instancia, hacer un análisis básico de las propiedades fisicoquímicas de los residuos sustituidos, en segundo lugar, mapear las sustituciones considerando las estructuras secundarias ya caracterizadas (Fig. 16) y finalmente mapearlas en la estructura tridimensional (Fig. 17).

Sin tener en cuenta al aislamiento 1104, dos de las sustituciones se encontraron en todos los aislamientos (Pro157Val y Arg328His). Otras dos fueron exclusivas del aislamiento 19/2 SDR (Asp336Asn y Val337Met), en tanto que la sustitución Val343Gly fue hallada en las cepas 19/1B, 19/1C y 19/2 SDR (Fig. 15).

Como se mencionó anteriormente, a excepción de la sustitución de un ácido aspártico (D) por una asparagina (N) en el aminoácido 336 de OmpK36 del aislamiento 19/2 SDR, las demás implican todas ellas cambios por aminoácidos con similares propiedades fisicoquímicas (hidrofóbicos por hidrofóbicos, hidrofílicos cargados positivamente por hidrofílicos de igual carga). En el caso de Asp336Asn, se está sustituyendo un aminoácido polar ácido (D) por uno polar neutro (N).

El hecho de que las propiedades fisicoquímicas del residuo aminoacídico sustituido no cambien, podría indicar que los AA de la secuencia de referencia tendrían el potencial de cambiarse por otros de similares características sin que esto vaya en detrimento de la funcionalidad de la proteína. Claro que para poder comprobarlo no es suficiente el ver la proteína en un SDS-PAGE, sino que se deberían hacer estudios de estructura-función, donde se cambie un aminoácido a la vez (por ejemplo mediante construcción de mutantes *knock-out* para las porinas a los cuales se los transforme con plásmidos de expresión de la secuencia de interés) y se analice si dicho cambio confiere o no una mayor resistencia a β -lactámicos, en ausencia de otros genes de resistencia a éstos. Por otra parte, abordajes bioinformáticos y de biofísica de proteínas podrían colaborar en el modelado de las sustituciones para dilucidar un posible cambio de conformación proteica.

Al mapear las sustituciones mencionadas anteriormente en la estructura secundaria de la proteína, se reveló que la mitad de ellas caen en regiones con estructuras definidas de hojas- β o α -hélices. Lo mismo sucede con la mayoría de las sustituciones halladas en la secuencia proteica de OmpK36 del aislamiento 1104. Considerando los datos de propiedades fisicoquímicas, así como reportes previos que indican que inserciones y cambios en el loop 3 (localizado entre una α -hélice y una hoja- β , entre las posiciones 110 y 123 aproximadamente en la Fig. 16) producirían deficiencias en la funcionalidad proteica (Garcia-Fernandez *et al.*, 2010), se podría hipotetizar que los cambios reportados en esta tesis no predicen carencia de funcionalidad.

Igualmente, y con el sólo fin de localizar esas sustituciones en la estructura tridimensional de la porina, se utilizó el programa Protein Workshop. De esta forma se pudo comprobar que las posiciones donde las sustituciones ocurrieron cambiando un AA hidrofóbico por otro de igual polaridad (Pro157Val en rojo, Val337Met en anaranjado y Val343G en amarillo – Fig. 17) se localizan más internamente en los monómeros de la porina, e incluso en regiones de contacto entre monómeros, apoyando el hecho de que por su hidrofobicidad se encuentran en posiciones internas alejadas del poro. Por el contrario, la posición 328 (Arg328His en azul) de propiedades hidrofílicas, parece localizarse más expuesta y en contacto con el poro. De haber cambiado las propiedades fisicoquímicas, se podría haber presupuesto un cambio de conformación en la estructura tridimensional, lo cual no se sugiere con los datos recabados.

Los análisis de expresión relativa del ARNm de *ompK36* indicaron variabilidad entre los aislamientos, pero en ningún caso la diferencia de expresión fue estadísticamente significativa cuando se la comparó con la media (Fig. 18B). Un patrón similar de variabilidad en la expresión de esta porina fue observado también por Landman *et al.* (2009). Estos resultados probablemente estén sugiriendo que los cambios aminoacídicos descritos anteriormente no afecten en gran medida la funcionalidad de la proteína.

Sin embargo, al comparar la expresión relativa de esta porina entre el aislamiento PRE y el aislamiento POST, la diferencia indicó ser estadísticamente significativa. Esto

es sorprendente desde un punto de vista de la secuencia codificante ya que éstas resultaron ser idénticas, lo cual sugiere un mecanismo de regulación pre-transcripcional que esté afectando la producción de mensajeros. Asimismo, cabe resaltar que los ensayos de expresión no fueron realizados en presencia de presión antibiótica. Considerando lo anterior, los datos de las diferencias de CIMs a meropenem y algunas cefalosporinas, en conjunto con los obtenidos respecto a la caracterización molecular de los genes de resistencia y los resultados de secuencia y expresión de OmpK35 y OmpK36, se puede inferir que el mecanismo que lleva a la regulación negativa de la expresión de OmpK36 es heredable ya que se mantuvo aún en ausencia de presión selectiva. Se puede entonces hipotetizar, que dado que el aislamiento POST provino del mismo paciente que el aislamiento PRE, y fue aislado posteriormente a la antibiótico-terapia, esta última habría actuado llevando a la bacteria a explotar mecanismos que le aseguraran su supervivencia. Reduciendo la expresión de la porina, aumentaría la impermeabilidad por lo cual variados antibióticos no ingresarían a la célula bacteriana para ejercer su acción. Molecularmente, este mecanismo ha de ser algo heredable, como bien podría ser una inserción o delección en la región promotora de *ompK36*, lo cual sería una atractiva explicación para lo sucedido considerando que ya ha habido reportes de casos similares donde se detectó la secuencia de inserción IS5 así como delecciones río arriba del gen (Clancy *et al.*, 2013; Hernandez-Alles, Benedi, *et al.*, 1999).

Finalmente, para completar el análisis de porinas, se realizó la extracción de PME y se corrieron los extractos en geles SDS-PAGE (Fig. 19). En estos ensayos se partió de medios de cultivo de diferente grado de osmolaridad a modo de poder diferenciar la aparente expresión de OmpK35 en medios de baja osmolaridad, como el NB. Así es que partiendo de ambos medios (NB y MH), se observó la falta de la banda mayor superior en todos los aislamientos, con la excepción de la del 1104 a partir de NB. Esto concuerda con la bibliografía consultada así como con los datos de secuencia de *ompK35* que parecía no presentar cambios aminoacídicos respecto de la secuencia de referencia. Por otra parte, la banda mayor de tamaño intermedio se observó en todos los aislamientos y con una intensidad apreciablemente menor para la cepa POST.

En suma, si bien no se realizaron análisis por *Western Blot* ni estudios de espectrometría de masas para verificar la identidad de cada banda, tomando toda la información obtenida respecto de las secuencias de los genes de porinas, su expresión relativa y su presencia o ausencia en el SDS-PAGE, se puede inferir que la banda mayor superior corresponde a la porina OmpK35 mientras que la banda mayor de tamaño intermedio correspondería a OmpK36. Creo importante destacar que si bien la última debería de migrar más lentamente en el gel que OmpK35 (36kD) ya que su tamaño es mayor (38kD), ya se ha descrito que el patrón de proteínas de *Klebsiella pneumoniae* en SDS-PAGE varía dependiendo de la composición del gel (Martinez-Martinez, 2008) y de otros factores no dilucidados aún (Zhang *et al.*, 2014). Para las proteínas homólogas en *E. coli* se sabe que al agregar urea al gel de poliacrilamida, las porinas migran acorde a su tamaño. Sin embargo los geles realizados y utilizados en el marco de esta tesis no contenían urea.

Aunque frecuentemente se ha afirmado que aislamientos no productores de BLEE suelen expresar ambas porinas principales, los resultados de esta tesis evidencian que al menos el aislamiento 19/2 SDR, sensible a antibióticos β -lactámicos, no produce OmpK35 (ni siquiera en NB). En lo que refiere a la significancia clínica de esta observación, probablemente no afecte en gran medida dado que las CIMs se mantienen dentro de rangos sensibles y se sabe que la expresión de una sola porina es suficiente para la penetración de los β -lactámicos (Martinez-Martinez, 2008).

Sin embargo, esta pérdida de expresión puede adquirir gran importancia en casos donde además el microorganismo pueda recibir genes de carbapenemasa así como adquirir mutaciones o inserciones en el gen de la porina funcional, lo cual se ha reportado puede llevar a valores muy altos de CIM a carbapenemes tales como $>256\mu\text{g/ml}$ (Yang *et al.*, 2010). Por E-test se verificó que la CIM a meropenem de la cepa POST era de $256\mu\text{g/ml}$ (Anexo IV) por lo cual este aumento en la resistencia parece efectivamente dado por la disminución en la expresión de OmpK36 en ausencia de expresión de OmpK35.

5.10 Expresión relativa de KPC

Para descartar que la mencionada diferencia pudiera deberse a una expresión diferencial de KPC, también se realizaron ensayos de Q-PCR a las cepas PRE y POST, así como a las correspondientes al segundo brote, pero en todos los casos calibrando versus la cepa PRE, lo cual no es un abordaje correcto para los aislamientos del segundo brote ya que el *background* genético es muy diferente. Los resultados no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión (Fig. 20) lo cual podría indicar, para el caso de las cepas del primer brote, que la expresión de la enzima no estaría afectando la CIM a carbapenemes. Ensayos de cuantificación de copias del gen deberían de adicionarse a este estudio para descartar una diferencia entre la cantidad de copias, así como estudios de bombas de eflujo que no se han abordado en el marco de esta tesis y que se han asociado con una contribución a la resistencia (Padilla *et al.*, 2010).

6. PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES

Los objetivos de esta tesis versaron sobre la detección y caracterización de BLEEs de la familia CTX-M así como de carbapenemasas de la familia KPC en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes a antibióticos, tanto a nivel de las variantes circulantes, como a nivel de sus contextos genéticos inmediatos y sus vías de dispersión. Uno de los focos de esta tesis fue la detección de integrones atípicos en torno a los cuales se buscaron los genes *bla*_{CTX-M}. Por otra parte se enfatizó en la capacidad de transferencia de los determinantes de resistencia, y finalmente se analizó el perfil PME en búsqueda de otros factores que pudieran explicar los fenotipos resistentes.

Los resultados evidenciaron la diseminación del gen *bla*_{CTX-M-15} asociado a regiones RMD en los entornos de integrones atípicos portados en plásmidos conjugativos de diferentes tamaños. Estos integrones de estructura atípica sugirieron una alta prevalencia en la población estudiada indicando que las técnicas moleculares clásicas de detección de integrones por PCR de la *int1* y/o la RV subestiman enormemente la diversidad estructural de estos elementos. Por otra parte en un período de dos meses solamente, se evidenció casi un 50% de bacterias productoras de BLEE, correspondientes a dos pulsotipos y probablemente dos secuencia-tipos diferentes.

