



Tesis de Maestría

Programa de desarrollo de Ciencias Básicas

Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa en un brote intra- hospitalario y producción de biofilm.

B.C. Florencia Geymonat

Orientadora: Dra. Q.F. Graciela Borthagaray

Co-orientadora: Dra. Carolina Márquez

2019

Cátedra de Microbiología Clínica

Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Química, Udelar

Montevideo, Uruguay



Financiación:

ANII
Agencia Nacional de
Investigación e Innovación

**Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemasa
en un brote intra-hospitalario y producción de biofilm.**

B.C. Florencia Geymonat

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

Tribunal:

Presidente: Dra. Teresa Camou

Vocal: Dra. Paola Scavone

Vocal: Dr. Julio Medina

Orientadora: Dra. Q.F. Graciela Borthagaray

Co-orientadora: Dra. Carolina Márquez

Montevideo 2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de todo corazón a las personas que formaron parte de este camino desde todas sus aristas.

A mis tutoras Graciela y Carolina por la oportunidad, la confianza, el conocimiento aportado, la paciencia y el tiempo para llevar a cabo este trabajo. A Ana por darle un toque dulce a todos los lunes y a mis compañeros del laboratorio 13, Natalia por la enseñanza y orientación dentro y fuera del laboratorio, a Jovan, Ángela y Lucía por la compañía y las risas en las horas de trabajo. A Valeria y Josefina por el tiempo compartido. Agradezco inmensamente y con todo cariño a Belén y a Victoria por el apoyo incondicional durante la fase final de mi pasaje por el laboratorio, gracias por cuidarnos.

A la Dra. Gianna Ceccetto por darme la oportunidad de realizar uno de los ensayos más relevantes en este trabajo y compartir sus conocimientos conmigo.

A mi familia: mamá, papá, hermana, sobrinas, tía, cuñado y amigas de toda la vida gracias por el aguante, por el apoyo, energía positiva y siempre con palabras de aliento, sin ustedes no hubiese sido posible.

Por último, quiero dedicarle este trabajo a Juan Manuel y Juan Martín, los Juanes que son mi luz en esta vida, los amo profundamente.

RESUMEN

El aumento progresivo de la resistencia de las bacterias a los antibióticos, es preocupante a nivel de la salud mundial. La resistencia bacteriana es un fenómeno natural, acelerado por el uso indebido de los antibióticos en el ser humano y en la producción de alimentos.

La clase de antibióticos β -lactámicos ha sido muy utilizada por su escasa toxicidad para la célula eucariota, por su buena distribución tisular y su amplio espectro. En 1996 se describe por primera vez la aparición en enterobacterias, de una β -lactamasa capaz de hidrolizar a las carbapenemas. En este trabajo se estudian aislamientos de *K. pneumoniae* (*Kp*) y de *E. coli* (*Ec*) resistentes a carbapenemas, epidemiológicamente relacionados, involucrados en un brote de infecciones intra-hospitalarias. El caso índice de este brote fue un paciente inmunodeprimido, con una herida operatoria abdominal, con un proceso de cicatrización lento. En el estudio bacteriológico de sucesivas muestras del exudado de la herida, se observaron dos morfologías de colonia. Ambas morfologías de colonia correspondieron a aislamientos identificados como *Kp*, que tenían diferente perfil de resistencia a los β -lactámicos. Además, en el mismo paciente, se aisló de la microbiota intestinal una *Ec* y una *Kp* en la misma muestra, ambas enterobacterias resistentes a carbapenemas. El brote abarcó a otros 3 pacientes con aislamientos resistentes a carbapenemas en un periodo de 2 meses.

El objetivo de este trabajo es contribuir al entendimiento de la resistencia a β -lactámicos en *Kp* productora de KPC y de las vías de diseminación del gen *bla*_{KPC} en enterobacterias.

Se realizó una caracterización fenotípica basada en el biotipo, perfil de resistencia a antibióticos y producción de biofilm, y una caracterización genotípica basada en los pulstipos a dos enzimas de restricción. Además se realizó la amplificación y tipificación de genes de resistencia a β -lactámicos, análisis del contenido plasmídico y localización por hibridación del gen *bla*_{KPC}, ensayos de conjugación bacteriana, tipificación de los plásmidos transferidos y secuenciación total del plásmido conteniendo el gen *bla*_{KPC}.

Los aislamientos de *Kp*-KPC provenientes de diferentes pacientes correspondieron a una misma clona, lo que indica una diseminación de una única cepa, que persistió

durante los dos meses. El gen *bla*_{KPC} está localizado generalmente en un plásmido común de aproximadamente 60Kb, del tipo de incompatibilidad IncN, que se transfiere entre cepas clínicas y de laboratorio, de *Kp* y de *Ec*, lo que evidencia una transmisión horizontal de la resistencia *in vitro* en enterobacterias. La *Ec* aislada de la microbiota intestinal, compartió el mismo plásmido, portador del gen *bla*_{KPC} indicando una potencial transferencia horizontal en la microbiota intestinal. La presencia del gen *bla*_{CTX-M-15} en alguno de los aislamientos y no en otros, explica parcialmente los distintos perfiles de resistencia a cefalosporinas encontrados y evidencia otro fenómeno de transferencia de la resistencia a antibióticos. Por otro lado, los resultados de la hibridación del gen *bla*_{KPC}, da lugar al análisis de la movilización vía transposición intra brote, circunstancia que excepcionalmente ha sido reportada, pero que teóricamente podría tener una mayor frecuencia de transferencia que la conjugación plasmídica.

La secuenciación total del plásmido común, p*Ec*20/2x*Ec*TOP, AN: MH514861.1, confirma su pertenencia al grupo de incompatibilidad IncN, pertenece al pST15, su peso molecular es de 60.204 pb, tiene 89% de homología con un plásmido ya publicado que no posee ningún otro gen de resistencia a antimicrobianos aparte del *bla*_{KPC-2}, que se encuentra ubicado dentro del transposón Tn4401 isoforma b.

En cuanto a la producción de biofilm, todos los aislamientos son productores en las condiciones ensayadas. Esta forma de vida bacteriana que facilita la transferencia horizontal de genes y ocasiona un retardo en la curación de infecciones de herida en el ser humano, pudo tener un rol importante en este brote.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aislamientos estudiados	34
Tabla 2. Ensayos de conjugación	39
Tabla 3. Bionúmero de los aislamientos	43
Tabla 4. Clasificación de los aislamientos <i>Kp</i> en antibiotipos según su CIM a β -lactámicos y proporción de cada antibiotipo	45
Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación utilizados para los genes <i>bla</i> _{CTX-M} y <i>bla</i> _{KPC}	46
Tabla 6. Resultado de la amplificación de los genes <i>bla</i> _{CTX-M} y <i>bla</i> _{KPC} en los aislamientos y secuenciación de los amplicones obtenidos en aislamientos seleccionados.....	49
Tabla 7. Pulsotipos de los aislamientos en estudio por PFGE con la enzima de restricción <i>Xba</i> I	52
Tabla 8. Perfiles plasmídicos de <i>Kp</i> -KPC	55
Tabla 9. Resultados de los ensayos de conjugación	60
Tabla 10. Expresión fenotípica de la resistencia en cepas dadoras, receptoras y transconjugantes	61
Tabla 11. Descripción de los Scaffolds obtenidos de la secuenciación del plásmido p <i>Ec</i> 20/2x <i>Ec</i> TOP	64
Tabla 12. Resultado del alineamiento de los scaffolds con tres secuencias de referencia seleccionadas	66
Tabla 13. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación para cerrar las brechas	67
Tabla 14. Valores de Densidad Óptica de ensayos de biofilm para aislamientos de <i>Kp</i> y <i>Ec</i>	75

Tabla 15. Resultados obtenidos de los ensayos de producción de biofilm para los pares cepa receptora-transconjugante	78
Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos para los aislamientos de <i>Kp</i>	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del transposón Tn4401 y sus isoformas a-h.	25
Figura 2. Fotografía de los aislamientos obtenidos del exudado de herida del paciente DA (caso índice)	33
Figura 3. Resultado de la amplificación con los oligonucleótidos universales descritos por Saladin et. al. para <i>bla</i> _{CTX-M}	47
Figura 4. Resultado de la amplificación con los oligonucleótidos descritos por Hamdy et. al. para <i>bla</i> _{CTX-M}	47
Figura 5. Resultado de la amplificación de <i>bla</i> _{KPC}	48
Figura 6. Gel de PFGE obtenido con la enzima de restricción <i>Xba</i> I.....	50
Figura 7. Gel de PFGE obtenido en esta tesis con <i>Xba</i> I	51
Figura 8. Dendograma basado en la similitud de los patrones de bandas obtenidos con <i>Xba</i> I	51
Figura 9. Gel de PFGE obtenido con la enzima de restricción <i>Spe</i> I de aislamientos seleccionados	53
Figura 10. Extracción plasmídica de los aislamientos.....	55
Figura 11. Resultado del Dot Blot para la determinación del límite de detección ...	56
Figura 12. Extracción plasmídica de las muestras previo al Southern blot	57
Figura 13. Resultado del Southern blot con la extracción plasmídica de las muestras	58
Figura 14. Análisis detallado de la zona donde hubo hibridación en la extracción plasmídica y la sonda para <i>bla</i> _{KPC}	59
Figura 15. Extracción plasmídica de los aislamientos dadores, receptores y transconjugantes	62

Figura 16. Resultado de la amplificación plasmídica para IncN en las transconjugantes	62
Figura 17. Amplificación para IncN de todos los aislamientos	63
Figura 18. Brechas generadas entre la secuencia de referencia y el alineamiento de los scaffolds	67
Figura 19. Representación gráfica del plásmido p <i>Ec20/2xEcTOP</i> y su anotación	70
Figura 20. Principales secuencias de inserción reconocidas en p <i>Ec20/2xEcTOP</i>	71
Figura 21. Análisis comparativo de los plásmidos IncN seleccionados con el plásmido p <i>Ec20/2xEcTOP</i>	73
Figura 22. Resultado del ensayo de formación de biofilms para los aislamientos de <i>Kp</i> y <i>Ec</i> y su clasificación	76
Figura 23. Resultado de la comparación de producción de biofilm de aislamientos morfología M y NM de la misma muestra	77
Figura 24. Resultado de ensayo de formación de biofilm para los pares receptoras-transconjugantes	78

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Exudado anal

Ak: Amicacina

Amp: Ampicilina

AmpS: Ampicilina-Sulbactam

AN: Accession Number

BLEE: β -lactamasa de espectro extendido.

C3G: Cefalosporina de tercera generación

C4G: Cefalosporina de cuarta generación.

Cat: Categorización.

Caz: Ceftazidima

Cef: Cefalotina

Cfz: Cefazolina

Cfp: Cefepima

CIM: Concentración inhibitoria mínima

Cip: Ciprofloxacina

Ctx: Cefotaxima

DO: Densidad óptica

Ec: Escherichia coli

Ec-KPC: Escherichia coli productora de KPC

Fd: Nitrofurantoína

Fox: Cefoxitin

Ge: Gentamicina

HO: Herida operatoria

I: Intermedio

Imp: Imipenem

IS: Secuencias de inserción

Kp: Klebsiella pneumoniae

Kp-KPC: Klebsiella pneumoniae productora de KPC

LB: Luria Bertani

M: Mucosa

Mem: Meropenem

Na: Acido Nalidíxico

NaN₃: Azida de Sodio

NM: No mucosa

PipT: Piperacilina-Tazobactam

R: Resistente

S: Sensible

SXT: Trimetroprim Sulfametoxazol

THG: Transferencia horizontal de genes

U: orina

INDICE

INTRODUCCIÓN	16
1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> patógeno oportunista en el medio intra-hospitalario	16
2 β -lactámicos y β -lactamasas	17
2.1 β -lactámicos mecanismos de acción y mecanismos de Resistencia	17
2.2 β -lactamasas tipo BLEE. Surgimiento de CTX-M	18
2.3 Surgimiento de Carbapenemasa tipo KPC	19
2.4 Clasificación de β -lactamasas	19
2.5 Diseminación de la resistencia a β -lactámicos por producción de β -lactamasas	21
3 Diseminación clonal de <i>Kp</i> -KPC	22
4 Elementos genéticos móviles	22
4.1 Plásmidos	22
4.1.1 Grupos de incompatibilidad plasmídico (Inc)	23
4.1.2 Grupos de incompatibilidad plasmídicos: Epidemiología	23
4.2 Secuencias de inserción	24
4.3 Transposones (Tn)	24
4.3.1 Tn4401	24
5 Biofilms bacterianos	26
6 Heterogeneidad fenotípica en poblaciones clonales e infecciones policlonales	27
7 Aislamientos en estudio, antecedentes y enfoque del trabajo	29
OBJETIVOS	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
MATERIALES Y METODOS.....	32
Aislamientos estudiados	32
1 Estudio de los biotipos y antibiotipos.....	35

1.1 Estudio de los biotipos.....	35
1.2 Estudio de los antibiogramas.....	35
2 Amplificación y caracterización de los genes <i>bla</i> _{CTX-M} y <i>bla</i> _{KPC}	35
3 Análisis de la relación genética entre los aislamientos	36
4 Análisis del contenido plasmídico y localización genética del gen <i>bla</i> _{KPC}	37
4.1 Análisis del contenido plasmídico	37
4.2 Localización del gen <i>bla</i> _{KPC} en la extracción plasmídica	37
5 Transferencia genética del gen <i>bla</i> _{KPC} a otras enterobacterias. Tipificación del plásmido transferido	37
5.1 Transferencia genética del gen <i>bla</i> _{KPC} ensayo de conjugación bacteriana	37
5.2 Tipificación del plásmido transferido	38
6 Análisis de la secuencia total del plásmido transferido por conjugación	40
7 Producción de biofilm	40
RESULTADOS.....	42
1 Estudio de biotipo y antibiograma	42
1.1 Biotipo.....	42
1.2 Antibiograma	44
2 Amplificación de los genes <i>bla</i> _{CTX-M} y <i>bla</i> _{KPC}	46
2.1 Amplificación de <i>bla</i> _{CTX-M}	46
2.2 Amplificación de <i>bla</i> _{KPC}	47
3 Análisis de la relación genética entre los aislamientos <i>Kp</i> -KPC	50
3.1 PFGE con <i>Xba</i> I	50
3.2 PFGE con <i>Spe</i> I.....	53
4 Análisis del contenido plasmídico de los aislamientos y localización genética del gen <i>bla</i> _{KPC}	54
4.1 Análisis del contenido plasmídico	54
4.2 Localización del gen <i>bla</i> _{KPC} en ADN plasmídico	56
4.2.1 Determinación del límite de detección del ensayo	56

4.2.2 Adaptación de las condiciones del Dot blot	
a las muestras	56
5 Transferencia del gen <i>bla</i> _{KPC} a otras enterobacterias	60
5.1 Ensayos de conjugación	60
5.1.1 Amplificación de los genes <i>bla</i> _{KPC} y <i>bla</i> _{CTX-M}	
de las transconjugantes	60
5.1.2 Expresión fenotípica de resistencia de	
las transconjugantes	60
5.1.3 Perfil plasmídico de las transconjugantes,	
dadoras y receptoras	61
5.2 Tipificación del plásmido transferido	62
6 Análisis de la secuencia total del plásmido transferido	
por conjugación	64
6.1 Reconstrucción del plásmido p <i>Ec</i> 20/2x <i>Ec</i> TOP	64
6.1.1 Brechas en la secuencia ensamblada	67
6.2 Ingreso de la secuencia plasmídica a la base	
de datos del GeneBank	68
6.3 Anotación de la secuencia plasmídica y búsqueda	
de genes de interés	68
6.3.1 Tn4401.....	71
6.4 Comparación de secuencias de plásmidos IncN	72
7 Producción de biofilm de los aislamientos	75
7.1 Producción de biofilm de los aislamientos	
en estudio	75
7.1.1 Análisis de la producción de biofilm para los	
aislamientos de <i>Kp</i> de morfología M y NM.....	76
7.2 Determinación de producción de biofilm de los	
aislamientos receptores y su respectiva transconjugante	77
8 Resumen de los resultados obtenidos para los aislamientos <i>Kp</i> -KPC.....	79
DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONES.....	92
BLIBLIOGRAFIA.....	98

ANEXO I Protocolo extracción de ADN genómico	108
ANEXO II Protocolo PFGE <i>Kp</i>	110
ANEXO III Protocolo de extracción de plásmidos pesados	113
ANEXO IV Protocolo para Southern blot.....	115
ANEXO V Protocolo para la conjugación bacteriana	120
ANEXO VI Protocolo para la determinación de biofilm en placa de microtitulación	121
ANEXO VII Tabla de comparación de las características presentes en las secuencias de los plásmidos MH514861 (perteneciente a un aislamiento de <i>Kp</i> -KPC de Montevideo 2011) y el plásmido pFC3SP (perteneciente a un aislamiento de <i>Kp</i> -KPC de San Pablo 2006)	123

INTRODUCCIÓN

1. *Klebsiella pneumoniae*, patógeno oportunista en el medio intra-hospitalario.

Klebsiella pneumoniae (*Kp*) es una enterobacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose en aguas superficiales, aguas de desecho, suelo, vegetación, en las membranas mucosas de mamíferos y como saprófito en la nasofaringe e intestino del hombre, siendo estos y especialmente el tracto gastrointestinal sus principales reservorios (Bagley, 1985). *Kp* es capaz de fermentar la lactosa, puede utilizar el citrato como única fuente de carbono, no produce ácido sulfhídrico, no produce indol, produce la enzima ureasa y puede descarboxilar la lisina (Ochman et. al., 2000).

En el ambiente hospitalario *Kp* es un patógeno oportunista, que causa con frecuencia diversas infecciones siendo importante como patógeno urinario, abdominal y respiratorio. *Kp* ha sido exitosa en el desarrollo de resistencia a diversas clases de antimicrobianos y en la diseminación por contacto (Podschun y Ullmann, 1998).

Naturalmente *Kp* contiene en su ADN cromosomal el gen codificante de la enzima β -lactamasa SHV-1, la cual le confiere resistencia a la ampicilina, ticarcilina y piperacilina, por lo tanto este perfil de resistencia corresponde al fenotipo salvaje de *Kp* (Bradford, 2001).

El grado de colonización de los pacientes hospitalizados por cepas multirresistentes aumenta al aumentar el tiempo de permanencia en el hospital. Además del tiempo de hospitalización, otros factores que favorecen la colonización son procedimientos quirúrgicos, diabetes, problemas renales, cáncer, el uso de catéteres y la administración de antimicrobianos (Singh et. al., 2006). La morbi-mortalidad producida por *Kp* está relacionada en gran medida a la resistencia adquirida a los antimicrobianos utilizados para combatirla y a la capacidad de formación de biofilm (Barreto y col., 2009).

2. β -lactámicos y β -lactamasas.

2.1 β -lactámicos mecanismo de acción y mecanismos de resistencia.

Los antibióticos β -lactámicos producen un efecto bactericida mediante la inhibición de la síntesis de la pared de peptidoglicano. La pared de peptidoglicano es vital para la supervivencia de la célula bacteriana, ya que la membrana citoplasmática es incapaz de resistir la diferencia de presión osmótica entre el interior y el exterior celular. Para la síntesis del peptidoglicano es fundamental la función de proteínas localizadas en la membrana citoplasmática, llamadas PBP (*penicillin binding proteins*). Estas proteínas tienen actividad transpeptidasa, e intervienen en la última etapa de la síntesis del peptidoglicano. Los antibióticos β -lactámicos tienen una estructura química similar al sustrato fisiológico de las PBP, por lo que se unen a las PBP inhibiendo su acción transpeptidasa y como consecuencia inhibiendo también la síntesis de nuevo peptidoglicano, produciendo un efecto bactericida. Estos antibióticos son más efectivos en la fase exponencial de crecimiento bacteriano, en la que la actividad de las lisinas de peptidoglicano es mayor. Los antibióticos β -lactámicos son muy utilizados debido a que tienen escasa toxicidad para la célula eucariota, buena distribución tisular y en general son de amplio espectro (bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y espiroquetas). La presencia de un anillo β -lactámico define químicamente a esta familia numerosa de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las β -lactamasas (Marin y Guidol, 2003); (Suarez y Guidol, 2008).

Los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos son:

*Alteraciones en la permeabilidad a los β -lactámicos de la membrana externa. Éste mecanismo es mediado principalmente por cambios en la estructura de las porinas, que dificultan su ingreso al espacio periplásmico, y como consecuencia estos no alcanzan la concentración necesaria para inhibir la función de las PBP.

*Bombas de expulsión o eflujo: producen el eflujo del antibiótico desde el espacio periplásmico al exterior de la célula. Un aumento del eflujo del antibiótico,

disminuye su concentración periplásmica, causando un efecto similar al mecanismo de resistencia anterior.

*Modificación en las PBP: Mutaciones, hiperexpresión que modifican la afinidad por los β -lactámicos. Estos mecanismos hacen que el antibiótico no pueda ejercer su acción en la molécula diana y es más frecuente en las bacterias Gram positivas.

*Producción de enzimas β -lactamasas: Es el principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos en bacterias Gram negativas. La bacteria produce una enzima, que actúa en el espacio periplásmico y que es capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico produciendo la inactivación del antibiótico (Suarez y Guidol, 2008); (Tafur y col., 2008).

2.2 β -lactamasas tipo BLEE. Surgimiento de CTX-M.

Existen muchos tipos de β -lactamasas y son muy variados los antibióticos β -lactámicos a los que son capaces de hidrolizar. Con el uso y abuso de los antibióticos β -lactámicos, durante mucho tiempo, han ido apareciendo progresivamente β -lactamasas con espectros hidrolíticos cada vez más amplios, por ejemplo, las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Éstas son enzimas capaces de hidrolizar las cefalosporinas de 1ra, 2da, 3ra, 4ta generación y monobactamas, pero que no hidrolizan cefamicinas, ni carbapenemas y que a su vez son inhibidas por ácido clavulánico (Paterson y Bonomo, 2005).

Las enzimas BLEE fueron descritas por primera vez a mediados de la década de 1980. En el inicio, los casos descritos correspondieron principalmente a variantes de las β -lactamasas tipo TEM-BLEE y SHV-BLEE y con menor frecuencia a variantes de las cefotaximasas tipo CTX-M. Sin embargo, la epidemiología ha cambiado debido a la amplia diseminación de las BLEE correspondientes a la familia CTX-M, con el consiguiente desplazamiento de las familias TEM y SHV. Los genes *bla*_{CTX-M} se han descrito en entornos genéticos muy variados, ya sea formando parte del cromosoma bacteriano, en plásmidos y/o asociados a secuencias de inserción (Cantón y Coque, 2006). La frecuencia de la localización plasmídica del gen *bla*_{CTX-M} ha tenido un gran aumento y también un importante impacto clínico. Se propone como origen del gen *bla*_{CTX-M} a un gen de localización cromosomal en *Kluyvera spp.* La mayoría de las

enzimas CTX-M muestran mucha actividad frente a cefotaxima y a ceftriaxona, pero poca actividad frente a ceftazidima, a pesar de lo cual algunas cefotaximasas como CTX-M-15, CTX-M-16 y CTX-M-19 tienen capacidad hidrolítica también frente a la ceftazidima (Zhao y Hu, 2013).

La familia CTX-M es un conjunto grande y complejo de enzimas, con 172 variantes descritas a la fecha, que se agrupan en 5 grupos (Lahey, 2016). Las variantes CTX-M-2 y CTX-M 15 son las que con mayor frecuencia se han descrito en aislamientos de nuestro país (Márquez y col., 2008)(Echeverría, 2014).

2.3 Surgimiento de Carbapenemasa tipo KPC.

Las infecciones causadas por enterobacterias productoras de BLEE han sido típicamente tratadas con carbapenemas (imipenem, meropenem, doripenem y ertapenem) ya que presentan susceptibilidad a esta clase de β -lactámicos. Sin embargo, en 1996 se describe un aislamiento de *Kp* resistente a carbapenemas, en un paciente de Carolina del Norte, EEUU, debido a la producción de una β -lactamasa capaz de hidrolizar carbapenemas. A esta enzima se le llamo KPC. Con el correr del tiempo han aparecido variantes de esta enzima, originadas en cambios nucleotídicos en el gen, que se reflejan en la estructura proteica y que provocan variación en la eficiencia de hidrólisis de distintos β -lactámicos. A la fecha hay descritas 24 variantes de la enzima KPC. El gen *bla*_{KPC} se encuentra usualmente dentro de transposones (principalmente el Tn4401) y estos a su vez dentro de plásmidos, lo cual facilita la transferencia entre distintas bacterias Gram negativas (Quale, 2008)(Chen et. al., 2012)(Nordmann et. al., 2011)(Lahey, 2016).

2.4 Clasificación de las β -lactamasas.

Las clasificaciones de las β -lactamasas se basan en dos criterios distintos, la clasificación de Ambler (Ambler, 1980) toma en cuenta la homología de la secuencia aminoacídica, y la clasificación de Bush (Busch y Jacoby, 2010) se basa en aspectos funcionales.

La clasificación molecular de Ambler divide las β -lactamasas en cuatro clases (A-D). Las clases A, C y D son serina- β -lactamasas y la clase B son metalo- β -lactamasas. Las β -lactamasas de las familias TEM, SHV, CTX-M 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 (Bradford, 2001) (Nordmann et. al., 2011).

La clasificación de Bush tiene en cuenta el perfil de sustratos e inhibidores de la actividad de la enzima y define tres grupos con múltiples sub-grupos cada uno:

Grupo 1: Cefalosporinasas. Perteneciente a la clase molecular C de Ambler. Estas enzimas suelen estar codificadas en el cromosoma de muchas enterobacterias. Generalmente son resistentes a la inhibición por ácido clavulánico y tazobactam. La enzima AmpC pertenece a este grupo.

Grupo 2: Serina- β -lactamasas. Están incluidas las clases moleculares A y D de Ambler. Este grupo es el más grande debido principalmente al aumento en la identificación de nuevas BLEE durante los últimos años. En base a su espectro de hidrólisis se subdividen en subgrupos denominados 2a, 2b, 2c, 2d, 2e y 2f. KPC pertenece al sub grupo 2f y CTX-M al sub grupo 2be. Estas enzimas son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam.

Grupo 3: Metalo- β -lactamasas. En este grupo están incluidas las enzimas pertenecientes a la clase B de Ambler. No son inhibidas por ácido clavulánico ni por tazobactam, pero sí por quelantes de iones metálicos como el EDTA o el ácido dipicolínico.

La eficiencia de hidrólisis de la enzima β -lactamasa KPC-2, determinada mediante estudios cinéticos realizados con la enzima purificada, es máxima para cefalosporinas de espectro reducido y penicilinas, es diez veces menor para imipenem, meropenem, cefotaxima y aztreonam, cien veces menor para cefepima y alrededor de mil veces menor para ceftazidima y ceftoxitina (Queenan and Bush, 2007). Por otro lado la actividad enzimática de KPC-2 *in vitro* es débilmente inhibida por ácido clavulánico y tazobactama, y fuertemente inhibida por ácido fenil borónico (Nordman et. al., 2015).

Los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa exhiben un amplio rango de CIM de carbapenemas, entre $< 1 \text{ mgL}^{-1}$ a $> 256 \text{ mgL}^{-1}$, y los valores de

CIM no guardan relación con el grado de expresión de la enzima (Seecoomar et. al., 2013). Para que se produzca un alto nivel de resistencia en cepas que producen carbapenemasas, se requiere de deficiencias adicionales de permeabilidad, con la combinación sinérgica de sobre-expresión de sistemas de eflujo (AcrAB y OqxAB) y de disminución de la expresión de las porinas principales OmpK35 y OmpK36 (Nordman et. al., 2015); (Nicolas et. al., 2018).

2.5 Diseminación de la resistencia a β -lactámicos por producción de β -lactamasas.

La evolución bacteriana está asociada con la generación continua de nuevas variantes genéticas. Las principales fuerzas conductoras en este proceso son las mutaciones puntuales, los reordenamientos genéticos y la transferencia horizontal de genes (THG). Estas fuerzas evolutivas llevan al desarrollo por parte de las bacterias de la capacidad de producir factores de virulencia que están directamente involucrados en la infección, además de la adquisición de resistencias a los antibióticos. Usualmente la adquisición de la resistencia o los factores de virulencia se codifican en regiones de ADN que pueden transferirse fácilmente a bacterias de la misma especie o incluso a distintas especies. En las bacterias, los plásmidos, los transposones y los integrones contribuyen considerablemente en la propagación de genes de resistencia a antibióticos (Ziebuhr et. al., 1999).

La adquisición de nuevo material genético puede ocurrir de tres maneras: transformación, transducción y conjugación. La transformación bacteriana implica la absorción de ADN desnudo del medio ambiente y tiene el potencial de transmitir ADN entre bacterias no relacionadas. (Ochman et. al., 2000) El ADN adquirido por transformación se mantiene dentro de la célula bacteriana en forma de replicón extracromosómico o se incorpora a su genoma por recombinación homóloga (Serrano-Rivero y col., 2012). En la transducción se puede introducir nuevo material genético en una bacteria por un bacteriófago que se ha replicado dentro de un microorganismo donante y ha empaquetado en su cápside fragmentos de ADN de ese microorganismo. La cantidad de ADN que se puede transferir en un solo evento está limitado por el tamaño de la cápside del fago. El espectro de microorganismos que pueden ser

transducidos depende de los receptores reconocidos por el bacteriófago. La conjugación implica contacto físico entre la bacteria donante y la bacteria receptora. Por lo general involucra un plásmido auto-transferible o movilizable de una cepa donante a una cepa receptora (Ochman et. al., 2000).

3. Diseminación clonal de *Kp*-KPC.

Para el seguimiento y tipificación de clonas de *Kp* a nivel mundial se utiliza la metodología de MLST (Multi locus sequence type) la cual se basa en la comparación de la secuencia de siete genes de referencia los cuales están presentes en todas las cepas de *Kp*. Estos genes son *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *recA* y *tonB* (Dinacourt et. al., 2005). Para cada fragmento secuenciado de cada gen se consideran los polimorfismos genéticos y la combinación de todos los alelos forman el perfil alélico o ST (sequence type) (Singh et. al., 2006).

La enzima KPC en *Kp* está presente en cepas pertenecientes a varios ST, pero la pandemia de *Kp*-KPC es debida principalmente a la diseminación de miembros del complejo clonal (CC) 258. *Kp* ST258 es el predominante y se ha descrito en aproximadamente el 70% de las cepas *Kp*-KPC (Vera-Leiva y col., 2017), tiene una distribución mundial y ha sido exitoso en la diseminación del gen *bla*_{KPC}. *Kp* ST258 es considerada una clona de alto riesgo por su habilidad para colonizar, diseminarse y persistir en una variedad de nichos (Pitout et. al., 2015). El CC258 esta formado por otros ST dentro de los cuales se encuentran los ST11, ST437, ST340 y ST512. Los ST 437 y 11 varían respecto al ST258 en un cambio nucleotidico en la secuencia del gen *tonB* y están ampliamente distribuídos en Brasil. (Andrade et.al., 2011) (Wyres et. al., 2014) (Pitout et.al., 2015)

4. Elementos genéticos móviles

4.1 – Plásmidos

Los plásmidos conjugativos y movilizables son las estructuras extra cromosomales de mayor importancia epidemiológica, responsables de la propagación horizontal de

múltiples genes de resistencia (Redondo y Alonso, 2007). Los plásmidos además de contener genes de resistencia a distintos antimicrobianos y genes de virulencia, también contienen genes esenciales para la iniciación y el control de replicación (Carattoli et. al., 2005).

4.1.1- Grupos de incompatibilidad plasmídico (Inc)

Para la clasificación de los distintos tipos de plásmidos se utiliza el criterio de los Grupos de Incompatibilidad. Que dos plásmidos pertenezcan al mismo grupo de incompatibilidad significa que si en una bacteria se encuentra uno de los plásmidos, la introducción del segundo plásmido desestabiliza al que ya estaba en la célula. En tal caso los plásmidos son incompatibles y por lo tanto pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad plasmídico (Novick, 1987).

