



Universidad de la República
Facultad de Ciencias

Tesina de grado para la Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación Microbiología

**Caracterización de genes de resistencia transferible a
fluoroquinolonas en aislamientos clínicos portadores
de carbapenemasas**

Br. María Federica Ferreira Acosta

Orientadora: PhD María Inés Bado Vázquez

Laboratorio de Resistencia Antibiótica
Unidad de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de
Medicina, UdelaR

Abreviaturas

AK: Amikacina
ATM: Aztreonam
ATCC: American Type Culture Collection
BOR: Acido borónico
BLEE: β -lactamasas de espectro extendido
CAT: Colistin Agar Test
CAZ: Ceftazidime
CIM: Concentración inhibitoria mínima
CIP: Ciprofloxacina
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
COL: Colistina
CRO: Ceftriaxona
CN: Gentamicina
CZA: Ceftazidime-avibactam
EDTA: ácido etil-endiamino tetra-acético
EGM: Elementos genéticos móviles
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FEP: Cefepime
FOS: Fosfomicina
GES: Guiana extended spectrum
IMs: Integrones móviles
IPM: Imipenem
ISCR: *Insertion sequence common region*
KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa
LB: Luria-Bertani
MATE: Multidrug and toxic compound extrusion
MBL: Metallo- β -lactamasa
MCL: MacConkey Lactosa
MEM: Meropenem
MH: Mueller-Hinton
MSF: Major facilitating subfamily
NDM: Nueva Delhi Metallo- β -lactamasa
OMS: Organización Mundial de la Salud
OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal
ORF: Open Reading Frame
PBP: Penicillin binding protein
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
RAM: Resistencia Antimicrobiana
RDRQ: Región determinante de resistencia a quinolonas
ROS: Especies reactivas del oxígeno
RV: Región variable
SI: Superintegrones
TBE: Tris-Borato-EDTA
TIG: Tigeciclina
TSA: Tripteina Soya Agar
VIM: Verona Integron-encoded Metalocarbapenemasa

Resumen

La resistencia antimicrobiana (RAM) es la capacidad de los microorganismos para adaptarse, evitando la efectividad de los antimicrobianos. El uso indiscriminado de antibióticos ha aumentado dicha resistencia a nivel global, generando presión selectiva en las bacterias. Esta pérdida de eficacia de los antibióticos amenaza tanto a la salud humana, animal como ambiental, proyectando un aumento significativo de muertes por infecciones bacterianas multirresistentes para 2050, llegando a 10 millones.

Las quinolonas son antibióticos bactericidas, de amplio espectro y concentración dependiente, cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la replicación del ADN. Existen diferentes mecanismos de resistencia a éstos antimicrobianos donde se destacan la presencia de mutaciones en el sitio blanco de acción, enmascaramiento del sitio de acción, y la inactivación enzimática.

Dentro de los numerosos mecanismos de resistencia a los β -lactámicos el más relevante desde un punto de vista clínico y epidemiológico son las β -lactamasas del tipo carbapenemasas. Estas se clasifican en cuatro clases (A-D) y confieren resistencia a los β -lactámicos de mayor espectro.

El objetivo propuesto para este trabajo fue caracterizar los mecanismos de resistencia transferible a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos portadores de carbapenemasas.

De la totalidad de aislamientos estudiados, un 76% presentó genes de resistencia transferible a fluoroquinolonas. 41% correspondió a genes *qnrA1* y un 19% a genes *qnrB* (4 *qnrB1*, 1 *qnrB2* y 1 *qnrB18*). Además, un 16% de los aislamientos totales presentó ambos genes *qnr* al mismo tiempo. A su vez, el 25% de los aislamientos *qnr+* portaban además genes *aac(6')-Ib-cr* y un 29% de dichos aislamientos, genes del tipo *bla*_{CTX-M}. La mayoría de estos genes de resistencia se encontraron en plásmidos conjugativos, pudiendo ser transferidos entre distintas especies bacterianas. Asimismo, en cuanto al entorno genético de los genes *qnr*, el 59% de las cepas también presentaban genes *intl1* y el 42% presentaban *ISCR1*. Finalmente, el 100% de los aislamientos productores de carbapenemasas mostraron perfiles de multirresistencia, siendo resistentes a al menos tres clases de antimicrobianos. Además, se verificó que los mecanismos de resistencia estaban alojados en elementos genéticos móviles, corroborando así la hipótesis previamente planteada.

1. Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) refiere a la capacidad que poseen los microorganismos de adaptarse a los mismos e impedir que éstos actúen contra ellos (Salud, O. M. 2016). En cuanto a los antibióticos particularmente, en las últimas décadas se ha detectado un incremento en la tasa de resistencia a los mismos a nivel mundial, especialmente en países de muy bajos ingresos. Esto se debe principalmente al uso indiscriminado e imprudente de los mismos, lo cual genera una presión de selección sobre las bacterias y a su vez al desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes microorganismos (Salud, O. M. 2016).

Como consecuencia, los antibióticos están perdiendo drásticamente su eficacia, lo que sugiere importantes consecuencias para la salud animal y humana. De seguir así se estima que para 2050, el número de muertes anuales a causa de infecciones causadas por bacterias multirresistentes pasaría de setecientos mil a diez millones, superando el número de muertes por cáncer (O'Neill *et al.* 2016).

Existen 3 grupos en los cuales se pueden clasificar a los microorganismos según el grado de resistencia que presenten a los diferentes antimicrobianos:

1. Multirresistente: El microorganismo es resistente a por lo menos tres clases de antimicrobianos a los que se habría esperado que fuera sensible.
2. Extensamente resistente: Solo quedan una o dos opciones de antimicrobianos frente a los cuales el microorganismo es susceptible.
3. Panresistente: El patógeno es resistente a todos los agentes antimicrobianos comercialmente disponibles (Paciel *et al.* 2011) (Magiorakos *et al.* 2012).

Ante esta crisis, en mayo de 2015 se aprobó un plan propuesto en la 68ª Asamblea Mundial de la Salud denominado “Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a Antimicrobianos”. Este plan tiene como objetivo general garantizar, en la medida de lo posible, una continuidad de la prevención y el tratamiento satisfactorio de las enfermedades infecciosas con medicamentos eficaces, seguros y de calidad avalada, que se utilicen de modo responsable y sean accesibles a todas las personas que los requieran (Salud, O. M. 2016). Asimismo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) colabora estrechamente con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), para establecer en conjunto el concepto de “Una Salud” (Salud, O. M. 2016).

Los tres pilares fundamentales que forman parte de este concepto son la inocuidad de los alimentos, el control de las zoonosis y la lucha contra la

resistencia a los antibióticos. Es imprescindible referirnos a “Una Salud” debido a que muchos microorganismos afectan tanto a animales como a humanos cuando estos conviven en un mismo ecosistema. Esto implica una correlación directa entre salud humana, animal, y de los ecosistemas, por lo cual se requiere un esfuerzo multi e interdisciplinario (Salud, O. M. 2016).

Como parte de las actividades de la OMS para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos, en 2017, publicó una lista de patógenos prioritarios, los cuales considera clave para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (Salud, O. M. 2016), (Salud, O. M. 2017). En el grupo de prioridad crítica se incluyen: *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenems, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenems y Enterobacterias resistentes a carbapenems y productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Por otra parte, los grupos de prioridad elevada y media incluyen a: *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella spp.* resistente a fluoroquinolonas, entre otros (Salud, O. M. 2017).

Los criterios utilizados para incluir patógenos en la lista fueron los siguientes: el grado de letalidad de las infecciones que provocan; el hecho de que el tratamiento requiera o no una larga hospitalización; la frecuencia con que presentan resistencia a los antibióticos existentes cuando infectan a las personas de las comunidades; la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas; si las infecciones son prevenibles; disponibilidades terapéuticas; si se están investigando y desarrollando nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan (Salud, O. M. 2017).

Por otra parte, desde 2005 y cada dos años, el “Grupo Consultivo sobre Vigilancia Integrada de la Resistencia a los Antimicrobianos” analiza y actualiza la “Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la Medicina Humana”. El principal objetivo de esta lista es contribuir a gestionar la RAM y garantizar un uso prudente de todos los antimicrobianos tanto en medicina humana como veterinaria, principalmente aquellos de importancia crítica. Se categorizan la totalidad de los fármacos antibacterianos utilizados actualmente en el ser humano y en animales, en tres grupos en función de su importancia para la medicina humana. Estos tres grupos son: de importancia crítica (de máxima o gran prioridad), muy importantes, e importantes. Los antibióticos considerados de importancia crítica y máxima prioridad son las cefalosporinas (tercera, cuarta y quinta generación), glicopéptidos, macrólidos y cetólidos, polimixinas y finalmente, las quinolonas (Salud, O. M. 2019).