Asimismo, el gen *bla*_{KPC-2} circuló en dos isoformas diferentes del Tn4401, transposón más frecuentemente asociado al gen mencionado. Se encontró en la isoforma *a* dentro de un plásmido no transferible en aquellos aislamientos pertenecientes al primer brote de KPC. Por el contrario, se localizó en la isoforma *b* dentro de un plásmido conjugativo IncN en aquellos pertenecientes al segundo brote. Las diferentes isoformas podrían explicar las diferencias en los perfiles de sensibilidad a carbapenemes. En los aislamientos productores de KPC se hizo evidente la circulación de dos clonas absolutamente diferentes entre los brotes y probablemente con orígenes distintos.

En cuanto a la expresión de porinas, se reveló la falta de OmpK35 en todos los aislamientos estudiados (a excepción de uno de ellos cuando fue crecido en medio

de baja osmolaridad). Los genes de algunos de los aislamientos no pudieron amplificarse, lo cual conjuntamente con la baja cuantificación de sus ARNm y la ausencia de proteína, sugiere probablemente una inserción o deleción en la región promotora.

La expresión de OmpK36 resultó variable entre los aislamientos, apreciándose una clara disminución en un único aislamiento, productor de KPC-2, y aislado posteriormente a la antibiótico-terapia del paciente. El gen *ompK36* en este aislamiento no presentó mutaciones que pudieran explicar la disminución en su expresión, lo cual podría estar indicando una regulación de la expresión génica pre y/o post-transcripcional impulsada por la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos. Considerando que los ensayos de extracción de PME se realizaron en ausencia de presión antibiótica, esto indicaría que la disminución de la expresión de OmpK36 en este aislamiento versus su contraparte pre-terapia, constituye un evento heredable.

En suma, los resultados de esta tesis enfatizan la problemática que representa la multirresistencia a antibióticos, donde ya no puede ser explicada enteramente por la detección de genes individuales sin tener presente el rol que juegan los EGM en su generación y dispersión.

A pesar de los datos obtenidos, es claro que resta aún mucho trabajo para poder comprender cabalmente los múltiples factores que llevan a la multirresistencia en bacterias. Sería interesante evaluar la implicancia de las bombas de eflujo en los fenotipos de resistencia exhibidos, así como también poder cuantificar el número de copias de genes para KPC y CTX-M presentes en cada aislamiento, a modo de recabar más información para poder llegar a afirmaciones más concluyentes.

Asimismo, de disponer de la posibilidad, sería muy provechoso seguir indagando sobre los genes *ompK35* que no pudieron ser amplificados, por ejemplo mediante secuenciación por *primer walking*, o diseñando nuevos cebadores que hibriden con las secuencias de inserción más frecuentemente reportadas.

Finalmente, y no por ello menos importante, sería interesante construir bibliotecas fósmidas para poder caracterizar las plataformas en las cuales se encuentran embebidos los integrones atípicos que no evidenciaron la presencia de las mismas regiones que el aislamiento U20.

A pesar de que la era genómica y bioinformática permite análisis globales de plásmidos y hasta cromosomas bacterianos, los datos crudos de secuencias no aportan más que asociaciones entre diversos genes. Por lo tanto considero que cualquier abordaje que comience con la detección molecular debería de continuarse con ensayos funcionales. Esta tesis intentó conjugar aspectos moleculares con aspectos funcionales, si bien lo molecular predominó. Sería muy interesante poder continuar realizando estudios de funcionalidad de las diferentes proteínas y enzimas analizadas a modo de complementar y darle sentido biológico e utilidad directa en el área clínica a los resultados obtenidos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, A., Paikin, S., Sterlin, Y., Glick, J., Edgar, R., Aronov, R., . . . Carmeli, Y. (2012). A swordless knight: epidemiology and molecular characteristics of the blaKPC-negative sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae* clone. *J Clin Microbiol*, 50(10), 3180-3185. doi: 10.1128/JCM.00987-12
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289(1036), 321-331.
- Antoniadou, A., Kontopidou, F., Poulakou, G., Koratzanis, E., Galani, I., Papadomichelakis, E., . . . Giamarellou, H. (2007). Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother*, 59(4), 786-790. doi: 10.1093/jac/dkl562
- Antunes, P., Machado, J., y Peixe, L. (2007). Dissemination of sul3-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(4), 1545-1548. doi: 10.1128/AAC.01275-06
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. C., y Peixe, L. (2005). Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(2), 836-839. doi: 10.1128/AAC.49.2.836-839.2005
- Arduino, S. M., Roy, P. H., Jacoby, G. A., Orman, B. E., Pineiro, S. A., y Centron, D. (2002). blaCTX-M-2 is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(7), 2303-2306.
- Bado, I., Cordeiro, N. F., Robino, L., Garcia-Fulgueiras, V., Seija, V., Bazet, C., . . . Vignoli, R. (2010). Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum beta-lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *Int J Antimicrob Agents*, 36(5), 453-458. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.042
- Bado, I., García, V., Araujo, L., Seija, V., Cordeiro, N., Gutierrez, C., . . . Vignoli, R. (2014, September 5-9). *Klebsiella pneumoniae* ST258 Harboring ESBLs, But Not KPC Carbapenemases, In Clinical Isolates From Inpatients In An ICU From Uruguay. Paper presented at the 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC®), Washington, DC, USA.
- Bae, I. K., Lee, Y. H., Jeong, H. J., Hong, S. G., Lee, S. H., y Jeong, S. H. (2008). A novel bla(CTX-M-14) gene-harboring complex class 1 integron with an In4-like backbone structure from a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 62(3), 340-342. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.06.006

- Bauernfeind, A., Grimm, H., y Schweighart, S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, *18*(5), 294-298.
- Betteridge, T., Partridge, S. R., Iredell, J. R., y Stokes, H. W. (2011). Genetic context and structural diversity of class 1 integrons from human commensal bacteria in a hospital intensive care unit. *Antimicrob Agents Chemother*, *55*(8), 3939-3943. doi: 10.1128/AAC.01831-10
- Beutlich, J., Rodriguez, I., Schroeter, A., Kasbohrer, A., Helmuth, R., y Guerra, B. (2010). A predominant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Saintpaul clonal line in German turkey and related food products. *Appl Environ Microbiol*, *76*(11), 3657-3667. doi: 10.1128/AEM.02744-09
- Bogdanovich, T., Adams-Haduch, J. M., Tian, G. B., Nguyen, M. H., Kwak, E. J., Muto, C. A., y Doi, Y. (2011). Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clin Infect Dis*, *53*(4), 373-376. doi: 10.1093/cid/cir401
- Brown, H. J., Stokes, H. W., y Hall, R. M. (1996). The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *J Bacteriol*, *178*(15), 4429-4437.
- Bush, K. (1989). Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, *33*(3), 259-263.
- Bush, K., y Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*(3), 969-976. doi: 10.1128/AAC.01009-09
- Bush, K., Jacoby, G. A., y Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, *39*(6), 1211-1233.
- Cano, M. E., Rodriguez-Martinez, J. M., Aguero, J., Pascual, A., Calvo, J., Garcia-Lobo, J. M., . . . Martinez-Martinez, L. (2009). Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *J Clin Microbiol*, *47*(7), 2033-2039. doi: 10.1128/JCM.02229-08
- Canton, R., y Coque, T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*, *9*(5), 466-475. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.011
- Canton, R., Gonzalez-Alba, J. M., y Galan, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol*, *3*, 110. doi: 10.3389/fmicb.2012.00110
- Canton, R., y Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol*, *11*(5), 477-485. doi: 10.1016/j.coph.2011.07.007
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., y Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*, *63*(3), 219-228. doi: 10.1016/j.mimet.2005.03.018
- Carvalho, A. P., Albano, R. M., de Oliveira, D. N., Cidade, D. A., Teixeira, L. M., y Marques Ede, A. (2006). Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase

- in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist*, 12(2), 103-108. doi: 10.1089/mdr.2006.12.103
- Castanheira, M., Farrell, S. E., Deshpande, L. M., Mendes, R. E., y Jones, R. N. (2013). Prevalence of beta-lactamase-encoding genes among Enterobacteriaceae bacteremia isolates collected in 26 U.S. hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010). *Antimicrob Agents Chemother*, 57(7), 3012-3020. doi: 10.1128/AAC.02252-12
- Clancy, C. J., Chen, L., Hong, J. H., Cheng, S., Hao, B., Shields, R. K., . . . Nguyen, M. H. (2013). Mutations of the ompK36 porin gene and promoter impact responses of sequence type 258, KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains to doripenem and doripenem-colistin. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(11), 5258-5265. doi: 10.1128/AAC.01069-13
- CLSI. (2013). Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23. Wayne, PA, USA: CLSI.
- Coe, E., y Kass, L. B. (2005). Proof of physical exchange of genes on the chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(19), 6641-6646. doi: 10.1073/pnas.0407340102
- Coelho, A., Gonzalez-Lopez, J. J., Miro, E., Alonso-Tarres, C., Mirelis, B., Larrosa, M. N., . . . Prats, G. (2010). Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J Antimicrob Agents*, 36(1), 73-78. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.03.005
- Coque, T. M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., . . . Nordmann, P. (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*, 14(2), 195-200. doi: 10.3201/eid1402.070350
- Cordeiro, N. F., Robino, L., Medina, J., Seija, V., Bado, I., Garcia, V., . . . Vignoli, R. (2008). Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the aac(6')-Ib-cr variant isolated from feces of inpatients in an intensive care unit in Uruguay. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(2), 806-807. doi: 10.1128/AAC.00444-07
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 16(22), 10881-10890.
- Cuzon, G., Naas, T., Truong, H., Villegas, M. V., Wisell, K. T., Carmeli, Y., . . . Nordmann, P. (2010). Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis*, 16(9), 1349-1356. doi: 10.3201/eid1609.091389
- Chanawong, A., M'Zali, F. H., Heritage, J., Lulitanond, A., y Hawkey, P. M. (2001). SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother*, 48(6), 839-852.