4.1.2- Grupos de incompatibilidad plasmídicos: epidemiología.

Las BLEE tipo CTX-M se han encontrado en plásmidos del grupo IncN o IncL/M (CTX-M-1), IncA/C2 (CTX-M-3), IncFII (CTX-M-15), e IncHI2, IncP1-alfa o IncFI (CTX-M9) (Navarro y Miró, 2007).

Los tipos de plásmidos que contienen el gen *bla*_{KPC} en aislamientos pertenecientes al ST258, pertenecen a diferentes grupos de incompatibilidad tales como IncF, IncI2, IncX, IncA/C, IncR, IncL/M y ColE1, siendo el grupo de incompatibilidad IncF, el predominante. Estos plásmidos tienen una amplia distribución geográfica y han sido descritos en Canadá, Polonia, Estados Unidos, Italia, Israel, Brasil y Noruega. Adicionalmente, en la caracterización de los primeros aislamientos de enterobacterias productoras de KPC en Chile, se identificó que el gen *bla*_{KPC-2} está asociado a variantes de plásmidos del grupo IncF (Vera et. al., 2017). En un estudio realizado en Argentina en el periodo 2006 al 2010 se asoció el gen *bla*_{KPC-2} al grupo de incompatibilidad plasmídico Inc M/L (Gomez et. al., 2011). En otro estudio realizado recientemente en Brasil, sobre la diversidad de la población de *Kp* productora de BLEE y/o carbapenemasas aisladas durante un periodo de un mes, de pacientes hospitalizados en cuatro principales hospitales de referencia, de cuatro ciudades diferentes de la

Macro región Nordeste de São Paulo, se encontró que el gen *bla*_{CTX-M-2} está asociado a plásmidos del grupo de incompatibilidad IncR de 90-100 kb, pero más frecuentemente en plásmidos no tipificables de tamaño variable (230-390 kb). El gen *bla*_{CTX-M-15} se encontró localizado principalmente en plásmidos del grupo IncR de tamaño variable (60-220 kb) y ocasionalmente en plásmidos no tipificables (74, 87 y 224 kb). El gen *bla*_{KPC-2} se encontró en todos los casos en un transposón Tn4401 dentro de plásmidos que varían en su tamaño entre 120 a 150 Kb y pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncFIK (Andrade et al., 2018). También en Brasil se describe el gen *bla*_{KPC-2} en un Tn4401 isoforma b en un plásmido IncN de 40Kb (Pereira et. al., 2013).

4.2- Secuencias de inserción

Las IS son elementos genéticos constituidos por secuencias cortas de ADN que codifican una transposasa y están flanqueadas por secuencias repetidas e inversas (IR). Estas secuencias homólogas repetitivas están implicadas en deleciones, inversiones o reorganizaciones del genoma bacteriano. En general no contienen genes que codifiquen para otras funciones más que las de su propia movilidad. (Mahillon y Chandler, 1998).

4.3- Transposones (Tn)

Los transposones son segmentos de ADN de mayor tamaño que las IS, que pueden insertarse en múltiples lugares del ADN. Son capaces de transferir genes de resistencia a antimicrobianos entre genomas de distintas bacterias. Los transposones contienen el gen de la transposasa, responsable de su movilización y uno o varios genes entre los que se encuentran los de resistencia a antibióticos (Ochman et. al., 2000).

4.3.1- Tn4401

La localización del gen *bla*_{KPC} ha sido ampliamente descrita en un transposón de 10kb perteneciente a la familia Tn3, denominado Tn4401, del cual se han encontrado variantes genéticas (Naas y col., 2008). Tn4401 está delimitado por dos secuencias

repetidas imperfectas de 39-bp, y entre estas secuencias repetidas se encuentran genes codificantes de una transposasa y una resolvasa y el gen *bla*_{KPC-2} entre dos IS, ISKpn6 e ISKpn7 (Cuzon et. al., 2011).

Hasta el momento se han descrito 8 variantes del Tn4401 (a-h), las isoformas a, c, d y e difieren entre sí por deleciones en el espacio intergénico entre *bla*_{KPC} e ISKpn7, la isoforma b no presenta deleción (Naas et. al., 2008)(Bryant et. al., 2013). Se ha descrito otra variante de la isoforma Tn4401d la cual se caracteriza por tener una deleción de 5,3 Kb que incluye parte del gen *bla*_{KPC}, por lo que la enzima no sería funcional (Chen et. al., 2012). Posteriormente, se describió la variante Tn4401f, esta contiene el gen codificante de KPC-4 en *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens*. En esta variante el gen *tnpA* está truncado y *tnpR*, ISKpn7 y Tn4401 IR-L están ausentes (Bryant et al., 2013). La isoforma Tn4401h, se caracteriza por tener una deleción entre los genes *istB* y *bla*_{KPC}, y fue identificada en *Kp* y *Enterobacter cloacae*. Las bacterias portadoras de las isoformas a ó h del Tn4401 tienen un nivel de expresión más elevado de la enzima KPC respecto a las bacterias que tienen la isoforma b (sin deleciones) (Cheruvanky et al., 2017). En la figura 1 extraída de Vera-Leiva (Vera-Leiva y col., 2017) se representa gráficamente el Tn4401 con sus variantes, isoformas a a la h.

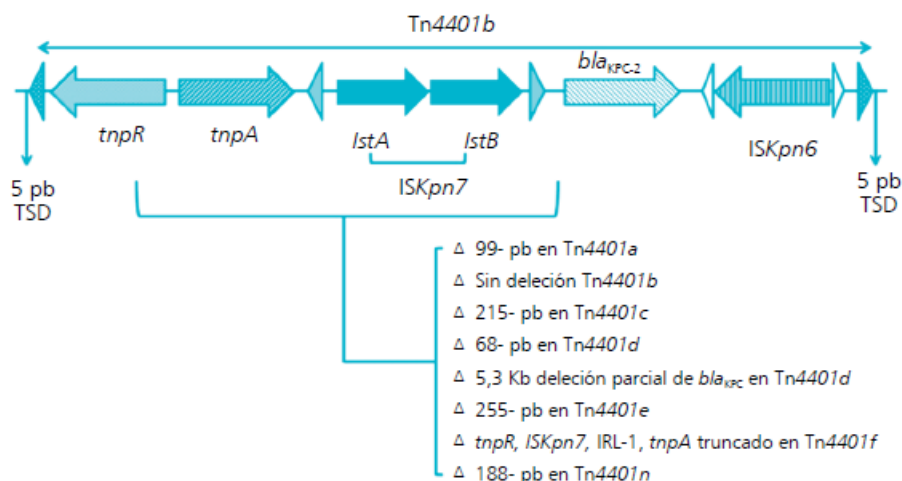


Figura 1. Estructura del transposón Tn4401 y sus isoformas a-h. IRL: repetición invertida izquierda; *tnpR*: gen que codifica la resolvasa; *tnpA*: gen que codifica la transposasa; *istA* e *istB*: genes que conforman la ISKpn7; ISKpn6: IS; TSD: sitio de duplicaciones diana. Los triángulos oscuros representan las secuencias repetidas invertidas.

5. Biofilms bacterianos

Una forma de vida bacteriana es formando conjuntos complejos de células envueltas en una matriz de exopolímeros, llamada biofilm. Estos consorcios se forman en una variedad de superficies inertes tales como metales, plásticos, superficies minerales y también sobre tejidos vivos. Las células sésiles del biofilm tienen un comportamiento alterado respecto a las células planctónicas, con una velocidad de crecimiento menor, activación de genes que en la forma planctónica no estaban activos, así como también la inactivación de otros (Herrera, 2004)(Donlan and Costerton, 2002)(Jamal et.al., 2015).

Para la formación inicial del biofilm se requiere de la expresión de genes específicos, cuyo producto permite que la bacteria se adhiera a la superficie donde se desarrollará el biofilm bacteriano. A su vez, mediante distintas señales, las bacterias utilizan flagelos y otros mecanismos de adhesión para crecer juntas en racimos. La organización de la estructura compleja del biofilm está gobernada por un mecanismo de regulación de la expresión de genes, mediada por señales químicas entre células, que se denomina “quorum sensing” (Donlan and Costerton, 2002)(Jamal et. al., 2015).

Los biofilms bacterianos contribuyen a la patogénesis de varias infecciones en el hombre, entre las que se incluyen las infecciones crónicas de herida, de pulmón y encías de pacientes con fibrosis quística. También cumplen un rol importante en las infecciones relacionadas al uso de dispositivos médicos como catéteres venoso y urinario, válvulas prostéticas de corazón, dispositivos ortopédicos, entre otras. (Donlan and Costerton, 2002)(Stewart y Costerton, 2001). También las complejas comunidades bacterianas de la microbiota normal forman biofilms, en particular en el intestino. Bacterias del biofilm se desprenden en su forma planctónica para colonizar otros sitios y formar nuevos biofilms. (de Vos, 2015).

Las bacterias en el biofilm están protegidas de la respuesta inmune innata del huésped y tienen una mayor resistencia a los antimicrobianos, lo que favorece la insuficiente erradicación de la infección y como consecuencia la producción de infecciones crónicas y de difícil tratamiento (Percival et. al., 2012). Se han postulado

tres hipótesis para explicar porqué el tratamiento con antimicrobianos no es efectivo contra las bacterias que forman parte del biofilm. La primera es que el antibiótico penetre muy lentamente o de forma incompleta a la estructura del biofilm, viéndose así afectada la llegada del mismo a las células. Por ejemplo, los antibióticos con carga positiva (aminoglucósidos) probablemente queden retenidos por las cargas negativas de los polisacáridos que forman la matriz del biofilm. La segunda hipótesis considera el ambiente químico dentro del biofilm, los gradientes de concentración de nutrientes, como por ejemplo el oxígeno, el cual es consumido en las capas externas del biofilm creando un ambiente anaeróbico en las capas internas. A esto se agrega la generación de productos del metabolismo bacteriano que puede derivar en cambios de pH que provoquen la inactivación de ciertos antibióticos. A su vez, la tasa de replicación celular dentro del biofilm en estas condiciones podría ser casi nula, lo cual afectaría directamente a la acción de los β -lactámicos, dado que su acción bactericida es fundamentalmente sobre bacterias en multiplicación. La tercera hipótesis es que dentro del biofilm exista una sub-población bacteriana más resistente, como en un estado de “espora”, lo cual podría explicar la resistencia a antimicrobianos y desinfectantes, a pesar de que ambos tienen estructuras químicas muy diferentes (Stewart y Costerton, 2001).

Anderl y col (Anderl et al., 2000) estudiaron en biofilms de *Kp* y en *Kp* planctónica la acción antibacteriana de ciprofloxacina, encontrando que en el biofilm formado por una cepa de *Kp* la ciprofloxacina fue capaz de penetrar en el total del biofilm a los 20 minutos y su efecto requirió concentraciones más altas que para la célula planctónica (Anderl et. al., 2000).

6. Heterogeneidad fenotípica en poblaciones clonales e infecciones policlonales

El aislamiento de bacterias patógenas que exhiben múltiples morfologías de colonias en un mismo cultivo no es frecuente, a pesar de lo cual es un hecho reconocido como característica de crecimiento en ciertas especies o géneros, principalmente *P. aeruginosa* (Zierdt et.al., 1964) y *Staphylococcus coagulasa* negativos (Becker et. al, 2014). Esta disociación en la morfología de las colonias se ha descrito en raras ocasiones también en *E. faecium*, *Mycobacterium chelonae*, *Burkholderia*

pseudomallei, y *K. pneumoniae*. En *E. faecium* resistente a vancomicina mediada por el gen *vanA*, codificado en un plásmido transferible, se ha descrito en aislamientos clonales perteneciente a un brote epidémico, dos morfologías de colonia, un tipo rugoso y otro liso, y ambos tipos conteniendo el gen *vanA* (Dunne et. al., 1997). En una situación similar, en cultivos de infecciones relacionadas a catéter intravenoso causadas por *Mycobacterium chelonae* multiresistente a antibióticos, se ha observado disociación en dos morfotipos de colonia en una población clonal y con idéntica sensibilidad a los antibióticos (Hsueh et al., 1998). En *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* las cepas tienen una alta frecuencia de variación de fases y las variantes difieren en la capacidad de producción de material capsular y en la resistencia a metilina, ambas propiedades relacionadas a la expresión de genes de codificación cromosómica (Ronen et. al., 2002)(Christensen et. al., 1990). El cultivo en medio sólido de *P. aeruginosa* clásicamente se describe con diferentes morfologías de colonia (Zierdt et.al., 1964). Para cultivos de muestras respiratorias, además de las diferentes morfologías de colonia, también se ha encontrado perfiles de sensibilidad a los antibióticos diferentes (Gillham et. al., 2009)(Serisier et. al., 2012).

En *Kp* la presencia de diferentes morfotipos de colonia en un mismo cultivo, no es un hecho que haya sido reconocido con frecuencia. Se ha descrito aislamientos de absceso hepático en pacientes diabéticos, que exhiben dos morfologías de colonia, con diferentes perfiles de resistencia a antibióticos β -lactámicos, cefazolina, cefoxitín y cefotaxima, correspondiendo ambos al mismo tipo clonal y contenido plasmídico (Hsueh et. al., 2002).

Por otro lado hay varios estudios que demuestran policlonalidad en *Burkholderia cepacia* recuperada de sangre (Boszczowski et al., 2014), en *Pseudomonas aeruginosa* de muestras respiratorias de pacientes con infección pulmonar crónica (Gillham et. al., 2009)(Foweraker et. al., 2005)(Nguyen and Singh, 2006), y en *S. aureus* y *K. pneumoniae* de infecciones de prótesis articulares (De-la-Fuente et. al., 2015). Además de varias clonas también describen varios antibiotipos, aún con morfología de colonias idénticas.

7. Aislamientos en estudio, antecedentes y enfoque del trabajo

En el año 2011 se detectaron por primera vez en nuestro país aislamientos clínicos de *Kp* productora de carbapenemasa proveniente de infecciones en pacientes graves, en un centro de tratamiento intensivo del interior del país, y posteriormente un segundo brote de infecciones en un hospital de la capital. En ambos casos se observó co-resistencia a varias clases químicas de antibióticos, lo que derivó en tratamientos con regímenes antimicrobianos alternativos sin eficiencia terapéutica demostrada. El primer brote se dio en el departamento de Maldonado, donde se detectó la presencia de la enzima KPC en aislamientos de *Kp* pertenecientes al ST258. Estos aislamientos además presentaron resistencia a múltiples drogas, el gen *bla*_{KPC} se localizó en un Tn4401 isoforma a y no se obtuvieron transconjugantes de los experimentos *in vitro* (Márquez y col., 2014). Tampoco se detectaron los genes de la familia *bla*_{CTX-M}, ni *qnrA*, ni *qnrB* en esos aislamientos, pero se identificaron los genes *bla*_{TEM1}, *bla*_{SHV11/155}, *aac6'-Ib*, que codifican respectivamente para dos β-lactamasas de espectro reducido y una acetilasa modificadora de aminoglucósidos. También se detectó *Int1*, marcador de la presencia de un integrón de clase I (Echeverría, 2014).

En esta tesis se plantea el estudio del segundo brote de *Kp* resistente a carbapenemas por producción de carbapenemasas. Se observó que cultivos bacteriológicos de la misma muestra (del mismo paciente, del mismo sitio de infección y obtenidas en el mismo momento) desarrollaron morfotipos de colonia diferentes, con patrones de resistencia a cefalosporinas y carbapenemas variable. El aislamiento de estos diferentes fenotipos perduró en el tiempo, en muestras consecutivas en el período que insumió la negativización de los cultivos bacteriológicos del sitio infectado. También se obtuvieron aislamientos resistentes a carbapenemas de la microbiota intestinal de contactos y de otras infecciones.

La identificación de aislamientos de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa, con disociación de morfología de colonia y distintos perfiles de sensibilidad a los antibióticos β-lactámicos, planteó la pregunta de si los aislamientos correspondían a una población clonal o policlonal, y en el primer caso cuál era la causa de la variación observada en la sensibilidad a antibióticos β-lactámicos. Por otro lado a partir del caso índice, se detectaron colonizaciones e infecciones en otros pacientes,

por lo que se planteó estudiar la relación genética de los aislamientos, así como también la relación existente entre *Kp*-KPC y *Ec*-KPC cultivadas del tracto intestinal del caso índice.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Contribuir al entendimiento del polimorfismo fenotípico a β -lactámicos en *Kp*-KPC y a la diseminación del gen *bla*_{KPC}

Objetivos específicos:

1- Analizar el polimorfismo fenotípico de los aislamientos de KPC-*Kp* por comparación de biotipos y antibiotipos.

2- Caracterizar los genes codificantes de BLEE de la familia CTX-M y de carbapenemasa tipo KPC, en los aislamientos del brote en estudio.

3- Analizar el grado de relación genética entre aislamientos de *Kp*-KPC.

4- Analizar el contenido plasmídico de los aislamientos *bla*_{KPC} y la localización genética del gen *bla*_{KPC}

5- Analizar la transferencia genética del gen *bla*_{KPC} a otras enterobacterias por ensayos de conjugación y tipificar el plásmido transferido.

6- Analizar la secuencia total de el/los plásmidos co-transferidos por conjugación.

7- Analizar la capacidad de producción de biofilm de los aislamientos.

MATERIALES Y METODOS

AISLAMIENTOS ESTUDIADOS

Se analizaron 17 aislamientos productores de carbapenemasa, provenientes de un brote infeccioso en un centro asistencial de Montevideo, el cual tuvo lugar entre 12/9/2011 y 31/10/2011, e involucró un total de 4 pacientes. 16 de los aislamientos fueron identificados como *Kp* y 1 fue identificado como *Ec*. La colección de los aislamientos clínicos se conservó por congelación a -70°C en medio BHI con glicerol 20%. Cada muestra tiene un número de identificación formado por letras y números y se procesó anónimamente. En el código así formado las letras se relacionan con la identidad del paciente y los números indican la muestra. En los casos en que de la misma muestra se aislaron dos morfologías de colonia distinta, estas se guardaron y analizaron por separado y se identificaron con /1 y /2. Los aislamientos /1 tenían morfología mucosa (M) y los aislamientos /2 morfología no mucosa (NM). Los datos de procedencia, biotipo y antibiotipo (antibiograma) fueron aportados por el centro asistencial. El biotipo y el antibiotipo se determinaron por el sistema automatizado Vitek-2 (BioMérieux) con las tarjetas GN para identificación y AST-N082 para el ensayo de sensibilidad a los antibióticos. Los ensayos de sensibilidad se complementaron con ensayos de sinergia para detección de BLEE y carbapenemasa. De dos aislamientos NC882 y DA865 se cuenta con los antibiogramas pero no con los aislamientos, por lo tanto para las determinaciones experimentales estos aislamientos no fueron incluidos.

También se consideraron los resultados obtenidos en el trabajo de tesis de Echeverría (Echeverría, 2014), en que el análisis por amplificación por PCR en los aislamientos de *Kp*, DA293, DA54/1, DA54/2, DA19/1, DA19/2, DA20/1, DA 66/1, DA66/2 fue positivo para los genes *aac6'-Ib-cr*, *IntI1*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{SHV-11/155}* y *qnrB*, a excepción de DA66/1 que es *qnrB* negativa. Los secuenciotipos de los aislamientos DA55/2, DA293 y DA19/2 correspondieron a ST437 (comunicación personal de C. Márquez).

Caso índice: (DA), paciente de 58 años trasplantado hepático con una infección de la herida operatoria. En los cultivos provenientes de esta herida operatoria se observaron en la misma muestra dos *Kp* con distinta morfología de colonia y con distinta CIM a β -lactámicos. La herida tardó en sanar.

Los aislamientos obtenidos se describen en la tabla 1: paciente, número del aislamiento, fecha de obtención, material de procedencia, identidad del aislamiento, biotipo (bionúmero) y antibiotipo. En la figura 2 se observan las dos morfologías de colonia.

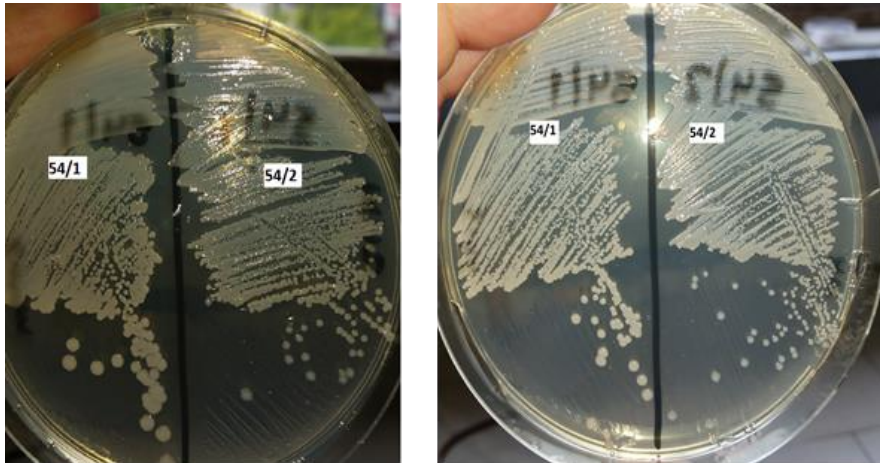


Figura 2. Fotografía de los aislamientos obtenidos del exudado de herida del paciente DA (caso índice). Las distintas morfologías de colonia están identificadas como /1 (M) y /2 (NM).

1. ESTUDIO DE LOS BIOTIPOS Y ANTIBIOTIPOS.

1.1 Estudio de los biotipos

Para el estudio de los biotipos se utilizó el bionúmero obtenido como resultado de identificación del sistema Vitek-2. Este bionúmero proviene de 48 pruebas bioquímicas cuyo resultado (positivo o negativo) se codifica mediante un número de 16 dígitos, en el que cada dígito contiene el resultado de 3 pruebas bioquímicas. Para el estudio de los bionúmeros se utilizaron los criterios descritos por Galar (Galar et al., 2013) en cuyo trabajo de las frecuencias de pruebas bioquímicas con resultados positivos en aislamientos de distintos pacientes y su reproducibilidad, determina cuales pruebas son las mejores para diferenciar distintas cepas dentro de la especie *Kp*. Las pruebas GGT (Gamma-Glutamil-Transferasa), GlyA (Glicina Arilamidasa), TyrA (Tirosina Arilamidasa) y SUCT (Alcalinización del Succinato) mostraron no ser reproducibles por lo tanto no son útiles para determinar variabilidad y no se tienen en cuenta para el análisis. Al extraer estas pruebas bioquímicas del bionúmero se obtiene un nuevo bionúmero al que se denomina bionúmero reducido. El bionúmero reducido es el que se utiliza en esta tesis para analizar la variabilidad en las pruebas bioquímicas de los aislamientos en estudio y determinar sub-poblaciones de *Kp*.

1.2 Estudio de los antibiogramas

Para el estudio de los antibiogramas se tomaron en cuenta los resultados de CIM a β -lactámicos, las demás familias de antibióticos no se tuvieron en cuenta ya que los resultados no muestran variabilidad entre los aislamientos. Teniendo en cuenta las CIM a los β -lactámicos se agrupan los aislamientos en distintos antibiogramas, considerando que la reproducibilidad del sistema es de +/- 1 dilución.

2. AMPLIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *bla*_{CTX-M} Y *bla*_{KPC}

Se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Saladin (Saladin et al., 2002) para la amplificación de los genes de la familia *bla*_{CTX-M}. Para la amplificación de los genes de la familia *bla*_{KPC} se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Endimiani (Endimiani et al., 2008). Se realizó la búsqueda de todas las versiones genéticas descritas para *bla*_{CTX-M} y *bla*_{KPC} utilizando la base de datos de Lahey (<http://www.lahey.org/Studies/>) y se

probaron in-silico los oligonucleótidos previamente seleccionados para tener la certeza de que todas las versiones genéticas son amplificables con dichos oligonucleótidos, utilizando el programa MEGA 6.

De las amplificaciones positivas se seleccionaron algunas para el análisis de las variantes alélicas mediante secuenciación del producto de PCR purificado (Macrogen Inc Korea) y su análisis mediante la herramienta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

El protocolo para la obtención de ADN molde para los ensayos de PCR se describe en el Anexo I.

3. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOS AISLAMIENTOS.

El análisis del polimorfismo genético se realizó mediante Electroforesis en Gel por Campo Pulsante (PFGE). Este método se considera el método de referencia para la tipificación genética de *Kp* (Arlet et. al., 1994)(Li and Fournier, 2009).

Las muestras fueron digeridas con dos tipos de enzimas de restricción, *Xba*I y *Spe*I. Las muestras se corrieron en un sistema de electroforesis en campos pulsados CHEF-DR III. La interpretación de los patrones de los fragmentos generados en el PFGE se realizó visualmente y mediante el programa informático GelCompar versión 4.0 de Applied Maths. La interpretación genética y epidemiológica de los patrones obtenidos se realizó según los criterios de Tenover (Tenover et. al., 1995) y el criterio de porcentaje de similaridad de Singh (Singh et. al., 2006). Para aislamientos simultáneos, de la misma muestra, se tomó en cuenta si los pulsotipos eran indistinguibles o no.

Se buscó la asociación de los pulsotipos con las sub-poblaciones previamente definidas por características fenotípicas.

El protocolo que se utilizó se describe en el Anexo II y es el que se usa habitualmente en el laboratorio de Microbiología Clínica.

Junto con los aislamientos se estudiaron dos cepas de *Kp*-KPC no pertenecientes al brote, la cepa *Kp*666 de la colección de cepas de la cátedra de microbiología clínica (Facultad de Química), fue obtenida del primer brote de KPC en Maldonado y la cepa *Kp*DLSP fue cedida por el Departamento de Laboratorios de Salud Pública.

4. ANÁLISIS DEL CONTENIDO PLASMÍDICO DE LOS AISLAMIENTOS Y LOCALIZACIÓN GENÉTICA DEL GEN *bla*_{KPC}.

4.1 Análisis del contenido plasmídico.

El análisis del contenido plasmídico se realizó con la técnica de extracción de plásmidos pesados de Kadó (Kadó y Liu, 1981) modificada. Se describe el protocolo en el Anexo III.

Como controles de calidad de la extracción de los plásmidos y referencia de peso molecular se utilizaron las cepas de *Ec* V517 (Marcina y col., 1987) y *Ec* J53 (Echeverría, 2014) de contenido plasmídico conocidos, ambas de la colección de cepas de la cátedra de microbiología clínica. Se realizó la separación por electroforesis en gel de agarosa y posteriormente se tiñó con good view y se fotografió.

4.2 Localización del gen *bla*_{KPC} en la extracción plasmídica.

La localización genética del gen *bla*_{KPC} se realizó por hibridación de las bandas obtenidas de la extracción plasmídica en el punto 4.1, con una sonda específica para el gen *bla*_{KPC} por *Southern blot*. Para ello en primera instancia se determina con un Dot Blot el límite de detección del kit utilizado para el marcado de la sonda (BioNick Labeling System, Invitrogen Cat. Nro 18247-015) y detección (Phototope–Star Detection kit NEB). Se utilizaron membranas de Nylon (HybondN+). El *Southern blot* se realizó con el protocolo descrito por Sambrook y Russell (Sambrook y Russell, 2001) con modificaciones, que se describe en el Anexo IV. Este experimento se realizó en el marco de una pasantía en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias-Facultad de Química.

5. TRANSFERENCIA GENÉTICA DEL GEN *bla*_{KPC} A OTRAS ENTEROBACTERIAS. TIPIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO TRANSFERIDO.

5.1 Transferencia genética del gen *bla*_{KPC}: ensayo de conjugación bacteriana.

Se estudió la transferencia del gen *bla*_{KPC} utilizando aislamientos de *Kp*-KPC y *Ec*-KPC como dadoras y *Ec* y *Kp* como receptoras.

Se realizaron 4 ensayos de conjugación, los aislamientos seleccionados para los ensayos, su descripción y las condiciones de selección de las transconjugantes se describen en la tabla 2. Las transconjugantes obtenidas se nombraron de la siguiente forma: Dadora x Receptora

El protocolo que se utilizó está basado en el descrito por Márquez (Márquez y col., 1999) con algunas modificaciones y se describe en el anexo V.

A los efectos de confirmar la transferencia del gen *bla*_{KPC} y/o *bla*_{CTX-M} a la cepa receptora, se realizó la extracción de ADN de las transconjugantes y se amplificaron ambos genes por PCR. Se evaluó la expresión fenotípica de la resistencia en las transconjugantes mediante ensayo de sensibilidad en el sistema automatizado Vitek-2 tarjeta AST-N249. También se realizó una extracción plasmídica de las cepas dadoras, receptoras y transconjugantes, con la técnica descrita en el Anexo III, con el fin de visualizar el/los plásmidos transferido/s en la conjugación.

No fue posible realizar ensayos de conjugación entre aislamientos de *Kp*-KPC ya que presentan resistencia a múltiples antibióticos, solo la Azida de sodio (NaN₃) inhibe su crecimiento, no pudiendo encontrar un segundo agente selectivo.

5.2 Tipificación del plásmido transferido.

Para caracterizar el/los plásmidos de las transconjugantes, se realizó la tipificación del grupo de incompatibilidad plasmídica por PCR con oligonucleótidos y condiciones ya descritas por Carattoli (Carattoli et. al., 2005).

Ensayos de conjugación	Dadora	Características	Condiciones de crecimiento	Receptora	Características	Condiciones de crecimiento	Selección de las transconjugantes
1	Ec 20/2	<i>bla</i> _{KPC+} <i>bla</i> _{CTX-M+} proveniente del exudado anal de DA	Mem (2ug/ml): CRECE NaN ₃ (200ug/ml): NO CRECE indol: + ditrato:-	Kp 12726	BLEE (-) proveniente de un aislamiento clínico. Perteneció a la colección de la cátedra de microbiología	Mem (2ug/ml): NO CRECE NaN ₃ (200ug/ml): CRECE indol: - ditrato: +	Se seleccionaron aquellas que crecieron en la placa con Mem 2ug/ml + NaN ₃ y fueron indol: - ditrato:+
2	Ec 20/2	<i>bla</i> _{KPC+} <i>bla</i> _{CTX-M+} proveniente del exudado anal de DA	Mem (2ug/ml): CRECE NaN ₃ (200ug/ml): NO CRECE indol: + ditrato:-	Kp 1120	BLEE (+) <i>bla</i> _{CTX-M+} , proveniente de un aislamiento clínico. Este aislamiento pertenece a una colección de la cátedra de microbiología clínica previamente estudiado.	Mem (2ug/ml): NO CRECE NaN ₃ (200ug/ml): CRECE indol: - ditrato: +	Se seleccionaron aquellas que crecieron en la placa con Mem 2ug/ml + NaN ₃ y fueron indol: - ditrato:+
3	Kp 54/1	<i>bla</i> _{KPC+} <i>bla</i> _{CTX-M-} proveniente del cultivo de herida de DA. Morfología M	Mem (2ug/ml): CRECE NaN ₃ (200ug/ml): NO CRECE indol: - ditrato:+	Ec TOP	Ec de colección, no alberga genes de resistencia a ningún beta-lactámico. Es resistente a Rifampicina y a NaN ₃ .	Mem (2ug/ml): NO CRECE NaN ₃ (200ug/ml): CRECE indol: + ditrato: -	Se seleccionaron aquellas que crecieron en la placa con Mem 2ug/ml + NaN ₃ y fueron indol: +
4	Kp 54/2	<i>bla</i> _{KPC+} <i>bla</i> _{CTX-M+} proveniente del cultivo de herida de DA. Morfología NM	Mem (2ug/ml): CRECE NaN ₃ (200ug/ml): NO CRECE indol: - ditrato:+	Ec TOP	Ec de colección, no alberga genes de resistencia a ningún beta-lactámico. Es resistente a Rifampicina y a NaN ₃ .	Mem (2ug/ml): NO CRECE NaN ₃ (200ug/ml): CRECE indol: + ditrato: -	Se seleccionaron aquellas que crecieron en la placa con Mem 2ug/ml + NaN ₃ y fueron indol: +

Tabla 2. Ensayos de conjugación. En esta tabla se describen los ensayos de conjugación realizados, las características de las cepas y aislamientos seleccionados y las condiciones de selección de las transconjugantes. NaN₃: Azida de sodio. Mem: meropenem. Para las pruebas de indol y ditrato se corroboró previamente que el comportamiento fuera el esperado, que se describe en la tabla.

6. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA TOTAL DEL PLÁSMIDO TRANSFERIDO POR CONJUGACIÓN.

Se realizó la extracción y purificación del ADN plasmídico de una de las transconjugantes con el kit comercial Quiagen Plasmid Maxi kit, el cual para la extracción de ADN plasmídico utiliza el método de lisis alcalina seguido de la unión del ADN a una resina, de la cual posteriormente es eluido. El producto se envió para su secuenciación a BGI Genomics, donde se utilizó la tecnología Illumina HiSeq 4000 sequencig platform. Para el calculo del contenido de GC se utilizó el programa online ENDMEMO <http://www.endmemo.com/bio/gc.php>. La herramienta Blast del NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> se utilizó para la búsqueda de secuencias de referencia, los alineamientos y la anotación de las mismas. El ensamblado de las secuencias resultantes de la secuenciación, con las secuencias de referencia, se realizó con el programa informático SeqMan de Lasergene. Para el análisis de las secuencias se usaron las siguientes bases de datos: Center for Genomic Epidemiology <http://www.genomicepidemiology.org/> donde se encuentran las herramientas “Resfinder” para la búsqueda de genes de resistencia a antimicrobianos, “Virulence finder” para la búsqueda de genes de virulencia, “Plasmid finder” para la determinación del grupo de incompatibilidad plasmídico, y “pMLST” para determinar el ST plasmídico. Para la búsqueda de secuencias de inserción se utilizó ISfinder en <https://isfinder.biotoul.fr/>. La búsqueda del origen de replicación (oriT) se llevó a cabo con el programa oriTfinder <http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/oriTfinder/>. El programa utilizado para la representación gráfica del plásmido con su anotación fue SeqBuilder de Lasergene. La comparación de la secuencia plasmídica con otros plásmidos se realizó con el programa MAUVE <http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>.

7. PRODUCCIÓN DE BIOFILM DE LOS AISLAMIENTOS.

Para analizar la capacidad de producción de biofilm de *Kp*-KPC y *Ec*-KPC se utilizó un método basado en la capacidad bacteriana de adherirse a las paredes de una policubeta de poliestireno y luego mediante tinción con cristal violeta medir de manera indirecta el biofilm formado. En el anexo VI se describe el protocolo que se utilizó el cual está basado en los protocolos descritos por O’Toole y Naves (O’Toole,

2011); (Naves et. al., 2008) con modificaciones. Se realizaron dos experimentos independientes con cinco replicas cada uno. Se elige como control positivo para la producción de biofilm la cepa *Ec* ATCC 25922 (Naves et. al., 2008) y como control negativo el medio de cultivo sin el agregado de bacterias. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realiza con el programa informático PAST.

Los aislamientos se clasifican teniendo en cuenta su capacidad de producción de biofilm en categorías según el valor de DO obtenido. Se consideran como no productores cuando la DO es $\leq DO_c$ (siendo $DO_c = DO_{\text{control negativo}} + 3$ desviaciones estandard), débil productor de biofilm cuando $DO_c < DO \leq 2xDO_c$, moderado productor de biofilm cuando $2xDO_c < DO \leq 4xDO_c$ y fuerte productor de biofilm cuando $DO > 4xDO_c$ (Stepanovi et. al., 2000).

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE BIOTIPO Y ANTIBIOTIPO

1.1 Biotipo

Se realiza el estudio del biotipo de los 16 aislamientos de *Kp*-KPC descritos previamente en la tabla 1. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Luego de aplicar los criterios descritos, se determinó que los aislamientos se distribuyeron únicamente en dos bionúmeros reducidos. El bionúmero reducido predominante abarcó 14 aislamientos mientras que el segundo bionúmero reducido comprendió solo dos aislamientos. La prueba bioquímica que diferenció a ambos biotipos fue la hidrólisis de urea, negativa en el bionúmero reducido menos frecuente y positiva para el bionúmero reducido más frecuente. La capacidad de hidrolisar urea es una característica de *Kp*, y la pérdida de dicha actividad marca un fenotipo diferente.

Aislamiento	Fecha obtención material	Material	Bionúmero	Bionúmero extendido	Bionúmero reducido
DA293	12/09/2011	HO	6607734453564010	01101100011111110001001101110101011001000100000	011011000111111100010111011101001101001101000100000
DA54/1	14/09/2011	HO	6607734653564010	01101100011111110001011101110101011001000100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
DA54/2	14/09/2011	HO	6607734653564010	01101100011111110001011101110101011001000100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
DA19/1	19/09/2011	HO	6607734653564010	01101100011111110001011101110101011001000100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
DA19/2	19/09/2011	HO	6605734653564010	01101100010111110001011101110101011001000100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
DA20/1	19/09/2011	Anal	6607734553565010	01101100011111110001011101110101011010100100000	011011000111111100010110111010011101001101000100000
AS897	21/09/2011	Anal	6605734653564010	011011000101111110001011101110101011001000100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
DA867	23/09/2011	Anal	6607734653565010	01101100011111110001011101110101011010100100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
DA865	23/09/2011	HO	6607734653564010	01101100011111110001011101110101011001000100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
DA66/1	23/09/2011	HO	6607734653565010	01101100011111110001011101110101011010100100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
DA66/2	23/09/2011	HO	6607734653564010	01101100011111110001011101110101011001000100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
DA635	28/09/2011	HO	6607734653565010	01101100011111110001011101110101011010100100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
NC407	13/10/2011	U	6607734653564010	01101100011111110001011101110101011001000100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
NC339	25/10/2011	U	6607734653165010	011011000111111100010111011101010100011101000100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
EP446	25/10/2011	Anal	6607734653564010	01101100011111110001011101110101011001000100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000
NC882	31/10/2011	Anal	6605734653564010	011011000101111110001011101110101011001000100000	011011000111111100011110111010011101001101000100000

Tabla 3. Bionúmero de los aislamientos. En la columna "bionúmero" se indica el bionúmero aportado por el sistema Vitrek-2 según la tarjeta de identificación GN. En la columna correspondiente a "bionúmero extendido" se muestra el resultado de las pruebas bioquímicas desglosadas. En la columna Bionúmero reducido se muestra el bionúmero que corresponde al extraer las pruebas no reproducibles y en negrita se destaca el número en el cual se encontró diferencia (prueba de la ureasa). HO: herida operatoria, U: orina.

1.2 Antibiotipo

Los valores de CIM a AmpS, PipT, Cef, Ge, Na, Cip, Fd y SXT fueron superiores a lo que puede determinar el sistema, siendo categorizados como resistentes. Para la Ak, si bien la CIM determinada corresponde a la categoría de sensible, el sistema experto indica una CIM más elevada que la población salvaje y aconseja su categorización como Intermedia.

Todos los aislamientos fueron productores de BLEE y productores de carbapenemasa.

Para Fox las CIM de todos los aislamientos se distribuyen entre 16 a ≥ 64 mg.L⁻¹ correspondiendo a categoría I o R, con excepción del aislamiento DA66/2 que correspondió a S. En el caso de cefoxitin, los aislamientos con CIM ≥ 32 mg.L⁻¹ tenían los mayores valores de CIM a carbapenemas, y el aislamiento con menor CIM tenía la menor CIM a carbapenemas, esta asociación podría deberse a que el grado de impermeabilidad contribuye a la resistencia a carbapenemas. De todas maneras el rango relativamente estrecho de distribución de las CIM no permite separar grupos con diferencias de CIM.

Los valores de CIM a cefaloporinas de espectro extendido, Caz, Ctx, Cfp y carbapenemas fueron variables. Los rangos de CIM para Ctx fue de 4 a ≥ 64 mg.L⁻¹, para Caz de 4 a ≥ 64 mg.L⁻¹ y para Cfp de 2 a ≥ 64 mg.L⁻¹, en tanto que en las carbapenemas el rango de CIM para Imp fue de ≤ 1 a ≥ 16 mg.L⁻¹ y para Mem de 1 a ≥ 16 mg.L⁻¹, correspondiendo a las categorizaciones de S, I o R. Por lo tanto, para la clasificación de los aislamientos en distintos antibiotipos se tomó en cuenta la CIM a Caz, Ctx, Cfp y la CIM a carbapenemas. Los antibiotipos obtenidos se definen en la tabla 4.

C3G		C4G	AISLAMIENTOS	ANTIBIOTIPO y proporción	CARBAPENEMAS		AISLAMIENTOS	ANTIBIOTIPO y proporción
Ctx	Caz	Cfp			Imp	Mem		
≥64	≥64	≥64	DA54/2 (HO) DA19/2(HO) DA867 (A) DA865(HO) DA66/2 (HO) NC407 (U) NC339 (U) EP446(A) NC882(A)	1 (56%)	4	1	DA293 (HO) DA54/1(HO) DA54/2 (HO) DA 19/1 (HO) DA19/2(HO) DA865(HO) DA66/1(HO) DA635(HO) NC407 (U) EP446(A) NC882(A)	1 (69%)
4	4-8	2	DA293 (HO) DA54/1(HO) DA66/1 (HO) DA635(HO)	2 (25%)	8 - ≥16	≥16	DA20/1 (A), AS897(A) DA867(A) NC339 (U)	2 (25%)
8	≥64	8-16	DA20/1 (A) AS897(A)	3 (13%)	≤1	1	66/2 (HO)	3 (6%)
4	≥64	2	DA 19/1 (HO)	4 (6%)				

Tabla 4. Clasificación de los aislamientos *Kp* en distintos antibiogramas según su CIM a β -lactámicos y proporción de cada antibiograma. Aclaraciones: Se definen 4 antibiogramas para las cefalosporinas de espectro extendido (1, 2, 3 y 4) y tres antibiogramas para las carbapenemas (1,2 y 3).

Los ensayos de tamizaje para BLEE, automatizados y/o manuales, fueron positivos, por lo que a todos los aislamientos se les realiza la búsqueda del gen *bla*_{CTX-M} por PCR.

Los valores elevados de CIM a por lo menos una de las carbapenemas ensayadas, mayor al punto de corte de sensibilidad según norma CLSI M100-S21, o los resultados positivos para el ensayo de Hodge y la inhibición de la resistencia a carbapenemas con ácido borónico en ensayo de difusión, sugieren la presencia del gen *bla*_{KPC}, por lo que se realiza su búsqueda por PCR.

2. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *bla*_{CTX-M} y *bla*_{KPC}

Las cefotaximasas *bla*_{CTX-M-8} y *bla*_{CTX-M-25} no eran amplificables con los oligonucleótidos descritos por Saladin et al., por lo tanto se utilizaron los descritos por Hamdy (Hamdy et al., 2016) y los descritos por Azam (Azam et al., 2016) a los efectos de cubrir todas las variantes descritas. Para la familia *bla*_{KPC} no fue necesario adicionar más oligonucleótidos ya que los descritos por Endimiani (Endimiani et al., 2008) abarcan todas las familias genéticas descritas en la base de datos. En la tabla 5 se describen los oligonucleótidos utilizados y las condiciones de amplificación.

Gen	Primers		Tamaño de producto	Condiciones de amplificación					Referencia	
	Nombre	Secuencia 5'-3'		Ciclos	Pre desnat ¹	Desnat ¹	Hibrid ²	Ext ³		Ext ³ final
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTXM-A1	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	543 pb	35	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	Saladin et al., 2002
	CTXM-A2	CGCRATATGRTTGTTGGTGTG			5 min	45 seg	30seg	1min	7min	
<i>bla</i> _{CTX-M-8-25}	CTX-8/25-F	AACRCRCAGACGCTCTAC	326 pb	30	94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	Hamdy et al., 2016
	CTX-8/25-R	TCGAGCCGGAASGTGYAT			5 min	60 seg	30seg	1 min	10min	
<i>bla</i> _{CTX-M-25}	CTX-25-F	ATGATGAGAAAAAGCGTAAGGCGGG	876 pb	30	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	Azam et al., 2016
	CTX-25-R	TTAATAACCGTCGGTGACAATTCTGGC			10 min	40 seg	40 seg	1 min	7 min	
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTC	882 pb	35	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	Endimiani et al., 2008
	KPC-R	TTACTGCCCGTTGACGCC			3 min	45 seg	30 seg	1 min	7 min	

Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación utilizados para los genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{KPC}.
Aclaraciones: 1: desnaturalización, 2: hibridación, 3: extensión.

2.1 Amplificación de *bla*_{CTX-M}

En las figuras 3 y 4 se muestra el resultado de la amplificación del gen *bla*_{CTX-M}. Se obtuvo una banda del PM esperado para las muestras DA54/2, DA19/2, DA20/2, DA66/2, EP446, CN407 y CN339. No se obtuvo ningún amplicón de PM esperado con los oligonucleótidos descritos por Hamdy et al., por lo que sólo algunos de los aislamientos *Kp* y la *Ec* poseen genes de la familia *bla*_{CTX-M}.

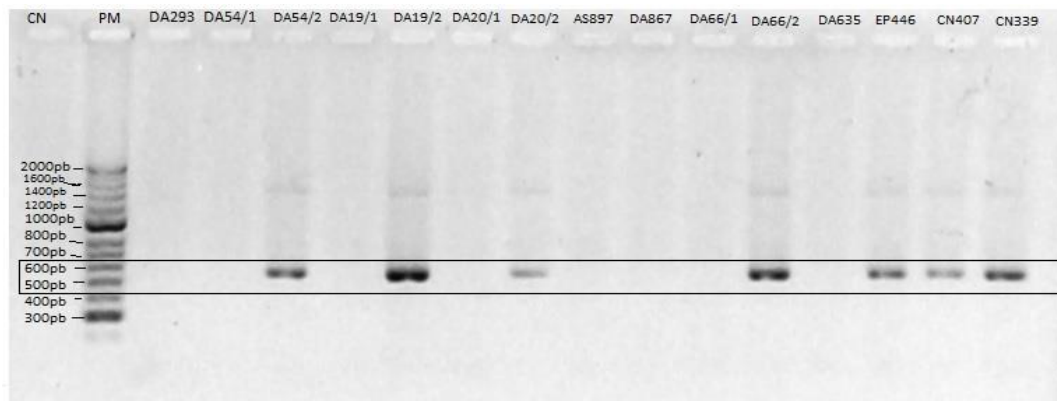


Figura 3 Resultado de la amplificación con los oligonucleótidos descritos por Saladin et. al. para bla_{CTX-M} En la foto se observa de izquierda a derecha: CN: control negativo, PM: marcador de peso molecular HyperLadder 50bp de Bioline. DA20/2 único aislamiento de *Ec*. El recuadro indica la zona del PM esperado para el producto de amplificación.

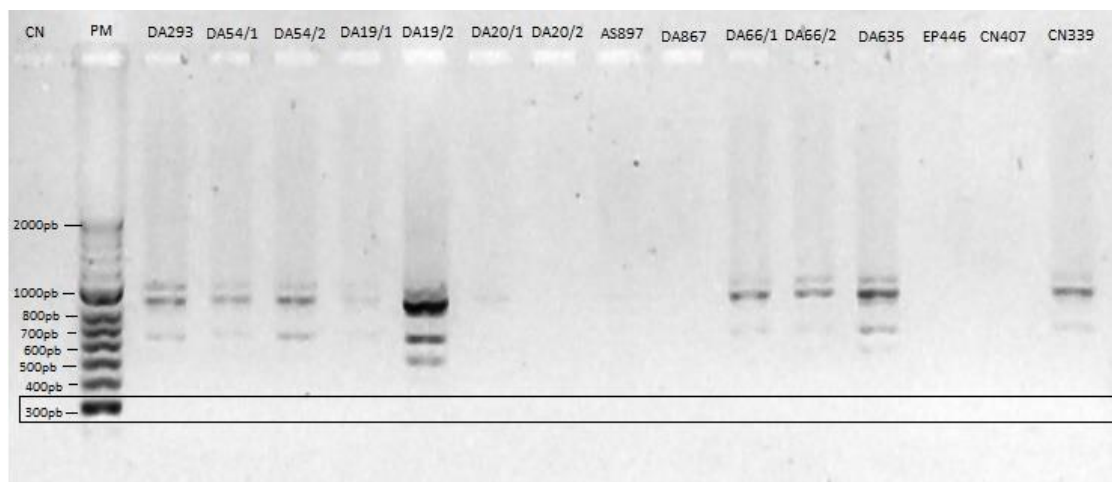


Figura 4. Resultado de la amplificación con los oligonucleótidos descritos por Hamdy et. al. para bla_{CTX-M} En la foto se observa de izquierda a derecha: CN: control negativo, PM: marcador de peso molecular HyperLadder 50bp de Bioline. DA20/2 único aislamiento de *Ec*. El recuadro indica la zona del PM esperado para el producto de amplificación.

2.2 Amplificación de bla_{KPC}

En la figura 5 se muestra el resultado que se obtuvo de la amplificación del gen bla_{KPC} . Todas las muestras amplificaron con los oligonucleótidos para bla_{KPC} y se obtuvo una banda del PM esperado.

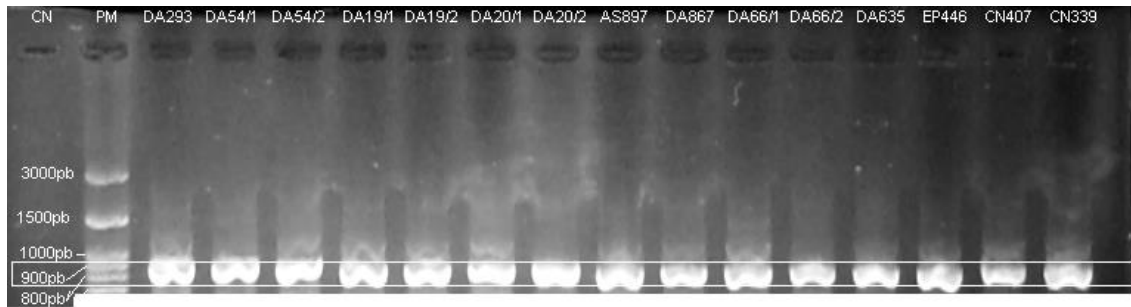


Figura 5. Resultado de la amplificación de *bla*_{KPC}. En la foto se observa de izquierda a derecha: CN: control negativo, PM: marcador de peso molecular AccuRuler 100pb Plus DNA RTU Ladder de MaestroGen. DA20/2 único aislamiento de *Ec*. El recuadro indica la zona del PM esperado para el producto de amplificación.

Algunos de los productos de amplificación fueron seleccionados para su secuenciación con el fin de confirmar la identidad del amplicón y de determinar a qué versión genética pertenece. Se enviaron para su secuenciación los productos de PCR correspondientes a la amplificación de *bla*_{KPC} de DA293, DA54/1, DA54/2, DA19/2, y DA20/2. Los productos correspondientes a la amplificación del gen *bla*_{CTX-M} que se enviaron para su secuenciación son los correspondientes a DA54/2, DA19/2, DA20/2 y DA66/2. En todos los casos se confirmó la identidad del gen esperado, para el caso de *bla*_{KPC} se determinó que corresponde a la variante genética KPC-2 o KPC-24 para todas las muestras secuenciadas. Dado que la diferencia entre ambas variantes genéticas del gen *bla*_{KPC} se encuentra en la secuencia que hibrida con el oligonucleótido, no se puede confirmar si es una u otra mediante el secuenciado del producto obtenido. Para el caso de *bla*_{CTX-M} se determinó para los amplicones correspondientes a los aislamientos DA54/2, DA19/2 y DA66/2 que se trata de la versión CTX-M-15. En el caso de DA20/2 que corresponde a la *Ec* no se pudo determinar si se trata de la variante CTX-M-9 o CTX-M-51 ya que la diferencia entre ambas variantes del gen se encuentra por fuera de la región amplificada.

En la tabla 6 se resumen los resultados obtenidos para la amplificación de los genes *bla*_{KPC} y *bla*_{CTX-M} y su correspondiente secuenciación.

Aislamiento	Amplificación <i>bla</i> _{CTX-M}	Amplificación <i>bla</i> _{CTX-M 8/25}	Amplificación <i>bla</i> _{KPC}
DA293	-	-	+ (KPC-2 o KPC-24)
DA54/1	-	-	+ (KPC-2 o KPC-24)
DA54/2	+ (CTX-M-15)	-	+ (KPC-2 o KPC-24)
DA19 /1	-	-	+
DA19/2	+ (CTX-M-15)	-	+ (KPC-2 o KPC-24)
DA20/1	-	-	+
DA20/2	+ (CTX-M-9 o 51)	-	+ (KPC-2 o KPC-24)
AS897	-	-	+
DA867	-	-	+
DA66/1	-	-	+
DA66/2	+ (CTX-M-15)	-	+
NC407	+	-	+
EP446	+	-	+
NC339	+	-	+

Tabla 6. Resultado de la amplificación de los genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{KPC} en los aislamientos y secuenciación de los amplicones obtenidos en aislamientos seleccionados. El signo + significa amplificación positiva y el – significa que no se obtuvo amplicón. De aquellos amplicones que se secuenciaron se indica la variante genética entre paréntesis. DA20/2 único aislamiento de *Ec*.

3. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOS AISLAMIENTOS *Kp*-KPC

3.1 PFGE con *Xba*I y análisis de los patrones de bandas

Previo a la realización de esta tesis algunos de los aislamientos ya habían sido analizados por PFGE con la enzima de restricción *Xba*I, el gel obtenido es el que se muestra en la figura 6. Se completó con el análisis de los aislamientos DA66/1, DA635 y CN339, incluyendo en el mismo gel la repetición del análisis de los aislamientos DA293, DA20/1 y DA867. El gel obtenido en esta tesis se muestra en la figura 7.

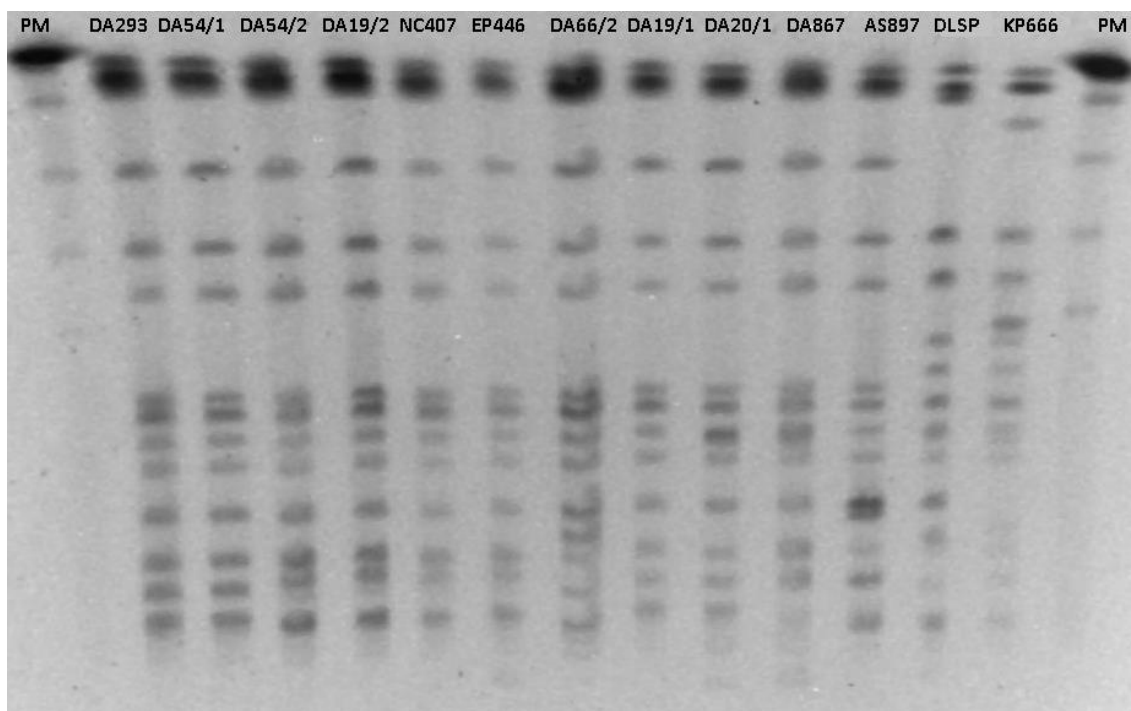


Figura 6. Gel de PFGE obtenido con la enzima de restricción *Xba*I. Gel obtenido en el año 2011 por A. Ingold, la tinción se realizó con BrEt. Desde el carril 2 al 12 se encuentran los aislamientos en estudio, los carriles 1 y 15 corresponden a un marcador de PM. En el anteúltimo carril hay una cepa DLSP de *Kp* y en el último carril la cepa *Kp*666 perteneciente al primer brote de KPC descrito en Maldonado.

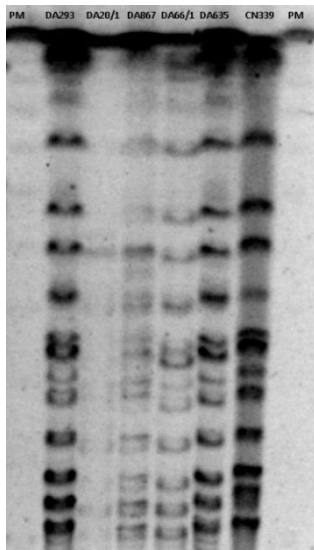


Figura 7 Gel de PFGE obtenido en esta tesis con *XbaI*. Los carriles 1 y 8 corresponden al marcador de PM Lambda Ladders de ProMega, los carriles 2, 3 y 4 corresponden a los aislamientos que se repiten en ambos geles (DA293, DA20/1 y DA867 respectivamente). Los aislamientos de los carriles 5, 6 y 7 son aquellos que no están en el gel de la figura 6 (DA66/1, DA635, NC339 respectivamente)

En base al resultado obtenido en el gel se realizó la comparación de los patrones de bandas de las muestras entre sí, y a cada patrón de bandas se lo asignó un pulsotipo. Cada pulsotipo contiene los patrones de banda de las muestras que son indistinguibles o idénticas. Este resultado se muestra en la tabla 7.

El dendograma obtenido para el gel correspondiente a la figura 6 se representa en la figura 8.

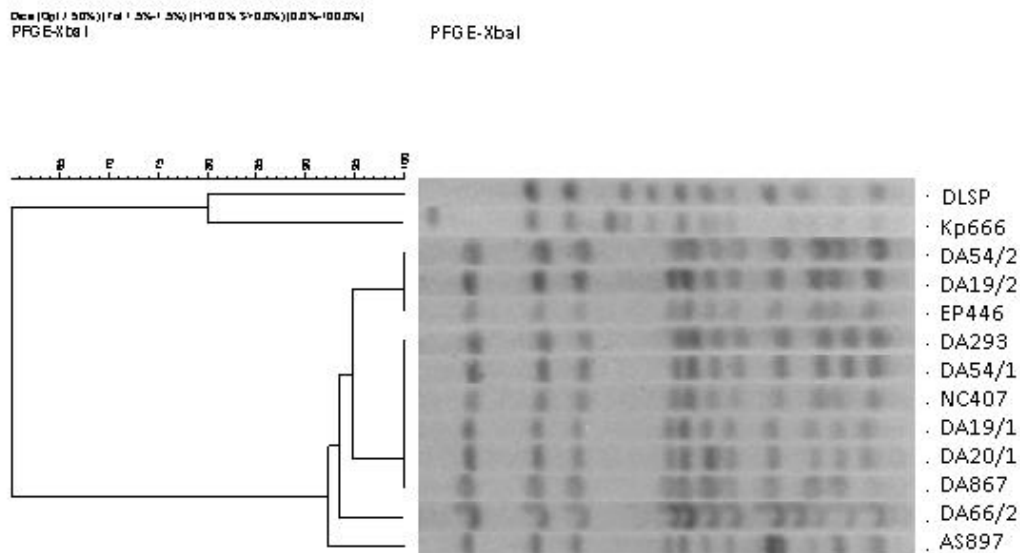


Figura 8. Dendograma basado en la similitud de los patrones de bandas obtenidos con *XbaI*. Este dendograma fue obtenido con el programa GelCompar.

Todos los aislamientos en estudio, de los que se sospecha pertenecen a un brote de infecciones hospitalarias y con menos de 2 meses de distancia temporal, muestran una similitud mayor al 90%, por lo que se interpreta como probablemente pertenecientes al brote. Una parte de los aislamientos pertenecen a cada uno de dos grupos de aislamientos indistinguibles entre sí. En tanto que las cepas epidemiológicamente no relacionadas, *Kp666* proveniente del brote de infecciones por *Kp-KPC* de Maldonado y la cepa *Kp DLSP* muestran perfiles de PFGE diferentes (80% de similitud o menor) y no son parte del brote.

Aislamiento	Pulsotipo
DA293	A
DA54/1	A
DA54/2	A1
DA19/1	A
DA19/2	A1
DA20/1	A
AS897	A2
DA867	A
DA66/1 ¹	A
DA66/2	A3
DA635 ¹	A
NC407	A1
EP446	A1
NC339 ¹	A1
Kp666	B
DLSP	C

Tabla 7. Pulsotipos de los aislamientos en estudio por PFGE con la enzima de restricción *Xba*I. En ningún caso se observa una diferencia mayor a 3 bandas, por lo que se nombran como subtipos (A1, A2, A3) del tipo más frecuente (A). Las cepas sin relación epidemiológica, ni genética se nombran como pulsotipos B y C. 1- se asigna pulsotipo por inspección visual.

3.2 PFGE con *SpeI*

Dada la similitud en los patrones de bandas obtenidos con la enzima *XbaI* se decidió someter a los aislamientos a una segunda enzima de restricción con el fin de corroborar si los patrones de bandas obtenidos con esta segunda enzima continúan siendo similares o por el contrario se obtienen patrones diferentes entre sí. Para ello se seleccionaron varios aislamientos pertenecientes al mismo pulsotipo, abarcando todas las categorías encontradas: aislamientos DA54/1 y DA 19/1 del pulsotipo A, DA 54/2, DA19/2, NC407 y EP446 que pertenecen al pulsotipo A1, y AS897? y DA66/2 que pertenecen a los pulsotipos A2 y A3 respectivamente. En la figura 9 se muestra el resultado obtenido.

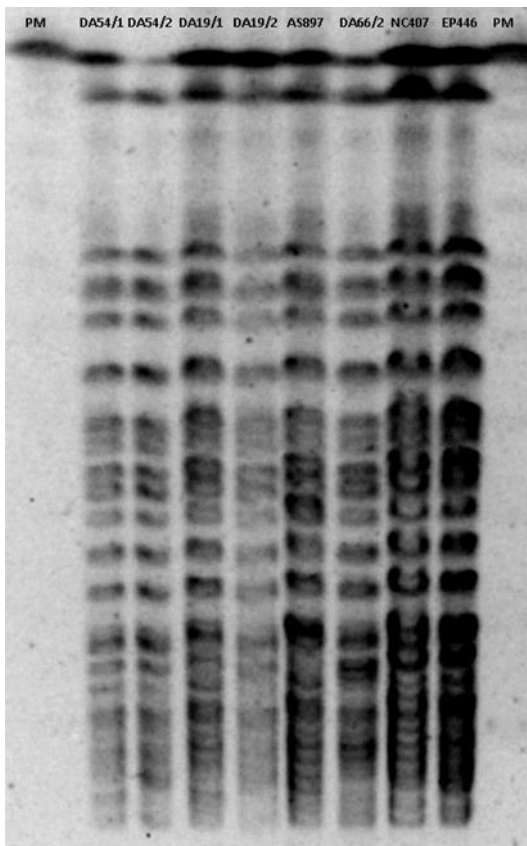


Figura 9. Gel de PFGE obtenido con la enzima de restricción *SpeI* de los aislamientos seleccionados. Los carriles 1 y 10 corresponden al marcador de PM Lambda Ladders de ProMega. Desde el carril 2 al 9 se encuentran los aislamientos, DA54/1 y DA19/1 correspondientes al pulsotipo A, DA54/2, DA19/2, NC407 y EP446 correspondientes al pulsotipo A1, AS867 correspondiente al pulsotipo A2 y DA66/2 correspondiente al pulsotipo A3.