2. Marco Teórico

Mecanismos de resistencia a antibióticos

Las bacterias como grupo o especie no son necesariamente uniformemente susceptibles o resistentes a cualquier agente antimicrobiano concreto. Los niveles de resistencia pueden variar mucho dentro de grupos bacterianos relacionados. En general se distinguen mecanismos de resistencia naturales o intrínsecos y mecanismos de resistencia adquirida. La susceptibilidad y la resistencia generalmente se miden en función de la concentración inhibitoria mínima (CIM), siendo esta la mínima concentración capaz de inhibir al 99% de un inóculo bacteriano en un tiempo determinado. La susceptibilidad se trata en realidad de un rango de las CIM promedio para cualquier fármaco determinado en la misma especie bacteriana. Si la CIM promedio para una especie está en la parte resistente del rango, se considera que la especie posee resistencia intrínseca a dicho antimicrobiano. Las bacterias también son capaces de adquirir genes de resistencia de otras especies bacterianas, donde el grado de resistencia dependerá de los genes adquiridos y de la especie en particular (Reygaert 2018).

Existen cuatro mecanismos principales de resistencia a antibióticos, siendo estos:

1. Inactivación o degradación enzimática: se debe a la producción de enzimas que son capaces de hidrolizar el agente antimicrobiano, el cual no puede reconocer luego su sitio blanco. Ejemplo: degradación del anillo β -lactámico por la acción de β -lactamasas (Bush *et al.* 2020).

2. Modificación del sitio blanco: ésta ocurre como consecuencia de la alteración del sitio blanco por mutaciones puntuales de los genes codificantes o debido a procesos de recombinación genética. Esto conduce a la alteración de un gen y la proteína que codifica, la cual sustituye funcionalmente a las moléculas inhibidas por el antibiótico o también a la hiperproducción de moléculas blanco. Ejemplo: La resistencia a fluoroquinolonas se produce mediante modificaciones en la ADN girasa, en el caso de los bacilos Gram negativos se da por mutaciones en los genes *gyrA* (Bush *et al.* 2020).

3. Disminución de la permeabilidad: Este mecanismo impide que el antibiótico alcance concentraciones intracelulares bacterianas efectivas debido a la disminución en la expresión de proteínas de membrana externa (porinas). Estas

proteínas permiten la entrada y salida de nutrientes y desechos, respectivamente, entre otros. Asimismo, es la puerta de entrada de los antibióticos, el cual luego contacta con su sitio blanco produciendo un efecto bacteriostático o bactericida. Ejemplo: La disminución en la expresión de porinas OprD en aislamientos de *P.aeruginosa*, reduce la susceptibilidad a los β -lactámicos y fluoroquinolonas (Bush *et al.* 2020).

4. Bombas de eflujo: Se trata de proteínas transmembrana cuya función es exportar activamente el antibiótico fuera de la célula una vez que ingreso a la misma. Ejemplo: La presencia de la bomba MefA en *Streptococcus pyogenes* confiere resistencia a macrólidos (Bush *et al.* 2020) (Figura 1).

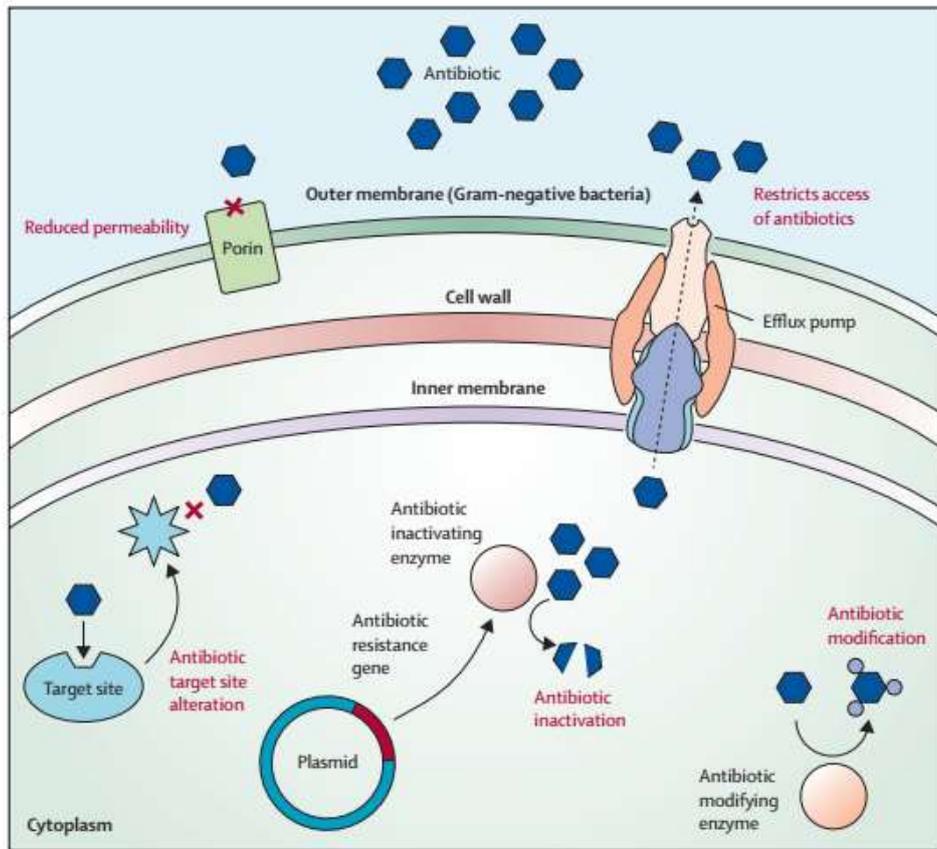


Figura 1. Mecanismos generales de resistencia a los antimicrobianos (Sherrard *et al.* 2014)

Quinolonas

Las quinolonas son un grupo de antibióticos bactericidas, concentración dependiente, de amplio espectro, que actúan inhibiendo la replicación del ADN. Son de origen totalmente sintético y aquellas de uso clínico poseen una estructura química común que consiste en un doble anillo que presenta un átomo de nitrógeno en la posición 1, un grupo carboxilo en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4 (Vignoli *et al.* 2019).

Al igual que otros antimicrobianos, las quinolonas se clasifican actualmente en cuatro generaciones:

1. Primera generación: (ácido nalidíxico y ácido pipemídico) poseen actividad sobre enterobacterias, sin embargo, son inactivas frente a Gram positivos y microorganismos anaerobios (Vignoli *et al.* 2019) (Ericsson *et al.* 2017).
2. Segunda generación: (norfloxacin y ciprofloxacina) el agregado de un átomo de flúor en el carbono de posición 6 genera éste nuevo grupo dentro de las quinolonas llamado fluoroquinolonas, el cual aumenta el espectro de acción en bacilos Gram negativos y Gram positivos (Vignoli *et al.* 2019) (Ericsson *et al.* 2017).
3. Tercera generación: (levofloxacina, sparfloxacina) retienen la actividad sobre Gram negativos mientras que aumentan la actividad frente a Gram positivos (Vignoli *et al.* 2019) (Ericsson *et al.* 2017).
4. Cuarta generación: (moxifloxacina, delafloxacina) al igual que las quinolonas de tercera generación, retienen la actividad sobre los Gram negativos mientras que aumentan la actividad frente a Gram positivos. Asimismo, agregan actividad frente a microorganismos anaerobios (Vignoli *et al.* 2019) (Ericsson *et al.* 2017) (Figura 2).