- Damjanova, I., Toth, A., Paszti, J., Hajbel-Vekony, G., Jakab, M., Berta, J., . . . Fuzi, M. (2008). Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother*, *62*(5), 978-985. doi: 10.1093/jac/dkn287
- Domenech-Sanchez, A., Martinez-Martinez, L., Hernandez-Alles, S., del Carmen Conejo, M., Pascual, A., Tomas, J. M., . . . Benedi, V. J. (2003). Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, *47*(10), 3332-3335.
- Doublet, B., Praud, K., Weill, F. X., y Cloeckert, A. (2009). Association of IS26-composite transposons and complex In4-type integrons generates novel multidrug resistance loci in *Salmonella* genomic island 1. *J Antimicrob Chemother*, *63*(2), 282-289. doi: 10.1093/jac/dkn500
- Doumith, M., Ellington, M. J., Livermore, D. M., y Woodford, N. (2009). Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother*, *63*(4), 659-667. doi: 10.1093/jac/dkp029
- Dutzler, R., Rummel, G., Alberti, S., Hernandez-Alles, S., Phale, P., Rosenbusch, J., . . . Schirmer, T. (1999). Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure*, *7*(4), 425-434.
- Eckert, C., Gautier, V., y Arlet, G. (2006). DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes. *J Antimicrob Chemother*, *57*(1), 14-23. doi: 10.1093/jac/dki398
- Endimiani, A., Carias, L. L., Hujer, A. M., Bethel, C. R., Hujer, K. M., Perez, F., . . . Bonomo, R. A. (2008). Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, *52*(7), 2680-2682. doi: 10.1128/AAC.00158-08
- Ford, P. J., y Avison, M. B. (2004). Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother*, *54*(1), 69-75. doi: 10.1093/jac/dkh251
- Gales, A. C., Castanheira, M., Jones, R. N., y Sader, H. S. (2012). Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*, *73*(4), 354-360. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007
- Garcia-Fernandez, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D., y Carattoli, A. (2009). Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother*, *63*(2), 274-281. doi: 10.1093/jac/dkn470
- Garcia-Fernandez, A., Miriagou, V., Papagiannitsis, C. C., Giordano, A., Venditti, M., Mancini, C., y Carattoli, A. (2010). An ertapenem-resistant extended-

- spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(10), 4178-4184. doi: 10.1128/AAC.01301-09
- Garcia-Fernandez, A., Villa, L., Carta, C., Venditti, C., Giordano, A., Venditti, M., . . . Carattoli, A. (2012). *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(4), 2143-2145. doi: 10.1128/AAC.05308-11
- Garcia-Fulgueiras, V., Bado, I., Mota, M. I., Robino, L., Cordeiro, N. F., Varela, A., . . . Vignoli, R. (2011). Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother*, 66(8), 1725-1729. doi: 10.1093/jac/dkr222
- Ghigo, J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412(6845), 442-445. doi: 10.1038/35086581
- Gillings, M. R., Labbate, M., Sajjad, A., Giguere, N. J., Holley, M. P., y Stokes, H. W. (2009). Mobilization of a Tn402-like class 1 integron with a novel cassette array via flanking miniature inverted-repeat transposable element-like structures. *Appl Environ Microbiol*, 75(18), 6002-6004. doi: 10.1128/AEM.01033-09
- Gionechetti, F., Zucca, P., Gombac, F., Monti-Bragadin, C., Lagatolla, C., Tonin, E., . . . Dolzani, L. (2008). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from Mediterranean herring gulls (*Larus cachinnans*). *Microb Drug Resist*, 14(2), 93-99. doi: 10.1089/mdr.2008.0803
- Gomez, S. A., Pasteran, F. G., Faccone, D., Tijet, N., Rapoport, M., Lucero, C., . . . Petroni, A. (2011). Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect*, 17(10), 1520-1524. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03600.x
- Gonzales-Escalante, E. (2012). Metallo- β -lactamasas: ¿el fin de los β -lactámicos? *Revista Peruana de Epidemiología*, 16(3), 1-8.
- Gootz, T. D., Lescoe, M. K., Dib-Hajj, F., Dougherty, B. A., He, W., Della-Latta, P., y Huard, R. C. (2009). Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(5), 1998-2004. doi: 10.1128/AAC.01355-08
- . Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. (2008) (pp. 1-70): Applied Biosystems.
- Gunn, J. S. (2008). The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol*, 16(6), 284-290. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.007

- Hernandez-Alles, S., Alberti, S., Alvarez, D., Domenech-Sanchez, A., Martinez-Martinez, L., Gil, J., . . . Benedi, V. J. (1999). Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*, *145* (Pt 3), 673-679.
- Hernandez-Alles, S., Benedi, V. J., Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Aguilar, A., Tomas, J. M., y Alberti, S. (1999). Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob Agents Chemother*, *43*(4), 937-939.
- Hope, R., Pllana, T., James, D., Warner, M., y Livermore, D. M. (2010). Zone breakpoints, by the CLSI disc method, for 15 mug tigecycline discs corresponding to EUCAST MIC breakpoints. *J Antimicrob Chemother*, *65*(10), 2262-2264. doi: 10.1093/jac/dkq288
- Hsueh, P. R., Wu, J. J., Teng, L. J., Chen, Y. C., Yang, P. C., Ho, S. W., y Luh, K. T. (2002). Primary liver abscess caused by one clone of *Klebsiella pneumoniae* with two colonial morphotypes and resistotypes. *Emerg Infect Dis*, *8*(1), 100-102.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, *22*(1), 161-182, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00036-08
- Jacoby, G. A., Mills, D. M., y Chow, N. (2004). Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, *48*(8), 3203-3206. doi: 10.1128/AAC.48.8.3203-3206.2004
- Jaurin, B., y Grundstrom, T. (1981). ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *78*(8), 4897-4901.
- Kaczmarek, F. M., Dib-Hajj, F., Shang, W., y Gootz, T. D. (2006). High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoe. *Antimicrob Agents Chemother*, *50*(10), 3396-3406. doi: 10.1128/AAC.00285-06
- Kadlec, K., y Schwarz, S. (2008). Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. *J Antimicrob Chemother*, *62*(3), 469-473. doi: 10.1093/jac/dkn233
- Kado, C. I., y Liu, S. T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol*, *145*(3), 1365-1373.
- Kang, H. Y., Jeong, Y. S., Oh, J. Y., Tae, S. H., Choi, C. H., Moon, D. C., . . . Lee, J. C. (2005). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother*, *55*(5), 639-644. doi: 10.1093/jac/dki076
- Kang, H. Y., Tamang, M. D., Seol, S. Y., y Kim, J. (2009). Dissemination of Plasmid-mediated qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA Genes Among 16S rRNA Methylase

- Producing Enterobacteriaceae in Korea *Journal of Bacteriology and Virology*, 39(3), 173-182.
- Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S., y Nordmann, P. (2001). Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett*, 201(2), 237-241.
- Kitchel, B., Rasheed, J. K., Endimiani, A., Hujer, A. M., Anderson, K. F., Bonomo, R. A., y Patel, J. B. (2010). Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(10), 4201-4207. doi: 10.1128/AAC.00008-10
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., y Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, ceftoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11(6), 315-317.
- Kontopoulou, K., Protonotariou, E., Vasilakos, K., Kriti, M., Koteli, A., Antoniadou, E., y Sofianou, D. (2010). Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect*, 76(1), 70-73. doi: 10.1016/j.jhin.2010.03.021
- Koressaar, T., y Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289-1291. doi: 10.1093/bioinformatics/btm091
- Labbate, M., Roy Chowdhury, P., y Stokes, H. W. (2008). A class 1 integron present in a human commensal has a hybrid transposition module compared to Tn402: evidence of interaction with mobile DNA from natural environments. *J Bacteriol*, 190(15), 5318-5327. doi: 10.1128/JB.00199-08
- LAHEY. (October 29th, 2014). β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes Retrieved September 16th, 2014, from <http://www.lahey.org/Studies>
- Landman, D., Bratu, S., Kochar, S., Panwar, M., Trehan, M., Doymaz, M., y Quale, J. (2007). Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother*, 60(1), 78-82. doi: 10.1093/jac/dkm129
- Landman, D., Bratu, S., y Quale, J. (2009). Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol*, 58(Pt 10), 1303-1308. doi: 10.1099/jmm.0.012575-0
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En E. Stackbrandt y M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115 - 176). Chichester: Wiley.
- Lapierre, L., Cornejo, J., Borie, C., Toro, C., y San Martin, B. (2008). Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2

- integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. *Microb Drug Resist*, 14(4), 265-272. doi: 10.1089/mdr.2008.0810
- Lartigue, M. F., Poirel, L., Aubert, D., y Nordmann, P. (2006). In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(4), 1282-1286. doi: 10.1128/AAC.50.4.1282-1286.2006
- Lartigue, M. F., Poirel, L., Poyart, C., Reglier-Poupet, H., y Nordmann, P. (2007). Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*, 13(2), 315-317. doi: 10.3201/eid1302.060747
- Lawlor, M. S., Hsu, J., Rick, P. D., y Miller, V. L. (2005). Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol*, 58(4), 1054-1073. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04918.x
- Lee, J., Patel, G., Huprikar, S., Calfee, D. P., y Jenkins, S. G. (2009). Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol*, 47(5), 1611-1612. doi: 10.1128/JCM.02466-08
- Li, J., Ma, Y. X., Zhang, Q. B., Zhou, Y. A., Shang, R. P., Li, P. L., y Hao, Z. Q. (2013). [Correlations of integrons and resistance gene cassettes in Gram-negative bacteria with multi-drug resistance]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 93(46), 3698-3702.
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., . . . Woodford, N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*, 59(2), 165-174. doi: 10.1093/jac/dkl483
- Livermore, D. M., y Hawkey, P. M. (2005). CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J Antimicrob Chemother*, 56(3), 451-454. doi: 10.1093/jac/dki239
- Mabilat, C., y Goussard, S. (1993). PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases. En D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover y T. J. White (Eds.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications* (pp. 553-559). Washington, D.C: American Society for Microbiology.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., . . . Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18(3), 268-281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Marquez, C., Labbate, M., Raymondo, C., Fernandez, J., Gestal, A. M., Holley, M., . . . Stokes, H. W. (2008). Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous

- and site-specific recombination. *J Clin Microbiol*, 46(10), 3417-3425. doi: 10.1128/JCM.00835-08
- Marquez, C., Xia, M., Borthagaray, G., y Roberts, M. C. (1999). Conjugal transfer of the 3.05 beta-lactamase plasmid by the 25.2 Mda plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Dis*, 26(3), 157-159.
- Martinez-Martinez, L. (2008). Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect*, 14 Suppl 1, 82-89. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01860.x
- Martinez-Martinez, L., Hernandez-Alles, S., Alberti, S., Tomas, J. M., Benedi, V. J., y Jacoby, G. A. (1996). In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(2), 342-348.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Conejo Mdel, C., Garcia, I., Joyanes, P., Domenech-Sanchez, A., y Benedi, V. J. (2002). Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(12), 3926-3932.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Hernandez-Alles, S., Alvarez-Diaz, D., Suarez, A. I., Tran, J., . . . Jacoby, G. A. (1999). Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(7), 1669-1673.
- Martinez, E., Pérez, J. E., Márquez, C., Vilacoba, E., Centrón, D., Leal, A. L., . . . Stokes, H. W. (2013). Emerging and existing mechanisms co-operate in generating diverse β -lactam resistance phenotypes in geographically dispersed and genetically disparate *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 1(3), 135-142. doi: 10.1016/j.jgar.2013.03.013
- Mataseje, L. F., Boyd, D. A., Willey, B. M., Prayitno, N., Kreiswirth, N., Gelosia, A., . . . Mulvey, M. R. (2011). Plasmid comparison and molecular analysis of *Klebsiella pneumoniae* harbouring bla(KPC) from New York City and Toronto. *J Antimicrob Chemother*, 66(6), 1273-1277. doi: 10.1093/jac/dkr092
- Matatov, R., Goldhar, J., Skutelsky, E., Sechter, I., Perry, R., Podschun, R., . . . Ofek, I. (1999). Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. *FEMS Microbiol Lett*, 179(1), 123-130.
- Maynard, C., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R. C., Brousseau, R., Masson, L., . . . Harel, J. (2004). Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J Clin Microbiol*, 42(12), 5444-5452. doi: 10.1128/JCM.42.12.5444-5452.2004
- Mella, S., Sepúlveda, M., González, G., Bello, H., Domínguez, M., Zemelman, R., y Ramírez, C. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características

- estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 21(4), 330-338.
- Mena, A., Plasencia, V., Garcia, L., Hidalgo, O., Ayestaran, J. I., Alberti, S., . . . Oliver, A. (2006). Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol*, 44(8), 2831-2837. doi: 10.1128/JCM.00418-06
- Miriagou, V., Carattoli, A., Tzelepi, E., Villa, L., y Tzouvelekis, L. S. (2005). IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(8), 3541-3543. doi: 10.1128/AAC.49.8.3541-3543.2005
- Miro, E., Grunbaum, F., Gomez, L., Rivera, A., Mirelis, B., Coll, P., y Navarro, F. (2013). Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist*, 19(2), 94-99. doi: 10.1089/mdr.2012.0125
- Mokracka, J., Koczura, R., Pawlowski, K., y Kaznowski, A. (2011). Resistance patterns and integron cassette arrays of *Enterobacter cloacae* complex strains of human origin. *J Med Microbiol*, 60(Pt 6), 737-743. doi: 10.1099/jmm.0.027979-0
- Montesinos, I., Rodriguez-Villalobos, H., De Mendonca, R., Bogaerts, P., Deplano, A., y Glupczynski, Y. (2010). Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase associated with the ST131 *Escherichia coli* clone in Belgium. *J Antimicrob Chemother*, 65(8), 1828-1830. doi: 10.1093/jac/dkq208
- Moreland, J. L., Gramada, A., Buzko, O. V., Zhang, Q., y Bourne, P. E. (2005). The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics*, 6, 21. doi: 10.1186/1471-2105-6-21
- Motsch, S., Schmitt, R., Avila, P., de la Cruz, F., Ward, E., y Grinstead, J. (1985). Junction sequences generated by 'one-ended transposition'. *Nucleic Acids Res*, 13(9), 3335-3342.
- Moura, A., Araujo, S., Alves, M. S., Henriques, I., Pereira, A., y Correia, A. C. (2014). The contribution of *Escherichia coli* from human and animal sources to the integron gene pool in coastal waters. *Front Microbiol*, 5, 419. doi: 10.3389/fmicb.2014.00419
- Moura, A., Pereira, C., Henriques, I., y Correia, A. (2012). Novel gene cassettes and integrons in antibiotic-resistant bacteria isolated from urban wastewaters. *Res Microbiol*, 163(2), 92-100. doi: 10.1016/j.resmic.2011.10.010
- Naas, T., Cuzon, G., Truong, H. V., y Nordmann, P. (2012). Role of ISKpn7 and deletions in blaKPC gene expression. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(9), 4753-4759. doi: 10.1128/AAC.00334-12

- Naas, T., Cuzon, G., Villegas, M. V., Lartigue, M. F., Quinn, J. P., y Nordmann, P. (2008). Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(4), 1257-1263. doi: 10.1128/AAC.01451-07
- Naseer, U., Haldorsen, B., Tofteland, S., Hegstad, K., Scheutz, F., Simonsen, G. S., y Sundsfjord, A. (2009). Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of Escherichia coli reveals the spread of multidrug-resistant ST131 (O25:H4) and ST964 (O102:H6) strains in Norway. *APMIS*, 117(7), 526-536. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02465.x
- Noguchi, N., Takada, K., Katayama, J., Emura, A., y Sasatsu, M. (2000). Regulation of transcription of the mph(A) gene for macrolide 2'-phosphotransferase I in Escherichia coli: characterization of the regulatory gene mphR(A). *J Bacteriol*, 182(18), 5052-5058.
- Nordmann, P., Cuzon, G., y Naas, T. (2009). The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, 9(4), 228-236. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70054-4
- Nordmann, P., y Poirel, L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*, 8(6), 321-331.
- Nuesch-Inderbinnen, M. T., Kayser, F. H., y Hachler, H. (1997). Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(5), 943-949.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., y Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299-304. doi: 10.1038/35012500
- Onyango, D. M., Ndeda, V. M., Wandili, S. A., Wawire, S. A., y Ochieng, P. (2014). Antimicrobial profile of Salmonella enterica serotype Choleraesuis from free-range swine in Kakamega fish market, western Kenya. *J Infect Dev Ctries*, 8(11), 1381-1390. doi: 10.3855/jidc.3861
- Oteo, J., Cuevas, O., Lopez-Rodriguez, I., Banderas-Florido, A., Vindel, A., Perez-Vazquez, M., . . . Campos, J. (2009). Emergence of CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother*, 64(3), 524-528. doi: 10.1093/jac/dkp211
- Oteo, J., Delgado-Iribarren, A., Vega, D., Bautista, V., Rodriguez, M. C., Velasco, M., . . . Campos, J. (2008). Emergence of imipenem resistance in clinical Escherichia coli during therapy. *Int J Antimicrob Agents*, 32(6), 534-537. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.06.012
- Ouellette, M., Bissonnette, L., y Roy, P. H. (1987). Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21), 7378-7382.

- . P. R. Vademécum. Retrieved November 15th, 2014, from <http://uy.prvademecum.com/>
- Padilla, E., Llobet, E., Domenech-Sanchez, A., Martinez-Martinez, L., Bengoechea, J. A., y Alberti, S. (2010). Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*(1), 177-183. doi: 10.1128/AAC.00715-09
- Padungtod, P., Tribuddharat, C., y Chuanchuen, R. (2011). Widespread presence of dfrA12 and its association with dfrA12-aadA2 cassette in Salmonella enterica isolates from swine. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, *42*(6), 1471-1476.
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahn, D., y Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, *50*(11), 3953-3955. doi: 10.1128/AAC.00915-06
- Pasteran, F., Lucero, C., Soloaga, R., Rapoport, M., y Corso, A. (2011). Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of Enterobacteriaceae? *J Clin Microbiol*, *49*(2), 697-701. doi: 10.1128/JCM.01178-10
- Paterson, D. L., y Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, *18*(4), 657-686. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
- Pembroke, J. T., MacMahon, C., y McGrath, B. (2002). The role of conjugative transposons in the Enterobacteriaceae. *Cell Mol Life Sci*, *59*(12), 2055-2064.
- Peng, C. F., Lee, M. F., Fu, H. T., Chen, Y. J., y Hsu, H. J. (2007). Characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in CTX-M-3-producing Serratia marcescens isolates from southern Taiwan. *Jpn J Infect Dis*, *60*(5), 250-256.
- Pereira, P. S., de Araujo, C. F., Seki, L. M., Zahner, V., Carvalho-Assef, A. P., y Asensi, M. D. (2013). Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother*, *68*(2), 312-316. doi: 10.1093/jac/dks396
- Podschun, R., y Ullmann, U. (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*, *11*(4), 589-603.
- Poirel, L., Decousser, J. W., y Nordmann, P. (2003). Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother*, *47*(9), 2938-2945.
- Poirel, L., Heritier, C., Tolun, V., y Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother*, *48*(1), 15-22.

- Queenan, A. M., y Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 20(3), 440-458, table of contents. doi: 10.1128/CMR.00001-07
- Randall, W. A. (1939). Colony and Antigenic Variation in *Klebsiella pneumoniae* Types A, B and C. *J Bacteriol*, 38(4), 461-477.
- Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., . . . Tenover, F. C. (1997). Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(3), 647-653.
- Robert, X., y Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDScript server. *Nucleic Acids Res*, 42(Web Server issue), W320-324. doi: 10.1093/nar/gku316
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., . . . Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*, 12(1), 83-88. doi: 10.1038/nm1347
- Robino, L., Telechea, H., Speranza, N., Garcia-Fulgueiras, V., Cordeiro, N., Bado, I., . . . Vignoli, R. (2013). Risk factors for the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospitalized children. *J Infect Dev Ctries*, 7(4), 361-364. doi: 10.3855/jidc.3014
- Rodriguez-Martinez, J. M., Poirel, L., y Nordmann, P. (2009). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(11), 4783-4788. doi: 10.1128/AAC.00574-09
- Rodriguez, M. M., Power, P., Radice, M., Vay, C., Famiglietti, A., Galleni, M., . . . Gutkind, G. (2004). Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12), 4895-4897. doi: 10.1128/AAC.48.12.4895-4897.2004
- Roy Chowdhury, P., Ingold, A., Vanegas, N., Martinez, E., Merlino, J., Merkier, A. K., . . . Stokes, H. W. (2011). Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(7), 3140-3149. doi: 10.1128/AAC.01529-10
- Ruiz, E., Ocampo-Sosa, A. A., Rezusta, A., Revillo, M. J., Roman, E., Torres, C., y Martinez-Martinez, L. (2012). Acquisition of carbapenem resistance in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strains harbouring blaCTX-M-15, qnrS1 and aac(6)-Ib-cr genes. *J Med Microbiol*, 61(Pt 5), 672-677. doi: 10.1099/jmm.0.038083-0
- Ryu, S. H., Park, S. G., Choi, S. M., Hwang, Y. O., Ham, H. J., Kim, S. U., . . . Chae, Y. Z. (2012). Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli*

- strains isolated from commercial fish and seafood. *Int J Food Microbiol*, 152(1-2), 14-18. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.003
- Sader, H. S., Jones, R. N., Gales, A. C., Silva, J. B., y Pignatari, A. C. (2004). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis*, 8(1), 25-79. doi: /S1413-86702004000100004
- Sader, H. S., Reis, A. O., Silbert, S., y Gales, A. C. (2005). IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect*, 11(1), 73-76. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01031.x
- Saenz, Y., Vinue, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martinez, S., Rojo-Bezares, B., . . . Torres, C. (2010). Class 1 integrons lacking qacEDelta1 and sul1 genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Vet Microbiol*, 144(3-4), 493-497. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.01.026
- Saladin, M., Cao, V. T., Lambert, T., Donay, J. L., Herrmann, J. L., Ould-Hocine, Z., . . . Arlet, G. (2002). Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett*, 209(2), 161-168.
- San Martin, B., Lapierre, L., Cornejo, J., y Bucarey, S. (2008). Characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and 2 integrons in strains of *Salmonella* spp. isolated from swine. *Can J Microbiol*, 54(7), 569-576. doi: 10.1139/w08-045
- Santos, C., Caetano, T., Ferreira, S., y Mendo, S. (2010). Tn5090-like class 1 integron carrying bla(VIM-2) in a *Pseudomonas putida* strain from Portugal. *Clin Microbiol Infect*, 16(10), 1558-1561. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03165.x
- Seki, L. M., Pereira, P. S., de Souza Mda, P., Conceicao Mde, S., Marques, E. A., Porto, C. O., . . . Asensi, M. D. (2011). Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70(2), 274-277. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.006
- Seol, S. Y., Kim, Y. T., Jeong, Y. S., Oh, J. Y., Kang, H. Y., Moon, D. C., . . . Lee, J. C. (2006). Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Shigella sonnei* isolates in Korea. *J Med Microbiol*, 55(Pt 7), 871-877. doi: 10.1099/jmm.0.46441-0
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., y Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*, 57(1), 138-163.
- Shen, P., Wei, Z., Jiang, Y., Du, X., Ji, S., Yu, Y., y Li, L. (2009). Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(10), 4333-4338. doi: 10.1128/AAC.00260-09