De la comparación de los perfiles de las 14 bandas de PM más elevado que se observan en el gel, se concluye que pertenecen a un único pulsotipo.

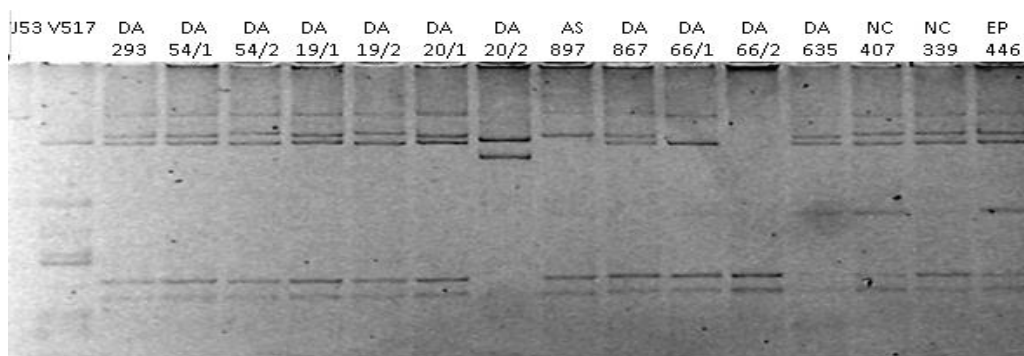
4. ANÁLISIS DEL CONTENIDO PLASMÍDICO DE LOS AISLAMIENTOS Y LOCALIZACIÓN GENÉTICA DEL GEN *bla_{KPC}*

4.1 Análisis del contenido plasmídico.

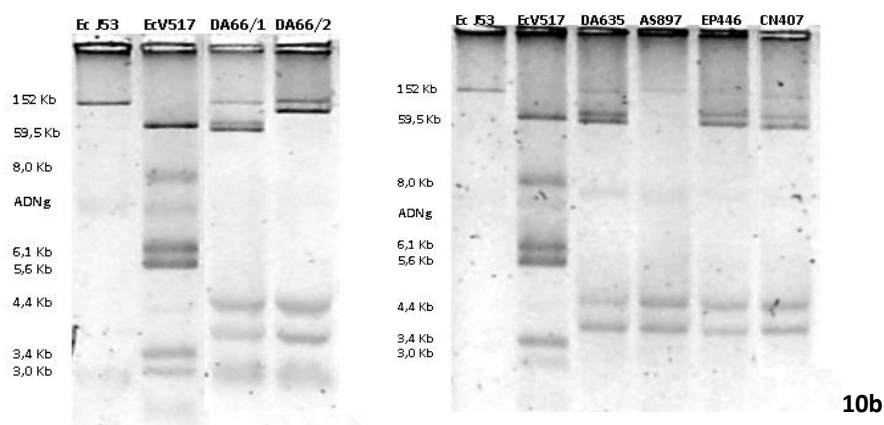
Se realizó la extracción plasmídica de todos los aislamientos y el resultado se muestra en las figuras 10a y 10b. En la foto de la figura 10a se observa perfiles similares en varios aislamientos, perfil que se designa como P en los aislamientos DA293, DA54/1, DA19/1, DA20/1 y perfil que se designa como P1 en los aislamientos DA54/2, DA19/2, DA865 y CN339. Para los aislamientos con perfiles únicos, se repitió la extracción plasmídica y el nuevo resultado se muestra en la figura 10b.

Del análisis de esta segunda determinación se concluyó que los perfiles plasmídicos de los aislamientos DA66/1, DA635 corresponden al perfil P y el de los aislamientos CN407 y EP 446 corresponden a perfil P1. Se confirmaron como perfiles plasmídicos únicos, P3 en el aislamiento DA66/2 y P2 en el aislamiento AS897.

El aislamiento de *Ec*-KPC DA20/2 tiene un perfil plasmídico que contiene un plásmido de PM aproximado a 59,5 Kb al igual que la mayoría de los aislamientos *Kp*-KPC a excepción de AS897 y DA66/2.



10a



10b

Figura 10- Extracción plasmídica de los aislamientos. 10a. Carriles 1 y 2 cepas de contenido plasmídico conocido, *Ec J53* y *Ec V517*. DA20/2 único aislamiento de *Ec*. **10b.** En el primer gel carriles 1 y 2 cepas de contenido plasmídico conocido, *Ec J53* y *Ec V517*. En el segundo gel carriles 1 y 2 cepas de contenido plasmídico conocido, *Ec J53* y *Ec V517*. Banda difusa a la altura de 8Kb se interpreta como ADN cromosomal

En la tabla 8 se resumen lo perfiles plasmídicos de los aislamientos *Kp-KPC*.

Aislamiento	Perfil plasmídico
DA293	P
DA54/1	P
DA54/2	P1
DA19/1	P
DA19/2	P1
DA20/1	P
AS897	P2
DA867	P
DA66/1	P
DA66/2	P3
DA635	P
NC407	P1
EP446	P1
NC339	P1

Tabla 8. Perfiles plasmídicos de *Kp-KPC*. En esta tabla se describe la clasificación de los perfiles plasmídicos obtenidos. Las clasificaciones P y P1 tienen como única diferencia la distancia observada entre las bandas número 2 y 3 comenzando a contar desde el pocillo del gel.

4.2 Localización del gen *bla*_{KPC} en ADN plasmídico.

4.2.1 Determinación del límite de detección del ensayo.

El producto de amplificación del gen *bla*_{KPC} se purificó y se utilizó por un lado para el ensayo de límite de detección del método y por otro como molde para la síntesis de la sonda por amplificación con nucleótidos biotilados.

Para la determinación del límite de detección se fija a la membrana de nylon cantidades conocidas de ADN molde. En la figura 11 se muestra el resultado del Dot Blot, con la sonda preparada, sobre diferentes cantidades del ADN molde (control positivo).

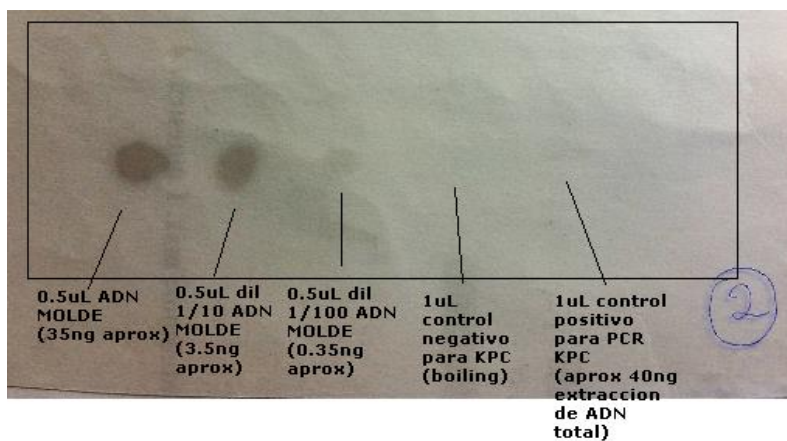


Figura 11. Resultado del Dot Blot para la determinación del límite de detección. Se observa que la mínima cantidad detectable del molde (control positivo), a simple vista, es de 0.35ng

El límite de detección se calculó teniendo en cuenta que el amplicón tiene 882 pb; con lo que se estima su PM en 551250, de modo que el número de Moles del gen *bla*_{KPC} en 0,35 ng de amplicón es de $6,35 \times 10^{-16}$. Esta es la cantidad mínima que se debe fijar en la membrana para poder detectarlo, y por lo tanto es el Límite de detección del sistema.

4.2.2 Adaptación de las condiciones del Dot blot a las muestras

Una vez determinado el límite de detección de la técnica, es necesario asegurar que las muestras contengan una cantidad de ADN superior. Se estimó la cantidad de ADN en las muestras, por comparación de la intensidad de las bandas en una electroforesis de un volumen conocido de ADN plasmídico, con la intensidad de un

marcador de PM, ajustando luego la cantidad ADN a analizar según este resultado. Este ajuste se hizo teniendo en cuenta que en 59,5Kb habría una copia del gen *bla_{KPC}* como mínimo.

Para determinar la cantidad de ADN en las preparaciones plasmídicas, se utilizó la preparación plasmídica de la *Ec* V517 realizada en el mismo procedimiento de extracción, obteniéndose una estimación de 0.37ng en 15 ul para el plásmido de 59.5 Kb. Se sembró entre 70-80 ul de cada una de las muestras de extracción plasmídica en el gel de electroforesis, para asegurar una cantidad residual por encima del límite de detección luego de la transferencia a la membrana de nylon donde se realizó la hibridación.

Previo a la realización del ensayo de Southern blot se realizó una electroforesis partiendo de 7uL de extracción plasmídica de cada muestra con el fin de chequear la extracción antes de la transferencia a la membrana. El resultado se muestra en la figura 12.

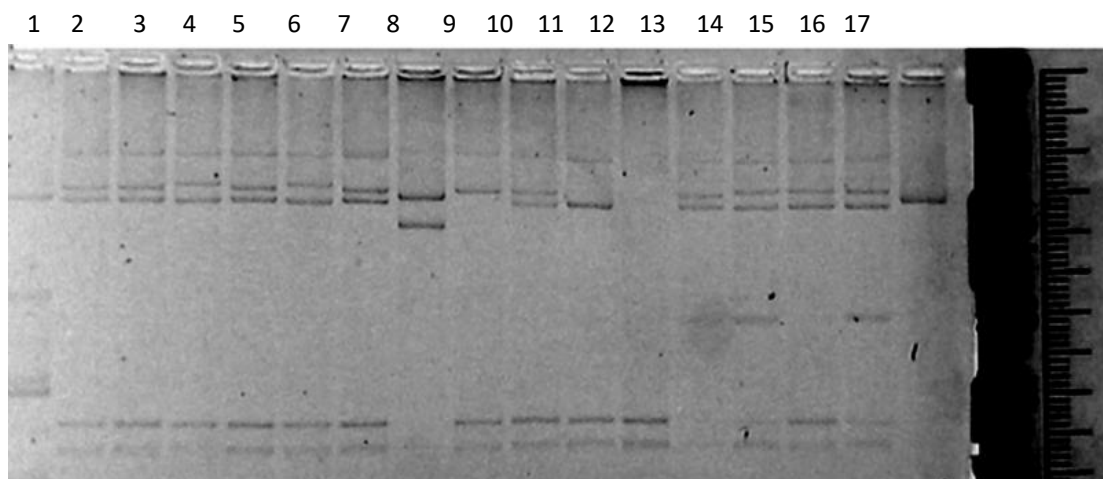


Figura 12. Extracción plasmídica de muestras previo al Southern blot. Siembra y tinción de 7uL de extracción plasmídica, es la misma extracción plasmídica de la figura 9a. Carril 1 cepa de contenido plasmídico conocido *Ec* V517, del carril 2 al 16 los aislamientos DA293, DA54/1, DA54/2, DA19/1, DA19/2, DA20/1, *Ec*DA20/2, AS897, DA867, DA66/1, DA66/2, DA635, NC407, NC339 y EP446. El último carril corresponde a la extracción plasmídica de Tc *Ec*20/2x*Ec*TOP (TcF), es una transconjugante resultante del ensayo de conjugación entre *Ec*20/2 y la *Ec*TOP obtenida por Natalia Echeverría en su tesis de maestría en el año 2014. La regla se utilizó para luego calcular la distancia de las bandas que aparecen en el resultado del Southern blot y relacionarlas con el gel de extracción plasmídica.

El resultado obtenido del Southern blot se muestra en la figura 13.

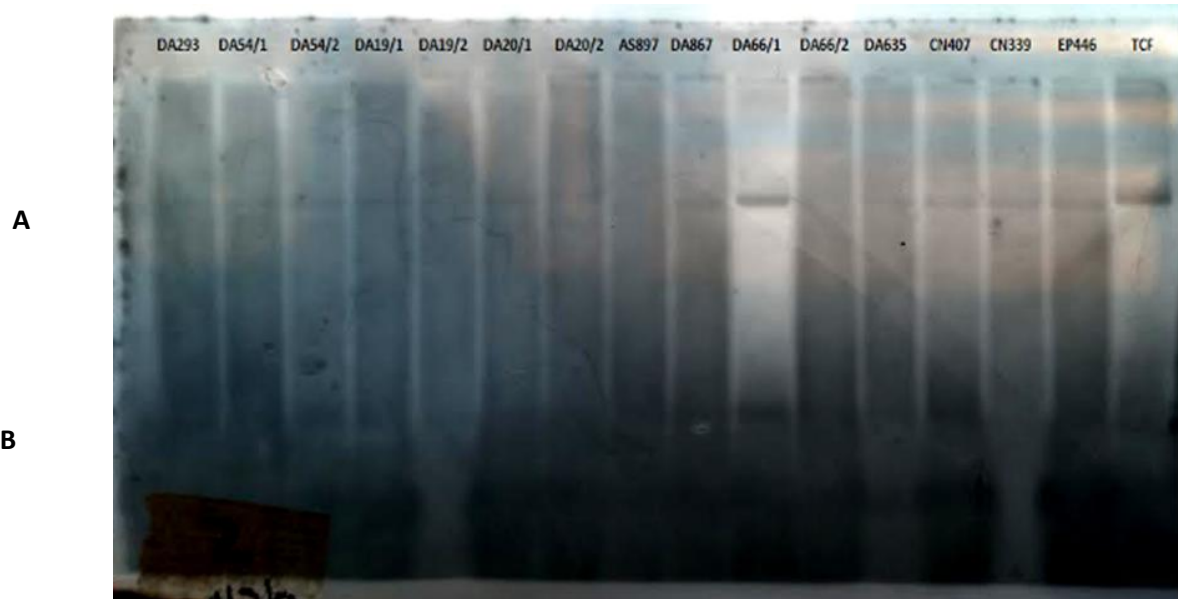


Figura 13. Resultado del Southern blot con la extracción plasmídica de las muestras. Los carriles del 1 al 6 y del 8 al 15 corresponden a aislamientos de *Kp*, los carriles 7 y 16 corresponden a *Ec*. La *Ec* DA20/2 corresponde a un aislamiento del estudio y la *Ec* TcF es una transconjugante resultante del ensayo de conjugación entre *Ec*20/2 y la *Ec*TOP obtenida por Natalia Echeverría en su tesis de maestría en el año 2014 (en esta tesis se la nombra como Tc *Ec*20/2x*Ec*TOP). **Zona A:** se observa hibridación a la distancia en que se encuentran los plásmidos de aproximadamente 59,9kb. **Zona B:** Las bandas positivas que se observan no coinciden con la distancia donde hay plásmidos definidos.

Por comparación de las distancias donde se observa la quimioluminiscencia, se concluyó que hubo hibridación específica en el plásmido de 59,5 Kb en los aislamientos de *Kp* DA293, DA54/1, DA54/2, DA19/1, DA19/2, DA20/1, DA867, DA66/1, DA635, CN407, CN339 y EP446.

En el aislamiento de *Ec* DA20/2 se observó hibridación en dos bandas, uno de ellas del mismo tamaño de 59,5kb del plásmido común y el otro de menor tamaño, lo que hace improbable que se trate de otra conformación del mismo plásmido.

Para el aislamiento DA66/2 no se observó hibridación y tampoco se vieron los plásmidos pesados en gel de control que se muestra en la figura 12. Por lo que, la falta de hibridación pudo deberse a una cantidad de ADN por debajo del límite de detección debida a una mala extracción plasmídica.

El aislamiento AS897, no mostró hibridación a pesar de que la extracción plasmídica contenía los plásmidos pesados, lo que podría deberse a una diferente localización del gen *bla*_{KPC} en este aislamiento respecto a la localización en el resto de los aislamientos.

En la zona B, se observó quimioluminiscencia, a las distancias 4 y 5 cm medidas a partir de origen de siembra, pero a estas distancias no existen bandas de ADN plasmídico dado que los plásmidos de menor peso molecular se encontraban a 4,3 cm y 4,7 cm, por lo que se concluye que son señales inespecíficas. En el caso del aislamiento DA 20/2, no hay plásmidos de bajo peso molecular, lo que apoya a la existencia de hibridación inespecífica en esa zona del gel o a la presencia de ADN degradado.

La Zona A se analiza más en detalle en la figura 14, en ella se marcan las bandas y los tamaños de ADN plasmídico donde se produjo hibridación específica.



Figura 14. Análisis detallado de la zona donde hubo hibridación de la extracción plasmídica y la sonda para *bla_{KPC}* **A)** La flecha indica el lugar donde hubo hibridación con la sonda *bla_{KPC}*. **B)** Electroforesis de los aislamientos en estudio y controles. El recuadro rojo indica a que banda corresponde el lugar de la hibridación en la placa de revelado del Southern blot. En el carril 1 (Ec V517) la banda presente corresponde a un plásmido de PM conocido de 59,5 Kb ya descrito. El último carril corresponde a la extracción plasmídica de la Tc Ec20/2xEcTOP (TcF) (resultado de la conjugación de Eco20/2xEcTOP) cuyo plásmido se utilizó como control positivo para la hibridación del gen *bla_{KPC}* y como marcador de PM (59,5 kb). Desde el segundo carril (DA293) hasta el anteúltimo (EP446) corresponden a la extracción de plásmidos pesados de los aislamientos del brote.

Se pudo detectar la hibridación de la sonda en casi todas las muestras a excepción de las muestras DA66/2 y AS897.

5 TRANSFERENCIA DEL GEN *bla*_{KPC} A OTRAS ENTEROBACTERIAS.

5.1 Ensayos de conjugación.

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos de conjugación.

DADORA	RECEPTORA	FRECUENCIA DE CONJUGACION*
<i>Kp54/1</i>	<i>EcTOP</i>	1×10^{-7}
<i>Kp54/2</i>	<i>EcTOP</i>	5×10^{-7}
<i>Ec20/2</i>	<i>Kp12726</i> (BLEE-)	1×10^{-7}
<i>Ec20/2</i>	<i>Kp1120</i> (BLEE+)	1×10^{-6}
<i>Ec20/2</i>	<i>EcTOP</i>	1×10^{-3} **

Tabla 9. Resultados de los ensayos de conjugación. * Frecuencia de conjugación es el cociente entre el recuento de bacterias receptoras sobre el recuento de bacterias transconjugantes, ** Resultado obtenido de un ensayo de conjugación realizado en una tesis anterior (Echeverría N, 2014).

Todas las frecuencias de conjugación tuvieron un valor similar a excepción de la conjugación de *Ec20/2xEcTOP* que se produce entre bacterias de la misma especie y por lo tanto se espera una mayor frecuencia de conjugación. Las transconjugantes crecieron en medios con meropenem, lo que indica la adquisición de resistencia a carbapenemas.

5.1.1 Amplificación de los genes *bla*_{KPC} y *bla*_{CTX-M} de las transconjugantes.

Para confirmar que todas las transconjugantes adquirieron el gen *bla*_{KPC} se realizó la amplificación por PCR. Todas las transconjugantes amplificaron para dicho gen. Como los genes de la familia *bla*_{CTX-M} también son transferibles, se agregó la amplificación de dicho gen en las transconjugantes para descubrir una posible co-transferencia de los mismos. Ninguna transconjugante amplificó para el gen *bla*_{CTX-M} a excepción de la transconjugante *Ec20/2xKp1120* dado que la receptora (*Kp1120*) ya era portadora del gen *bla*_{CTX-M}.

5.1.2 Expresión fenotípica de resistencia de las transconjugantes

Para evaluar la expresión fenotípica de la resistencia en las transconjugantes se realizó el ensayo de sensibilidad mediante el sistema automatizado Vitek-2. En la tabla se muestra las CIM de los aislamientos dadores, de las cepas receptoras y las respectivas transconjugantes.

Antibiótico	CIM ug.mL ⁻¹ para :									
	DADORAS			RECEPTORAS			TRANSCONJUGANTES			
	<i>Kp</i> 54/1	<i>Kp</i> 54/2	<i>Ec</i> 20/2	<i>Ec</i> TOP	<i>Kp</i> 12726	<i>Kp</i> 1120	<i>Kp</i> 54/1x <i>Ec</i> TOP	<i>Kp</i> 54/2x <i>Ec</i> TOP	<i>Ec</i> 20/2x <i>Kp</i> 12726	<i>Ec</i> 20/2x <i>Kp</i> 1120
AmS	≥ 32	≥ 32	≥ 32	8	4	≥32	≥ 32	≥ 32	≥ 32	≥ 32
PipT	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≤4	≤4	32	64	64	≥ 128	≥ 128
Cfz	S/D	S/D	S/D	≤4	≤4	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
Cxm	S/D	S/D	S/D	32	≤1	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
Ctx	4	≥ 64	≥ 64	≤1	≤1	≥ 64	4	2	4	≥ 64
Caz	8	≥ 64	16	≤1	≤1	≥ 64	4	2	4	≥ 64
Cfp	2	≥ 64	2	≤1	≤1	≥ 64	≤1	≤1	2	≥ 64
Imp	4	4	2	≤0,25	≤0,25	≤0,25	2	2	≥16	≥16
Mem	1	1	1	≤0,25	≤0,25	≤0,25	2	2	≥16	≥16
Ak	4	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
Ge	≥16	≥16	4	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Cip	≥ 4	≥ 4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≥ 4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≥ 4
SXT	≥ 320	≥ 320	S/D	≤20	≤20	≥ 320	≤20	≤20	≤20	≥ 320

Tabla 10. Expresión fenotípica de la resistencia en cepas dadoras, receptoras y transconjugantes. En esta tabla se encuentran los valores de CIM a distintos antibióticos de los aislamientos dadores, de las cepas receptoras y de las transconjugantes. Los ensayos de sensibilidad se realizaron con el sistema automatizado Vitek-2. Los valores resaltados indican cambios en la CIM de la transconjugante respecto de la receptora. El cambio de CIM se considera significativo, cuando es de 2 diluciones o mayor.

Se pudo ver con los resultados obtenidos que las únicas CIM que aumentan en las transconjugantes corresponden a los antibióticos de la familia de los β -lactámicos, siendo el aumento de la CIM a carbapenemas, cefazolina, piperacilina-tazobactam y cefuroxima significativa en todos los casos. El aumento de la CIM a las cefalosporinas de tercera generación también es significativo, para la cefalosporina de cuarta generación los resultados son indeterminados porque no se conocen las CIM. En ningún caso hubo aumento de CIM a los antibióticos amicacina (aminoglucósido), gentamicina (aminoglucósido), ciprofloxacina (fluoroquinolona), y trimetoprim-sulfametoxazole (inhibidor de la dihidrofolato reductasa-sulfonamida) en ninguna transconjugante.

5.1.3. Perfil plasmídico de las transconjugantes, dadoras y receptoras.

Luego de realizados los ensayos de conjugación y la confirmación de la transferencia del gen *bla*_{KPC} por PCR y por expresión fenotípica de la resistencia en las transconjugantes, se realizó la extracción plasmídica con el fin de objetivar en la transconjugante el plásmido portador del gen codificante de la enzima KPC. En la figura 15 se muestra el resultado de la extracción plasmídica de los aislamientos dadores, receptores y transconjugantes.

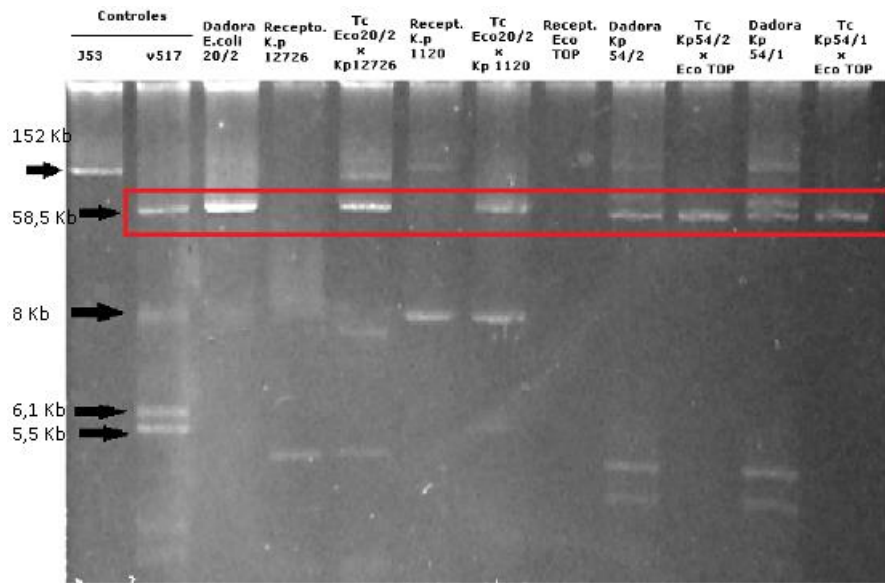


Figura 15. Extracción plasmídica de los aislamientos dadores, receptores y transconjugantes. El recuadro rojo marca la zona del plásmido que porta el gen *bla_{KPC}* en el entorno de los 59,5Kb., zona en la que se observa una banda en las transconjugantes.

Se observa la aparición de una única banda correspondiente a un PM del entorno de los 59,5Kb en todas las transconjugantes. También se demuestra con este resultado que ninguna de los aislamientos receptores era portador de un plásmido de dicho PM.

5.2 Tipificación del plásmido transferido.

La tipificación del plásmido transferido, según el grupo de incompatibilidad, se realizó en las transconjugantes. Se obtuvo un producto de PCR del PM esperado para el grupo de incompatibilidad IncN (PM esperado= 559pb). En la figura 16 se muestra el resultado de la amplificación.

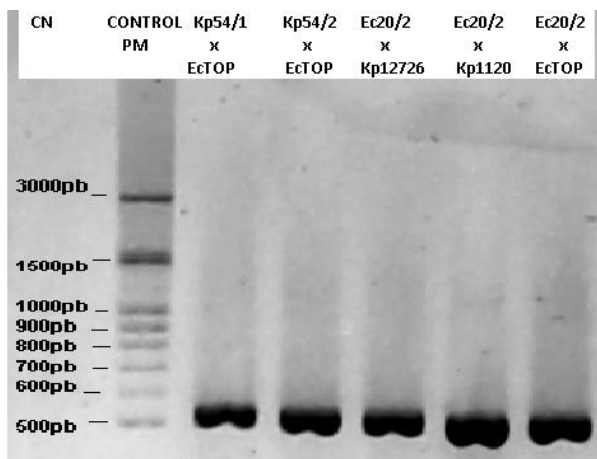


Figura 16. Resultado de la amplificación plasmídica para IncN de las transconjugantes. CN: control negativo. El marcador de PM utilizado fue AccuRuler 100pb Plus DNA RTU Ladder de MaestroGen. Los carriles 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden a las transconjugantes

Dados estos resultados se realizó la amplificación para el grupo de incompatibilidad IncN a todos los aislamientos del brote y en todos los casos se obtuvo una banda del PM esperado. El resultado se muestra en la figura 17.

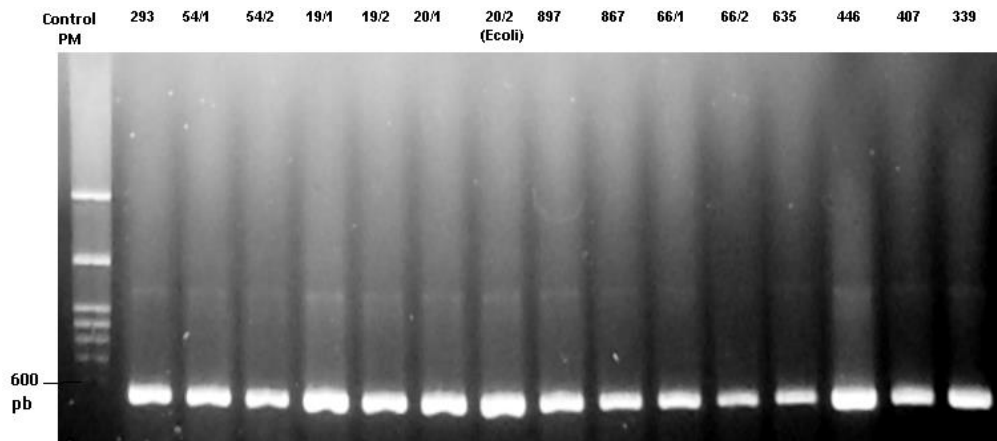


Figura 17. Amplificación para IncN de todos los aislamientos. Se obtuvo el amplicón del PM esperado para todos los aislamientos en estudio. El PM utilizado fue AccuRuler 100pb Plus DNA RTU Ladder de MaestroGen. Desde el carril 2 hasta el carril 16 se encuentran los aislamientos estudiados.

6. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA TOTAL DEL PLÁSMIDO TRANSFERIDO POR CONJUGACION.

Para el análisis mediante secuenciación masiva del plásmido transferido por conjugación, se realizó la extracción plasmídica de una de las transconjugantes. Se selecciona *Ec20/2xEcTOP* por ser la primera obtenida y tener un solo plásmido.

El resultado enviado por BGI Genomics es la secuencia organizada en 14 scaffolds los cuales representan un total de 67.254pb, con el 53.36% de GC. Según los datos crudos en las secuencias hay 74 genes que abarcan 50.055 bases, lo que representa un 74.43% de genoma total. En la tabla 11 se describe el tamaño de cada scaffold, su %GC y 3 AN que corresponden a los de mayor puntuación en el resultado de un alineamiento con secuencias en la base de datos de NCBI y que además son compartidos por la mayor cantidad de scaffolds.

Scaffold	Tamaño en pb	%GC	AN de mayor puntuación
1	11.435	51	CP018887.1 KX276209.1 CP004367.2
2	10.016	62	CP018887.1 KX276209.1 CP004367.2
3	9.079	48	CP018963.1 KX276209.1 CP004367.2
4	7.686	52	CP018963.1 KX276209.1 CP004367.2
5	6.726	51	CP018963.1 KX276209.1 CP004367.2
6	5.516	62	CP035181.1 LR130548.1 CP023430.1
7	4.667	51	CP025818.1 CP24511.1 CP024486.1
8	4.363	52	CP018887.1 KX276209.1 CP004367.2
9	2.578	54	CP018887.1 KX276209.1 CP004367.2
10	1.842	48	CP018887.1 KX276209.1 CP004367.2
11	1.293	57	CP018887.1 KX276209.1 CP004367.2
12	820	52	CP034212.1 CP033516.1 CP022735.1
13	713	56	CP030240.1 CP032667.1 CP031214.1
14	520	54	CP030240.1 CP032867.1 MG387191.2

Tabla 11. Descripción de los Scaffolds obtenidos de la secuenciación del plásmido p*Ec20/2xEcTOP*. En la columna 1 se describe el número de cada scaffold, en la columna 2 el tamaño de cada scaffold medido en pares de bases, en la columna 3 se calculó el %GC para cada uno de los scaffolds y en la columna 4 se escriben los resultados de mejor puntuación obtenidos luego de realizar un Blast contra la base de datos del NCBI.

6.1 Reconstrucción del plásmido p*Ec20/2xEcTOP*.

Para la reconstrucción del plásmido secuenciado se seleccionó una secuencia de referencia contra la cual se ensamblaron los scaffolds obtenidos en la secuenciación,

utilizando el programa SeqMan de Lasergene. La secuencia de referencia se seleccionó entre los tres AN de la tabla 11 que se unen a un mayor número de scaffolds.

En la tabla 12 se muestra el alineamiento de los scaffolds con cada uno de los tres potenciales genomas de referencia y de donde proviene cada genoma considerado.