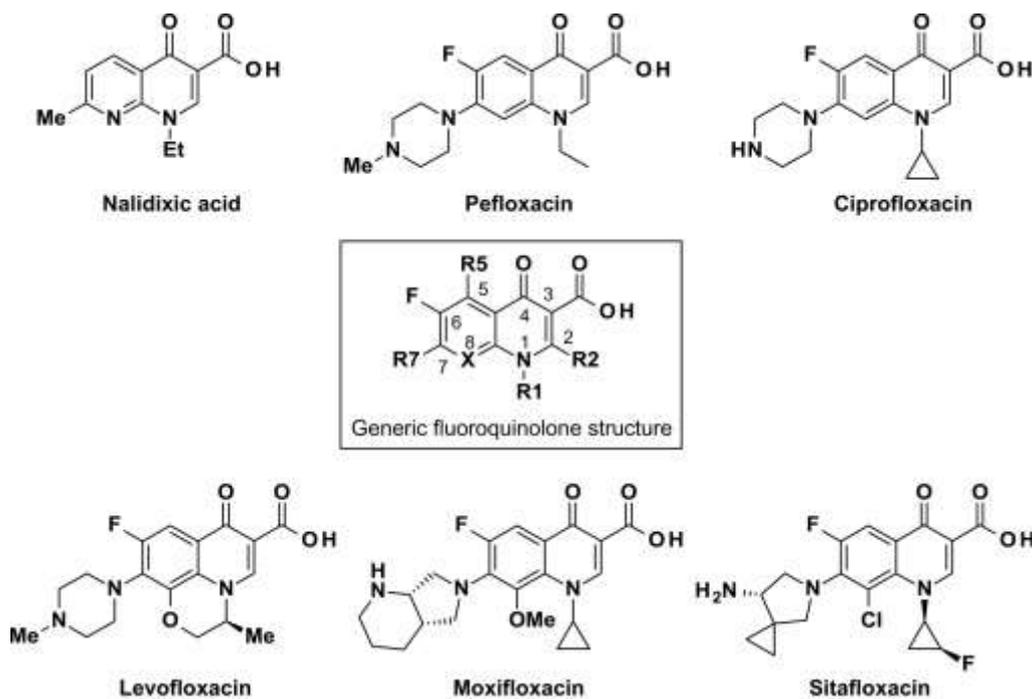


Figura 2. Estructura química de distintas fluoroquinolonas (Ericsson *et al.* 2017).

Mecanismo de acción de las quinolonas

El sitio activo de las quinolonas son dos enzimas relacionadas entre sí dentro de la célula bacteriana; las ADN girasas y las topoisomerasas IV (Vignoli *et al.* 2019). Las ADN topoisomerasas se encargan de catalizar cambios en la topología del ADN permitiendo su transición entre formas relajadas y superenrolladas. Éstas se dividen en tipo I y II dependiendo si clivan una o ambas hebras del ADN, respectivamente. Ambas están constituidas por tetrámeros compuestos por dos subunidades codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* o *parC* y *parE*, respectivamente. La clave del mecanismo de acción de las quinolonas es la formación de un complejo ADN-girasa-quinolona (Vignoli *et al.* 2019). La interacción entre las quinolonas con el ADN es mediante intercalado, de modo tal que los anillos aromáticos de las quinolonas se unen al sitio clivado del ADN, produciendo un desalineamiento de ambos extremos del ADN, impidiendo su religación. A su vez, interactúan con ciertas regiones de las girasas impidiendo su liberación del ADN y generando una acumulación de complejos ternarios. La pérdida de función de la horquilla de replicación y el clivado de ADN, sin un posterior religado, es lo que permite a las quinolonas alcanzar su efecto bactericida sobre los microorganismos sensibles (Vignoli *et al.* 2019) (Figura 3).

En cuanto a este efecto, no se sabe a ciencia cierta cómo se produce la muerte ya sea lenta o rápida. Sabemos que la primera etapa en la letalidad por quinolonas es la unión de la molécula de quinolona a un complejo de escisión topoisomerasa-ADN. Los complejos de clivaje contienen ADN roto que no puede ser resellado por la misma topoisomerasa si la quinolona está presente. Sin embargo, los complejos de clivaje y sus roturas de ADN "ocultas" son reversibles, por lo que debe haber eventos adicionales que causen la muerte bacteriana (Figura 3).

Ahora bien, dependiendo de si se procesa el complejo de escisión, se cree que la muerte bacteriana puede producirse de dos formas diferentes. Si el complejo de escisión no se procesa, la replicación del ADN y la transcripción se bloquean, lo que finalmente conduce a la muerte celular: muerte lenta. Si el complejo de escisión se procesa (ya sea por la eliminación de la girasa del ADN con una proteína desconocida o porque las subunidades de la girasa se disocian) y el ADN roto no se logra reparar exitosamente, se produce la fragmentación cromosómica, que mata rápidamente a la célula: muerte rápida. La presencia de ADN roto y, tal vez, de complejos de escisión también provoca la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) intracelulares, lo que puede dar lugar a más roturas de ADN (Bush *et al.* 2020) (Figura 3).

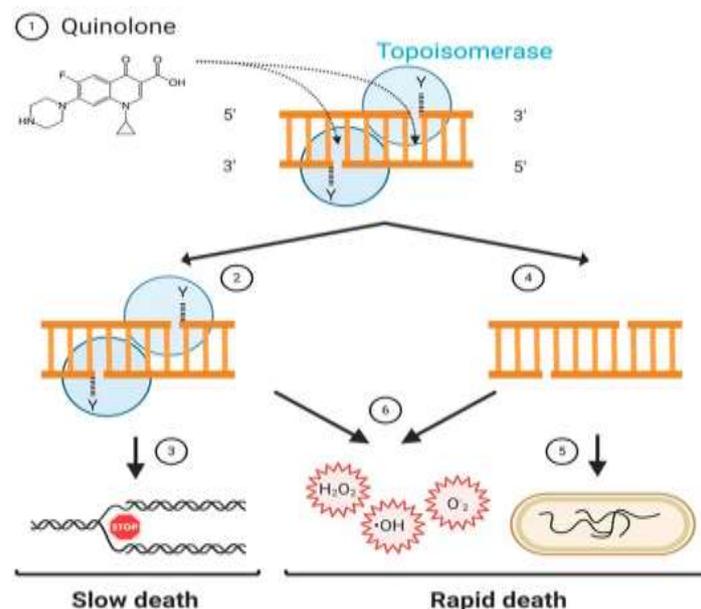


Figura 3. Mecanismo de acción de las quinolonas. 1. Las quinolonas estabilizan el complejo de escisión ADN-topoisomerasa en el cual ocurre una rotura de doble cadena. 2. Si el complejo no se resuelve, 3. los procesos de replicación y transcripción no pueden ocurrir, lo cual provoca la muerte celular lenta. 4. Si se elimina la topoisomerasa, la rotura de la doble cadena queda libre, y si no se repara, 5. se da la fragmentación del cromosoma lo cual ocasiona una rápida muerte celular. 6. El complejo de escisión estabilizado, o la eliminación de la topoisomerasa del complejo de escisión, podría conducir a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales pueden causar una rápida muerte celular bacteriana. (Bush *et al.* 2020)

Mecanismos de resistencia a quinolonas

Entre los mecanismos de resistencia a quinolonas se encuentran: alteraciones en el sitio blanco de acción debido a la presencia de mutaciones puntuales, disminución en la captación del mismo, enmascaramiento del sitio blanco, inactivaciones enzimáticas y bombas de eflujo (Vignoli *et al.* 2019).

Los dos primeros mecanismos se encuentran codificados a nivel cromosómico y, por ende, no son mecanismos transferibles horizontalmente, a diferencia del enmascaramiento del sitio blanco y presencia de bombas de eflujo (el cual puede a su vez ser un mecanismo cromosómico) (García *et al.* 2018).

1. Alteraciones en el sitio blanco: Éstas son producidas por mutaciones puntuales en los genes *gyrA* y *gyrB*, en una región particular denominada región determinante de resistencia a quinolonas (RDRQ). Para el caso particular de *GyrA*, la RDRQ involucra cambios aminoacídicos entre las posiciones 51 a 106, mientras que las mutaciones en *parC* involucran las posiciones 23 a 176. Asimismo, si bien las RDRQ involucran alrededor de 50 y 150 nucleótidos, respectivamente, la mayoría de las mutaciones descritas se da en las posiciones 83 y 87, en *gyrA*, y 80 y 84, en el caso de *parC* (Vignoli *et al.* 2019).

2. Disminución en la entrada: Esta disminución se encuentra asociada a dos factores principales:

2.1 Aumento de la impermeabilidad: Generalmente asociadas a una disminución en la expresión de porinas, fundamentalmente OmpF en *Escherichia coli* y proteínas homólogas, en otras enterobacterias (Vignoli *et al.* 2019).

2.2 Sobreexpresión de bombas de eflujo: Las bacterias poseen naturalmente un gran número de bombas de eflujo, asociadas usualmente a su membrana interna, por lo que son capaces de eliminar diversas sustancias tóxicas fuera del citoplasma (Vignoli *et al.* 2019). Un ejemplo de estas bombas de eflujo son las llamadas bombas *Multidrug and toxic compound extrusion* (MATE-MDR). Particularmente, los principales sustratos reconocidos por estas bombas son las fluoroquinolonas. NorM es, por ejemplo, una bomba de eflujo MATE que protege a los patógenos del daño inducido por especies reactivas de oxígeno y exporta compuestos catiónicos antimicrobianos o antibióticos, como se demostró en *Neisseria gonorrhoeae* (De Gateano *et al.* 2023).