- Sho, T., Muratani, T., Hamasuna, R., Yakushiji, H., Fujimoto, N., y Matsumoto, T. (2013). The mechanism of high-level carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*: underlying Ompk36-deficient strains represent a threat of emerging high-level carbapenem-resistant *K. pneumoniae* with IMP-1 beta-lactamase production in Japan. *Microb Drug Resist*, *19*(4), 274-281. doi: 10.1089/mdr.2012.0248
- Shoma, S., Kamruzzaman, M., Ginn, A. N., Iredell, J. R., y Partridge, S. R. (2014). Characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Australia carrying blaNDM-1. *Diagn Microbiol Infect Dis*, *78*(1), 93-97. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.001
- Siu, L. K., Lin, J. C., Gomez, E., Eng, R., y Chiang, T. (2012). Virulence and plasmid transferability of KPC *Klebsiella pneumoniae* at the Veterans Affairs Healthcare System of New Jersey. *Microb Drug Resist*, *18*(4), 380-384. doi: 10.1089/mdr.2011.0241
- Smet, A., Van Nieuwerburgh, F., Vandekerckhove, T. T., Martel, A., Deforce, D., Butaye, P., y Haesebrouck, F. (2010). Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates: insertional events of transposons and insertion sequences. *PLoS One*, *5*(6), e11202. doi: 10.1371/journal.pone.0011202
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., y de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, *74*(3), 434-452. doi: 10.1128/MMBR.00020-10
- Soufi, L., Abbassi, M. S., Saenz, Y., Vinue, L., Somalo, S., Zarazaga, M., . . . Torres, C. (2009). Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathog Dis*, *6*(9), 1067-1073. doi: 10.1089/fpd.2009.0284
- Sougakoff, W., Goussard, S., Gerbaud, G., y Courvalin, P. (1988). Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis*, *10*(4), 879-884.
- Stokes, H. W., y Gillings, M. R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, *35*(5), 790-819. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x
- Stokes, H. W., y Hall, R. M. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol*, *3*(12), 1669-1683.
- Stokes, H. W., Nesbo, C. L., Holley, M., Bahl, M. I., Gillings, M. R., y Boucher, Y. (2006). Class 1 integrons potentially predating the association with tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *J Bacteriol*, *188*(16), 5722-5730. doi: 10.1128/JB.01950-05

- Stokes, H. W., Tomaras, C., Parsons, Y., 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*, *30*(1), 39-50. doi: 10.1006/plas.1993.1032
- Streicher, S., Gurney, E., y Valentine, R. C. (1971). Transduction of the nitrogen-fixation genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *68*(6), 1174-1177.
- Tofteland, S., Naseer, U., Lislevand, J. H., Sundsfjord, A., y Samuelsen, O. (2013). A long-term low-frequency hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* involving Intergenous plasmid diffusion and a persisting environmental reservoir. *PLoS One*, *8*(3), e59015. doi: 10.1371/journal.pone.0059015
- Toleman, M. A., y Walsh, T. R. (2011). Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, *35*(5), 912-935. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00294.x
- Toth, A., Damjanova, I., Puskas, E., Janvari, L., Farkas, M., Dobak, A., . . . Paszti, J. (2010). Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *29*(7), 765-769. doi: 10.1007/s10096-010-0921-3
- Tsai, Y. K., Fung, C. P., Lin, J. C., Chen, J. H., Chang, F. Y., Chen, T. L., y Siu, L. K. (2011). *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*, *55*(4), 1485-1493. doi: 10.1128/AAC.01275-10
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., y Rozen, S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, *40*(15), e115. doi: 10.1093/nar/gks596
- Vignoli, R., Cordeiro, N., Seija, V., Schelotto, F., Radice, M., Ayala, J., . . . Gutkind, G. (2006). [Genetic environment of CTX-M-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in Uruguay]. *Rev Argent Microbiol*, *38*(2), 84-88.
- Vranic-Ladavac, M., Bosnjak, Z., Beader, N., Barisic, N., Kalenic, S., y Bedenic, B. (2010). Clonal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Croatian hospital. *J Med Microbiol*, *59*(Pt 9), 1069-1078. doi: 10.1099/jmm.0.019778-0
- Walsh, T. R. (2006). Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr Opin Microbiol*, *9*(5), 476-482. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.009
- Wang, G., Huang, T., Surendraiah, P. K., Wang, K., Komal, R., Zhuge, J., . . . Wormser, G. P. (2013). CTX-M beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in suburban New York City, New York, USA. *Emerg Infect Dis*, *19*(11), 1803-1810. doi: 10.3201/eid1911.121470
- Wang, M., Tran, J. H., Jacoby, G. A., Zhang, Y., Wang, F., y Hooper, D. C. (2003). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*, *47*(7), 2242-2248.

- Wannaprasat, W., Padungtod, P., y Chuanchuen, R. (2011). Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. *Int J Antimicrob Agents*, 37(5), 457-461. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.12.001
- Woodford, N., Carattoli, A., Karisik, E., Underwood, A., Ellington, M. J., y Livermore, D. M. (2009). Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(10), 4472-4482. doi: 10.1128/AAC.00688-09
- Woodford, N., Turton, J. F., y Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 35(5), 736-755. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x
- Yang, Q., Wang, H., Sun, H., Chen, H., Xu, Y., y Chen, M. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(1), 573-577. doi: 10.1128/AAC.01099-09
- Yao, F., Qian, Y., Chen, S., Wang, P., y Huang, Y. (2007). Incidence of extended-spectrum beta-lactamases and characterization of integrons in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Shantou, China. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39(7), 527-532.
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., . . . Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(4), 1151-1161. doi: 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001
- Zhang, Y., Jiang, X., Wang, Y., Li, G., Tian, Y., Liu, H., . . . Rajakumar, K. (2014). Contribution of beta-lactamases and porin proteins OmpK35 and OmpK36 to carbapenem resistance in clinical isolates of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(2), 1214-1217. doi: 10.1128/AAC.02045-12
- Zhuo, C., Li, X. Q., Zong, Z. Y., y Zhong, N. S. (2013). Epidemic plasmid carrying bla(CTX-M-15) in *Klebsiella pneumoniae* in China. *PLoS One*, 8(1), e52222. doi: 10.1371/journal.pone.0052222
- Zong, Z., Partridge, S. R., y Iredell, J. R. (2010). ISEcp1-mediated transposition and homologous recombination can explain the context of bla(CTX-M-62) linked to qnrB2. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(7), 3039-3042. doi: 10.1128/AAC.00041-10

8. ANEXO I: Sitio de corte de *FokI*



Figura Anexo I.1. Sitio de reconocimiento de corte de la enzima de restricción *FokI*. En rojo se recuadra la posición que en el gen *aac6'-Ib* es polimórfica y diferencia el alelo salvaje del alelo *aac6'-Ib-cr*.

9. ANEXO II: Cebadores utilizados para tipificación plasmídica

Tabla Anexo II.1. Tabla de cebadores utilizados para tipificar el grupo de incompatibilidad plasmídica. Extraída de Carattoli *et al.*, 2005.

Table 1
Primers used in this study

Name	DNA sequence	Target site	EMBL accession no.	Amplicon size (bp)
H11 FW	5'-ggagcgatggattacttcagtac-3'	parA-parB	AF250878	471
H11 RV	5'-tgccgtttcaacctgtagta-3'			
H12 FW	5'-tttctctgagtcacctgttaaac-3'	iterons	BX664015	644
H12 RV	5'-ggctcaactaccgttgcacatcct-3'			
I1 FW	5'-cgaagccggacggcagaa-3'	RNAI	M20413	139
I1 RV	5'-tcgtcgttcgccaagtcgt-3'			
X FW	5'-aaccttagaggctatttaagtgtgat-3'	ori γ	Y00768	376
X RV	5'-tgagagtcgaattttatctcatgttttagc-3'			
L/M FW	5'-ggatgaaaactacagcatctgaag-3'	repA,B,C	U27345	785
L/M RV	5'-ctgcaggggcattcttagg-3'			
N FW	5'-gtctaacgagcttaccgaag-3'	repA	NC_003292	559
N RV	5'-gttcaactctgccaagttc-3'			
FIA FW	5'-ccatgctgttctagagaagtg-3'	iterons	J01724	462
FIA RV	5'-gtatctcttactggcttccgag-3'			
FIB FW	5'-ggagttctgacacacgattttctg-3'	repA	M26308	702
FIB RV	5'-ctcccgtcctcagggcatt-3'			
W FW	5'-cctaagaacaacaagcccccg-3'	repA	U12441	242
W RV	5'-ggtgcgcggcatagaaccgt-3'			
Y FW	5'-aattcaacaacactgtgcagcctg-3'	repA	K02380	765
Y RV	5'-gcgagaatggacgattacaaaacttt-3'			
P FW	5'-ctatggcctgcaaacgcgccagaaa-3'	iterons	M20134	534
P RV	5'-tcacgcgccagggcgcagcc-3'			
FIC FW	5'-gtgaactggcagatgaggaagg-3'	repA2	AH003523	262
FIC RV	5'-ttctctctgcccactagat-3'			
A/C FW	5'-gagaaccaaaagacaaagacctgga-3'	repA	X73674	465
A/C RV	5'-acgacaaacctgaattgcctctt-3'			
T FW	5'-ttggcctgtttgacctaaacct-3'	repA	K00053	750
T RV	5'-cgttgattacttagctttggac-3'			
FII _S FW	5'-ctgtcgttaagctgatggc-3'	repA	AE006471	270
FII _S RV	5'-ctctgccacaaaactcagc-3'			
F _{repB} FW	5'-tgatcgtttaaggattttg-3'	RNAI/repA	AY234375	270
F _{repB} RV	5'-gaagatcagtcacaccatcc-3'			
K/B FW	5'-gcgtccggaaagccagaaaac-3'	RNAI	M93063	160
K RV	5'-tccttcagagcccgcacaa-3'			
B/O RV	5'-tctgcgttcgccaagttcga-3'	RNAI	M28718	159

10. ANEXO III: Resultados de ensayos de microdilución a Aminoglucósidos

Tabla Anexo III 1. Resultados de ensayos de microdilución a aminoglucósidos de aislamientos estudiados en el HUMV, llevados adelante por un estudiante del Servicio de Microbiología, bajo la orientación de la Dra. Marta Fernández.