Luego de que se realizaron los alineamientos se seleccionó como secuencia de referencia la secuencia AN CP004367.2, ya que solo dos de los scaffolds quedan por fuera del alineamiento. Las otras dos secuencias de referencia se descartaron ya que son más los scaffolds que no pudieron ser ubicados a lo largo de su secuencia (CP018887.1 deja por fuera a los scaffolds 7, 13 y 14; KX276209.1 deja por fuera los scaffolds 7, 12, 13 y 14). Los scaffolds 13 y el 14 no se alinearon con ninguna de las tres potenciales secuencias de referencia y tampoco se unieron extremo-extremo con ninguno del resto de los scaffolds. Estas secuencias tienen homología con secuencias pertenecientes a plásmidos pero también con secuencias cromosómicas de *Ec*, por lo tanto cabe la posibilidad de que correspondan a ADN contaminante y no pertenezcan a la secuencia plasmídica. Para corroborar si las secuencias de los scaffolds 13 y 14 eran ADN proveniente del cromosoma de *Ec*TOP, se realizó un alineamiento con el genoma de *Ec*DH10B (AN NC010473.1) (https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes#TOP10_.28Invitrogen.29) que se describe como cepa similar a *Ec*TOP, debido a que el genoma de esta última cepa no está en la base de datos. Luego de realizar el alineamiento de la secuencia de *Ec*DH10B con todos los scaffolds, los únicos que compartieron homología 100% con *Ec*DH10B son el 13 y el 14 (el scaffold 14 comparte 100% de homología desde la posición 1 a 520 de *Ec*DH10B y el scaffold 13 lo hace desde la base 1.798.667-1.799.379).

Los scaffolds 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ensamblaron contra la secuencia de CP004367.2, a los cuales se les unieron los scaffolds 12 y 7 a través del scaffold 3 por unión extremo-extremo y dio como resultado una secuencia de 60.204 pb concordante con el tamaño plasmídico obtenido en la extracción plasmídica (59.500pb) y 52% GC esperado para ADN plasmídico <http://insilico.ehu.es/oligoweb/index2.php?m=all>.

El plásmido con el cual se realizó el empalme de los scaffolds provino de un hemocultivo del año 2008 de un paciente infectado con *Kp-KPC* en San Pablo, Brasil y que pertenece al ST 442 (Pérez-Chaparro et. al., 2014).

AN genoma de referencia	Identidad	Alineamiento con los scaffolds
CP018887.1	Plasmido pInCn proveniente de Kp.	
KX276209.1	Plasmido pKp314/119 proveniente de Kp.	
CP004367.2	Plasmido pKPC_FCF/35P proveniente de Kp. Genoma publicado: "Complete nucleotide sequences of two blaKPC-2-bearing IncN Plasmids isolated from sequence type 442 Klebsiella pneumoniae clinical strains four years apart."	

Tabla 12. Resultado del alineamiento de los scaffolds con tres secuencias de referencia seleccionadas. La imagen del alineamiento se obtuvo con el programa SeqMan, donde muestra una imagen global del alineamiento que realiza. Las secuencias se representan con líneas, la dirección de la flecha indica la orientación que adopta en el alineamiento, la punta de la flecha es el extremo 3' y el origen de la flecha es el extremo 5'. La flecha de tramo continuo representa secuencias asignadas a la cadena superior y la flecha de tramo discontinuo representa secuencias asignadas a la cadena inferior (complementaria) de la secuencia de referencia. En la línea superior de la imagen, los tramos rojos indican tramos donde no hay alineamiento de ambas secuencias (scaffold y referencia). La línea de color verde representa los tramos de la secuencia consenso donde la cadena superior del scaffold y la de la referencia coinciden, la línea celeste representa los tramos de la secuencia consenso donde la cadena inferior del scaffold es la que coincide con la secuencia de referencia.

6.1.1 Brechas en la secuencia ensamblada.

Luego de que los scaffolds fueron ordenados, se observaron brechas en la secuencia, donde o bien el plásmido en estudio tiene la secuencia idéntica a la de referencia y no se obtuvo esa información en los scaffolds o tiene otra secuencia o bien la brecha no existe. Para completar la secuencia se diseñaron oligonucleótidos específicos utilizando como molde los scaffolds contiguos a las brechas, con el programa Primer3. En la figura 18 se muestra un esquema dónde se localizaron las brechas y en la tabla 13 se describen los oligonucleótidos utilizados, las condiciones de amplificación y el PM esperado del producto.

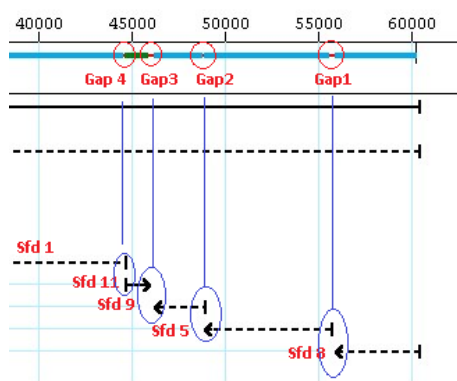


Figura 18. Brechas generados entre la secuencia de referencia y el alineamiento de los scaffolds. En la imagen se señala donde se encuentran las brechas o "Gaps" con un círculo, numeradas del extremo derecho al izquierdo.

GAP	Primers		Tamaño de producto esperado	Condiciones de amplificación					
	Nombre	Secuencia 5'-3'		Ciclos	Pre desnat	Desnat	Hibridacion	Extension	Extension final
GAP 1	Gap1_fw	GGTGCCGTGTGGGAATCG	575 pb	35	94°C	94°C	58°C	72°C	72°C
	Gap1_rv	GATTTCCACTACAGCGGC			5 min	60 seg	30seg	1min	5min
GAP 2	Gap2_fw	TCATTTCCCTTCAGCCTCC	435 pb	30	94°C	94°C	56°C	72°C	72 °C
	Gap2_rv	TTTTCGGGTGGCGGTGTC			5 min	60 seg	60seg	1 min	5min
GAP 3	Gap3_fw	GCCTAATCAAAGTGCTACGC	833 pb	30	94°C	94°C	54°C	72°C	72°C
	Gap3_rv	AACATAAACAGAAGGGGTCG			5 min	60 seg	30 seg	1 min	5min
GAP 4	Gap4_fw	GGGTCGCTCTGCTGTGCTG	623 pb	30	94°C	94°C	56°C	72°C	72°C
	Gap4_rv	TTTTCGGGTGGCGGTGTTG			5 min	60 seg	60 seg	1 min	5 min

Tabla 13. Oligonucleótidos y condiciones de amplificación para cerrar las brechas. Se describe la secuencia de cada primer y las condiciones de PCR empleadas. 1-Pre Desnat: Pre desnaturalización, 2-Des: Desnaturalización

No se obtuvo producto de amplificación para el Gap 1, se obtuvieron amplicones para los Gaps 2, 3 y 4. Los productos de amplificación para los Gaps 2, 3 y 4 tuvieron el PM molecular esperado, por lo tanto se purificaron y se enviaron a secuenciar a Macrogen. En el caso de los Gaps 2 y 3 la secuencia obtenida no se alineó con la secuencia de referencia ni con los scaffolds contiguos a las brechas, por lo tanto la amplificación no fue exitosa para el objetivo planteado. Luego de realizar un alineamiento de la secuencia obtenida para el Gap 2, se determinó que pertenecía a ADN cromosomal de *Ec*, y en el caso de la secuencia amplificada para Gap 3 se determinó que no tiene similitud con ninguna secuencia de la base de datos. Por el contrario el producto obtenido con los oligonucleótidos para amplificar el Gap 4 fue una secuencia que alineó con la de referencia y por lo tanto se pudo cerrar esa brecha.

6.2 Ingreso de la secuencia plasmídica a la base de datos del GeneBank.

Posteriormente al ensamblado de los scaffolds se subió la secuencia a la base de datos del NCBI, donde se le asignó el AN: MH514861.1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MH514861.1?report=GenBank>.

6.3 Anotación de la secuencia plasmídica y búsqueda de genes de interés.

En el análisis en busca de genes de resistencia a antimicrobianos, se encontró como único gen de resistencia el gen *bla_{KPC-2}*, no encontrando genes de resistencia a otras clases de antimicrobianos (glicopéptidos, macrólidos, lincosamida, nitroimidazol, rifampicina, sulfonamidas, tetraciclinas, trimetoprim, aminoglucósidos, colistín, fluoroquinolonas, ni fosfomicina). No se encontraron genes de virulencia.

El grupo de incompatibilidad plasmídico es **IncN**, con un 99.92% de homología con el plásmido de referencia R46, AN: AY046276. El pMLST del plásmido es **ST-15**, 100% de identidad en los alelos *korA_3*, *repN_7* y *TraJ_6*.

El origen de replicación plasmídico se marca en el esquema de la figura 18. Se determinó que el origen de replicación plasmídico conteniendo el sitio de restricción GGTGTATAGC estaba entre las bases 41226 a 41325, y los repetidos invertidos entre las bases: [41302..41307]-[41315..41320], [41303..41308]-[41315..41320], [41304..41309]-[41315..41320], [41245..41251]-[41325..41320].

La secuencia plasmídica luego de incorporada a la base de datos del GeneBank fue anotada por el “NCBI Prokariotic Genome Anotation” y complementada manualmente. Se agregó el origen de replicación, el sitio de la inserción del Tn4401 y la interrupción de genes correspondientes a la inserción de elementos móviles. También se comparó con la secuencia de CP 004367.2 en forma manual y en el Anexo VII se muestra en una tabla el resultado de la comparación. En la figura 19 se representan los principales genes de la anotación realizada por el NCBI mas otros genes de interés.

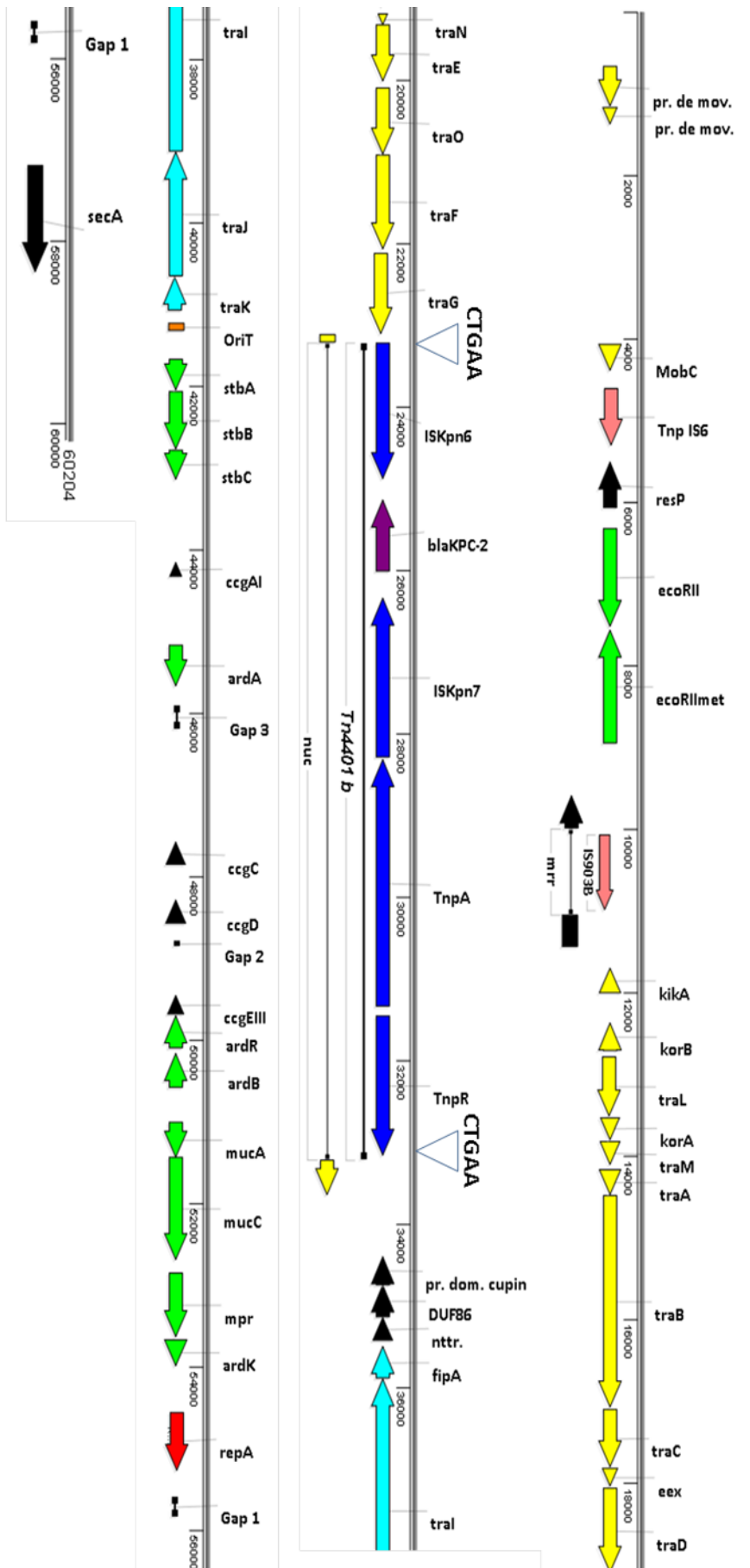


Figura 19. Representación gráfica del plásmido pEC20/2xECTOP y su anotación. Se representó el plásmido en formato lineal. En el gráfico cada gen se indica con flechas cuya longitud es proporcional a la cantidad de bases nucleotídicas y con su respectiva anotación. Los colores de las flechas hacen referencia a la función del gen, de color rojo genes de transferencia conjugativa, en celeste genes de transferencia y replicación, en verde genes involucrados en la estabilidad plasmídica, en amarillo el gen *blaKPC-2* y en azul la estructura del *Trn4401b*, en color rosa se representan los elementos móviles encontrados diferentes al *Trn4401b*, los demás genes y los gaps de la secuencia se representan en color negro. Los triángulos invertidos indican la secuencia nucleotídica de los repetidos directos (RD). Las dos secuencias de repetidos imperfectos se encuentran contiguos a los RD, la IRR está a la derecha del primer RD y la IRD se encuentra antes de del segundo RD, las secuencias son las siguientes:
 ggggggggtraagcggggaacccagagaanaattccggcattcc IRR
 ggaattgcggaatttcggattcccgcttagaacc RL
 Las letras resaltadas en negro indican las bases que se aparecen y las que no están resaltadas indican donde no hay apareamiento, por eso son imperfectos.
 La línea que corre por encima de las flechas indica la posición de los genes en la secuencia, desde la base 1 a la 60,204, pr. de mov.: proteína de movilización, Tnp IS6: transposasa de la familia IS6, pr. dom. Cupin: proteína de dominio cupin, nttr.: nucleotidiltransferasa.

Se encontraron distintas IS distribuidas en la secuencia plasmídica. En la figura 20 se muestran los principales resultados.

Database: ISfinder_Nucl
5,396 sequences; 7,953,996 total letters

Query=
Length=60204

Sequences producing significant alignments	IS Family	Group	Origin	Score (bits)	E. value
ISKpn7	IS21		Klebsiella pneumoniae	3782	0.0
ISKpn6	IS1182		Klebsiella pneumoniae	3053	0.0
ISPsy42	Tn3		Pseudomonas syringae	2504	0.0
ISPa38	Tn3		Pseudomonas aeruginosa	1850	0.0
ISPsy30	Tn3		Pseudomonas syringae	1806	0.0
IS903B	IS5	IS903	Escherichia coli	1715	0.0
IS903	IS5	IS903	Escherichia coli	1675	0.0
IS26	IS6		Proteus vulgaris	1626	0.0
IS102	IS5	IS903	Escherichia coli	1620	0.0
IS15DII	IS6		Salmonella panama	1618	0.0
IS15DIV	IS6		Salmonella typhimurium	1616	0.0
IS15DI	IS6		Salmonella panama	1602	0.0
IS15	IS6		Salmonella panama	1602	0.0
ISPan1	IS5	IS903	Pantoea ananatis	1080	0.0
IS1X2	IS1		Escherichia vulneris	519	2e-145
IS1X1	IS1		Shigella flexneri	519	2e-145
IS1F	IS1		Escherichia coli	504	9e-141

Figura 20. Resultados principales de ISfinder para pEc20/2xEcTOP. Se muestran los principales resultados hallados con el buscador ISfinder, el cual es específico para secuencias de inserción, y busca IS dentro de la base de datos del GenBank. Score y E.value son parámetros estadísticos, el Score o puntuación, indica la extensión en que dos secuencias tienen los mismos residuos en las mismas posiciones, a mayor puntuación mayor calidad del alineamiento y el E.value o valor esperado es el número de secuencias blanco que pueden obtenerse al azar con la misma o mayor puntuación, a menor valor esperado menor es la probabilidad que el alineamiento sea debido al azar.

6.3.1 Tn4401

En el alineamiento realizado previamente se encontró un 100% de homología del transposón del plásmido pEc20/2xEcTOP con el transposón encontrado en la secuencia de referencia (AN: CP0043672.2, misma secuencia la cual fue utilizada para el alineamiento de los scaffolds). El Tn4401b se encuentra de la base 27.541 a la 37.544 (10.004pb) en la secuencia de referencia y en el plásmido pEc20/2xEcTOP desde la base 33.219 a la 23.216.

Un transposón (Tn) al insertarse duplica la secuencia nucleotídica del sitio de inserción, y a estas secuencias duplicadas resultantes de la inserción, se les llama sitio de duplicación diana o repetidos directos (RD). En el Tn4401 los RD están formadas por 5 bases nucleotídicas (Naas et.al., 2008). En el Tn4401 del plásmido en estudio estos RD presentaron secuencias nuevas, no descritas en los trabajos de Cuzón (Cuzon et al., 2011), lo que sugiere un sitio de inserción inespecífico del Tn, como se muestran en la figura 19. Las secuencias de los repetidos imperfectos de 39 pb que delimitan el

Tn4401 inserto en el plásmido pEc20/2xEcTOP son idénticas a las descritas (Naas et al., 2008).

6.4 Comparación de secuencias de plásmidos IncN

Una vez conocida la secuencia completa del plásmido pEc20/2xEcTOP se comparó con otras secuencias de plásmidos IncN, previamente reportadas y provenientes de bacterias de origen ambiental y clínico con el fin de analizar su complejidad.

De la búsqueda de secuencias de plásmidos IncN, se seleccionaron las siguientes secuencias para su comparación con la secuencia pEc20/2xEcTOP:

- las secuencias pRSB203 correspondiente a un plásmido ambiental de bacterias no cultivables de aguas de desecho (Eikmeyer et al., 2012)

- las secuencias de pECN580 y pYD626E, plásmidos de aislamientos clínicos de *Ec* conteniendo el gen *bla*_{KPC-2} (Chen et al., 2014) (Li et al., 2014)

- las secuencia de pFCF_3SP y pBK31551, plásmidos de aislamientos clínicos de *Kp*, el primero contiene el gen *bla*_{KPC-2} y el segundo el gen *bla*_{KPC-4}. (Pérez-Chaparro et al., 2014) (Chen et al., 2013).

En la figura 21 se muestra el análisis comparativo de las secuencias plasmídicas previamente descritas.

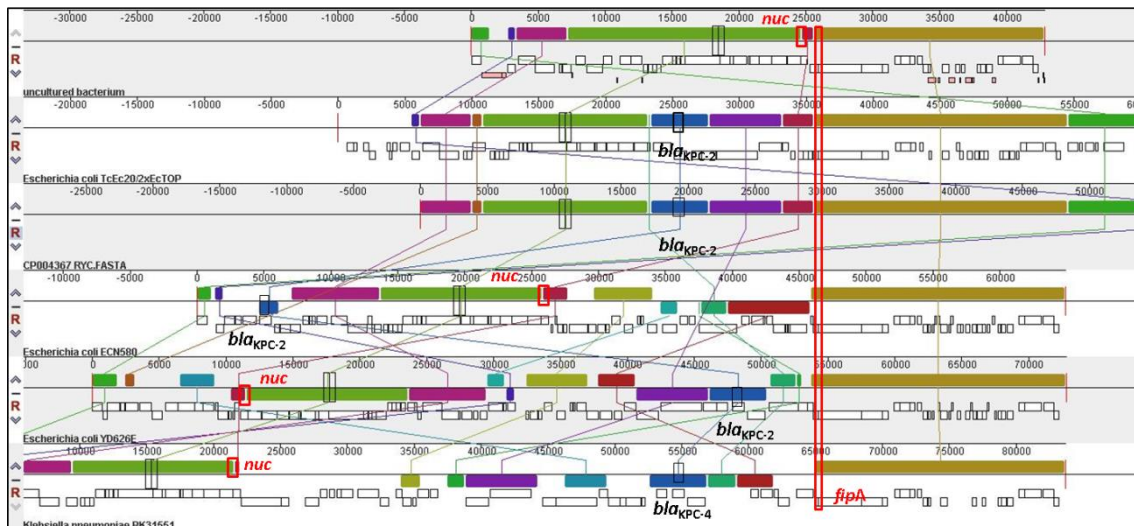


Figura 21. Análisis comparativo de los plásmidos IncN seleccionados con el plásmido pEc20/2xEcTOP.

Desde arriba hacia abajo se observa pRSB203, pEc20/2xEcTOP, pFCF_3SP, pECN580, pYD626E y pBK31551. Las barras de igual color indican regiones de homología. El gen *repA* se encuentra en la región de color verde más oscuro, los genes *traL*, *traM*, *traA*, *traB*, *traC*, *traD*, *traN*, *traO*, *traF*, *traG*, *korA*, *korB*, *eex*, y *kikA* se encuentran en la región verde más clara, el gen *nuc* se encuentra en la región bordó. Los genes *traI*, *traJ*, *traK*, *fipA*, *stbABC*, *mucAB*, *ardAB*, *ccg* y repetidos CUPA, CUPB, A1, A2, CUP2 Y A2 se encuentran en la región color marrón pardo. Los genes *ecoRII*, *dcm* están en la región fucsia. La diferente longitud de las regiones de homología que tienen el mismo color se debe a que en algunas están presentes otros genes adicionales, como por ejemplo regiones denominadas de “proteínas hipotéticas”. En el caso del plásmido ambiental (pRSB203) en la región verde más clara tiene los genes de resistencia a antibióticos *strB*, *strA*, *tetR*, *tetB* y *tetC*. La región repetida del plásmido ambiental (35676-36114) no se encuentra en el pEc20/2xEcTOP, esta región coincide con la región donde se encuentran las brechas. Las regiones sin colorear son zonas donde no hay homología con el resto de las secuencias. Se representa la alineación de los plásmidos con sus respectivos colores marcando la homología. Los plásmidos están alineados respecto al gen *fipA* ubicado al comienzo de la línea color marrón/pardo. Con recuadros negros se marca la ubicación de los genes *bla*_{KPC}. Los recuadros rojos marcan el lugar de los genes *fipA* y *nuc* en cada secuencia.

Todos los plásmidos analizados poseen un conjunto de genes comunes, siguiendo un orden idéntico, que codifican para la replicación, transferencia conjugativa, estabilidad y control del plásmido, compartiendo por lo tanto un mismo esqueleto. Las diferencias principalmente resultaron en la presencia o ausencia de genes accesorios como son los genes de resistencia a otros antibióticos y los elementos genéticos móviles.

Está descrito que preferencialmente los genes accesorios se insertan en la región comprendida entre los genes *nuc* y *fipA* (Eikmeyer et al., 2012). El plásmido ambiental pRSB203 presenta la organización genética más simple dado que *nuc* y *fipA* están contiguos y por lo tanto no hay genes exógenos insertados. Sin embargo, los plásmidos pEc20/xEcTOP, pFCF_3SP pECN580, pYD626E y pBK31551, de origen clínico, presentan

una región accesoria de genes entre *nuc* y *fipA* con diferente número de genes insertados y diferentes genes. El plásmido de estructura más compleja (pECN580) contiene 7 genes de resistencia, 5 en la región entre *nuc* y *fipA* y los otros dos por fuera de la misma, mientras que plásmido en estudio pEc20/2xEcTOP y pFCF_3SP contienen un único gen de resistencia (*bla*_{KPC-2}) presentando la organización genética más simple dentro de los plásmidos clínicos que contienen *bla*_{KPC}.

Se observaron tres localizaciones diferentes del Tn4401 codificante del *bla*_{KPC-2}: i) entre los genes *nuc* y *fipA* (pYD626E), ii) dentro del gen *nuc* (pEc20/2xEcTOP y pFCF_3SP) (figura 18) y iii) fuera de la región entre *nuc* y *fipA* (pECN580).

En los plásmidos pEc20/2xEcTOP y pFCF_3SP el Tn4401b (*bla*_{KPC-2}) no se insertó entre los genes esperados, sino que lo hizo dentro del gen *nuc* (ver figura 19 para pEc20/2xEcTOP).

7. PRODUCCIÓN DE BIOFILM DE LOS AISLAMIENTOS.

7.1 Producción de biofilm de los aislamientos del brote en estudio.

En la tabla 14 se muestran los valores de DO a 590nm, obtenidos en las cinco réplicas de dos ensayos independientes de producción de biofilm, de aislamientos de *Kp* y *Ec*.

E.B.I.	CN	CP Eco 25922	DA293	DA 54/1	DA 54/2	DA 19/1	DA 19/2	DA 20/1	DA 20/2	AS 897	DA 867	DA 66/1	DA 66/2	DA 635	CN 407	CN 339	EP 446
Exp 1	0,087	0,278	0,136	0,166	0,141	0,238	0,177	0,168	0,221	0,198	0,169	0,347	0,153	0,339	0,225	0,154	0,167
	0,081	0,298	0,139	0,176	0,142	0,245	0,181	0,166	0,237	0,213	0,176	0,321	0,155	0,314	0,229	0,162	0,164
	0,077	0,313	0,138	0,180	0,142	0,220	0,174	0,158	0,258	0,208	0,171	0,312	0,155	0,297	0,198	0,152	0,168
	0,076	0,302	0,133	0,167	0,149	0,233	0,196	0,172	0,260	0,207	0,159	0,322	0,160	0,279	0,193	0,150	0,174
	0,079	0,277	0,139	0,181	0,157	0,237	0,190	0,166	0,279	0,218	0,153	0,326	0,161	0,313	0,203	0,156	0,180
Exp 2	0,076	0,300	0,132	0,177	0,148	0,271	0,187	0,174	0,230	0,211	0,169	0,320	0,146	0,400	0,211	0,196	0,185
	0,073	0,322	0,128	0,179	0,148	0,251	0,184	0,163	0,209	0,207	0,170	0,334	0,151	0,363	0,223	0,157	0,185
	0,072	0,325	0,135	0,183	0,147	0,273	0,198	0,176	0,238	0,213	0,155	0,346	0,162	0,343	0,220	0,158	0,186
	0,072	0,300	0,135	0,186	0,149	0,304	0,189	0,165	0,239	0,217	0,156	0,330	0,159	0,385	0,186	0,160	0,191
	0,075	0,324	0,132	0,188	0,166	0,295	0,192	0,172	0,244	0,209	0,156	0,304	0,158	0,413	0,232	0,154	0,190

Tabla 14. Valores de Densidad Óptica de ensayos de biofilm para aislamientos de *Kp* y *Ec*. E.B.I: Experimento Biológico Independiente. Exp 1: Experimento 1. Exp 2: Experimento 2. CN: Control negativo. CP: Control positivo.

Los datos presentados en la tabla se ordenaron con el programa Excel y se analizaron estadísticamente con el programa PAST. En todos los casos los conjuntos de datos para cada experimento/aislamiento presentaron un coeficiente de variación (CV) menor al 30%, por lo que se consideró que todos correspondían a la misma población y no se descartó ninguno. La homogeneidad de varianza se determinó con el test de Levene's. El análisis estadístico se realizó con el test ANOVA y se determinó que en ambos experimentos la varianza fue homogénea por lo tanto se aplica el test de Tukey para determinar si hay diferencia significativa entre los aislamientos respecto al control negativo. Para el Test de Tukey un valor $p > 0,05$ representa una aceptación de hipótesis nula (no hay diferencia) y un valor $< 0,05$ representa su rechazo. En todos los aislamiento se obtuvo una $p < 0,05$.

En la figura 22 se representó gráficamente ambos experimentos biológicos con su desvío estándar.

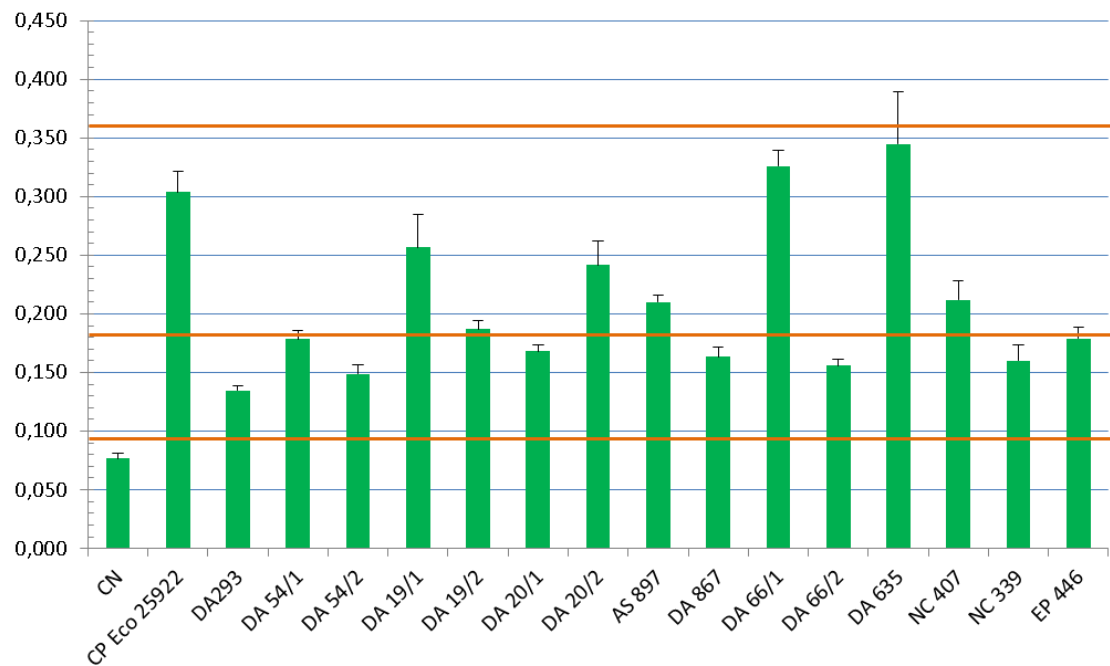


Figura 22. DO obtenida en el ensayo de formación de biofilm para los aislamientos de *Kp* y *Ec* y su clasificación. Se muestran los promedios de DO a 590nm de 5 réplicas de 2 experimentos biológicos independientes. Las barras de error representan el desvío estándar. El DOc es 0.091 y los rangos de DO en cada categoría son ≤ 0.091 no productor de biofilm, $0.091 < DO \leq 0.182$, $0.182 < DO \leq 0.364$, $DO > 0.364$.

En ambos ensayos biológicos independientes se determinó que todos los aislamientos presentan diferencia significativa con el control negativo para la formación de biofilms, por lo tanto en las condiciones experimentales todos los aislamientos son productores de biofilm distribuidos en las categorías de débiles productores de biofilm y moderados productores de biofilm, no se obtuvieron resultados de aislamientos categorizados como fuertes productores de biofilm.

7.1.1. Análisis de la producción de biofilm para los aislamientos de *Kp* de morfología M y NM.

Para analizar si existe diferencia significativa en cuanto a la producción de biofilm de los aislamientos obtenidos simultáneamente del mismo sitio en el paciente DA se comparó la producción de biofilm de las dos variantes morfológicas. En la figura 23 se muestra el resultado de dicha comparación.