3. Resistencia por enmascaramiento del sitio blanco: Este mecanismo consiste en la acción de una proteína (Qnr) codificada por los genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE*, *qnrVC* y *qnrS*) presentes en plásmidos. Dicha proteína actúa uniéndose específicamente a las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV, impidiendo así la formación del complejo ADN-girasa, complejo imprescindible para que las quinolonas ejerzan su acción (Vignoli *et al.* 2019).

4. Resistencia por inactivación enzimática: Se trata de un mecanismo conferido por una variante alélica del gen *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr*. Esta variante codifica una enzima denominada aminoglucósido acetiltransferasa, la cual modifica ciertos aminoglucósidos (amikacina, tobramicina y kanamicina), junto a norfloxacin y ciprofloxacina (Vignoli *et al.* 2019). La modificación enzimática de las fluoroquinolonas ocurre por la acetilación del nitrógeno en el anillo piperazilínico. Los antibióticos ciprofloxacina y norfloxacin son los únicos que poseen un grupo piperazilínico no sustituido, siendo las únicas fluoroquinolonas modificadas por esta nueva enzima. En base a lo antedicho puede darse la co-selección de resistencia a dos clases distintas de drogas llevada a cabo por una misma enzima. Los niveles de resistencia conferidos por este mecanismo son similares a los descritos para *qnr*, alcanzando a cuadruplicar los niveles de resistencia a ciprofloxacina en relación a la misma cepa antes de incorporar el gen *aac(6')-Ib cr*.

5. Bombas de eflujo: Se describen dos bombas de eflujo capaces de conferir resistencia transferible a quinolonas, OqxAB y QepA, codificadas por los genes *oqxAB* y *qepA*, respectivamente. Esta última pertenece a la familia de bombas MSF (*major facilitating subfamily*), actuando concretamente sobre ciprofloxacina, norfloxacin y enrofloxacin (Vignoli *et al.* 2019)

La resistencia a quinolonas en general se ve asociada a otros grupos de antibióticos tales como la fosfomicina, la colistina y los β -lactámicos siendo estos últimos los de mayor relevancia y a los que se hará referencia a continuación.

β -lactámicos

Los β -lactámicos son antibióticos bactericidas, tiempos dependientes, que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana ejerciendo su efecto por inhibición de la síntesis del peptidoglicano o mureína, actuando sobre las etapas finales de la misma (Vignoli *et al.* 2019).

De acuerdo a su estructura química, pueden describirse cuatro clases de β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenem (Figura 4).

1. Penicilinas: Esta subfamilia posee como núcleo base al ácido 6-aminopenicilánico o grupo penam, el cual está compuesto por la fusión del anillo β -lactámico (común a todos los β -lactámicos) y un anillo tiazolidínico (Figura 4) (Gómez *et al.* 2015) (Vignoli *et al.* 2019).

2. Cefalosporinas: El núcleo base de las cefalosporinas es el ácido 7 α -cefalosporánico o grupo cefem, el cual queda constituido por la fusión del anillo β -lactámico a un anillo dihidrotiacínico (Figura 4). De esta manera se generan

compuestos de 8 miembros pudiéndose introducir cadenas laterales en las posiciones 3 y 7 de la molécula (Vignoli *et al.* 2019). Tradicionalmente se agrupan en generaciones, hasta cinco en el momento actual. A rasgos generales, la evolución de las generaciones se ha asociado a un incremento de su espectro y de su actividad intrínseca frente a Gram negativos a expensas de una progresiva reducción de la actividad frente a Gram positivos, a excepción de las cefalosporinas de quinta generación cuyo actividad es sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. (Gómez *et al.* 2015).

3. Monobactámicos: estos consisten únicamente en el anillo β -lactámico, y tienen como característica distintiva su alta estabilidad frente a las metalo- β -lactamasas (un tipo de carbapenemasa). Actualmente, el aztreonam es el único antibiótico disponible (Gómez *et al.* 2015).

4. Carbapenems: Los carbapenems son los antimicrobianos β -lactámicos de más amplio espectro, mayor actividad y no hidrolizables por varias β -lactamasas, incluidas las BLEE. (Figura 4) (Gómez *et al.* 2015) (Vignoli *et al.* 2015). Dentro de este grupo encontramos al imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem (Werth, B 2022).

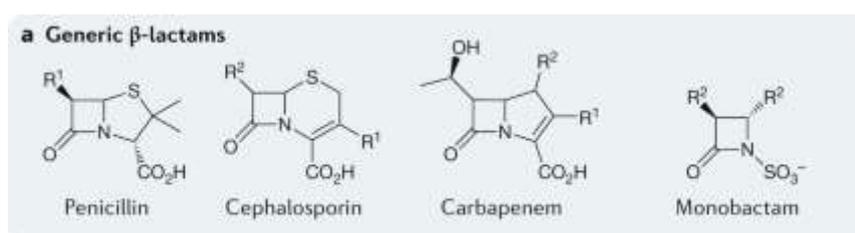


Figura 4. Estructura química de las diferentes clases de antibióticos β -lactámicos (Bush *et al.* 2019)

Mecanismo de acción de los β -lactámicos

El mecanismo de acción de los β -lactámicos, implica la inhibición de los dominios transpeptidasa y carboxipeptidasa de las proteínas denominadas *penicillin binding proteins* (PBP). Esto lleva a la detención total del proceso de síntesis de peptidoglicano, pero no al proceso de degradación. El balance es la pérdida de continuidad de la malla de mureína con el consiguiente estallido osmótico del microorganismo.

Mecanismos de resistencia a β -lactámicos

Dentro de los mecanismos de resistencia a β -lactámicos hallamos: alteraciones en el sitio blanco de acción, impermeabilidad y eflujo, y finalmente producción de β -lactamasas (Vignoli *et al.* 2019).

1. Alteraciones en el sitio blanco de acción:

1.1 Producción de nuevas PBPs de baja afinidad por el antibiótico: estas nuevas PBPs son funcionalmente activas y reemplazan la acción de las PBP originales. Ejemplo, producción de PBP2' en *Staphylococcus aureus* (Vignoli *et al.* 2019)

1.2 Modificación de PBPs: las modificaciones en las PBP originales genera la formación de variantes de baja afinidad por los β -lactámicos. Se pueden dar por la producción de eventos de recombinación interespecie como ocurre en *Streptococcus pneumoniae* (Vignoli *et al.* 2019).

2. Impermeabilidad y eflujo: El más importante y estudiado se produce en bacilos Gram negativos, y es debido a la aparición de mutantes deficientes en una o más porinas de la membrana externa. En Enterobacterales se ha reportado resistencia a carbapenems mediado por la interacción de alteraciones de porinas y/o presencia de β -lactamasas de espectro extendido (Vignoli *et al.* 2019).

3. Producción de β -lactamasas: Este es el mecanismo de resistencia más relevante desde el punto de vista clínico y epidemiológico en bacilos Gram negativos, y consiste en la hidrólisis enzimática del β -lactámico. Según criterios estructurales, estas enzimas se clasifican en cuatro clases: clase A, B, C y D. Aquellas pertenecientes a las clases A, C y D son serin-enzimas, caracterizadas por la presencia de una serina en el sitio activo, que media la reacción de hidrólisis. Por su parte, las enzimas de clase B tienen una o dos moléculas de zinc asociadas al sitio activo, por lo que se las considera metalo- β -lactamasas (MBL) (Halat *et al.* 2020).

En las cuatro clases de enzimas antes mencionadas, se encuentran variantes capaces de hidrolizar oximino-cefalosporinas, mientras que sólo las de clase B y algunas pocas variantes de las clases A y D alcanzan a hidrolizar carbapenems denominándose carbapenemasas (Halat *et al.* 2020).