Aislamiento	Ge	MICRODILUCION										Perfil de Resistencia	
		EUCAST >4	To	EUCAST >4	Nm	EUCAST >8	Nt	EUCAST >4	Ak	EUCAST >16	K		EUCAST >8
1104	0,25		≤0,125		0,5		≤0,125		0,5		2		sensible
19/1B	128	R	32	R	>128	R	32	R	8		>256	R	GKTNmNt
19/1C	≤0,125		≤0,125		16	R	≤0,125		≤0,25		256	R	KNm
19/2 SDR	0,5		0,25		64	R	0,25		0,5		256	R	KNm
20/1	>128	R	16	R	128	R	8	R	4		>256	R	GKTNmNt
POST	>128	R	>128	R	128	R	>128	R	32	R	>256	R	AGKTNmNt
PRE	64	R	128	R	64	R	>128	R	16	R	>256	R	AGKTNmNt

Ge, G: Gentamicina; To, T: Tobramicina; Nm: Neomicina; Nt: Netilmicina; Ak, A: Amicacina; K: Kanamicina; EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

11. ANEXO IV: Protocolo de ensayo de formación de Biofilms

1. A partir de un cultivo *overnight* en placa de MHA, se prepararon cultivos en suero fisiológico a una densidad de 0,5 Mac Farland los cuales fueron diluidos al 1:100 en caldo MH.
2. Se sembraron 500µl de cada una de estas diluciones y 500µl de caldo MH en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos. Como control negativo se sembró 1ml de caldo MH y como control positivo una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* previamente caracterizada como productora de biofilms. Cada cepa se sembró por duplicado en la placa, y el experimento biológico se hizo por duplicado.
3. Se dejó la placa en estufa a 37°C por 48hs.
4. Se removió el medio de cultivo de cada pocillo y se lavó dos veces con 1ml de suero fisiológico cada vez.
5. Se agregó 1ml de cristal violeta en cada pocillo y se dejó incubando la placa a temperatura ambiente por 12 minutos.
6. Posteriormente se removió el cristal violeta y se volvió a lavar dos veces con 1ml de suero fisiológico cada vez.
7. Se dejó secar la placa y luego se agregó 1ml de ácido acético al 33% en cada pocillo. Se incubó la placa por 2 minutos a temperatura ambiente, con agitación.
8. Finalmente se midió la absorbancia a 620nm del volumen resuspendido, normalizando con el valor del control negativo.
9. Se realizó la media de los duplicados y posteriormente la media de ambos experimentos.
10. La evaluación de la capacidad de formación de biofilms fue realizada por análisis estadísticos.

12. ANEXO V: Diferentes morfotipos de colonia

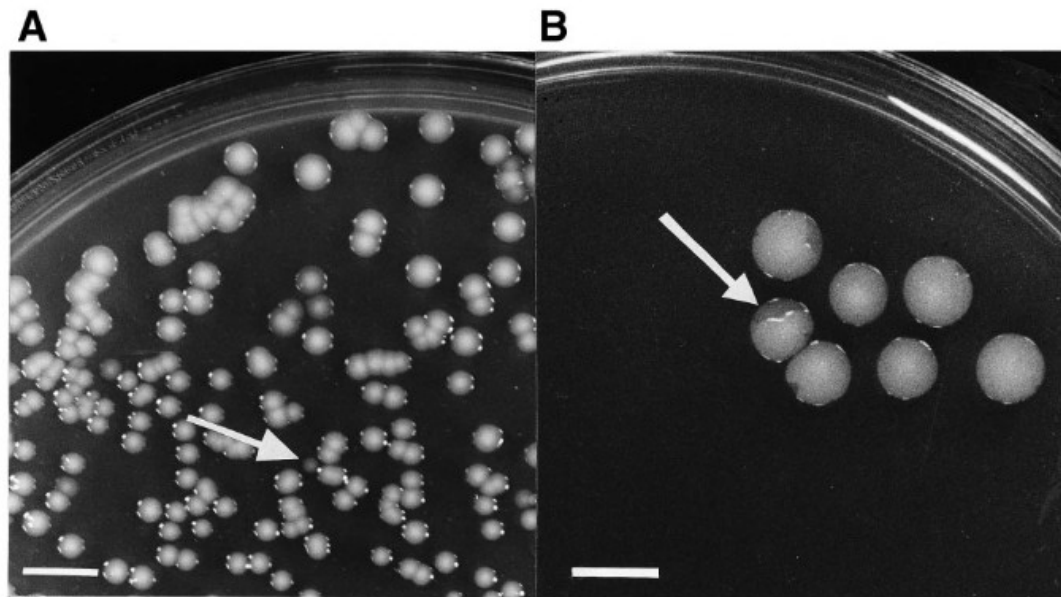
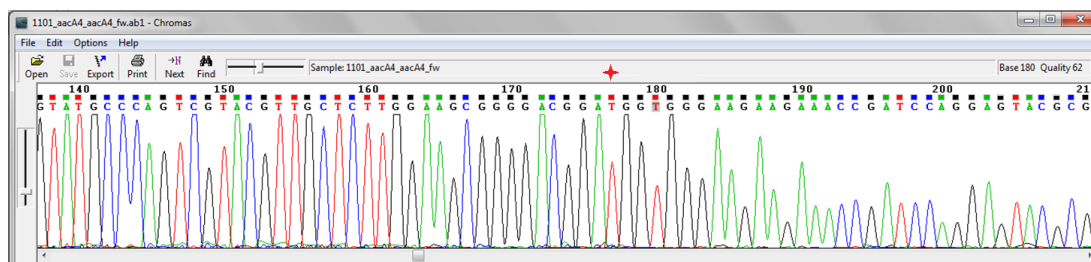


Figura Anexo V. 1. Morfología de colonia de cepa parental K21a. A. Una suspensión bacteriana fue plaqueada en TSA e incubada por 18hs. La flecha indica la variante translúcida no-mucoide. **B.** Cultivo incubado por 48hs. La flecha indica segmentos translúcidos no-mucoides. Tomada de Matatov *et al.* 1999. La imagen B refleja cómo se veía el cultivo del aislamiento 19/1 a las 72hs para algunas de las colonias.

13. APÉNDICE I: Cromatogramas de gen *aac6'-Ib*

A.



B.

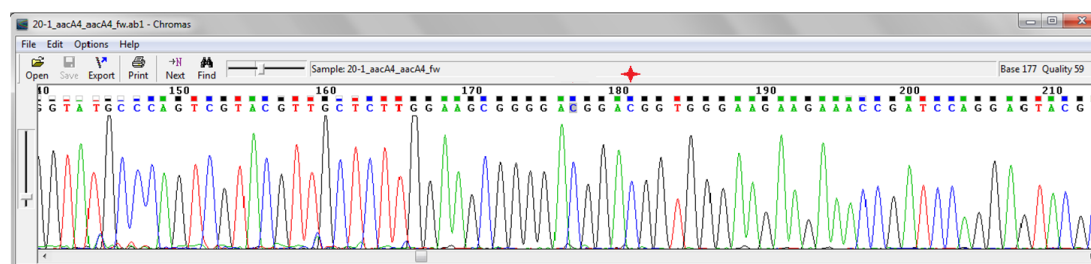


Figura Apéndice I.1. Cromatogramas de un fragmento del gen *aac6'-Ib* mostrando la posición 304 polimórfica entre alelos. A. Aislamiento 1101. La posición T304 se indica con una estrella sobre el cromatograma, la T indica que se trata del alelo salvaje (*aac6'-Ib*). B. Aislamiento 20-1. La posición C304 se indica con una estrella sobre el cromatograma, la C indica que se trata del alelo *aac6'-Ib-cr*.

15. APÉNDICE III: Resultados de ensayo de formación de *biofilms*

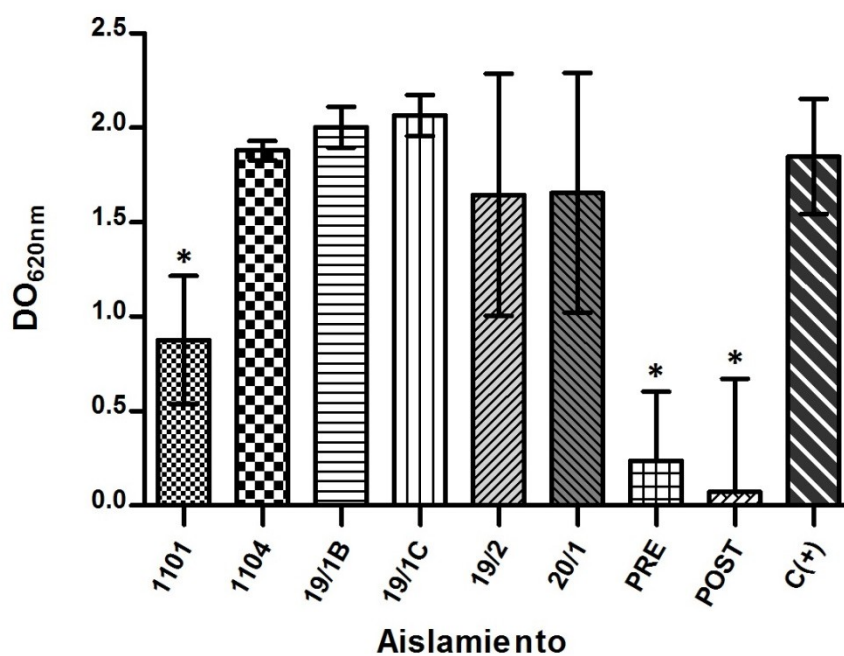


Figura Apéndice III.1. Resultado de ensayo de formación de *biofilms*. Se muestran los promedios dos réplicas y dos experimentos biológicos independientes en los cuales se mide la densidad óptica a 620nm luego de teñir el crecimiento bacteriano con cristal violeta según protocolo indicado en Anexo III. Como control positivo de formación de *biofilms* se utilizó un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* previamente caracterizado en el HUMV como productor de *biofilms*. Los asteriscos indican diferencias significativas en la densidad óptica comparados con el C(+) y la media de todas las muestras (por análisis de ANOVA de una vía y por test *t* de Student de dos colas).

16. APÉNDICE IV: Publicación (primer reporte de *K. pneumoniae* productora de KPC)

Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay: infection control and molecular characterization

C. Marquez¹, A. Ingold², N. Echeverría², A. Acevedo², R. Vignoli³, V. García-Fulgueiras³, J. Viroga⁴, O. Gonzalez⁴, V. Odizzio⁵, K. Etulain⁵, E. Nuñez⁶, H. Albornoz⁷, G. Borthagaray⁸ and A. Galiana⁹

1) Cátedra de Microbiología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias y de Química-UdelaR, 2) Facultad de Química-UdelaR, Cátedra de Microbiología, UdelaR, 3) Dpto Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene/Facultad de Medicina-UdelaR, Montevideo, 4) Laboratorio Gram/Microbiología, Sanatorio SemmMautone, 5) Comité de Infecciones, Sanatorio SemmMautone, Maldonado, Uruguay, 6) Unidad de Cuidados Intensivos, Sanatorio SemmMautone, 7) Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay, 8) Facultad de Química-UdelaR, Bioquímica Clínica and 9) Dpto Microbiología, Hospital Maciel, UDYCI, Montevideo, Uruguay

Abstract

We describe the first outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (KPC-KP), the infection control measures adopted and the shift in resistance patterns of isolates during antibiotic treatment. The ST258 KPC-KP strain exhibited a multiresistant antibiotic phenotype including co-resistance to gentamicin, colistin and tigecycline intermediate susceptibility. Isolates before and after treatment had different behaviour concerning their antibiotic susceptibility and the population analysis profile study. A progressive increase in the aminoglycosides (acquiring ampicillin resistance) and β -lactam MICs, and a decreased susceptibility to fosfomycin was observed throughout the administration of combined antimicrobial regimens including meropenem. A high meropenem resistance KPC-KP homogeneous population (MIC 256 Jg/mL), could arise from the meropenem heterogeneous low-level resistance KPC-KP population (MIC 8 Jg/mL), by the selective pressure of the prolonged meropenem therapy. The *kpc* gene was inserted in a Tn4401 isoform a, and no transconjugants were detected. The core measures adopted were successful to prevent evolution towards resistance dissemination.