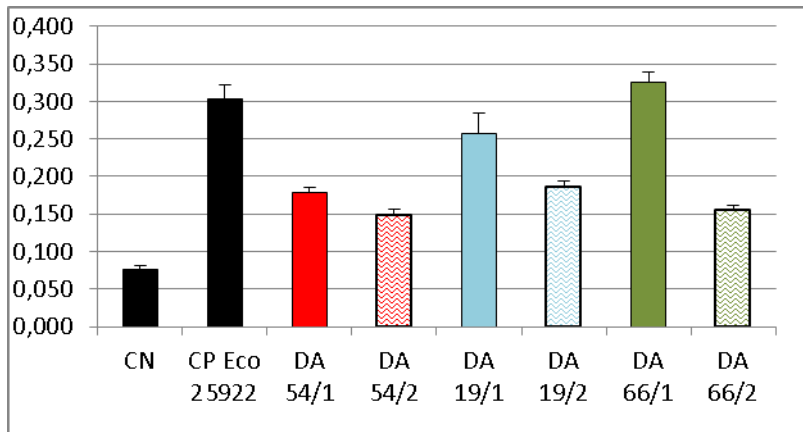


Figura 23. Resultado de la comparación de producción de biofilm de aislamientos de morfología M y NM de la misma muestra (exudado de herida del paciente DA). Los colores indican la muestra, y para cada muestra se grafica el valor promedio de la DO a 590nm de 2 experimentos biológicos diferentes con 5 repeticiones (ver tabla 15), para todos los pares M y NM la $p < 0.05$ en ambos experimentos biológicos independientes. Los aislamientos de morfología NM se representan con una trama ondeadada, los aislamientos de morfología M se representan con colores lisos.

En todas las instancias (3 muestras), los aislamientos obtenidos de la misma muestra presentaron diferencias significativas en la producción de biofilm ($p < 0,05$ en ambos experimentos biológicos independientes de los pares M y NM) para las condiciones ensayadas, siendo mayor la producción de biofilm de los aislamientos de morfología M respecto a la producción en los aislamientos de morfología NM.

7.2 Determinación de producción de biofilm de los aislamientos receptores y su respectivas transconjugantes.

Para la determinación de producción de biofilm de los pares receptora-transconjugante se aplicó el protocolo previamente descrito y se realizaron 2 experimentos biológicos independientes con 5 réplicas de cada uno. En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos en ambos experimentos.

E.B.I	CN	Ec ATCC 25922	Ec TOP	Ec 20/2x Ec TOP	Kp 54/1 x Ec TOP	Kp 54/2 x EcTOP	Kp 12726	Ec 20/2 x Kp 12726	Kp 1120	Ec 20/2 x Kp1120
Exp 1	0,073	0,174	0,126	0,139	0,156	0,127	0,308	0,325	0,294	0,321
	0,067	0,183	0,111	0,136	0,133	0,117	0,266	0,292	0,267	0,300
	0,066	0,192	0,103	0,126	0,116	0,108	0,260	0,295	0,258	0,305
	0,066	0,177	0,102	0,128	0,116	0,123	0,396	0,326	0,258	0,301
	0,072	0,151	0,110	0,126	0,119	0,125	0,334	0,347	0,272	0,307
Exp 2	0,066	0,223	0,122	0,116	0,125	0,124	0,291	0,278	0,256	0,270
	0,064	0,206	0,105	0,118	0,119	0,105	0,277	0,290	0,236	0,243
	0,065	0,220	0,099	0,102	0,106	0,106	0,272	0,285	0,232	0,248
	0,068	0,211	0,103	0,102	0,111	0,117	0,276	0,277	0,223	0,233
	0,066	0,219	0,105	0,105	0,115	0,120	0,286	0,279	0,227	0,243

Tabla 15. Resultados obtenidos de los ensayos de producción de biofilm para los pares receptora-transconjugante. E.B.I: Experimento Biológico Independiente. Exp1: Experimento 1. Exp2: Experimento 2. CN: Control negativo. CP: Control positivo. Los valores son la DO (densidad óptica) obtenida a 590nm.

Para el análisis estadístico de los datos se procede del mismo modo que para el punto 7.1 En la figura 24 la representación gráfica de ambos experimentos biológicos independientes.

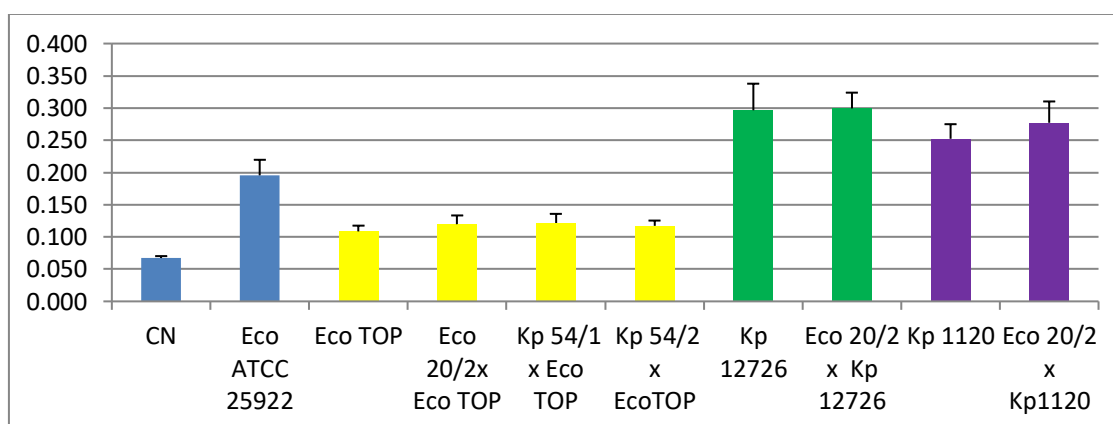


Figura 24. Resultado de ensayo de formación de biofilm para los pares receptoras-transconjugantes. Se muestran los promedios de 5 réplicas de 2 experimentos biológicos independientes en los cuales se mide la DO a 590nm. Las barras representan el desvío estándar.

En ambos ensayos biológicos independientes se obtuvo un valor $p > 0,05$ lo que representa una aceptación de la hipótesis nula (no hay diferencia significativa) por lo tanto no se encontró diferencia en la producción de biofilm entre la cepa receptora y su respectiva transconjugante, por lo tanto en las condiciones experimentales no se encontró diferencia en la producción de biofilm por la presencia del plásmido conjugativo que contiene el gen *bla*_{KPC-2}.

8. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LOS AISLAMIENTOS *Kp*-KPC

Con el conjunto de los datos obtenidos se pueden encontrar relaciones entre los distintos biotipos, antibiotipos, los genes *bla*_{KPC} y *bla*_{CTX-M}, pulsotipos, la morfología de colonia observada y la capacidad de formación de biofilm. El pulsotipo A se encuentra en siete aislamientos que tienen diferentes antibiotipos a cefalosporinas (1, 2, 3 y 4) y a carbapenemas (1 y 2), y estos aislamientos solo provienen del paciente DA. El pulsotipo A1 se encuentra en cinco aislamientos, dos de DA clasificados como NMbC1 *bla*_{CTX-M-15} (NMb: colonia NM formadora de menor cantidad de biofilm respecto a la colonia de morfología M obtenida en la misma muestra; C1 perfil cefalosporinas 1) con antibiotipo a carbapenemas 1 y 2, y en los aislamientos de los pacientes NC y EP (NC407, NC339 y EP446). El pulsotipo A3 corresponde a un solo aislamiento NMbC1 *bla*_{CTX-M-15} y con un antibiotipo único (3) a carbapenemas y perfil plasmídico único del paciente DA (*Kp*DA66/2). El pulsotipo A2 también corresponde a un solo aislamiento de un paciente diferente a DA (AS897) obtenido de portación anal con un perfil plasmídico único y en el cual no fue posible ubicar el gen *bla*_{KPC}.

El resultado se resume en la tabla 16.

Identidad	Fecha	Sitio	Morfología	Hidrólisis Urea	Antibiótipo carbapenemes	Antibiótipo cefalosporinas	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{CTX-M}	Pulsotipo <i>Xba</i> I	Perfil plasmídico	Hibridación <i>bla</i> _{KPC} (Southern blot)	Producción de biofilm
DA293	12/09/2011	HO		-	1	2	+	-	A	P	+ (~60Kb)	+
DA54/1	14/09/2011	HO	M	+	1	2	+	-	A	P	+ (~60Kb)	+
DA54/2	14/09/2011	HO	NM1	+	1	1	+	+	A1	P1	+ (~60Kb)	+
DA20/1	19/09/2011	A		-	2	3	+	-	A	P	+ (~60Kb)	+
DA19/1	19/09/2011	HO	M	+	1	4	+	-	A	P	+ (~60Kb)	++
DA19/2	19/09/2011	HO	NM1	+	1	1	+	+	A1	P1	+ (~60Kb)	++
AS897	21/09/2011	A		+	2	3	+	-	A2	P2	N	++
DA867	23/09/2011	A		+	2	1	+	-	A	P	+ (~60Kb)	+
DA66/1	23/09/2011	HO	M	+	1	2	+	-	A	P	+ (~60Kb)	++
DA66/2	23/09/2011	HO	NM1	+	3	1	+	+	A3	P3	N	+
DA635	28/09/2011	HO		+	1	2	+	-	A	P	+ (~60Kb)	++
NC407	13/10/2011	U		+	1	1	+	+	A1	P1	+ (~60Kb)	++
EP446	25/10/2011	A		+	1	1	+	+	A1	P1	+ (~60Kb)	+
NC339	25/10/2011	U		+	2	1	+	+	A1	P1	+ (~60Kb)	+

Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos para los aislamientos de Kp. Los colores de las filas corresponden a las donas circulantes, los aislamientos pertenecientes a la misma dona se representan con el mismo color. El orden en el que se encuentran los aislamientos es por fecha en que se aislaron. El signo +: positivo, el signo -: negativo. HO: herida operatoria, A: anal, U: orina. Antibiótipo carbapenemas: 1 (CIM Imp=4, CIM Mem=1), 2 (CIM Imp=8-216, CIM Mem=216), 3 (CIM Imp=1, CIM Mem=1). Antibiótipo cefalosporinas: 1 (CIM Cx= ≥64, CIM Caz=≥64, CIM Cfp=≥64), 2 (CIM Cx=4, CIM Caz=4-8, CIM Cfp=2), 3 (CIM Cx=8, CIM Caz=≥64, CIM Cfp=8-16), 4 (CIM Cx=4, CIM Caz=≥64, CIM Cfp=2). Producción de biofilm: += débil productor de biofilm, +++ moderado productor de biofilm.

DISCUSION

Todos los aislamientos involucrados en este estudio, se obtuvieron de una investigación epidemiológica desencadenada a partir de un aislamiento de *Kp* productor de carbapenemasa, perfil de resistencia a antimicrobianos inusual en ese centro hospitalario. En el curso de la investigación epidemiológica se obtuvieron aislamientos de *Kp*-KPC de portación intestinal, de infección de herida quirúrgica e infección del tracto urinario, en cuatro pacientes relacionados al caso índice, dentro de un período de 1 a 3 meses, constituyendo un brote bien definido (Singh et. al., 2006).

BIOTIPO Y ANTIBIOTIPO

En el análisis del biotipo de los aislamientos se observan dos biotipos reducidos (BR). El BR predominante coincide con el más frecuente encontrado por Galar (Galar et. al., 2013). El BR menos frecuente, presente en dos aislamientos, tiene como única diferencia el resultado negativo para la hidrólisis de la urea (U). Este hallazgo es poco común en la especie ya que la hidrólisis de la urea es una prueba con una alta frecuencia de positividad (94,7%) para *Kp* (Galar et. al., 2013). En un trabajo realizado en el año 2017 por la entonces estudiante de grado de la carrera de Bioquímica Clínica Florencia Sardi, se estudiaron los biotipos de 38 aislamientos de *Kp* obtenidos en el periodo de 2015-2016 en el mismo centro asistencial donde ocurrió el brote de *Kp*-KPC estudiado en esta tesis, y como parte de su estudio determinó la reproducibilidad de varias pruebas bioquímicas con el sistema Vitek-2, obteniendo una reproducibilidad del 100% para la hidrólisis de urea negativa en cepas de *Kp* (*kpUN*). Por lo cual se descarta la variabilidad debida al método empleado y la intrínseca de la especie, debiendo corresponder entonces a un cambio genético que afecta la codificación o la expresión de dicho carácter.

Si bien la mayoría de los aislamientos tienen el mismo BR determinado a partir de las reacciones bioquímicas utilizadas en su identificación, presentaron dos morfologías de colonia y cada morfología de colonia se asoció a una diferente producción de biofilm, lo que permitió distinguir dos biotipos: colonia M formadora de mayor cantidad de biofilm (MB) y colonia NM formadora de menor cantidad de biofilm (NMb).

En la mayoría de estudios de aislamientos intrahospitalarios sin relación genética ni epidemiológica, se observa el mismo patrón de resistencia a los antimicrobianos, por lo cual el antibiograma no tiene gran utilidad en la diferenciación de cepas (Singh et. al. 2006). En este caso, se observa la situación inversa, en la que aislamientos epidemiológicamente relacionados tienen diferentes antibiogramas, razón por lo cual se incluyó el antibiograma como parte de su caracterización. Los aislamientos presentan diferencias en los antibiogramas, correspondiendo a cuatro antibiogramas 1, 2, 3 y 4 para las cefalosporinas de espectro extendido y tres antibiogramas 1, 2 y 3 para los carbapenemas. Los aislamientos NMB tienen el antibiograma a cefalosporinas 1 (NMB1), al igual que los aislamientos provenientes de tres de los cuatro pacientes involucrados en el brote. Por otro lado, aislamientos con todas las variantes de antibiogramas a cefalosporinas y a carbapenems se recuperaron del paciente DA, lo que sugiere que este paciente podría ser el reservorio de dichos aislamientos.

Se destaca la dificultad de detección, que implica la existencia de aislamientos con CIM bajas a los carbapenemas, que pertenecen a la categoría de sensibles, de no tener en cuenta que las CIM a pesar de ser bajas son más elevadas que lo habitual en la especie.

GENES *bla*_{CTX-M} y *bla*_{KPC}

Todos los aislamientos amplificaron con los oligonucleótidos específicos para el gen *bla*_{KPC}, lo que se confirmó mediante secuenciación de algunos productos de PCR seleccionados.

Por otro lado no se obtuvo amplificación de los genes *bla*_{CTX-M} en todos los aislamientos. Se obtuvieron resultados positivos para los aislamientos *Kp*DA54/2, *Kp*DA19/2, *Kp*DA 66/2 y *Ec*DA20/2. Se identificó la variante *bla*_{CTX-M-15} mediante secuenciación, en los aislamientos *Kp*DA54/2, *Kp*DA19/2, *Kp*DA 66/2, los cuales tienen fenotipo NMB1 (NMB1 *bla*_{CTX-M-15}). La *Ec*DA20/2 tiene una variante del gen *bla*_{CTX-M} distinta a la variante 15 lo cual la aleja de la posibilidad de que el origen del gen *bla*_{CTX-M-15} en los aislamientos de *Kp* sea la *Ec* o viceversa. Los antibiogramas de cefalosporinas 2, 3 y 4 no amplificaron para *bla*_{CTX-M} lo cual agrega a las diferencias encontradas entre aislamientos de *Kp*.

ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSANTE

Idealmente los polimorfismos de longitud de los fragmentos de macrorestricción de los aislamientos de un brote, se espera que sean indistinguibles. En consideración de que pueden ocurrir eventos genéticos al azar, que pueden alterar el perfil de macrorestricción en la cepa epidémica en el curso de un brote (alteración de sitio de restricción, inserciones o deleciones de ADN asociados a plásmidos, bacteriófagos o elementos transponibles), se requiere de un criterio interpretativo que permita distinguir las verdaderas diferencias debidas a eventos genéticos al azar de aquellas que correspondan a diferencias entre cepas endémicas. En esta tesis se utilizó el criterio interpretativo de Tenover (Tenover et. al., 1995), el cual considera que durante un brote bien definido puede ocurrir un evento genético que altere el patrón de macrorestricción en dos a tres bandas, en cualquier momento.

De acuerdo a los perfiles de bandas obtenidos por PFGE con la enzima de restricción *XbaI* se observan perfiles de bandas distintos entre algunos de los aislamientos. Según el criterio de Tenover (Tenover et. al., 1995) los aislamientos estarían estrechamente relacionados y las diferencias observadas serían debidas a un evento genético. Algo interesante a destacar es que en el dendograma obtenido del gel de la figura 6 los dos aislamientos de *Kp*-KPC no pertenecientes al brote en estudio quedaron separados y diferenciados de los primeros. Esto apoya la idea de que los aislamientos del brote pertenecen a una misma clona ya que si fueran clones distintas la distancia genética sería mayor, como en el caso de *Kp666* y de *KpDLSP*.

De acuerdo a los perfiles obtenidos de PFGE con la enzima *SpeI* no se logra una resolución óptima de las bandas de menor peso molecular, por lo cual si existiesen diferencias a este nivel no se pueden apreciar en este gel. En cambio si se toman en cuenta los perfiles obtenidos en las bandas superiores se puede observar que no hay diferencias entre los perfiles.

Si analizamos los aislamientos del paciente DA, encontramos diferentes biotipos (morfología de colonia e hidrólisis de urea), antibiotipos, presencia y ausencia de *bla*_{CTX-M15}, y a tres pulsotipos distinguibles uno de otro. Estas diferencias están presentes en aislamientos que se obtienen en el cultivo de una misma muestra, de manera simultánea y que se repiten en diferentes muestras del exudado de herida. Esta

situación escapa a las condiciones que establece Tenover para la comparación de pulsotipos, a saber en aislamientos de un brote en el transcurso del tiempo o que implica numerosos pacientes, y numerosas generaciones bacterianas, condición en la que justifica que exista la probabilidad de que se produzca un evento genético que explique la diferencia de 2 o 3 bandas en el pulsotipo de una misma clona. En la situación de los aislamientos del exudado de herida del paciente DA, los aislamientos son simultáneos y en tal circunstancia debemos decir que no son idénticos y que la infección es policlonal.

En el análisis de la diseminación de *kp*-KPC, comparando aislamientos de diferentes pacientes, podemos decir que hubo una diseminación clonal del aislamiento *kp*-KPC, portador de *bla*_{CTX-M15}, pulsotipo A1 y perteneciente al ST 437 (resultado obtenido por la Dra. Carolina Márquez en Fiocruz donde determinó que los aislamientos DA293, DA54/2 y DA19/2 pertenecen al ST437).

ANÁLISIS DEL CONTENIDO PLASMÍDICO Y UBICACIÓN DEL GEN *bla*_{KPC}.

En los perfiles plasmídicos obtenidos se observa que son todos similares a excepción de los aislamientos DA 66/2, pulsotipo A3 único, en el que no se observa las bandas a la altura de 59,5 Kb y AS 897, pulsotipo A2 único, que no muestra una de las bandas a la altura de 59,5Kb como todos los demás. Al igual que para los perfiles obtenidos en el PFGE los patrones plasmídicos obtenidos se clasifican en distintos perfiles tal como se muestra en la tabla de los resultados correspondientes (tabla 8). Los perfiles plasmídicos de los aislamientos se diferencian entre sí en la distancia entre las 2 bandas que se encuentran a la altura de 59,5Kb, por tal motivo se les llama perfiles P y P1. Los perfiles obtenidos guardan la misma relación que los perfiles de PFGE y se puede observar que el perfil plasmídico P solo se encuentra en el paciente DA, el perfil plasmídico P1 se encuentra en 3 de los 4 pacientes y en el total de los aislamientos clasificados como antibiotipo a cefalosporinas 1 y portadores del gen *bla*_{CTX-M-15}. Los perfiles plasmídico P3 y P2 son únicos y pertenece al aislamiento DA 66/2 el primero y al aislamiento AS 897 el segundo, ambos tienen un pulsotipo único.

En el caso de la hibridación de la *Ec* presenta señal en la banda de aproximadamente 59,5Kb y otra adicional de menor peso molecular, esto podría

indicar que el gen *bla*_{KPC} estaría en dos plásmidos diferentes o tratarse de dos conformaciones del mismo plásmido. Sin embargo, las conformaciones plasmídicas diferentes a la superenrollada corren a menor velocidad, debiendo ubicarse más cerca del punto de siembra. Además, las diferentes conformaciones de un mismo plásmido en general tienen distinta intensidad de bandas cosa que aquí no sucede ya que ambas tienen intensidad equivalente. Para descartar definitivamente una doble conformación podría utilizarse el método basado en exposición a luz UV y electroforesis en dirección vertical a la inicial, para distinguir entre las formas plasmídicas circular superenrollada, circular abierta y lineal (Hintermann et. al., 1981).

La extracción plasmídica del aislamiento DA66/2, reveló la presencia de dos plásmidos mayores al plásmido común de 59.5Kb estando este último ausente (figura 10b en la sección Resultados). Dado que la amplificación para IncN y el gen *bla*_{KPC} dieron positivas, estos resultados indicarían una localización distinta del gen *bla*_{KPC}. No fue posible determinar dicha localización debido a la baja calidad de extracción plasmídica utilizada en el ensayo de Southern blot lo que resultó en una señal negativa para la hibridación del gen *bla*_{KPC}.

El aislamiento AS897 presenta el plásmido común de 59.5Kb, amplificación positiva para IncN y *bla*_{KPC}, sin embargo no se observa señal de hibridación positiva para *bla*_{KPC} en ninguno de los plásmidos presentes en la extracción. En este caso la calidad de extracción plasmídica fue buena y comparable con el resto de los aislamientos que mostraron señal positiva de hibridación, por lo tanto se podría inferir que el gen *bla*_{KPC} estaría localizado en plásmidos que no fueron recuperados con la técnica de extracción utilizada.

Cabe recordar que con respecto a los aislamientos pertenecientes a la clona que se disemina con pulstipo A1 y perfil plasmídico P1, los aislamientos AS897 y DA66/2 presentan diferencias a saber, perfiles plasmídicos únicos P2 y P3 y pulstipos únicos A2 y A3 respectivamente. Estos hallazgos sobre diferentes localizaciones potenciales del gen *bla*_{KPC} son una diferencia más que refuerza la heterogeneidad entre los aislamientos de un brote recuperados en un corto periodo de tiempo.

La recuperación en cultivo, a partir de la microbiota intestinal, de dos especies de enterobacterias ambas portadoras del mismo gen de resistencia a carbapenemas y distinta variante genética del gen *bla*_{CTX-M}, hace pensar en una diseminación de la

resistencia por THG o diseminación clonal mas THG. Ya se ha reportado que en cortos periodos de tiempo se puede dar una diseminación rápida del gen de resistencia *bla_{KPC}* contenido dentro del Tn4401, a frecuencias mayores que la conjugación plasmídica y hacia múltiples especies, entre cepas e incluso entre plásmidos de una misma cepa (Sheppard et. al., 2016). En el caso de la *Ec* DA20/2 puede ser que la bacteria haya adquirido ambos plásmidos en eventos genéticos separados y por lo tanto los genes *bla_{KPC}* tengan distinto origen, o que el Tn4401 conteniendo el gen *bla_{KPC}* haya realizado una transposición replicativa y se insertara en otro plásmido de la misma cepa, dejando así una copia del gen *bla_{KPC}* en cada uno de los plásmidos. En cualquiera de los casos son necesarios más estudios para poder dilucidar cual es la situación de *Ec* DA20/2.

TRANSFERENCIA DEL GEN *bla_{KPC}* A OTRAS ENTEROBACTERIAS.

En todos los ensayos de conjugación se obtuvieron transconjugantes las cuales portan el gen *bla_{KPC}* pero no el gen *bla_{CTX-M}*, por lo tanto el gen *bla_{CTX-M}* no es transferible en las condiciones ensayadas. Esto es corroborado mediante PCR y por expresión fenotípica de las resistencias mediante el antibiograma. Además se realiza la extracción plasmídica de los aislamientos dadores, receptores y transconjugantes comprobándose que en todos los casos se dio la transferencia de un plásmido del mismo tamaño. Con los ensayos de conjugación se demuestra que el gen *bla_{KPC}* es capaz de transferirse de *Kp* a *Ec* y de *Ec* a *Kp*.

Teniendo en cuenta los valores obtenidos de las frecuencias de conjugación no parece haber ninguna predilección por un contexto genético determinado en lo que respecta al pasaje del gen *bla_{KPC}*, dado que las dos *Kp* receptoras utilizadas difieren en su perfil de resistencia, una es multiresistente y la otra tiene un fenotipo salvaje. En donde si se observa una diferencia respecto al valor de frecuencia de conjugación obtenido de las conjugaciones inter-especies es en la conjugación entre *Ec-Ec*. Este valor de frecuencia es mucho mayor al obtenido en las conjugaciones *Kp-Ec*. Esta diferencia podría deberse a que enterobacterias de la misma especie compartirían el plásmido con mayor facilidad (Chen et. al., 2014)(Thomas et. al., 2005). En este trabajo no fue posible realizar el ensayo *Kp-Kp* dado que las dadoras son resistentes a los

antibióticos disponibles y no se encontraron condiciones de selección para realizar el ensayo, pero sería de esperar que de *Kp-Kp* el plásmido se transfiera con facilidad.

En los antibiogramas realizados a las transconjugantes se puede constatar que aquellas que solo poseen el gen de resistencia *bla_{KPC}* además de aumentar su CIM frente a Carbapenemas (imipenem, meropenem) también lo hacen frente a los demás miembros de la familia de los β -lactámicos.

ANALISIS DE LA SECUENCIA DEL PLASMIDO TRANSFERIDO POR CONJUGACION.

El plásmido fue secuenciado por el método de secuenciación masiva con un secuenciador Illumina (NGS), método por el cual se generan secuencias cortas de ADN que es necesario ensamblar para reconstruir el plásmido *de novo*. Para el ensamblado de las secuencias se alinearon contra una secuencia de referencia. Esta metodología no permite la reconstrucción precisa de las zonas con secuencias repetidas. Esta es la razón por la que se dificultó el diseño de oligonucleótidos para la amplificación y secuenciado de las brechas. Si bien es necesario realizar nuevas amplificaciones con otros oligonucleótidos para cerrar las brechas, igual se pudo reconstruir el plásmido en base a una secuencia de referencia. El tamaño del plásmido ensamblado es similar al tamaño esperado. La metodología de secuenciación masiva, ej. PacBio, si bien es mas costosa, genera secuencias cerradas, evitando los inconvenientes mencionados, (Sheppard et. al., 2016).

Se comprueba mediante el análisis de la secuencia obtenida que el plásmido posee solo un gen de resistencia a β -lactámicos y que este gen es el *bla_{KPC-2}*, este resultado es concordante con los hallazgos previamente descritos en cuanto a las amplificaciones por PCR y secuenciación y expresión fenotípica (antibiograma). Además de ello se pudo corroborar el grupo de incompatibilidad plasmídico (IncN) y se pudo determinar el pMLST lo cual es importante para realizar un seguimiento epidemiológico del plásmido. La variante genética pST-15, detectada en pEc20/2xEcTOP, se describe por primera vez en plásmidos IncN contenidos en aislamientos de *Kp* de Israel pertenecientes al período 2004-2008 (Chmelnitsky et. al., 2014). En otro estudio se analizó la diseminación de *bla_{KPC}* por THG mediante la

selección de muestras de pacientes donde se co-aislaron *Kp* y otra enterobacteria, ambas productoras de KPC encontrándose que el factor clave para la transmisión del gen *bla*_{KPC} fue el plásmido IncN, ST-15 en todos los casos (Adler et. al., 2016). La importancia de los plásmidos encontrados radica en su capacidad de conjugación intra e inter especies, la cual fue probada mediante ensayos de conjugación.

Los plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncN están ampliamente diseminados en bacterias de origen ambiental, principalmente aisladas de plantas de tratamiento de aguas residuales (Eikemeyer, 2012). A su vez estos plásmidos han sido considerados de interés para la salud humana dada su presencia en aislamientos clínicos de enterobacterias de origen humano y animal confiriendo resistencia a carbapenemas (*bla*_{KPC} y *bla*_{NDM}) y cefalosporinas de tercera generación a nivel mundial (Bortolaia et al., 2010) (Carattoli, 2009) (Carattoli et al., 2010) (Cullik et al., 2010). Estos plásmidos IncN poseen un conjunto de genes comunes que putativamente intervienen en la replicación, la transferencia conjugativa, el control y la estabilidad del plásmido. Tales genes se agrupan en módulos funcionales. La replicación requiere de la proteína de iniciación RepA, la cual interacciona con iterones localizados corriente arriba y corriente abajo del gen *repA* (Papp y Iyer, 1995), y tiene una secuencia idéntica en CP004367.2 y en la mayoría de plásmidos IncN (Pérez-Chaparro et al., 2014). Poseen también dos módulos de genes que se predice están involucrados en la transferencia conjugativa, formando el sistema de secreción bacteriano tipo IV (T4SS). Uno de estos módulos está integrado por 10 genes; *traL*, *traM*, *traA*, *traB*, *traC*, *traD*, *traN*, *traO*, *traF* y *traG*, cuya expresión consiste en proteínas componentes del pelo sexual, el canal a nivel de membrana, y de la maquinaria de provisión de energía para la biosíntesis y el transporte de ADN. También contiene genes regulatorios *korA*, *korB*, *eex*; los genes *nuc* y *kikA* y dos genes de función desconocida. En el segundo módulo se codifican tres proteínas TraI, TraJ y TraK que funcionan en la transferencia y replicación de ADN (sistema Dtr) y el gen *fipA* localizado corriente debajo de *traI* que funciona en la inhibición de la fertilidad de los plásmidos IncP. El gen *mobC* se describe como un gen de movilización (Fong et al., 1993). El plásmido contiene además varios genes que contribuyen a su estabilidad, el sistema de restricción-antirestricción codificado por *ecoRII* y *ecoRIImet* que probablemente se encargue de eliminar células que han perdido el plásmido

(Kulakauskas et al., 1995), el grupo *stbABC* que se supone estabiliza al ADN de simple cadena durante la conjugación (Paterson et al., 1999), *mucAB* que eleva la mutagenicidad (Clerch et al., 1996) y *ardAB* que proveen función de antirrestricción y su regulación *ardKR*. La función de los genes controlados por *cup* (*ccg*) y la de los otros marcos de lectura abierta es desconocida (Eikmeyer et al., 2012).

En una pasantía realizada por la Dra. Carolina Márquez en Fiocruz previa a la realización de esta tesis, se determinó que el ST de los aislamientos DA54/2, DA293 y DA19/2 pertenecen al ST 437 (CC-258/11) (Wyres et. al., 2014). Este ST ha sido hallado en los estados de Río de Janeiro y Santa Catalina según un estudio realizado en Brasil, en el cual se analizaron por PFGE y MLST 113 aislamientos de *Kp* productora de KPC, de 12 estados de Brasil en el año 2010 (Pereira et. al., 2013). Además, determinaron que el gen *bla*_{KPC-2} estaba asociado al Tn4401 isoforma b y en el 36% de los casos este Tn se encontraba en un plásmido IncN de 40Kb. No solamente se han encontrado aislamientos de *Kp* ST437 con plásmidos codificantes para el gen *bla*_{KPC-2} del grupo IncN en ambientes hospitalarios, sino que también hay reportes de aislamientos de *Kp* ST 437 con plásmidos IncN, conteniendo el gen *bla*_{KPC-2} dentro de un Tn4401 isoforma b en 2 ríos distintos en San Pablo (Olivera et. al., 2014), lo que es una evidencia de la diseminación de clonas ST437 resistentes a β -lactámicos al ambiente extra-hospitalario. Queda de manifiesto que las clonas de *Kp* pertenecientes al ST437 resultan ser exitosas en su supervivencia y en su diseminación. De todas maneras el plásmido con el cual se realizó el empalme de los scaffolds del plásmido pEc20/2xEcTOP provino de un hemocultivo del año 2008 de un paciente infectado con *Kp-KPC* en San Pablo, y que pertenece al ST 442 (Pérez-Chaparro et. al., 2014).