En este sentido, existen carbapenemasas de clase A, tales como, *Guiana extended spectrum* (GES), denominada así por su país de origen. Asimismo, una carbapenemasa de clase A de gran relevancia clínica es la llamada *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC). Dicha enzima posee una diseminación mundial y ha sido identificada en las diferentes enterobacterias relacionadas al ámbito de la salud, principalmente en *Klebsiella pneumoniae* (Vera-Leiva *et al.* 2017). Por otro lado, dentro de las carbapenemasas de clase B encontramos a la enzima *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase* (VIM) y la enzima Nueva Delhi Metalo- β -lactamasa. Dicha enzima fue reportada por primera vez en 2008 en Nueva Delhi que al igual que la KPC, posee una diseminación mundial. Sin embargo, a diferencia de las carbapenemasas de clase A, esta enzima no es capaz de hidrolizar monobactámicos como el aztreonam (Correa *et al.* 2017) (Vera-Leiva *et al.* 2017).

Las β -lactamasas de mayor relevancia clínica son las carbapenemasas, pudiendo estar codificadas tanto a nivel cromosómico como por genes mediados por plásmidos. Estas enzimas representan las β -lactamasas más potentes, que hidrolizan una amplia variedad de β -lactámicos, incluidos los carbapenems, y dependiendo de la variante también hidrolizan cefalosporinas, penicilinas y aztreonam. Los principales problemas asociados a la producción de carbapenemasas son clínicos, dado que comprometen la actividad de los antibióticos de último recurso utilizados para tratar infecciones graves, y además epidemiológicos, debido a su diseminación en diversas bacterias de casi todas las regiones geográficas (Halat *et al.* 2020).

La aparición de resistencia a quinolonas en aislamientos productores de β -lactamasas representa un problema de gran preocupación y un desafío en el manejo clínico de infecciones. La existencia de un vínculo reconocido entre la resistencia a quinolonas y las β -lactamasas en enterobacterias, se relaciona a vehículos genéticos como lo son los integrones, los cuales se discutirán a continuación (Halat *et al.* 2020).

Mecanismos de diseminación de resistencia antimicrobiana

Los elementos genéticos móviles (EGM) son elementos que promueven la movilidad de ADN intra e intercelular. Dichos elementos suelen estar presentes en múltiples copias en diferentes ubicaciones del genoma bacteriano y también pueden facilitar la recombinación homóloga (intercambio de secuencias entre segmentos idénticos o relacionados). Los mecanismos intracelulares de intercambio genético incluyen a los procesos de conjugación (mediada por plásmidos), transducción (mediada por fagos bacterianos) y transformación (captación de ADN extracelular) (Partridge *et al.* 2018). Asimismo, existen unas estructuras denominadas integrones que actúan adquiriendo, almacenando, disponiendo y recurriendo a los marcos de lectura en elementos móviles denominados casetes (Sabbagh *et al.* 2021). Es importante destacar que las interacciones entre transposones, plásmidos e integrones transfieren genes de resistencia en bacterias a través de los mecanismos mencionados y sustentan la rápida evolución de diversos microorganismos multidrogoresistentes (Partridge *et al.* 2018) (Varsha *et al.* 2023).

Plásmidos

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN de doble cadena, extracromosómico que se encuentran en múltiples microorganismos de los dominios Bacteria y Archaea (Shintani *et al.* 2015). Estas moléculas son transmisibles mediante el mecanismo de conjugación, siendo uno de los

mecanismos más eficaces para propagar elementos genéticos entre bacterias. Es por esto que los plásmidos son considerados los “vehículos” más importantes para la comunicación bacteriana de la información genética, lo que facilita la evolución y rápida capacidad adaptativa de las bacterias (Shantini *et al.* 2015).

Aunque el ADN plasmídico no contiene información genética vital para la bacteria, sí posee genes que modifican sus propiedades fenotípicas, mejorando su supervivencia y patogenicidad al codificar mecanismos de resistencia a antibióticos o factores de virulencia, respectivamente, entre otros (Bado *et al.* 2008).

Los plásmidos pueden clasificarse según: la clase de genes que contiene (resistencia antibiótica, virulencia, etc); grupo de incompatibilidad (IncA/C, IncH, etc); o su capacidad de transferirse de una célula a otra (Sussmann *et al.* 2020).

Con respecto a este último criterio hallamos tres grandes grupos:

2 1. Plásmidos conjugativos: Son los únicos capaces de mediar el proceso de conjugación. Presentan una región de transferencia, la cual contiene toda la información necesaria para la conjugación, y se subdivide en dos subregiones llamadas *mob* y *tra*, respectivamente. La región *mob* posee el *oriT* (origen de transferencia) y los genes *mob*, mientras que la región *tra* posee a los genes que codifican para el *pili*, el puente intercelular y la regulación de la transferencia. Es imprescindible para que un plásmido sea conjugativo, que éste porte la región de transferencia completa (Madigan *et al.* 2018) (Sussmann *et al.* 2020).

2. Plásmidos movilizables: poseen la secuencia necesaria para permitir su transferencia, pero ellos mismos no codifican las proteínas necesarias para ser transferidos (Madigan *et al.* 2018) (Sussmann *et al.* 2020).

3. Plásmidos no-conjugativos: No poseen el *oriT* o éste no es funcional, y por ende son incapaces de transferirse en absoluto. (Madigan *et al.* 2018) (Sussmann *et al.* 2020).

Integrones

Como fue mencionado previamente, los integrones son estructuras que actúan mediante el almacenamiento, disponiendo y recurriendo a los marcos de lectura en estructuras denominadas genes casete. Es importante mencionar que cuando hablamos de genes casete nos referimos a pequeños EGM que no son capaces de movilizarse por sí mismos y que generalmente incluyen un único gen u *Open Reading Frame* (ORF) y un sitio de recombinación corriente abajo denominado 59-be, que constituye un sitio de unión para la integrasa o *attC*. (Hall 2013). De esta manera se dice que median la rápida evolución de las bacterias y su gran capacidad para adquirir diversos genes de resistencia (Sabbagh *et al.* 2021). De manera general, podemos dividir a estos elementos en:

a. Integrones móviles (IMs): Los IM tienen un número reducido de genes casete, suelen codificar la resistencia a antibióticos, tienen diferentes sitios *attC* y su movilidad depende de transposones o plásmidos.

b. Superintegrones (SI): tienen múltiples genes casete y sitios *attC* homogéneos y además se localizan en el cromosoma. Estos integrones se dividen en tres grupos basados en la filogenia de los genes *intl*, que codifican para la proteína integrasa.

De la totalidad de clases descritas de integrones hasta el momento sólo cuatro están asociadas a aislamientos clínicos. Como ya se mencionó, la secuencia de aminoácidos del gen de la integrasa se utiliza como marcador para clasificar los integrones en diferentes clases, y los miembros que tienen la misma integrasa pertenecen a la misma clase, pero pueden portar diferentes genes casete (Sabbagh *et al.* 2021).

Estructuralmente, la totalidad de los integrones constan de dos componentes principales, el segmento conservado 5' y 3' y una región variable central entre la zona 5' y 3' (en la que los integrones son responsables de la captura y expresión de genes exógenos). Los componentes esenciales de dicha región 5' y 3' en todos los integrones incluyen:

1. El gen codificante para la integrasa (*intl*), una recombinasa sitio específica (Figura 5) (Sabbagh *et al.* 2021).

2. El sitio receptor *attI*, identificado por la integrasa y ubicado corriente arriba del gen *intl* (Figura 5) (Sabbagh *et al.* 2021).

3. Una secuencia promotora que consiste en *P_c* y *P_{int}*; situada dentro de *intl* o entre *intl* y *attI* y cuya función es la expresión de los genes casete insertos en estos integrones, y la integrasa (Sabbagh *et al.* 2021)

El segmento conservado 3' de los integrones posee diferentes estructuras que difieren en las distintas clases de integrones. Además, los genes casete se sitúan entre la zona 5 y 3 donde los integrones son capaces de recibir nuevos genes a través de estos (Figura 5) (Sabbagh *et al.* 2021)

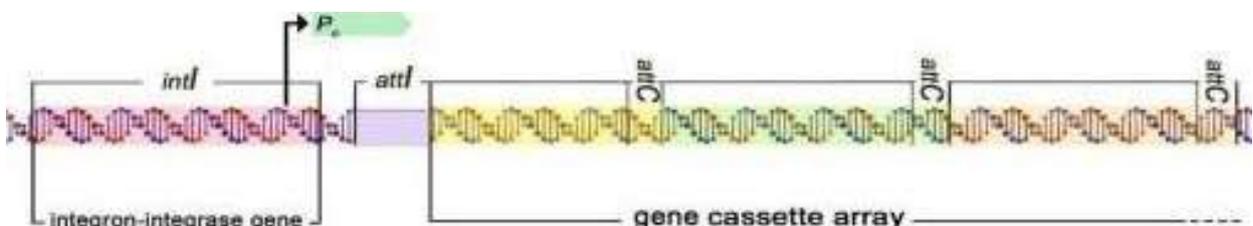


Figura 5. Esquema de la estructura general de un integrón. *intl*: gen codificante para la integrasa; *attI*: sitio de recombinación; *attC*: sitio de recombinación asociados a casetes; *P_c*: promotor (Sabbagh *et al.* 2021).