Keywords: Antibiotic resistance, infection control, KPC

Original Submission: 19 September 2013; **Revised Submission:** 12 January 2014; **Accepted:** 17 January 2014

Article published online: 4 April 2014

New Microbe New Infect 2014; **2**: 58–63

Corresponding author: A. Galiana, Dpto Microbiología, Hospital Maciel, UDYCI, Montevideo, Uruguay.
E-mail: galiana@netgate.com.uy

Introduction

Carbapenems are recommended for severe infections caused by extended spectrum β -lactamase (ESBL) -producing Enterobacteria, because of their resistance to third-generation cephalosporins and associated resistance to almost all other antibiotics. Therefore the emergence of carbapenem-resistance in Enterobacteria is worrying, and could be related to several combined mechanisms involving outer membrane

permeability defects, hyperproduction of AmpC cephalosporinases, ESBL and carbapenemase production [1].

Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPC) are the most frequent carbapenemases found in *Klebsiella pneumoniae* and are mostly plasmid encoded, but chromosomal location has also been reported [2]. As the gene encoding KPC usually resides on transferable plasmids, it is capable of disseminating to other Gram-negative genera [3]. The worldwide spread of KPC-producing *K. pneumoniae* strains (KPC-KP) has revealed the successful dissemination of a major clone defined as sequence type 258 (ST258). Since 2006, KPC-KP has arisen in South America, particularly in countries bordering Uruguay—Argentina and Brazil [4,5].

A high frequency of ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates (70%) has been reported in intensive care unit (ICU) patients but no cases of KPC-producing isolates had been reported in

the country up to April 2011 [6]. We describe the first two clinical cases of KPC-KP infections in Uruguay, their phenotypic and genotypic characteristics, the shift of resistance patterns during antibiotic treatment and the infection control measures adopted.

Methods

Hospital setting characteristics

The 'Sanatorio Mautone' is a 65-bed acute general hospital located in Maldonado-Punta del Este, a tourist area receiving 500 000 tourists annually from Argentina, Brazil and to a lesser extent from the USA and Europe. The ICU has six beds, one in an isolation room and the others in a common area separated by curtains.

Clinical cases

Patient A. On 20 February 2011 a 30-year-old man (Table 1) was admitted from home to the ICU for severe enteric sepsis caused by a *Salmonella* sp. that was nalidixic acid and ciprofloxacin susceptible, recovered from blood and stool cultures. He was mechanically ventilated due to septic shock and acute respiratory distress syndrome and intravenous ciprofloxacin treatment was started. This patient had Evans syndrome associated with systemic lupus erythematosus treated with corticosteroids and immunosuppressants. He had never required medical care in any other country. He first developed an *Escherichia coli* tracheobronchitis treated with piperacillin-tazobactam, and later developed a *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia with secondary bacteraemia that was treated with imipenem for 13 days. On

26 March a urine specimen grew *P. aeruginosa* and KPC-KP (A1). A second urine specimen grew KPC-KP (A2) as well. This catheter-related asymptomatic bacteriuria was not treated. On 31 March the patient developed fever and septic shock and blood cultures grew *Salmonella* sp. susceptible to nalidixic acid, ciprofloxacin and imipenem, treated with ciprofloxacin and imipenem; he progressed to refractory septic shock and died on 7 April. On 6 April the central venous catheter tip grew 10 CFU of KPC-KP (A3) and the blood cultures were negative.

Patient B. On 15 March 2011 a 67-year-old man (Table 1) with severe chest trauma was hospitalized in ICU with respiratory failure requiring mechanical ventilation. Piperacillin-tazobactam treatment was started for suspected pulmonary infection. The patient was diabetic with a history of chronic hypertension. He had not required medical care in any other country. On 20 March the patient developed a *P. aeruginosa* ventilator-associated pneumonia with secondary bacteraemia treated with imipenem for 9 days and then with piperacillin-tazobactam and ciprofloxacin. Patient condition improved and the orotracheal tube was removed on 4 April. Three days later he developed respiratory failure and mechanical ventilation was reinstalled. On 7 April KPC-KP (B1) was recovered from respiratory secretions and from the central venous catheter tip (100 CFU) (B2). On 9 April the patient developed a ventilator-associated pneumonia caused by KPC-KP (B3) with septic shock. Blood cultures were negative, and cultures from urine and perianal swabs grew KPC-KP (B4, B5). Initially a high dose of doxycycline (200 mg every 6 h) plus rifampicin (600 mg every 24 h) and meropenem (2 g in a 3-h infusion every 8 h) were started. The patient's condition improved and noradrenalin infusion was

TABLE 1. Characteristics of the patients, treatments and KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates

	Diagnosis and antimicrobial treatment	Date	Isolate (Specimen)	Synergy tests/ <i>bla</i> _{KPC-2}	Sequence type	PFGE (XbaI)
Patient A	SLE, Enteric <i>Salmonella</i> sepsis; CIP	20/02				
	<i>Escherichia coli</i> Tracheobronchitis; PTZ	27/02				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VAP with secondary bacteraemia; IMP	10 al 23/03				
	<i>P. aeruginosa</i> persistent tracheal	26/03	A1 (Urine)	+/nd	nd	nd
	<i>Samonella</i> bacteraemia and Septic shock; IMP plus CIP	30/03	A2 (Urine)	+/+	ST258	A
		31/03				
Patient B		06/04	A3 (Catheter)	+/nd	nd	nd
	Chest trauma, respiratory failure, Diabetic; PTZ	15/03				
	<i>P. aeruginosa</i> VAP with secondary bacteraemia; IMP	20 al 30/03				
	<i>P. aeruginosa</i> persistent tracheal infection	1 al 09/04				
	Mechanical ventilation reinstalled	07/04	B1 (TA)	+/+	ST258	A
			B2 (Catheter)	+/+	nd	A
			B3 (TA)	+/nd	nd	nd
	KPC-KP VAP, Septic shock; DOX plus RIF plus MEM	09/04	B4 (Urine)	+/nd	nd	nd
			B5 (Rectal)	+/nd	nd	nd
			B6 (TA)	+/+	ST258	A
	TIG plus RIF plus MEM Respiratory failure, <i>P. aeruginosa</i> bacteraemia	14/04 28/04				

CIP, ciprofloxacin; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; PTZ, piperacillin-tazobactam; IMP, imipenem; DOX, doxycycline; RIF, rifampin; MEM, meropenem; TYG, tigecycline; A₁, >10⁵ CFU/mL *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*; A₂, >10⁵ CFU/mL of *K. pneumoniae*; A₃, 10 CFU of *K. pneumoniae* in the tip of central line catheter; B₂, 100 CFU of *K. pneumoniae*; B₄, >10⁵ CFU mL⁻¹ of *K. pneumoniae*; +, difference of ≥5 mm in zones between MEM and MEM plus boronic acid and <5 mm in zone between MEM and MEM plus cloxacillin and MEM plus dipicolinic acid; nd, not determined; SLE, systemic lupus erythematosus; VAP, ventilator-associated pneumonia; TA, tracheal aspirate.

stopped. On 14 April doxycycline was substituted by tigecycline (100 mg every 12 h), which became available for the first time in Uruguay. Antimicrobial treatment was stopped on 25 April. On 28 April the respiratory failure persisted, respiratory secretions were positive for KPC-KP (B6) and *P. aeruginosa* and blood culture was positive for *P. aeruginosa*. Finally on 3 May the patient died of refractory respiratory failure.

Infection prevention and control measures

The Infection Control Committee, considering the unusual antimicrobial resistance phenotype of *K. pneumoniae* isolates suspected nosocomial cross-transmission and decided to implement control measures, perform an epidemiological investigation and notify the public health authorities [7,8]. Control measures adopted were: meeting with hospital (clinicians, nurses, laboratory, housekeeping) and administration staff; extended contact isolation precautions for ICU patients with daily monitoring (isolation room and dedicated staff for the colonized and the infected patients, exclusive work clothes to use with these patients, strict hand hygiene with alcohol gel, reinforcement of the unshared use of instruments and disinfection between patients of shared instruments); screening of patients in contact with colonized or infected patients and pre-emptive isolation while awaiting results; closing the ICU to new patients; and reinforcement of environmental hygiene with alcohol or chlorinated agents. The surveillance cultures for the identification of KPC-KP intestinal-tract-colonized patients were performed according to the CDC protocol [9]. Respiratory secretions and urine were evaluated following conventional culture methods.

Identification and antimicrobial susceptibility studies

The identification and the antibiotic susceptibility testing were performed using the VITEK 2 C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) system. The MICs of imipenem, meropenem, tigecycline, colistin and gentamycin were determined using E-test (bioMérieux). CLSI clinical breakpoints were applied, except for tigecycline and colistin where EUCAST (<http://www.eucast.org>) breakpoints were used [10,11]. ESBL testing was performed according to CLSI guidelines.

Susceptibility to fosfomycin was assayed by disc diffusion [12]. KPC phenotype was determined by synergy test using KPC/MBL confirm kit (ROSCO Diagnostica A/S, Denmark). The population analysis profile was determined for meropenem as described elsewhere [13].

Molecular studies

Screening for resistance genes was performed by PCR, following reported conditions for *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M},

*bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} gene families, and *bla*_{PER-2}, *aacA4*, *qnrA* and *qnrB* genes [14–20].

The genetic environment of *bla*_{KPC-2} gene was studied by PCR mapping with specific primers for ISKpn6 or ISKpn7 or *tnpA* and *bla*_{KPC-2}. PCR amplification of the complete *ompK36* gene was performed [21].

Crude extracts were subjected to isoelectrofocusing with the use of PhastSystem and PhastaGels IEF 3–9 (Pharmacia, Stockholm, Sweden).

Genetic relatedness

The genetic relatedness of KPC-KP isolates was evaluated by pulsed field gel electrophoresis using *Xba*I-digested total DNA and interpreted by Tenover criteria [22]. Multilocus sequence typing with seven housekeeping genes was performed according to the protocol described on the *K. pneumoniae* multilocus sequence typing website (<http://www.pasteur.fr/mlst/Kpneumoniae.html>).