Respecto a la localización del Tn4401 codificante del *bla*_{KPC-2} dentro de distintos plásmidos IncN provenientes de aislamientos clínicos se observaron tres localizaciones diferentes: i) entre los genes *nuc* y *fipA* (pYD626E), ii) dentro del gen *nuc* (pEc20/2xEcTOP y pFCF_3SP) y iii) fuera de la región entre *nuc* y *fipA* (pECN580) (figura 20), lo que sugiere el potencial que tendría el Tn4401 y por ende el *bla*_{KPC-2} para diseminarse.

PRODUCCION DE BIOFILM DE LOS AISLAMIENTOS.

Todos los aislamientos del brote en estudio son productores de biofilm en las condiciones ensayadas. Esta característica le confiere a la cepa bacteriana una ventaja ya que la vida en biofilms tiene muchos beneficios.

Resulta interesante el análisis de los datos obtenidos de la determinación de biofilm al analizar los resultados de los aislamientos en pares del paciente DA (colonia mucosa y no mucosa) de la herida quirúrgica. Las muestras DA54/1, DA19/1 y DA66/1 fueron negativas para la amplificación del gen *bla*_{CTX-M} y las DA54/2, DA19/2 y DA66/2 fueron positivas para la amplificación de *bla*_{CTX-M}, confirmándose posteriormente la variante CTX-M-15. Respecto a la producción de biofilm también presentaron diferencias los pares /1 y /2. Los aislamientos /1 presentan mayor producción de biofilm que los /2. En concordancia con los resultados hallados se ha descrito que podría darse una relación inversa entre la producción de β -lactamasas y la capacidad de formar biofilms. (Gallant et. al., 2005). También se ha visto que los vectores plasmídicos que codifican para la β -lactamasa TEM-1 causan defectos en la formación de biopelículas sin afectar las tasas de crecimiento en *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Este efecto no se observa al introducir otros genes de resistencia como los que codifican para resistencia a gentamicina y a tetraciclina. La interferencia sobre la formación de biofilm estaría acotada a β -lactamasas clase A, como CTX-M-15 y D, pero no a las clases B y C (Naves et. al., 2008) (Gallant et. al., 2005).

Se ha reportado que los plásmidos conjugativos naturalmente expresan factores que inducen a bacterias planctónicas a formar biofilms o a entrar en las comunidades que constituyen un biofilm ya formado. A su vez, en el biofilm se favorece la transferencia horizontal de plásmidos. Esta conexión entre conjugación y biofilm sugiere que cepas que contengan plásmidos conjugativos tienen más tendencia a formar biofilms. Esto aumenta la chance de que cepas productoras de biofilm se asocien a la diseminación de factores de virulencia (Ghigo, 2001). En este trabajo se determinó la producción de biofilm de los pares receptoras/transconjugantes y se observa que no presentan diferencias significativas. Como las cepas de cada par receptora/transconjugante son isogénicas con excepción del plásmido conjugativo

presente en la transconjugante, el plásmido conteniendo el gen *bla*_{KPC} parece no tener influencia en la producción de biofilm.

En un biofilm existen bacterias creciendo en diferentes micro-nichos, que varían espacial y temporalmente, con diferentes velocidades de crecimiento y adaptaciones metabólicas, y de cuyo cultivo se obtiene variantes de colonia en un amplio rango de bacterias (Stewart y Franklin, 2008). Debe también considerarse las diferentes presiones selectivas producidas por concentraciones variables de antibiótico como consecuencia de su penetración variable en el biofilm. En dichas comunidades hay una mayor transferencia horizontal de genes (Madsen et. al., 2012) y alto grado de tasa de mutación, incluyendo mutaciones que cambian mecanismos de permeabilidad relativamente inespecíficos y contribuyen a la resistencia a antibióticos. La formación de biofilm en heridas está descrita como una de las causas del enlentecimiento en su curación (Hurlow et. al., 2015). Por tanto, las variaciones en el fenotipo y genotipo de los aislamientos provenientes del exudado de herida del paciente DA, podrían ser originados en un biofilm bacteriano formado en la herida. También se conoce que las comunidades bacterianas del intestino son parte de un biofilm, lo que estaría contribuyendo a la THG en el nicho intestinal (de Vos, 2015).

Los aislamientos de *Kp*-KPC y *Ec*-KPC se clasificaron en las categorías de débil o moderada producción de biofilm. Los aislamientos que se diseminan corresponden a débiles productores de biofilm o a la categoría moderada en sus valores mas bajos, lo cual coincide con la descripción de cepas de *Kp*-KPC pertenecientes al ST437, aisladas en Brasil y asociadas con débil producción de biofilm (Araujo et. al., 2018).

CONCLUSIONES

La infección de herida del primer paciente correspondió a una infección mixta o policlonal, de por lo menos tres cepas de la misma especie. Los repetidos cultivos del exudado de herida, en un período de 10 días, desarrollaron más de una clona.

El grado de relación genética que guardan los aislamientos de *Kp* de distintos pacientes es estrecho por lo que se considera que se produjo una diseminación clonal de una de las cepas del caso inicial.

Los biotipos y antibiogramas de los aislamientos presentaron variabilidad entre sí, ya sea entre aislamientos de distintos pacientes e incluso en un mismo paciente.

Todos los aislamientos fueron productores de la enzima KPC y alguno de los aislamientos de *Kp* son productores de la BLEE CTX-M-15, mientras que el único aislamiento de *Ec* contenía una BLEE del tipo CTX-M-9 o CTX-M-51.

El estudio del contenido plasmídico de todos los aislamientos determinó que contienen varios plásmidos y que el gen *bla*_{KPC} está localizado en un plásmido de aproximadamente 60Kb, excepto en dos de ellos, DA66/2 y AS897.

El plásmido portador del gen *bla*_{KPC} es un plásmido conjugativo que puede movilizarse tanto desde una *Ec* a una *Kp* como de una *Kp* a una *Ec* o de una *Ec* a una *Ec* con frecuencias de conjugación idénticas entre *Ec-Kp* y *Kp-Ec* pero con mayor frecuencia de conjugación entre *Ec-Ec*.

En todos los casos el plásmido transferido se determina que corresponde al grupo de incompatibilidad IncN y su pMLST es 15. También se observó que el gen *bla*_{KPC} es el único gen de resistencia que porta dicho plásmido.

El estudio de la totalidad del entorno genético del gen *bla*_{KPC} permitió definir que éste se encuentra en un transposón Tn4401 isoforma b.

Todos los aislamientos tienen la capacidad de producir biofilms bacterianos en las condiciones ensayadas. La capacidad de producción de biofilm no es modificada con la adquisición del plásmido conjugativo de 60kb.

En términos generales y teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, podría decirse que en este brote se está frente a una población de *Kp* heterogénea con una clona exitosa en su diseminación y en la adquisición de genes de resistencia a β -lactámicos. Además, el gen *bla*_{KPC} tiene éxito en su diseminación más allá de la diseminación clonal, ya que también se encontró en una *Ec* que se aisló junto a una *Kp* ambas conteniendo el gen *bla*_{KPC} localizado en un plásmido de idéntico tamaño y del mismo grupo de incompatibilidad. Para los aislamientos DA66/2 y AS897 el gen *bla*_{KPC} no se encuentra en el plásmido en que se localiza en la mayoría de los aislamientos, por lo tanto en este caso se puede pensar en una diseminación a nivel del Tn que lo contiene y no de la transferencia del plásmido como tal. El aislamiento DA66/2 tiene un pulsotipo diferente al resto de aislamientos del paciente DA, se considera como una clona distinta dentro de la infección de herida. En tanto que el aislamiento AS897 tiene un pulsotipo estrechamente relacionado a la clona que se disemina y se considera parte del brote. En el caso de la *Ec*-KPC se encuentra señal de hibridación en dos bandas, que podría corresponder a una diseminación del Tn que contiene el gen *bla*_{KPC-2} que debe ser confirmada.

El biofilm podría explicar el polimorfismo fenotípico de los aislamientos y podría contribuir al enlentecimiento de la curación en la herida. La herida del paciente índice contiene la mayoría de los aislamientos estudiados siendo, todos formadores de biofilms.

BIBLIOGRAFÍA

Adler A., Khabra E., Paikin S., Carmeli, Y. (2016). Dissemination of the *bla*_{KPC} gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8): 2143-2146, <https://doi.org/10.1093/jac/dkw106>.

Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biological Sciences*, 289(1036): 321-331.

Anderl, JN., Franklin, MJ., Stewart, PS., (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Doi: 10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000 <http://aac.asm.org/content/44/7/1818>.

Andrade L., Stegani L., Ferreria J., Darini A., Novais A., Rodrigues C., y Peixe L. (2018) Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M (-2, -8, -15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 91(2):164-168. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.007.

Araújo B.F., Ferreira M.L., Amaral de Campos P., Royer S., Rossi Gonçalves L., da Fonseca Batist D.W, Rodriguez Fernandes M., Teixeira Cerdeira L., Silveira de Brito C., Lincopan N., Pinto Gontijo-Filho P., and Marques Ribas R. (2018). Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 67:523-528

Arlet G., Rouveau M., Casin I., Bouvet P.J., Lagrange P.H., Philippon A. (1994) Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 β -lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:2553-2558.

Azam M, Jan A.T., Haq Qazi M. (2016). blaCTX-M-152, a novel variant of CTX-M-group-25, identified in a study performed on the prevalence of multidrug resistance among

natural inhabitants of River Yamuna, India. DOI=10.3389/fmicb.2016.00176. ISSN=1664-302X <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00176>.

Bagley T.S. (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection Control*, 6:52-58. 10.1017/S0195941700062603.

Barreto S., Zambrano M., y Araque M. (2009). Variaciones fenotípicas de susceptibilidad en cepas de *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial y su asociación con la formación de biopelículas. *Investigación Clínica*, 50(2): 221-229.

Becker K., Heilmann C., Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 870–926. doi:10.1128/CMR.00109-13

Bortolaia V., Guardabassi L., Trevisani M., Bisgaard M., Venturi L., Bojesen A.M. (2010). High diversity of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (4): 1623–1626.

Boszczowski I., do Prado G. V., Dalben M. F., Telles R. C., Freire M. P., Guimarães T., Oliveira M. S., Rosa J. F., Soares R. E., Llacer P. E., Dulley F. L., Costa S. F., Levin A. S. (2014). Polyclonal outbreak of bloodstream infections caused by *Burkholderia cepacia* complex in hematology and bone marrow transplant outpatient units. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 56(1): 71-6.

Bradford P. A. (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933–951. <http://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>.

Bryant K. A., Van Schooneveld T. C., Thapa I., Bastola D., Williams L. O., Safranek T. J., Fey P. D. (2013). KPC-4 Is Encoded within a Truncated Tn4401 in an IncL/M Plasmid, pNE1280, Isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1): 37–41. <http://doi.org/10.1128/AAC.01062-12>.

Bush K., and Jacoby G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3): 969-976. doi: 10.1128/AAC.01009-09.

Cantón R., and Coque MT. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9 (5): 466-475, ISSN 1369-5274, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>.

Carattoli A., (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (6): 2227–2238.

Carattoli A., Aschbacher R., March A., Larcher C., Livermore D.M., Woodford N. (2010). Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65 (10): 2070–2075.

Carattoli A., Bertini, Villa A., L., Falbo V., Hopkins K. L., y Threlfall E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3): 219-228. doi: 10.1016 /j.mimet.2005.03.018.

Chen L. F., Anderson D. J., & Paterson D. L. (2012). Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infection and Drug Resistance*, 5: 133–141. <http://doi.org/10.2147/IDR.S26613>

Chen L., Chavda K. D., Fraimow H. S., Mediavilla J. R., Melano R. G., Jacobs M. R., Bonomo R. A., Kreiswirth B. N. (2013). Complete nucleotide sequences of blaKPC-4- and blaKPC-5-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1): 269-76.

Chen L., Chavda K. D., Mediavilla J. R., Jacobs M. R., Levi M. H., Bonomo R. A., Kreiswirth B. N. (2012). Partial excision of bla_{KPC} from Tn4401 in Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3): 1635–1638. <http://doi.org/10.1128/AAC.06182-11>

Chen L., Hu H., Chavda K. D., Zhao S., Liu R., Liang H., Zhang W., Wang X., Jacobs M. R., Bonomo R. A., Kreiswirth B. N. (2014). Complete sequence of a KPC-producing IncN

multidrug-resistant plasmid from an epidemic *Escherichia coli* sequence type 131 strain in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4): 2422-5.

Chen Y.T, Lin J.C., Fung C.P., Lu P.L., Chuang Y.C., Wu T.L., Siu L.K., 2014. KPC-2-encoding plasmids from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 69, Issue 3, March 2014, Pages 628-631, <https://doi.org/10.1093/jac/dkt409>

Cheruvanky A., Stoesser N., Sheppard A. E., Crook D. W., Hoffman P. S., Weddle E., ... Mathers A. J. (2017). Enhanced *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase expression from a novel Tn4401 deletion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(6): e00025–17. <http://doi.org/10.1128/AAC.00025-17>.

Chmelnitsky I., Shklyar M., Leavitt A, Sadovsky E., Navon-Venezia S., Dalak B.M., Rotem E., Yehuda C. (2014). Mix and match of KPC-2 encoding plasmids in Enterobacteriaceae comparative genomics. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease*, 79: 255-260.

Christensen GD, Naddor L. M., Madison B. M, Parisi J. T., Abraham S. N., Hasty D. L., Lowrance J. H., Josephs J. A., Simpson W. A.(1990). Colonial morphology of *Staphylococcus* on Memphis agar: phase variation of slime production, resistance to β lactam antibiotics, and virulence. *Journal of Infectious Diseases*, 161(6):1153-69.

Clerch B., Bravo J. M., Llagostera M. (1996) Efficiency of MucAB and *Escherichia coli* UmuDC proteins in quinolone and UV mutagenesis in *Salmonella typhimurium*: effect of MucA and UmuD processing. *Mutation research.*, 349 (2): 201-208.

CLSI, (2011) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first Informational supplement, 31 (1):50-53.

Cullik, A., Pfeifer, Y., Prager, R., von Baum, H., Witte, W., (2010). A novel IS26 structure surrounds blaCTX-M genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 59 (Pt 5): 580–587.

Cuzon G., Naas T., & Nordmann P. (2011). Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5370-3.

De-la-Fuente M., Martinez-Perez M., Gonzalez-Pallares I., Esteban J. (2015). Detection of polyclonality among clinical isolates from prosthetic joint infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 53 (12):3766-3772.

De Vos MW. (2015). Microbials biofilms and the human intestinal microbiome. *Npj biofilms and microbiota*, 1, 15005.

Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A., & Brisse, S. (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), 4178–4182. doi:10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005

Donlan R. M., & Costerton J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 167–193. <http://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>.

Dunne W. M., J.R and Wang W. (1997). Clonal dissemination and colony morphotype variation of Vancomycin- resistant *Enterococcus faecium* isolates in metropolitan Detroit, Michigan. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2):388-392.

Echeverría N. (2014). Plataformas genéticas involucradas en la adquisición y transferencia de la multirresistencia a antibióticos en *Klebsiella pneumoniae*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PEDECIBA Biología.

Eikmeyer F., Hadiati A., Szczepanowski R., Wibberg D., Schneiker-Bekel S., Rogers L.M., Brown C.J., Top E.M., Pühler A., Schlüter A. (2012). The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution. *Plasmid*, 68:13-24.

Endimiani A., Carias L. L., Hujer A. M., Bethe, C. R., Hujer K. M., Pere, F., Bonomo R. A. (2008). Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*

isolates possessing *bla*_{KPC} in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7): 2680-2682. doi: 10.1128/AAC.00158-08.

Fong S. T., & Stanisich V. A. (1993). Identification and characterization of RP1 Tra1 cistrons involved in pilus function and plasmid mobilization. *Journal of Bacteriology*, 175(2): 448-56.

Foweraker J.E., Laughton C. R., Brown D. F. J. and D. Bilton. (2005). Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 921–927.

Galar A., Kuldorff M., Rudnick, O'Brien W., and Stelling J. (2013). Biochemical phenotypes to discriminate microbial subpopulations and improve outbreak detection. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084313>.

Gallant C.V., Daniels C., Leung J.M., Ghosh A.S., Young K.D., Kotra L.P. and Burrows L.L. (2005) Common β lactamases inhibit bacterial biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 58: 1012–1024.

Ghigo J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412.

Gillham M. I., Sundaram S., Laughton C. R., Haworth C. S., Bilton D. and Foweraker J. E. (2009). Variable antibiotic susceptibility in populations of *Pseudomonas aeruginosa* infecting patients with bronchiectasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63: 728–732.

Gomez S.A., Pasteran F.G., Faccione D., Tijet N., Rapoport M., Lucero C., Lastovetska O., Albornoz E, Galas M, Melano R.G., Corso A., Petroni A. (2011). Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(10): 1520-1524, ISSN 1198-743X, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03600.x>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X1461870X>.

Hamdy Mohammed El & Fakhr Ahmed & Mohammed El sayed Hanan & abd Elmohsen Al Johery Said & Abdel Ghani Hassanein Wesam. (2016). Spread of TEM, VIM, SHV, and CTX-M β -Lactamases in Imipenem-resistant Gram-negative bacilli isolated from Egyptian Hospitals. *International Journal of Microbiology*, 1-15. 10.1155/2016/8382605.

Herrera T. (2004). El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova*. 2. 10.22490/24629448.10.

Hintermann G., H.-M. Fisher, R. Cramer, and R. Hutter. (1981). Simple procedure for distinguishing CCC, OC, and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid* 5: 371-373.

Hsueh P. R., Teng L. J., Yang P. S., Chen Y. CH., Ho S. W., and Luh K. T. (1998) Recurrent catheter-related infection caused by single clone of *Mycobacterium chelonae* with two colonial morphotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(5):1422-1424.

Hsueh P-R., Wu J-J., Teng L-J., Chen Y-Ch., Yang P-C., Ho S-W., Luh K-T. (2002). Primary liver abscess caused by one clone of *Klebsiella pneumoniae* with two colonial morphotypes and resistotypes. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (1):100-2.

Hurlow J., Couch K., Laforet K., Bolton L., Metcalf D., and Bowler P. (2015). Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care. *Advances In Wound Care*, 4(5):295-301

Jamal M., Ufaq T., Hussain T., Andleeb, S. (2015). Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*. 4. 1-14.

Kadó C.I. and Liu S-T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*, 145(3):1365-1373.

Kulakauskas S., Lubys A., Ehrlich S.D. (1995) DNA restriction-modification systems mediate plasmid maintenance. *Journal of Bacteriology*, 177 (12): 3451-3454.

LAHEY. 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>.

Li W., Raoult D., Fournier P. E. (2009) Bacterial strain typing in the genomic era. *Federation of European Microbiological Societies Rev* 33:892-916.

Li J. J., Lee C. S., Sheng J. F., & Doi Y. (2014). Complete sequence of a conjugative incN plasmid harboring blaKPC-2, blaSHV-12, and qnrS1 from an *Escherichia coli* sequence type 648 strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(11): 6974-7.

Macrina F. L., Kopecko D. J., Jones K. R., Ayers D. J., McCowen S. M. (1987). A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: Convenient source of size reference plasmid molecules, *Plasmid*. ISSN 0147-619X, [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(78\)90056-2](https://doi.org/10.1016/0147-619X(78)90056-2).

Madsen J. S., Burmølle M., Hansen L. H., Sørensen S. J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 65(2):183-95.

Mahillon J., & Chandler M. (1998). Insertion Sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 725–774.

Marin M., Guidol F. (2003). Antibióticos β lactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21:42-55 - DOI: 10.1016/S0213-005X (03)72873-0.

Márquez C., Ingold A., Echeverría N., Acevedo A., Vignoli R., García-Fulgueiras V., Galiana A. (2014). Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay: infection control and molecular characterization. *New Microbes and New Infections*, 2(3): 58–63. <http://doi.org/10.1002/nmi2.40>.

Márquez 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10): 3417-3425. doi: 10.1128/JCM.00835-08.

Márquez C., Xia M., Borthagaray G., y Roberts M. C. (1999). Conjugal transfer of the 3.05 β -lactamase plasmid by the 25.2 Mda plasmid in *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexually Transmitted Diseases*, 26(3): 157-159.

Naas T., Cuzon G., Villegas M.-V., Lartigue M.-F., Quin, J. P., & Nordmann P. (2008). Genetic structures at the origin of acquisition of the β -Lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4): 1257–1263. <http://doi.org/10.1128/AAC.01451-07>.

Navarro F., Miró E. (2007). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 25 Supl. 2:11-7.

Naves P., Del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V., Blanco J., Rodríguez-Cerrato V., Ponte M. and Soriano F. (2008), Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 585-590. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x.

Nguyen D. and Pradeep K. S. (2006). Evolving stealth: Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (22): 8305–8306.

Nicolas-Chanoine M. H., Mayer N., Guyot K. , Dumont E. and Pagès J-M. (2018) Interplay between membrane permeability and enzymatic barrier leads to antibiotic-dependent resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*. 9:1-14.

Nordmann P., Naas T., & Poirel L. (2011). Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10):1791-1798. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1710.110655>.

Novick R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews*, 51(4): 381–395.

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.

Oliveira, S., A. Moura R., Silva K.C., Pavez M., McCulloch J. A., Dropa M., Matté M.H., Mamizuka E.M., Sato M. I. Z., Pestana de Castro A. F., Lincopan L. (2014). Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumonia* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69 (3):849–852, <https://doi.org/10.1093/jac/dkt431>.

OMS. Plan de acción mundial sobre resistencia a los antimicrobianos. (2015). <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/es/>

O'Toole G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE*. 47. <http://www.jove.com/details.php?id=2437>, doi: 10.3791/2437.

Papp P., Iyer V.N. (1995) Determination of the binding sites of RepA, a replication initiator protein of the basic replicon of the IncN group plasmid pCU1. *Journal of Molecular Biology*. 246 (5): 595-608.

Paterson E. S., Moré M. I., Pillay, G., Cellini C., Woodgate R., Walker G. C., Iyer V. N., Winans S. C. (1999). Genetic analysis of the mobilization and leading regions of the IncN plasmids pKM101 and pCU1. *Journal of Bacteriology* 181 (8): 2572-2583.

Paterson D. L., & Bonomo R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4): 657–686. <http://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686>.

Percival S. L., Hill K. E., William, D. W., Hooper S. J., Thomas D. W. and Costerton J. W. (2012), Biofilms in wounds. *Wound Repair Regen*, 20: 647-657. doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x.

Pereira S.P., Machado de Araujo C. F., Miyuki Seki L., Zahner V., D'Alincourt Carvalho-Assef A.P., Dutra Asensi M. (2013). Update of the molecular epidemiology of KPC-2 producing *Klebsiella pneumonia* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340), *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68 (2): 312–316, <https://doi.org/10.1093/jac/dks396>.

Pérez-Chaparro P. J., Cerdeira L. T., Queiroz, M. G., de Lima C. P., Levy C. E., Pavez M., Lincopan N., Gonçalves E. C., Mamizuka E. M., Sampaio J. L., Nunes M. R., McCulloch J. A. (2014). Complete nucleotide sequences of two blaKPC-2-bearing IncN Plasmids isolated from sequence type 442 *Klebsiella pneumoniae* clinical strains four years apart. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5): 2958-60.

Pitout J. D. D., Nordmann P., Poirel L. (2015) Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10):5873-5884.

Podschun R. and Ullmann U. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical of Microbiology Rev*, 11(4): 589–603.

Quale J. (2008). Global Spread of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Microbe Magazine*, 3:516-520. 10.1128/microbe.3.516.1.

Queenan A. M., Bush K. (2007) Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 20(3):440-458

Redondo C., Alonso G. (2007). Conjugated plasmids isolated from multi resistant strains obtained at four health centers in the Caracas metropolitan area. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. (2007). 27(2): 100-107. Disponible en: http://www.scielo.org.ve /scielo.php? script=sci_arttext&pid=S1315-25562007000200009&lng=es.

Ronen B-A., Navon-Venezia S., Schwartz D. and Carmeli Y. (2002) Infection of a ventricular shunt with phenotypically variable *Staphylococcus epidermidis* masquerading as polymicrobial bacteremia due to various coagulase-negative Staphylococci and Kocuria variants. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6): 24444-2447.

Saladin, M., Cao V. T., Lambert T., Dona, J. L., Herrman, J. L., Ould-Hocine Z., Arlet G. (2002). Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from

Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*, 209(2): 161-168.

Sambrook J. & Russell D. (2001). *Molecular Cloning*. 3ra Edición.

Seecoomar G. D., Marmol B. C., Kwon D. H. (2013). Promoter deletions of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-encoding genes (*bla*_{KPC-2}) and efflux pump (AcrAB) on β -lactam susceptibility in KPC-producing Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* 348: 120-6.

Serrano-Rivero, Y., Hernández-García, A., Fando-Calzada, R. (2013). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 44, núm. 2.

Serisier D. J., Tuck A., Matley D. et al. (2012) Antimicrobial susceptibility and synergy studies of cystic fibrosis sputum by direct sputum sensitivity testing. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 31: 3211.
<https://doi.org/10.1007/s10096-012-1687-6>.

Sheppard A.E., Stoesser N., Wilson D.J., Sebra R., Kasarskis A., Anson L.W., Giess A., Pankhurst L.J., Vaughan A., Grim C. J., Cox H. L., Yeh A.J., Sifri C. D., Walker, A. S., Peto, T. E., Crook D. W., Mathers Amy J. (2016). Nested Russian doll-like genetic mobility drives rapid dissemination of the Carbapenem resistance gene *bla*_{KPC}. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60 (6): 3767-3778; DOI: 10.1128/AAC.00464-16.

Singh A., Goering R. V., Simjee S., Foley S. L., & Zervo, M. J. (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3): 512–530. <http://doi.org/10.1128/CMR.00025-05>.

Stepanovi S., Vukovi D., Daki I., Savi B., Svabi-Vlahovi M. (2000) A modified microtiterplates test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology Methods*, 40:175-179

Stewart P. S. and Franklin M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6:199-210.

Stewart P. S., Costerton J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *The Lancet*, 358(9276):135-138, ISSN 0140-6736, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1).

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673601053211>.

Suarez C., Guidol F. (2008). Antibióticos Bactéricos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27:116-29. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.12.001.

Tafur J.D., Torres J.A., & Villegas M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3): 227-232.

Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., & Swaminathan B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9): 2233–2239.

Thomas C.M., Nielsen K.M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. Vol 3, pages 711–721

Vera Leiva A., Barria-Loiza C., Carrasco-Anabalón S., Aguayo-Reyes A., Domínguez M., Bello-Toledo H., González-Rocha G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, main carbapenemase in Enterobacteriaceae. *Revista Chilena de Infectología* 34: 476-484.

Vera-Leiva A., Barria-Loiza C., Carrasco-Anabalón S., Lima C., Aguayo-Reyes A., Domínguez M., Bello-Toledo H., González-Rocha G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 476-484. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>

Wyres K., Gorrie C., Edwards D.J., Wertheim H.F., Hsu L.Y., Kinh N.V., Zadoks R., Baker S., Holt K.E. (2014). Extensive capsule locus variation and large-scale genomic recombination within the *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258/1. bioRxiv

010769; doi: <https://doi.org/10.1101/010769>. *Genome Biology and Evolution* doi: 10.1093/gbe/evv062

Zhao W.-H., & Hu Z.-Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(1): 79–101. <http://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460>.

Ziebuhr W. & Ohlsen K. & Karch H. & Korhonen T. & Hacker J. (1999). Evolution of bacterial pathogenesis. *Cellular and molecular life sciences*, 56: 719-28. 10.1007/s000180050018.

Zierdt C., Schmidt, P. J. (1964). Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 87(5), 1003–1010.

ANEXO I

Protocolo utilizado para la extracción de ADN genómico

- 1) A partir de un cultivo puro de crecimiento *overnight* en placa de TSA (Agar Tripticasa de Soja), se resuspende crecimiento en 600µl de suero fisiológico, de modo obtener una suspensión con turbidez equivalente a 3 Mac Farland. Se centrifuga a 9500xg por 10 minutos a 4°C.
- 2) El pellet obtenido se resuspende en 200µl de Buffer TE (pH 8, 10mM Tris, 1mM EDTA) y se le agregan 20µl de lisozima 50mg/ml. Luego de vortexear, se incuba a 37°C por 15 minutos.
- 3) Posteriormente se agregan 250µl de Buffer TE (pH 8), 25µl de SDS 10% y 3µl de proteinasa K 20mg/ml. Se mezcla por inversión y se incuba a 37°C por una hora.
- 4) Se agrega 2,5µl de ARNasa A libre de ADNasa 1mg/ml y se incuba a 37°C por 30 minutos.
- 5) Inmediatamente cada tubo se coloca en hielo durante 5 minutos y luego se agregan 285µl de NaCl 5M frío y se agita por inversión. Se incuba 10 minutos más en hielo, agitando por inversión 5 veces durante la incubación.
- 6) Se centrifuga a 16000xg por 15 minutos a 4°C.
- 7) El sobrenadante se transfiere a otro tubo. A éste se le agrega igual volumen de isopropanol frío y se agita por inversión al menos 20 veces.
- 8) Se centrifuga a 16000xg por 15 minutos a 4°C.
- 9) Se elimina el sobrenadante por inversión y el precipitado se lava con 900µl de Etanol 70% frío. Se centrifuga a 16000 g por 2 minutos a 4°C y se retira el sobrenadante cuidadosamente. El precipitado se deja secar al aire.
- 10) Una vez comprobada la evaporación de restos de etanol, se resuspende el precipitado en 100µl de agua milli Q incubando a 65°C por 20 minutos.

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

ANEXO II

Protocolo utilizado para Pulse Field Gel Electrophoresis. *K. pneumoniae*

Preparación de los bloques de agarosa

Cultivar en medio solido con presión selectiva (en el caso que lo requiera) overnight a 37°C en estufa los aislamientos a estudiar.

Resuspender en 1mL de buffer TE hasta lograr una concentracion de 0,5 en la escala de Mc Farland.

Centrifugar a 10,000 rpm duratne 2 minutos.

Fundir agarasosa LPM al 1% en buffer 0,5X TBE

Armr los bloques.

Enfriar la agarosa a 50°C. Si los bloques son muchos poner la agarosa en un baño de agua a 50°C para que no solidifique.

Retirar el sobrenadante del pellet con una pipeta pasteur.

Resuspender el pellet en 500uL de agarosa y vortexear.

Llenar el bloque con una pipeta. Dejar correr la agarosa por una de las paredes del bloque. Rotular cada bloque con su respectivo numero.

Dejar solidificar durante 10-15 min.

Tratamiento de los bloques.

En una placa de petri chica agregar:

- 5mL buffer TE

- 100uL 20% SDS

- 100 uL proteinasa K (5mg/mL)

Retirar con cuidado los blocks de agarosa del mode y agregar cada uno a la placa de petri.

Sellar la placa de petri con parafilm

Incubar a 50°C durante 48hs (poner una placa vacía abajo para no recalentar la ultima de las placas)

Lavar los bloques 3 veces con 10mL de TE, agitar 30 min entre lavado y lavado.
Luego del ultimo lavado colocar el bloque de agarosa en una placa de petri limpia con 15 mL de buffer TE, sellar con parafilm y guardar a 4°C.

Tratamiento con la enzima de restriccion

En un eppendorf de 1,5mL agregar:

150 uL de dH₂O

22 uL de buffer de reacción.

Agregar al eppendorff un bloque de un espesor de 2 a 3mm (el tamaño del bloque es dependiente de la concentración en el bloque)

Agregar 3uL de la enzima (XbaI)

Mezclar la solución.

Incubar overnight a 37°C.

PFGE

Acomodar el molde y el gel:

gel grande: 150mL 1% SeaKem agarosa

gel chico: 100mL 1% SeaKem agarosa.

Dejar solidificar el gel por lo menos 30 minutos.