En lo que respecta a integrones clase 1, estos son los encontrados con mayor frecuencia en comparación con el resto de clases. Intl es capaz de identificar tres tipos de sitios de recombinación (*attI*, *attC* y sitios secundarios). Por lo tanto, estos tipos de integrones son capaces de recibir múltiples genes casetes a través de la recombinación de sitios específicos (Sabbagh *et al.* 2021). La prevalencia de este tipo de integrones es de entre el 22% al 55% entre los Gram negativos aisladas de diversos aislamientos clínicos, entre los que se incluyen los géneros *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, entre otros (Sabbagh *et al.* 2021).

A su vez, estos integrones actúan como factor común en la distribución y propagación de la resistencia antimicrobiana portando más de 40 genes de resistencia relacionados a aminoglucósidos, β -lactámicos, cloranfenicol, macrólidos, sulfonamidas, entre otros. El segmento 3' conservado en los integrones clase 1 consta de los siguientes componentes: 1. Gen *qacE Δ 1*, que codifica la resistencia a sales de amonio cuaternario y dextrofenil; 2. Gen *sul1*, que codifica la resistencia a sulfonamidas; 3. *orf5*, no tiene función conocida, pero se cree es similar a la acetil-transferasa de puromicina hallada en *Streptomyces albonier* (Figura 6) (Sabbagh *et al.* 2021).

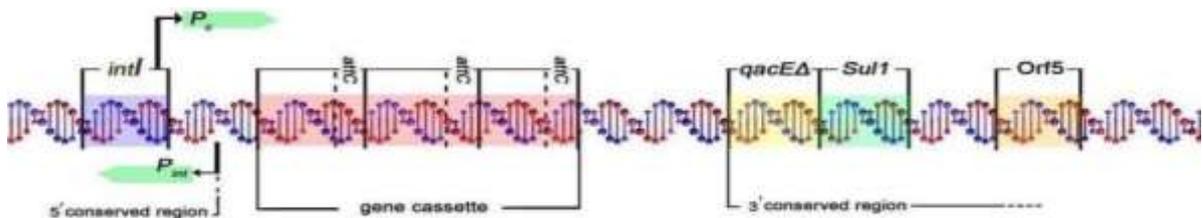


Figura 6. Estructura general de un integrón clase 1 (Sabbagh *et al.* 2021).

Es importante destacar que cuando un integrón clase 1 se encuentra asociado a secuencias de inserción que contienen una región común (ISCR), estos se denominan integrones clase 1 complejos (Rui *et al.* 2018).

En lo que respecta a las secuencias de inserción ISCR, éstas pertenecen a una extensa familia de elementos similares a IS91 y se cree que probablemente movilizan secuencias de ADN adyacentes mediante un mecanismo denominado "replicación en círculo rodante" (Rui *et al.* 2018). Este potente mecanismo de movilización proporciona a diversos genes de resistencia un vehículo genético altamente móvil para transferirse entre diferentes especies bacterianas y por ende se cree que desempeñan un papel muy importante en la diseminación de mecanismos de resistencia antibiótica y la aparición de microorganismos multidrogoresistentes (Rui *et al.* 2018).

Por otra parte, los integrones clase 2 poseen una alta prevalencia en aislamientos clínicos en bacterias Gram negativas como *Acinetobacter* sp, *Shigella* sp, *Salmonella* sp, *Pseudomonas* sp, entre otras. Los integrones de clase 2 contienen genes casete que incluyen *dfrA1* (dihidrofolato reductasa), *sat1* (estreptotricina-acetiltransferasa) y *aadA1* (aminoglucósido adenil-transferasa) los cuales confieren resistencia a trimetoprim, estreptomina y estreptomina/espectinomicina, respectivamente. Por otra parte, el gen *ereA* (eritromicina esterasa) también se ha encontrado en integrones clase 2. El gen de la integrasa en los integrones de clase 2 es casi un 46% similar al gen de la integrasa hallada en los integrones clase 1 (Sabbagh *et al.* 2021).

Una de las diferencias más importantes entre ambos integrones es que el gen *intl2* detiene antes su transcripción por los codones finales (TAA), lo que provoca la desactivación de la síntesis de proteína de 178 aminoácidos. Por ende, los integrones de clase 2 no solo son más débiles que los de clase 1 a la hora de mover los genes casete, sino que también son estructuras más conservadas (Sabbagh *et al.* 2021).

Antecedentes en Uruguay

Previamente se han realizado diversos estudios en base a la búsqueda de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas en nuestro país. En 2011 se estudió la corresponsión a β -lactámicos (por la presencia de BLEE) y a fluoroquinolonas (por la presencia de genes *qnr* y *aac(6)'-Ib*) en 368 aislamientos de enterobacterias obtenidos en 2009 en el Hospital Pediátrico Pereira Rossell (García-Fulgueiras *et al.* 2011). En dicho estudio se encontró que diversos aislamientos eran portadores de genes *bla_{CTX-M}*, así como de genes *qnr*, y en ciertos aislamientos se detectaron de manera conjunta (García-Fulgueiras *et al.* 2011).

Por otra parte, en 2011 se analizaron distintas cepas obtenidas del tracto gastrointestinal de pacientes internados en el Hospital de Clínicas. En dicho estudio se halló que más de la mitad de las cepas estudiadas presentaban genes *qnr* y genes *bla_{CTX-M}*, además de la detección de integrones de clase 1 y clase 2 asociados. Dos de ellos correspondían a integrones de clase 1 complejos, y a su vez se describió por primera vez la secuencia de inserción IS5 en un integrón clase 2, hallada en 10 aislamientos (Bado *et al.* 2010).

Asimismo, en 2017 se analizó un aislamiento clínico de *Citrobacter freundii* productora de una MBL, obtenida en el Hospital de Clínicas, con el fin de caracterizar los mecanismos subyacentes responsables de la resistencia a oximino-cefalosporinas y a quinolonas. Mediante ensayos moleculares se

detectó la presencia del gen *bla*_{NDM-1} junto a *qnrVC6* y a *aac(6')-Ib-cr*. Particularmente, *qnrVC6* se encontró formando parte de un integrón complejo de clase 1, siendo la primera descripción de este gen en un aislamiento productor de una carbapenemasa de tipo NDM-1 (Bado *et al.* 2018).

Por otra parte, se realizó un estudio cuyo objetivo fue caracterizar todas las enterobacterias productoras de carbapemasas provenientes del Hospital de Clínicas en el periodo 2012-2016. Se analizaron 8364 aislamientos, de los cuales solo 12/8364 presentaron producción de carbapenemasas. A su vez, 10/12 portaban el gen *bla*_{NDM-1}, un aislamiento portaba el gen *bla*_{VIM-2} y uno el gen *bla*_{KPC-2} (Papa-Ezdra *et al.* 2020). Asimismo, diez aislamientos estaban asociados a integrones de clase 1 y se descubrió un nuevo arreglo genético, que portaba *bla*_{VIM-2-dfrA7}, llamado In1678 (Papa-Ezdra *et al.* 2020).

De las seis cepas que portaban integrones pertenecientes a In907, 6/6 estaban asociadas a *bla*_{NDM-1}, y 4/6 a *qnrVC* y *aac(6')-Ib*. Además, se hallaron asociaciones de mecanismos de resistencia entre carbapenemasas y distintos genes de resistencia a aminoglucósidos (*aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr*), β-lactámicos (*bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-15}) y fluoroquinolonas (*qnrA1*, *qnrB1*, *qnrD1*, *qnrVC*, *aac(6')Ib-cr*) (Papa-Ezdra *et al.* 2020).

En vista a la relación entre la presencia de carbapenemasas y mecanismos de resistencia transferible a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos, nos planteamos la siguiente hipótesis y nos propusimos llevar a cabo los objetivos a continuación.

3. Hipótesis

Las Enterobacterias portadoras de carbapenemasas provenientes de muestras clínicas del Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela" en el período 2017-2019 presentan mecanismos de resistencia transferible a fluoroquinolonas y elementos genéticos móviles.

4. Objetivos

Objetivo general

- Caracterizar los mecanismos de resistencia transferible a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos portadores de carbapenemasas.