Mating experiments

To determine whether the *bla*_{KPC-2} gene was on a transferable element, isolates AI and BI—cefotaxime resistant, rifampin and sodium azide sensitive—were mated in three independent assays with *E. coli* strain Top10—cefotaxime susceptible, rifampin and sodium azide resistant. They were cultured for 18 h at 35°C, in Müller–Hinton agar (MHA) containing cefotaxime 2 mg/L or rifampin 200 mg/L. The growth was suspended in MH broth (MHB) to achieve a 1 MacFarland turbidity standard, and 0.5 mL of the mix of equal volumes of the donor and receptor suspensions was plated as a drop in the middle of an MHA plate, and incubated for 18 h at 35°C. Serial decimal dilutions of the suspension in 1 mL MHB of the total growth were prepared. Transconjugants were selected from 10⁻¹ and 10⁻² dilutions in MHA containing cefotaxime 2 mg/L and rifampin 200 mg/L and confirmed by positive growth in MHA containing sodium azide 100 µg/mL and positive PCR for *bla*_{KPC-2} gene.

Results

The ICU remained closed to new admissions while KPC-KP-infected patients were still hospitalized. Three patients were considered contacts because they shared their stay in ICU with KPC-KP-infected patients. Two of them were discharged with negative surveillance cultures that persisted negative on days 15 and 30 thereafter. Surveillance cultures of the third contact were performed every 48 h with negative results. The epidemiological investigation identified a diabetic patient with a history of contact with the healthcare system in New York,

USA, who was admitted to the ICU 17 days before the first isolation of KPC-KP. She had a severe urosepsis caused by non-multiresistant *E. coli* and had multiple episodes of diarrhoea during the 5 days of hospitalization. When the ICU was free of patients, it underwent a thorough cleaning and environmental disinfection. Five months later two colonized cases were detected (asymptomatic urinary catheter bacteriuria and hepatic drain of quistostomy), similar control measures were applied, surveillance cultures were performed during the next 6 months and no more cases have been identified since then.

All *K. pneumoniae* isolates recovered showed a multiresistant phenotype but were susceptible to fosfomycin, ESBL-negative and exhibited a KPC phenotype. Different values for MICs to β -lactams and gentamycin were observed for the isolates from patient B (Table 2). The fosfomycin inhibition zone diameters were 22 and 17 mm for B1 and B6 isolates, respectively. Scattered colonies were observed within the inhibition zone of meropenem for A2 and B1 whereas B6 showed no inhibition zone.

The B1 isolate population analysis profile showed a heterogeneous population with a subset of 0.01–0.001% growing at meropenem concentrations ranging from 16 to 128 $\mu\text{g/mL}$. The B6 isolate population analysis profile showed that >0.01% of cells grew up to 512 $\mu\text{g/mL}$.

The isolates A2, B1, B2 and B6 revealed the presence of a *bla*_{KPC-2}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-1} and *aacA4* genes. Isoelectrofocusing showed that these isolates shared two common β -lactamase activities with isoelectric points of 5.4 and 6.7, characteristic of TEM-1 and KPC-2 enzymes, respectively. PCR mapping revealed a 4-kb genetic region containing *tnpA*, *ISKpn7*, *bla*_{KPC-2} and *ISKpn6* genes, consistent with a Tn3-based Tn4401 isoform a, since a 100-bp deletion was detected upstream of the *bla*_{KPC-2} gene (Fig. 1) [23]. Sequence analysis of *ompK36* DNA revealed a 99% similarity with a described gene encoding a functional OmpK36 porin (Accession number FJ577673).

Biparental conjugation did not render transconjugants, indicating a conjugation frequency less than 1×10^{-8} /recipient.

Discussion

In the present study we describe the first nosocomial outbreak caused by KPC-KP in Uruguay. Considering that none of the patients had a history of recent travel abroad, it is possible that an unrecognized colonized patient with a history of admission in a healthcare facility in one of the endemic areas introduced

TABLE 2. Susceptibility of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates

<i>K. pneumoniae</i> isolate	Vitek MIC $\mu\text{g mL}^{-1}$ to:											E-test MIC $\mu\text{g mL}^{-1}$ to:			
	TZP	FOX	CTX	CAZ	CEP	GEM	ANK	CIP	COL	IPM	MEM	IPM	MEM	TYG	COL
A1	$\geq 128/4$	≥ 64	16	16	8	≥ 16	16	≥ 4	≥ 16	8	4	8	4	2	24
A2	$\geq 128/4$	≥ 64	16	16	8	≥ 16	16	≥ 4	≥ 16	8	4	8	4	2	24
B1	$\geq 128/4$	≥ 64	16	16	8	$\geq 16^a$	32	≥ 4	≥ 16	≥ 16	4	8	8	2	24
B2	$\geq 128/4$	≥ 64	16	16	8	≥ 16	32	≥ 4	≥ 16	≥ 16	4	8	8	2	24
B3	$\geq 128/4$	≥ 64	16	16	8	≥ 16	32	≥ 4	≥ 16	≥ 16	4	8	8	2	24
B5	$\geq 128/4$	≥ 64	16	32	8	≥ 16	32	≥ 4	≥ 16	≥ 16	8	16	8	2	24
B6	$\geq 128/4$	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	$\geq 16^b$	≥ 64	≥ 4	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 32	$\geq 32^c$	2	24

PTZ, piperacillin-tazobactam; FOX, ceftioxin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; CEP, cefepime; GEM, gentamicin; ANK, amikacin; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; IPM, imipenem; MEM, meropenem; TYG, tigecycline.

^aE-test MIC 36 $\mu\text{g/mL}$.

^bE-test MIC 96 $\mu\text{g/mL}$.

^cE-test MIC 256 $\mu\text{g/mL}$.

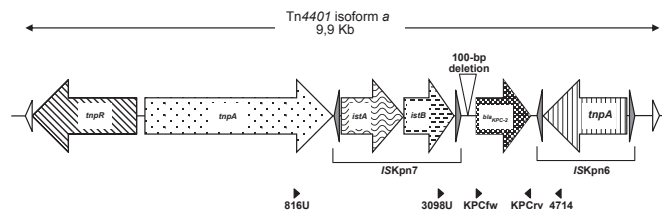


FIG. 1. Schematic representation of the genetic structures from Tn4401 isoform a identified in the surroundings of *bla*_{KPC-2} gene. Genes and their corresponding transcription orientations are shown by horizontal arrows. Empty triangles represent inverted repeats (IRs) that flank Tn4401 structure. Internal grey triangles represent IRs from *ISKpn6* and *ISKpn7*. The 100-bp deletion characteristic of Tn4401 isoform a is indicated above the sequence. Primers used are shown below the sequence: KPCfw, KPCrv [15], 816U, 3098U, 4714 [26].

the causative agent to our hospital, as may be the case identified in the root-cause analysis [24].

The KPC-KP isolates exhibited a multiresistant antibiotic phenotype including resistance to colistin and intermediate susceptibility to tigecycline. Based on pulsed field gel electrophoresis analysis they represent a single clone and they belong to the internationally distributed ST258 KPC-KP clone, allowing us to propose their introduction and the occurrence of cross-transmission between patients. Both clinical cases had risk factors previously reported to be associated with the acquisition of KPC-producing bacteria: prolonged ICU stay, invasive devices, immunosuppression and previous multiple antibiotic therapies, including ciprofloxacin, tazobactam-piperacillin and imipenem [25].

This is the first description of isolates belonging to the KPC-KP ST258, exhibiting co-resistance to gentamycin, colistin and tigecycline intermediate susceptibility, acquiring further amikacin resistance.

The first patient had a KPC-KP asymptomatic catheter-related bacteriuria, considered the source for the cross-transmission, and his death was related to *Salmonella* sepsis. In contrast, the second patient had multiple sites colonized, and developed severe sepsis associated with KPC-KP ventilator-associated pneumonia.

The core measures adopted according to European expert opinion were reinforced and have been successful in preventing evolution towards resistance dissemination [8].

The deletions in the upstream genetic environment of the *bla_{KPC}* gene increased the level of KPC production, in accordance with the high-level of carbapenem resistance observed [26]. Even though B1 and B6 isolates were the same strain based on pulsed field gel electrophoresis analysis, they had different behaviours concerning their antibiotic susceptibility and the population analysis profile study. A progressive increase in the MICs for aminoglycosides and β -lactams, and a decreased susceptibility to fosfomycin was observed throughout the administration of combined antimicrobial regimens in patient B. Even though pre- and post-treatment isolates possessed *ompk36* genes identical to a previously described functional protein, a decrease in the *ompk36* expression level could not be discounted.

In addition, selection of mutants with resistance to different antibiotic classes could have emerged by the acquisition of a resistance mechanism with a broad range specificity spectrum. Further studies are needed to understand the molecular basis of these complex and variable resistance phenotypes and to evaluate their frequency and clinical significance. To counteract the emergency of carbapenem resistance, new antibiotic regimens need to be developed and hospital infection control and diagnostic microbiology practice must be improved.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012; 27: 128–142.
- Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1553–1555.
- Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999–2005). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56: 367–372.
- Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1520–1524.
- Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 333–334.
- Guerra SE, Albornoz H, Rosa R et al. Incidences of nosocomial infections in Uruguayan adult intensive care units 2010. International Conference on Prevention & Infection Control (ICPIC 2011), Geneva, Switzerland, 29 June–2 July 2011. *BMC Proc* 2011; 5(suppl 6): 77.
- Centers for Diseases Control and Prevention. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 256–260.
- Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 102–111.
- CDC. Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing, *Klebsiella* spp. and *E. coli* from rectal swabs. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC, 2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st Informational Supplement*. CLSI Document M100-S21. Wayne, PA: CLSI, 2011.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods of dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved Standard 8th ed*. CLSI Document M7-A8. Wayne, PA: CLSI, 2009.
- Pasteran F, Lucero C, Rapoport M et al. Tigecycline and intravenous fosfomycin zone breakpoints equivalent to the EUCAST MIC criteria for *Enterobacteriaceae*. *J Infect Dev Ctries* 2012; 6: 452–456.
- Pournaras S, Kristo I, Vrioni G et al. Characteristics of meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing clinical isolates of *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2601–2604.
- Ma L, Chang FY, Fung CP et al. Variety of TEM-, SHV-, and CTX-M-type β -lactamases present in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. *Microb Drug Resist* 2005; 11: 31–39.
- Chowdhury PR, Ingold A, Vanegas N et al. Dissemination of multiple drug resistance genes by Class I integrons in *Klebsiella* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 3140–3149.

16. Endimiani A, Carias LL, Hujer AM et al. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing *bla_{KPC}* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2680–2682.
17. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1791–1798.
18. Power P, Di Conza J, Rodriguez MM et al. Biochemical characterization of PER-2 and genetic environment of *bla_{PER-2}*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2359–2365.
19. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3953–3955.
20. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. Common regions e.g. *orf513* and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class I integrons. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 1–6.
21. Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, Gootz T. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to Upstate New York. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 26–28.
22. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233–2239.
23. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisitions of the β -lactamase *bla_{KPC}* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1257–1263.
24. Rogers BA, Aminzadeh Z, Hayashi Y, Paterson DL. Country-to-country transfer of patients and the risk of multi-resistant bacterial infection. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 49–56.
25. Nordmann P, Cuzon G, Nass T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 228–236.
26. Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, et al. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4201–4207.