Fundir el LMP al 1% y dejar enfriar hasta 50°C

Hacer 2,5L de buffer 0,5X TBE

Agregar el buffer a la cámara, encender la bomba y el agua fría, dejar que el buffer se enfríe ($\leq 20^{\circ}\text{C}$)

Con cuidado volcar los bloques previamente tratados con la enzima en su correspondiente well (escribir el orden en el que son colocados)

Cubrir los wells con la agarosa LMP al 1%

Esperar 5 minutos a que el gel solidifique completamente.

Colocar el gel en la cámara, hacer que el gel este al ras del suelo de la cámara. (Bajar la

presión de la bomba para colocar el gel).

Configurar las condiciones de corrida:

Tiempo inicial: 5 segundos

Tiempo final: 30 segundos

Tiempo de corrida: 20 hs

Voltaje: 6 V/cm, ángulo: 120 °.

Teñir el gel en 400ml de agua destilada con 30uL de goodview con agitación suave durante 1 hora. Luego retirarlo del baño de tinción y lavarlo con agua destilada durante 2 hs. Tomar la foto. Si la foto tiene mucho ruido volver a lavar con agua destilada y volver a tomar la foto.

ANEXO III

Protocolo para extracción de plásmidos pesados

1- Partir de un cultivo puro de los aislamientos a estudiar, se inoculan 3mL de caldo LB (con presión selectiva en caso de aislamientos que contengan el gen *bla_{KPC}*) toda la noche a 37°C. No necesita agitación.

2- Transferir a un eppendorf 1,5mL del caldo con crecimiento y centrifugar 5min a 13000rpm.

3- Secar el botón celular con la pipeta, luego añadir 20uL de buffer Kado (Tris-HCl 50mM, pH 8 y EDTA 1mM pH 8). Homogeneizar con pipeta e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

4- Añadir a lo anterior 100uL de Buffer de lisis pH12,6 (Tris 50mM pH 10,5 y SDS 3% pH 7. Ajustar pH con NaOH 5M). Homogeneizar suavemente con la pipeta y se incuba a 58°C durante 32 minutos. (Durante este tiempo ir preparando la solución fenol-cloroformo)

5- Añadir 100uL de una solución 1:1 fenol redestilado al 99% y cloroformo 99%. (Para disolver el fenol pre calentar a una temperatura de 50°C aproximadamente y una vez disuelto agregar enseguida el cloroformo.) Mezclar por inversión y dejar reposar 10 minutos. Luego centrifugar durante 30 minutos a 13,000 rpm a temperatura ambiente.

6- En el paso anterior se obtiene una solución separada en 3 fases. De la fase superior se transfieren 90uL a otro eppendorf al que previamente se le habían añadido 20uL de buffer de carga. Esta mezcla no se resuspende.

7- Dejar esta mezcla 24hs en la heladera o 5hs como mínimo.

8- Correr electroforéticamente en gel de agarosa al 0,9% bajo las siguientes condiciones:

1 fase: 50V durante 50min

2 fase: 100V durante 75 min

Volumen de siembra: 30uL

Buffer de corrida: TBE 0,5X. Tinción: GoodView 12uL en 200mL de agua, dejar tiñendo durante 60 minutos, agitando cada 20 min. Lavar durante 2 h en agua destilada en la heladera. Sacar una foto. De ser necesario dejar lavando toda la noche en agua en la heladera y luego volver a sacar la foto.

ANEXO IV

Protocolo utilizado para *SOUTHERN BLOT*

Electroforesis de las muestras y transferencia a membrana de nylon.

Realizar extracción plasmídica con la técnica de Kado y Liu modificada (Anexo III).

De la extracción plasmídica correr 7uL de producto para chequear las bandas y la extracción en general. Tomar medidas de las distancias de las bandas de control con las de las muestras, el resto guardarlo todo para la transferencia (70-80uL aproximadamente).

Gel para la transferencia: Realizar la electroforesis de los plásmidos en 0,9% de agarosa. Sembrar las muestras y en los carriles externos del gel los controles de distancia de las bandas (en este caso vamos a utilizar los marcadores de PM plasmídico V517 y J53, se colocan ambos marcadores en el mismo carril ya que los tamaños no se superponen), estas medidas serán utilizadas como referencia luego para ubicar las bandas producto de la hibridación.

Cortar del gel los carriles de ambos extremos y dejarlos aparte. Estos carriles se tiñen para ver las bandas y calcular distancias. Fotografíarlos con regla. Con el gel que contiene el resto de las muestras, seguir con la técnica.

Exponer el gel de corrida durante 5 minutos a la luz UV (este proceso ayuda a romper el ADN y mejorar la transferencia a la membrana)

Tratar el gel incubándolo inmerso en :

solución depurinizante (HCl 0,25M) Colocar el gel en esta solución hasta que el azul de bromofenol cambie de color, luego de que suceda esto dejar 10 minutos más. Luego lavar con agua destilada un par de veces. *(Para un gel de 200 ml lleva unos 30 minutos aproximadamente)*

Buffer de transferencia alcalina (0,4M NaOH): Sumergir el gel en el buffer de transferencia alcalina con agitación durante 15 minutos. En este tiempo armar el puente y cortar los papeles whattman y la membrana).

Armar torre de transferencia SIN TOCAR LA MEMBRANA (ni con guantes) USAR PINZAS:

Cortar membrana mismo tamaño del gel. Humedecerla completamente durante 5 minutos en el buffer de transferencia.

Cortar 2x papel absorbente del mismo tamaño del gel

Sobre isla poner en el siguiente orden, siempre cuidando que no queden burbujas:

vidrio

punte de papel absorbente (cortamos 40cm*12cm), mojar en buffer de transferencia.

Gel. Invertirlo de modo que su parte inferior es ahora superior. Coloque el gel invertido sobre el soporte de modo que esté centrado sobre el papel mojado húmedo.

Humedecer con el buffer de transferencia la parte de arriba del gel.

bloqueadores alrededor del gel (parafilm o similar)

membrana, previamente mojada en buffer. *Cuidar que no queden burbujas entre la membrana y el gel, sino la transferencia no es eficiente*



2x papeles absorbentes, mojados previamente en buffer

torre de servilletas o similar

vidrio

peso (lo indicado es 1kg) (colocar un nivel arriba de todo para asegurarnos de que la torre queda derecha)

Dejar transfiriendo.

Cambiar torre de servilletas por unas secas a las 2 hs aproximadamente. *Dejar transfiriendo toda la noche.*

Fijación de ADN a la membrana.

Retirar torre y papeles sin mover membrana y marcar con lápiz los pocillos del gel.

Dejar secando la membrana a TA durante 2 horas.

Fijar las muestras mediante UV, colocando film en la superficie del transiluminador, luego la membrana con las muestras sembradas orientadas hacia abajo y dejar exponiendo durante 5 minutos. Posteriormente colocar la membrana en estufa a 65°C durante 1 hora.

Cortar la membrana a la altura de la última banda que se observa según en marcador de PM, es conveniente que la membrana tenga el menor tamaño posible.

Guardar membrana a TA entre papeles Whatman o continuar con la pre-hibridación.

Pre-hibridación

Pre-hibridar con solución de Church en un volumen de 125uL/cm² de membrana durante 60 minutos (como mínimo) a 65°C en una bolsa de nylon sellada. El tiempo de pre-hibridación debe ser como mínimo 60 minutos, puede extenderse más tiempo sin problemas (incluso es mejor).

Hibridación.

Síntesis de la sonda (se puede realizar mientras la membrana se encuentra pre-hibridando)

Marcado de la sonda.

Mezclar bien en hielo y spin (hacer esta reacción por triplicado) :

dNTP mix 10X	7uL
ADN	x uL (1ug)
Agua destilada	x uL
Enzyme mix 10x	7 uL
Volumen final	70 uL

Incubar 1 hora a 16°C (se puede extender hasta 2 horas).

Agregar 5 µL de Stop Buffer.

Precipitar con 1/10 vol. de acetato de sodio 3M y 2 vol. EtOH absoluto frío. Mezclar por inversión y dejar 15 min. a -70°C ó 2 hr a -20°C.

Centrifugar 10min. A 13000rpm

Remover SN y secar el pellet.

Resuspender la sonda en buffer TE (50uL) (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH=8)

Almacenar la sonda marcada a -20°C.

Desnaturalizar la sonda en agua hirviendo durante 5 minutos y luego colocarla en hielo rápidamente (tener el hielo pronto al momento de retirar la sonda del baño de agua hirviendo). Centrifugar brevemente para llevar los reactivos al fondo del tubo.

Descartar la solución de pre-hibridación y reemplazarla por solución de Church nueva. Agregar la sonda recién desnaturalizada y dejar hibridando durante toda la noche a 65°C en baño de agua.

Lavados de la membrana

Lavados de la membrana. Las soluciones de lavado deben ser utilizadas en exceso, por lo menos 1-5mL/cm² de membrana. Realizar los lavados de la siguiente manera (1,5mL por cm² de membrana) en lo posible con agitación:

- 2x SSC, 0,1% SDS: 5 minutos 2 veces

- 1X SSC, 0,1% SDS: 15 minutos

- 0,1 SSC, 0,1% SDS: 10 minutos 2 veces a la temperatura de hibridación (65°C).

Transferir la membrana humedecida por la última solución de lavado a una bolsa nueva para que no se reseque.

Detección

1 Pasar membrana a bolsa nueva sellada, con un corte en esquina cerrar con clip.

2 Lavar sucesivamente con:

Solución A, 0,1ml/cm² membrana, 5 min TA con agitación. Descartar la solución.

Streptavidina: diluida 1:250 en Sol.A, 0,05ml/cm², 5 min TA con agitación. Descartar la solución Preparar en el momento.

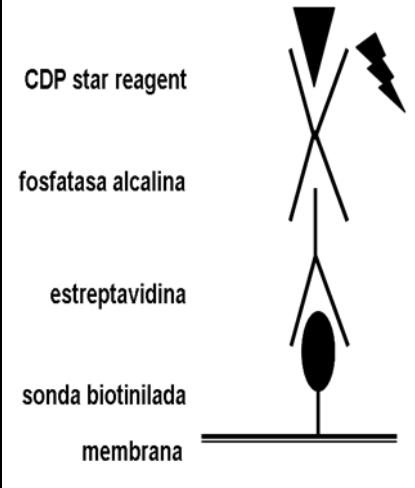
Solución B, 0,5 ml /cm² membrana, 5 min TA con agitación. Repetir. Descartar la solución entre lavados

Fosfatasa alcalina biotilada diluida en Sol.A (1:250), 0,05 ml/cm² membrana, 5 min TA con agitación. Descartar la solución.

Solución A, 0,5 ml /cm² membrana, 5 min TA con agitación. Descartar la solución

Solución C 1X, 0,5 ml /cm² membrana, 5 min TA con agitación. Repetir. Descartar la solución

Solución CDP-Star*, 0,025ml/cm² membrana, 5 min TA. Con agitación. Descartar la solución. Preparar en el momento:

<p>Fundamento:</p> <p>Detección por quimioluminiscencia: enzima que cataliza una reacción que emite luz azul. La estreptavidina se une primero al target biotilado (sonda) y luego a la fosfatasa alcalina biotilada. En el último paso, el reactivo CDP–star forma un intermediario moderadamente estable que decae espontáneamente, emitiendo a 461 nm.</p>		Vol para membrana de:		
			50 cm ²	100 cm ²
		Agua mQ	1,2 mL	2.4 mL
		Buffer CDP 25X	50 uL	100 uL
		CDP Star 100-500X	12.5 uL	25 uL
		Vol final	1,25 mL	2.5 mL

3 Exposición de membrana: Pasar membrana a bolsa nueva y sellar.. Colocar en cassette con ADN hacia arriba y adherir con cinta. En cuarto oscuro, colocar una placa sobre la membrana. Dejar exponiendo

Revelado

- 1- Sumergir placa en revelador y mover hasta aparición de bandas.
- 2- Lava con agua.
- 3- Sumergir en líquido fijador durante unos minutos (hasta que quede transparente).
- 4- Lavar con agua y dejar secar.

ANEXO V

Protocolo utilizado para la conjugación bacteriana

Día 1: Subcultivar o descongelar la cepa dadora en Mer 2 ug/mL de medio LB agar (1 placa) y la cepa receptora en LB 200ug/mL de NaN₃ (1 placa). Dejar en estufa 18 hs.

Día 2: Resuspender la dadora y la receptora por hisopado de todo el crecimiento de la placa en 1 mL de Caldo LB (lograr una densidad de 1 Mc Farland aproximadamente). Luego mezclar 0,5 mL de la receptora con 1 mL de la dadora y sembrar 0,5 mL de la mezcla en una placa de LB agar sin presión selectiva. Descargar los 0,5 mL de manera tal que quede un “botón” en el centro de la placa y que quede horizontal. Dejar en estufa 18 hs.

Día 3: Remover todo el crecimiento y resuspenderlo en 1 mL de caldo LB. A partir de esta suspensión preparar diluciones seriadas al décimo hasta la dilución -9. Luego sembrar con rastrillo esteril 100 uL de:

Diluciones 0, -1, -2 y -3 en LB agar con (Mer 2ug/mL) + (NaN₃ 200ug/mL) (Para seleccionar las transconjugantes).

Diluciones -6, -7, -8 y -9 en LB agar con Mem2ug/mL (para calcular en número de dadoras) y en LB agar con NaN₃ 200ug/mL (para calcular el número de receptoras).

Incubar en estufa overnight.

Día 4: Verificar crecimiento, las colonias que crezcan en (Mer 2ug/mL) + (NaN₃ 200ug/mL) son presuntas transconjugantes. Subcultivar de colonia aislada en una placa de (Mer 2ug/mL) + (NaN₃ 200ug/mL) nuevamente.

Día 5: Realizar la prueba bioquímica correspondiente a cada uno de los subcultivos para poder confirmar que se trata de una verdadera transconjugante.

ANEXO VI

Método estático para la determinación de biofilm en placa de microtitulación.

Procedimiento

- 1) Descongelar los aislamientos a estudiar en placas de LBA o LBA+ 2 ug/mL meropenem (dependiendo si al microorganismo se le quiera agregar presión selectiva o no). Cultivar toda la noche en estufa a 35-37°C.
- 2) Cultivar de colonia aislada en 3mL de Caldo LB overnight con o sin presión selectiva a 35- 37°C.
- 3) Llevar todos los cultivos a una misma densidad óptica (DO). (De ser posible una DO equivalente a la escala de 0,5 Mc Farland).
- 4) Realizar diluciones 1:100 de cada uno de los cultivos líquidos del punto 3 en medio M9+0,8% glucosa. Realizar estas diluciones en tubos estériles. Homogeneizar bien.
- 5) Sembrar en la placa de microtitulación 200 uL de la dilución del punto 4 de cada muestra por quintuplicado.
- 6) Dejar toda la noche en estufa a 37°C.
- 7) Descartar el contenido de la placa de microtitulación en un recipiente con una solución de hipoclorito sin sumergir la placa, solo volcar el contenido de los pocillos. Luego sumergir la placa en otro recipiente conteniendo suero fisiológico, la placa debe quedar completamente sumergida en el suero fisiológico. Luego retirar la placa del recipiente, volcar fuertemente el contenido de los pocillos y golpear la placa con los hoyos orientados hacia abajo sobre una superficie cubierta con servilletas de papel para asegurar que

se retira la mayor cantidad del contenido de los hoyos posible. Descartar estas servilletas en bolsas para autoclave.

8) Dejar secar los pocillos al aire durante 20 minutos y luego colocar en cada uno 225uL de la solución de cristal violeta al 1%. Dejar 20 minutos.

9) Volcar el cristal violeta en el recipiente y realizar 4 enjuagues con agua destilada de la misma manera que se procedió en el punto 7.

10) Dejar secar las placas al aire durante 1hora.

11) Solubilizar el Cristal violeta retenido en las paredes de cada hoyo con 215 uL de alcohol 95 durante diez minutos. Luego de pasado este tiempo ayudar a homogeneizar con una pipeta de ser necesario.

12) Medir la absorbancia del cristal violeta disuelto en cada uno de los hoyos de la placa a 590nm en el lector de placas de microtitulación.

Repetir este procedimiento al menos 2 veces, descongelando las cepas de interés cada vez que se realice. Tener en cuenta que en las repeticiones la DO de los caldos de partida deben ser idénticos, con el fin de que puedan ser comparables en las distintas repeticiones del ensayo.

Siempre en cada ensayo se debe incluir un control negativo (CN), este es desde el comienzo un tubo con caldo LB al cual no se lo inocula con ninguna bacteria y debe ser tratado como una muestra más de las que se están ensayando. Este valor va a ser muy importante para los cálculos y para el control del experimento ya que con él se va a controlar la unión inespecífica de cristal violeta al hoyo de la placa que no está vinculado a la producción de Biofilm de la muestra.

De ser posible utilizar una cepa como control positivo (CP) como la *Ec* ATCC25922 que ha sido reportada como productora de biofilm (Naves et al., 2008)

ANEXO VII

Tabla de comparación de las características presentes en las secuencias de los plásmidos MH514861 (perteneciente a un aislamiento de Kp-KPC de Montevideo 2011) y el plásmido pFC3SP (perteneciente a un aislamiento de Kp-KPC de San Pablo 2006)

MH514861		pFC3SP		Función/Rol/ Observaciones
Característica	Coordenadas	Característica	Coordenadas	
Nucleasa, motivo proteico:HMM:PF03432.12	142..681			Incompleta; parcial en el centro de un contig; falta final
Proteína de movilización, protein_id=" AXN76561.1 "	662..1159			Proteína hipotética/ Desconocida
Proteína de movilización, protein_id=" AXN76562.1 "	1166..1381			Proteína hipotética/ Desconocida
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76563.1 "	1886..2257			Proteína hipotética/ Desconocida
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76564.1 "	c(2354..2779)			Proteína hipotética/ Desconocida
Proteína de iniciación de la replicación, RefSeq: "WP_001326446.1"	c(3301..3434)			Marco de lectura corrido
Proteína hipotética, RefSeq:WP_012579059.1	c(3459..3701)			Incompleta; parcial en el centro de un contig; falta inicio
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76565.1 "	3621..3866			Proteína hipotética/ Desconocida
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76566.1 "	c(3848..4033)			Proteína hipotética/ Desconocida
Proteína MobC, protein_id=" AXN76567.1 "	4054..4395			Movilización plasmídica
Nucleasa RefSeq: WP_000635827.1"	4385..4540			Incompleta; parcial en el centro de un contig; falta final
Transposasa de la familia IS6 IS15DIV, protein_id=" AXN76568.1 "	4606..5310			Transposición
5,10-methylenetetrahydrofolate reductase"	c(5373..5489)			Incompleta; parcial en el centro de un contig; falta inicio

Proteína de la familia de recombinasas, protein_id=" AXN76569.1 "	c(5505..6074)	resP	81..650	Resolvasa/recombinación de AND/también presente en plásmidos KPC NC_021365 y NC_011383
Endonucleasa de restricción, protein_id=" AXN76570.1 "	6320..7528	ecoRII	c(53232..54446)	Endonucleasa de restricción Tipo II/Estabilidad/Causa letalidad cuando EcoRIImet no está presente
Methyltransferasa de citosina del ADN, protein_id=" AXN76571.1 "	c(7562..8995)	ecoRIImet	51723..53198	Metilasa de ADN/Estabilidad/ Metilación de sitios reconocidos por EcoRII
Transposasa de la familia IS1, RefSeq: WP_076612230.1	9094..9366	insB	c(51394..51600)	Incompleta; parcial en el centro de un contig; falta inicio Transposasa/ Transposición de ADN
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76572.1 " Parte del gen mrr	c(9377..9583)	FCF3SP_p0068	51177..51383	Proteína hipotética/ Desconocida
Endonucleasa de restricción truncada por inserción de IS903B RefSeq:WP_000893479.1 mrr	Unir [c(9588..9994); c(11050..11445)]	Endonucleasa truncada por inserción IS903B	Unir (50768..51172; 49315..49710)	Endonucleasa truncada debido a la inserción de IS903B
Transposasa de la familia IS5, protein_id=" AXN76574.1 "	10070..10993	IS903B	49711..50767)	Elemento móvil/Transposición/También presente en plásmidos JX42442, JX397875
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76575.1 "	c(11351..11662)	FSF3SP_p0064	49098..49409	Proteína hipotética/Desconocida/ También presente en plasmido 9 que contiene kpc
Proteína KikA, protein_id=" AXN76576.1 "	c(11698..12012)	kik A	48748..49062	Muerte de Klebsiella durante la conjugación/Estabilidad/ Tra modulo I, esqueleto IncN
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76577.1 "	c(12009..12353)	FCF3SP_p0062	48407..48751	Proteína hipotética/ Desconocida
KorB protein_id=" AXN76578.1 "	c(12369..12719)	korB	48086..48391	Inhibición de muerte por KikA/Estabilidad/ Tra modulo I, IncN
Proteína TraL, protein_id=" AXN76579.1 "	12783..13520	traL	c(47240..47977)	T4SS formación/conjugación/ Tra módulo I- esqueleto IncN
Regulador	13529..13810	korA	c(46950..4723	Inhibición de muerte por

transcricional, protein_id=" AXN76580. 1			1)	kik/Estabilidad/Tra modulo I, IncN
Proteína TraM, protein_id=" AXN76581. 1 "	13820..14113	traM	c(46647..4694 0)	T4SS formación/conjugación/ Tra módulo I- esqueleto IncN
VirB3, Proteína protein_id=" AXN76582. 1	14164..14481	traA	c(46279..4659 6)	T4SS formación/conjugación/ Tra módulo I- esqueleto IncN
VirB4, Proteína del sistema de secreción tipo IV, protein_id=" AXN76583. 1 "	14481..17081	traB	c(43679..4621 9)	T4SS formación/conjugación/ Tra módulo I- esqueleto IncN
Proteína del sistema de secreción tipo IV, /protein_id=" AXN76584. 1 "	17099..17812	traC	c(42948..4366 1)	T4SS formación/conjugación/ Tra módulo I- esqueleto IncN
Proteína de exclusión de entrada, protein_id=" AXN76585. 1 "	17820..18047	eex	c(42713..4294 0)	Exclusión entrada de ADN/Estabilidad/Tra módulo I- esqueleto IncN
Proteína de transferencia conjugative TraD, protein_id=" AXN76586. 1 "	18063..19103	traD	c (41657..42697)	T4SS formación/conjugación/ Tra módulo I- esqueleto IncN
Proteína de transferencia conjugative TraN, protein_id=" AXN76587. 1 "	19186..19332	traN	c (41428..41586)	T4SS formación/conjugación/ Tra módulo I- esqueleto IncN
Proteína de transferencia conjugative, VirB8, protein_id=" AXN76588. 1 "	19322..20020	traE	c(39216..3992 3)	T4SS formación/conjugación/ Tra módulo I- esqueleto IncN
Proteína de transferencia conjugative TraO, protein_id=" AXN76589. 1	20094..20915	traO	c (39845..40729)	T4SS formación/conjugación/ Tra módulo I- esqueleto IncN
Proteína de la familia TrbI/VirB10 protein_id=" AXN76590. 1 "	20915..22075	traF	c(38685- 39845)	T4SS formación/conjugación/ Tra módulo I- esqueleto IncN
Proteína de transferencia conjugativa TraG protein_id=" AXN76591. 1 "	22117..23112	traG	c(37648..3964 3)	T4SS formación/conjugación/ Tra módulo I- esqueleto IncN
Gen <i>nuc</i> interrumpido por inserción de Tn4401	23122..23215			
Repetido Directo por	c(23211-23215)			

inserción Tn4401 CTGAA				
IRR Tn 4401 (39pb)	c(23216..23254)			
Elemento similar a IS1182-Transposas de la familia ISKpn6, protein_id="AXN76593. <u>1</u> "	c(23568..24887)	ISKpn6 Transposasa TnpA	35703..37246	Elemento móvil/transposición/ Parte transposón Tn4401
β -lactamasa, carbapenemasa class A KPC-2, protein_id="AXN76594. <u>1</u> "	c(25137..26018)	bla KPC2	34742..35623	β -lactamasa clase A/Confiere Resistencia a carbpenems
ISKpn7	c(26337..28292)	ISKpn7	32468..34423	Elemento móvil/Transposición/Par te del transposón Tn4401
Proteína hipotética, RefSeq:WP_004152395. 1	c(26178..26408)	Sin equivalencia, región incluida en ISKpn7		Incompleta; parcial en el centro de un contig; pérdida de finalización
ATPasa de la familia AAA protein_id="AXN76595. <u>1</u> " TraB	c(26405..27184)	Sin equivalencia, región incluida en ISKpn7		
Transposasa de la familia IS21 protein_id="AXN76596. <u>1</u> "	c(27181..28206)	Sin equivalencia, region incluida en ISKpn7		
Transposasa del Tn4401 protein_id="AXN76597. <u>1</u> "	c(28313..31342)	TnpA	29418..32447	Transposasa del Tn4401/Transposición replicativa
Integrasa protein_id="AXN76598. <u>1</u> "	31452..33167	TnpR	27593..29308	Resolvasa del Tn4401/Transposición replicativa
IRL Tn4401 (39pb)	c(33181..33219)			
Tn4401b	33219..23216	Tn4401b	27541..37544	Elemento móvil, contiene el blaKPC- 2/Tn4401b con >99% identidad con EU176012
Repetido Directo por inserción Tn4401 CTGAA	c(33220..33224)			
Ꞥnuc	Unir (33225..33656; 23122..23215)	Ꞥnuc	Unir(27104..2 7538; 37544..37648)	
Proteína de la familia de la fosfolipasf D f protein_id="AXN76599. <u>1</u> "	33192..33656			
Proteína hipotética, protein_id="AXN76600. <u>1</u> "	c(33829..34143)	FCF3SP_p0039	26617..26931	Proteína hipotética/Desconocida/ También presente en plásmido KPC (NC_011383)
Proteína conteniendo el dominio cupin,	c(34398..34754)	FCFSSP_p0038	26006..26362	Involucrada en la síntesis de L-rhamsosa, un

protein_id=" AXN76601.1				sacárido requerido por la virulencia de Salmonella
Proteína conteniendo el dominio DUF86, protein_id=" AXN76602.1	c(34744..35145)	FCFSSP_p0037	25615..26016	Proteína hipotética/ Desconocida
Nucleotidiltransferasa protein_id=" AXN76603.1	c(35142..35432)	FCFSSP_p0036	25322..25618	Posible transferencia de nucleótidos causando resistencia a antibióticos
FipA protein_id=" AXN76604.1 "	c(35496..35894)	fipA	24866..25264	Inhibición fertilidad plásmidos/Estabilidad/Parte del esqueleto IncN
Relaxasa conjugativa protein_id=" AXN76605.1 "	c(35894..39130)	traI	21630..24866	Transferencia de ADN durante la conjugación/ Estabilidad/Parte del esqueleto de IncN
Proteína conteniendo el dominio DUF87 protein_id=" AXN76606.1	c(39130..40659)	traJ	20101..21630	Transferencia de AND durante la conjugación/ Estabilidad/Parte del esqueleto de IncN
Proteína TraK, protein_id=" AXN76607.1	c(40661..41077)	traK	19683..20099	Transferencia de ADN durante la conjugación/ Estabilidad/Parte del esqueleto de IncN
oriT	41226..41325			Origen de replicación conteniendo el sitio de restricción GGTGTATAGC
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76608.1	41666..42052	stbA	c (18708..19094)	Estabilización del ssADN durante conjugación/ Estabilidad/Parte del esqueleto de IncN
Proteína StbB, protein_id=" AXN76609.1	42061..42777	stbB	c (17983..18699)	Estabilización del ssADN durante conjugación/ Estabilidad/Parte del esqueleto de IncN
Proteína StbC protein_id=" AXN76610.1 "	42779..43147	stbC	c (17613..17981)	Estabilización del ssADN durante conjugación/ Estabilidad/Parte del esqueleto de IncN
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76611.1	43459..43692			Proteína hipotética/ Desconocida
		FCFSP_p0028	17068..17412	Proteína hipotética/ Desconocida
		FCFSP_p0027	16903..17061	Proteína hipotética/ Desconocida
		FCFSP_p0026	16722..16877	Proteína hipotética/ Desconocida
CbiX biosíntesis de cobalamin, protein_id=" AXN76612.1	c(44154..44333)	cggAI	16427..16606	Regulación de la replicación/ Parte del esqueleto de IncN
		FSFSP_p0024	15874..16314	Proteína hipotética/ Desconocida
ArdA Proteína antirrestricción	c(45165..45674)	ardA	15086..15595	Inhibición de enzimas de restricción/Antirestricció

protein_id=" AXN76613.1 "				n/ Parte del esqueleto de IncN
Gap 3	45901..46200			
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76614.1 "	<46201..46462			
		FCF3SP_p0021	14532..14972	Proteína hipotética/ Desconocida
	46349..46462	FCF3SP_p_0020x	c(14298..14411)	Proteína hipotética/ Desconocida
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76615.1 "	c(46442..46699)	FCF5SP_p0019	14061..14318	Proteína hipotética/ Desconocida
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76616.1 "	c(47034..47366)	FCF5SP_p0018	13394..13726	Proteína hipotética/ Desconocida
CbiX biosíntesis cobalamina protein_id=" AXN76617.1 "	c(47575..47859)	ccgC	12901..13185	Proteína hipotética/ Desconocida/ Parte esqueleto IncN
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76618.1 "	c(47928..48287)	FCF3SP_p_0016	12473..12832	Proteína hipotética/ Desconocida
cobalamin biosynthesis protein CbiX protein_id=" AXN76619.1 "	c(48284..48580)	CcgD protein FCF3SP_p_0015	12180..12476	Parte del esqueleto IncN
gap	48779..48859			
		FCF3SP_p_0014	11522..12067	Proteína hipotética/ Desconocida
	c(49223..49343)	FCF3SP_p_0013	11403..11522	Proteína hipotética/ Desconocida /También presente en plásmido portando KPC (NC_011383)
CbiX biosíntesis de cobalamina protein_id=" AXN76620.1 "	c(49451..49690)	ccgEIII"	10613..10852	Parte esqueleto IncN
ArdR Proteína antirrestricción protein_id=" AXN76621.1 "	c(49700..50104)	ardR	10199..10603	Iniciación de la replicación/Replicación/ Parte esqueleto IncN
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76622.1 "	c(50162..50587)	ardB protein	10159..10584	Proteína de iniciación de la replicación/Replicación/ parte de IncN
Proteína hipotética, protein_id=" AXN76623.1 "	c(50679..50876)			
MucA-Polimerasa ADN	51003..51443	mucA	c (9304..9762)	Reparación de AND/Estabilidad/ Parte del esqueleto IncN

MucB polimerasa subunidad V protein_id="AXN76625. <u>1</u>	51431..52696	umuC	c (8051..9316)	
Proteína conteniendo dominio sprT protein_id="AXN76626. <u>1</u>	52847..53638	mpr	c (7109...7900)	Reparación ADN/Estabilidad/ Parte del esqueleto IncN
ArdK Regulador transcripcional protein_id="AXN76627. <u>1</u>	c(53653..53994)	ardK	6693..7094	Regulación de la replicación/Estabilidad/ Parte del esqueleto IncN
RepB Iniciador de replicación plasmídica protein_id="AXN76628. <u>1</u>	54554..55273	repA	c (5474...6193)	Proteína de iniciación de replicación/Replicación/ Parte del esqueleto IncN
Proteína hipotética, protein_id="AXN76629. <u>1</u>	55398..>55584			Proteína hipotética/Desconocida
Gap 1	55585..55841			Proteína hipotética/Desconocida
Proteína hipotética, protein_id="AXN76630. <u>1</u> "	<55842..56480			Proteína hipotética/Desconocida
Proteína hipotética, protein_id="AXN76631. <u>1</u> "	56597..56791			Proteína hipotética/Desconocida
	57173..58346	secA	c(2401 3573)	Proteína hipotética/Desconocida
Proteína hipotética, protein_id="AXN76632. <u>1</u>	57233..58708			Proteína hipotética/Desconocida
Proteína hipotética, protein_id="AXN76633. <u>1</u>	59640..59951			Proteína hipotética/Desconocida