Objetivos específicos

- Buscar de genes de resistencia transferible a fluoroquinolonas, b lactámicos y fosfomicina.
- Determinar el entorno genético de los mismos y su presencia en plásmidos conjugativos.
- Estudiar el perfil de susceptibilidad de los aislamientos frente a distintos grupos de antibióticos.

5. Metodología

5.1 Cepas bacterianas e identificación

Se trabajó con 32 enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) provenientes de muestras clínicas de pacientes internados en el Hospital de Clínicas, entre el año 2017 y 2019 (Tabla 1).

A su vez, las mismas fueron identificadas mediante MALDI-TOF y sistema automatizado VITEK®2 *Compact System* (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Todos los aislamientos fueron conservados en caldo Luria Bertani (LB) con glicerol al 30% en freezer a -80°C.

5.2 Ensayos de susceptibilidad antibiótica

El estudio de sensibilidad fue realizado mediante el sistema automatizado VITEK®2 *Compact System* (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) y antibiograma por disco difusión de Kirby-Bauer, siguiendo las normas del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI 2020).

Este último, se trata de un método cualitativo, ya que no proporciona valores de concentración inhibitoria mínima (CIM), solamente categoriza al microorganismo

en resistente, sensible o si presenta resistencia intermedia a un determinado antimicrobiano.

Dicha técnica es estandarizada y además la CLSI establece ciertas recomendaciones para realizar e interpretar el método, de forma tal que los resultados sean reproducibles y comparables.

Los parámetros a estandarizar recomendados por la CLSI son: 1) Tipo de bacterias e inóculo: Las condiciones en que se realiza dependen de la velocidad de crecimiento de la cepa, sus exigencias nutricionales, y requerimientos atmosféricos. El inóculo recomendado es una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente al 0,5 en la escala Mc Farland (1.5×10^8 UFC/ml). 2) Medio de Cultivo: El medio utilizado para las pruebas de sensibilidad de rutina es el agar Mueller Hinton (MH) y se deben utilizar placas con un grosor de 3-5 mm de este medio para evitar resultados falsos de resistencia y/o sensibilidad. 3) Antibióticos: se debe chequear la fecha de vencimiento de los mismos y mantenerlos refrigerados hasta al menos una hora antes de su uso. 4) Condiciones de incubación y control de calidad: La temperatura oscilará entre 35-37°C y el tiempo de incubación es de 18 a 24 horas. Asimismo, el control de calidad se realiza en paralelo con cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) con valores de susceptibilidad conocidos (CLSI 2020).

Los antibióticos testados correspondieron a: meropenem (MEM), imipenem (IPM), ertapenem (ETP), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), aztreonam (ATM), gentamicina (CN), amikacina (AK), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), ciprofloxacina (CIP) y tigeciclina (TIG).

Con el fin de detectar fenotípicamente la presencia de carbapenemasas se realizó la colocación estratégica de discos (test de sinergia) donde se sitúa en el centro un agente inhibidor de β -lactamasas (ácido borónico, Britania®, o EDTA, Britania®), y a ambos lados, discos de meropenem 10 μ g (Oxoid®) e imipenem 10 μ g (Oxoid®), respectivamente. En caso de obtener un test de sinergia positivo, se observará un agrandamiento de los halos del lado del inhibidor (Figura 7).



Figura 7. a) Test de sinergia entre discos de MEM-EDTA-IPM. El agrandamiento del halo indica un test de *screening* positivo para una carbapenemasa de clase B (ej. NDM, VIM). b) Test de sinergia entre discos de MEM-ácido borónico (BOR)-IPM. El agrandamiento del halo indica un test de *screening* positivo para una carbapenemasa de clase A (ej. KPC).

Por otro lado, se determinó la CIM a colistina y fosfomicina mediante dilución en agar.

Para el caso de la colistina, se utiliza el “Colistin Agar Test” (CAT). Dicha técnica consistió en la siembra de una estría de una dilución 1:10 de una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente a un 0,5 Mc Farland en medios de Mueller-Hinton (MH) suplementado con distintas concentraciones de colistina sulfato (0, 1, 2 y 4 µg/ml). Los resultados fueron observados luego de una incubación a 37°C por 18-24 horas (CLSI 2021).

En lo que respecta a la fosfomicina, para la determinación de su CIM también se utiliza un método de agar dilución. Para ello se sembraron 600µl una dilución 1:20 de una suspensión bacteriana equivalente a un 0,5 Mc Farland en medio MH suplementado con fosfomicina y glucosa-6-fosfato (25 µg/ml); con concentraciones de dicho antibiótico desde 0,25 hasta 256 µg/ml. También se incluyeron dos placas de MH sin antibiótico como pre y post controles de viabilidad. Todas las placas se realizaron por duplicado e incubadas a 37°C por 18-24 horas (EUCAST 2023).

El control de calidad se realizó con una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

5.3 Amplificación de los genes *qnr*, *aac(6′)-Ib*, *bla_{CTX-M}* y *fosA*

5.3.1 Extracción de ácidos nucleicos mediante shock térmico

Cada una de las cepas fue aislada en medio Tripteina Soya Agar (TSA) suplementado con ceftazidime (2 µg/ml) y tras 24 horas de incubación a 37°C, se tomaron 3-4 colonias y se suspendieron en 200 µl de agua calidad molecular (mili-Q). Posteriormente, dichas suspensiones fueron sometidas a una temperatura de 100°C en baño seco durante 10 minutos, y luego a una de congelamiento a -20°C durante 5 minutos. Finalmente, éstas se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 rpm, y se conservó el sobrenadante en un nuevo tubo para mini centrífuga Eppendorf con el fin de ser utilizados como molde para las posteriores reacciones de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas las extracciones de ADN fueron conservadas en freezer a -20°C.

5.3.2 Búsqueda de genes *qnr* (A-E, S y VC), *aac(6′)-Ib*, *bla_{CTX-M}* y *fosA*

A la totalidad de las cepas se les realizó la búsqueda de genes de resistencia transferible a fluoroquinolonas mediante PCR con cebadores específicos para

los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrVC*, *qnrS*, *qnrE* y *aac(6')-Ib* (y posterior búsqueda de la variante *cr*).

Se utilizó un protocolo genérico de PCR para todas las reacciones donde el volumen final de reacción fue de 25 µl con las siguientes concentraciones finales: Taq Buffer Thermo Scientific (NH₄)₂SO₄ al 1X, dNTPS al 0.2 mM, MgCl₂ al 2 mM, cebadores *forward* y *reverse* 0.5 µM, enzima Taq polimerasa a 0.025 U, 2.5 µl de ADN molde y agua miliQ.

Las reacciones se realizaron en un termociclador, comenzando con un paso de desnaturalización a 94°C por 10 minutos y continuando con 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a temperaturas específicas para cada cebador (Tabla 1) durante 1 minuto, y polimerización a 72°C a 1 minuto, y finalizando con un periodo de extensión final a 72°C por 10 minutos. Asimismo, para cada ensayo de amplificación, se incluyeron controles positivos, negativos y de mezcla para cada gen específico.

Además, en aquellos aislamientos *qnr* positivos se les realizó la búsqueda de genes de resistencia transferible a fosfomicina (genes *fosA*) y β-lactamasas de espectro extendido (*bla_{CTX-M}*) (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores utilizados para la búsqueda de genes *qnr*, *aac(6')-Ib*, *fosA* y *bla_{CTX-M}* mediante amplificación por PCR.

Gen	Cebadores	Secuencia	Temperatura de hibridación	Tamaño del amplicón
<i>qnrA</i> (35)	qnrA F qnrA R	atttctcacgccaggatttg gatcggcaaaggttaggtca	53°C	516pb
<i>qnrB</i> (71)	qnrB F qnrB R	gatcgtgaaagccagaaagg acgacgcctggtagtgtcc	52°C	469pb
<i>qnrC</i> (71)	qnrC F qnrC R	gggtgtacattattgaatc cacctaccattatttca	50°C	307pb
<i>qnrD</i> (12)	qnrD F qnrD R	cgagatcaatttacggggaata aacaagctgaagcgctg	51°C	580pb
<i>qnrE</i> (15)	qnrE F qnrE R	ggcattgattttgaaggcga gtgggtaaaattggccgctc	55°C	516pb
<i>qnrS</i> (55)	qnrS F qnrS R	acgacattcgtaacctgcaa taaattgacacctgtaggc	53°C	417pb
<i>qnrVC</i> (5)	qnrVC F qnrVC R	atggaaaaatcaaagcaatt ttagttaggaacaatgatta	46°C	656pb
<i>aac</i> (50)	aac F aac R	ttgcgatgctctatgagtggtca ctcgaatgctggcggttt	55°C	481pb
<i>fosA</i> (15)	fosA F fosA R	atctgtgggtctgcctgtcgt atgcccgcattagggtctct	56°C	271pb
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	CTX-M-1 F	cccatggttaaaaaatcactg	54°C	450pb

(36)	CTX-M-1 R	gctagccgggccgccaacgtga		
<i>bla</i> _{CTX-M-2} (17)	CTX-M-2 F CTX-M-2 R	ttaatgatgactcagagcatt gatacctcgctccatttattgc	51°C	875pb
<i>bla</i> _{CTX-M-3} (38)	CTX-M-3 F CTX-M-3 R	acctgattaactacaatcccat actttctgccttctgctctggc	55°C	514pb
<i>bla</i> _{CTX-M-4} (38)	CTX-M-4 F CTX-M-4 R	gctggagaaaaagcagcggag gtaagctgacgcaacgtctg	57°C	473pb
<i>bla</i> _{CTX-M-25} (11)	CTX-M-25 F CTX-M-25 R	agaaaaagcgtaaggcgggc ccgctcggtgacaattctggc	52-56 °C	862pb
<i>bla</i> _{NDM} (44)	NDM-1 F NDM-1 R	ggtttggcgatctggttttc cggaatggctcatcacgatc	56°C	620pb
<i>bla</i> _{KPC} (52)	KPC F KPC R	aacaaggaatatcgttgatg agatgatttcagagcctta	50°C	915pb
<i>bla</i> _{VIM} (31)	VIM F VIM R	taggaattcccatgttcaaacttttgagtaagt ataaagcttagctactcaacgactgagcga	55°C	800pb

F: cebador *forward*; R, cebador *reverse*; pb, pares de bases.

5.3.3 Determinación del entorno genético

A su vez, en aquellas cepas *qnr* + se llevó a cabo la búsqueda de integrones de clase 1 y 2, y del elemento *ISCR1* para lo cual se hicieron ensayos de PCR con cebadores específicos para los genes codificantes (Tabla 2). También se estudió la presencia de regiones variables de integrones de clase 1, comprendidas entre las regiones conservadas 5' y 3' (3'CS y 5'CS) donde suelen insertarse los genes en forma de casetes (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores utilizados para la búsqueda de los genes *int11* e *int12*, *ISCR1* y región variable mediante amplificación por PCR.

Gen	Cebadores	Secuencia	Temperatura de hibridación	Tamaño del amplicón
<i>Int11</i> (17)	I5 I3	accgccaactttcagcacat gcgttcggtaaggttctgg	59°C	928pb
<i>Int12</i> (4)	int12 F int12 R	ttattgctgggattaggc acggctaccctctgttatc	54°C	232pb
<i>ISCR1</i> (69)	F12R ORFend	aaaccagcatggttggttac ccgtaagctcttatgtggg	54°C	1210pb
RV de Int11	5CS	ggcatccaagcagcaagc	56°C	Variable

(17)

3CS

aagcagacttgacctgat

F: cebador *forward*; R, cebador *reverse*; pb, pares de bases.

5.4 Visualización de los productos mediante electroforesis en gel de agarosa

Los amplicones previamente obtenidos fueron analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X (Tris Base 89mM; Ácido Bórico 89mM; EDTA 25mM, pH 8). A dichos productos se les adicionó buffer de carga 6X (0.25% azul de Bromofenol, 30% glicerol) a una concentración final de 1X, y a su vez se utilizaron marcadores de peso molecular comercial (InvitrogenTM, Life Technologies) de 100 a 1000 pares de bases (pb) con el fin de estimar el tamaño de los productos amplificados.

Posteriormente, el gel inmerso en TBE, fue sometido a un campo eléctrico de 120V por una hora en una cuba de electroforesis, donde las muestras se separaron según su tamaño. Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel fue sumergido por aproximadamente 15-20 minutos en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y luego expuesto a un transiluminador UV para observar los resultados obtenidos.

5.5 Detección de la variante *aac(6')-Ib-cr*

En aquellos aislamientos que portaban el gen *aac(6')-Ib*, se llevó a cabo un ensayo de restricción con el fin de determinar si se trataba de la variante alélica, *aac(6')-Ib-cr*. Primeramente, se realizó un ensayo de PCR para la detección del gen *aac(6')-Ib* y una posterior electroforesis en gel de agarosa al 1% para la visualización del mismo. Luego, se realizó una mezcla conteniendo: 2 µl de la enzima BseGI (Invitrogen) diluida al 1/10, 1 µl de buffer (Tango), 5 µl agua miliQ y 2 µl del ADN previamente amplificado; la cual fue incubada a 55°C durante 3 horas. Finalmente, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Park *et al.* 2006).

5.6 Secuenciación

La identidad de los productos amplificados fue confirmada mediante secuenciación. Para ello los productos de amplificaciones fueron purificados utilizando el kit comercial DNA Clean & Concentrator-5 (ZymoResearch) siguiendo las instrucciones del fabricante, y luego secuenciados por el Servicio

de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo o por el servicio de secuenciación de Macrogen. El análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo con el programa Chromas Lite 2.1 y cotejadas con la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mediante la herramienta Nucleotide BLAST.

5.7 Ensayos de conjugación

Se realizaron ensayos de conjugación utilizando como cepa receptora *Escherichia coli* J53-2 (resistente a rifampicina, ornitina descarboxilasa negativa inmóvil, indol positivo). Se partió de un cultivo monomicrobiano de las cepas donantes y receptora, incubadas a 37°C durante 24 horas en medio MacConkey lactosa (MCL).

Estas fueron inoculadas en caldo LB e incubadas durante 3 horas a 37°C en agitación a 120 rpm. Posteriormente, se realizó una mezcla conteniendo 200 µl de cada cepa donante y 2000 µl de la cepa receptora la cual se incubó a 37°C por 24 horas.

A continuación, los caldos fueron plaqueados con rastrillo en medio MCL suplementado con 0,125 µg/ml de ciprofloxacina y 150 µg/ml de rifampicina e incubados a 37°C durante 18-24 horas. Los volúmenes utilizados para sembrar las placas fueron los siguientes: 10 y 100 µl de la mezcla de conjugación y 100 µl de un concentrado obtenido a partir del centrifugado de dicha mezcla a 4000 rpm durante 10 minutos, en la que se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet para luego inocularlo.

Aquellas colonias capaces de crecer en el medio conteniendo ambos antibióticos se consideraron transconjugantes y su identidad bacteriana fue confirmada mediante su siembra en medio MIO (movilidad-indol-ornitina). Mediante PCR se confirmó la presencia de los genes presentes en ellos.

En paralelo se llevaron a cabo controles de viabilidad mediante la siembra de las cepas donantes y receptora en medios MCL sin antibiótico y MCL conteniendo rifampicina y/o ciprofloxacina (Palencia-Gándara *et al.* 2021).

6. Resultados

6.1 Cepas bacterianas

Se partió de 32 aislamientos provenientes del Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela" obtenidas a partir de aislamientos clínico durante el período 2017-2019 de EPC, los cuales correspondían a: 14 *Klebsiella pneumoniae*, 6 *Enterobacter cloacae complex*, 4 *Citrobacter freundii*, 3 *Escherichia coli*, 2 *Proteus mirabilis*, y un aislamiento de *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii* y *Providencia rettgeri*. A su vez, 11 aislamientos provenían de muestras de orina, 10 de sangre periférica, 2 provenían de muestras óseas, 2 de líquido broncoalveolar, 2 de líquido ascítico, 2 fueron aislados de secreciones respiratorias, 1 de un hemocultivo, 1 de punta de catéter y, finalmente, un aislamiento provenía de una muestra de piel.

6.2 Ensayos de susceptibilidad antibiótica

En cuanto a los β -lactámicos, se observó que el 100% de las cepas fueron resistentes a meropenem, ceftazidime y cefotaxime, mientras que 97% presentaron resistencia a imipenem y ertapenem. Además, un 94% de los aislamientos fueron resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, en tanto que el 72% de los mismos lo fueron a ciprofloxacina, 66% a ceftazidime-avibactam, 59% a aztreonam y un 41% a gentamicina. Solamente el 9% de los aislamientos presentó resistencia a tigeciclina, y no se hallaron cepas resistentes a amikacina. Finalmente, un 6% de las cepas presentaron resistencia a fosfomicina y 5% fueron resistentes a colistina (Figura 8).

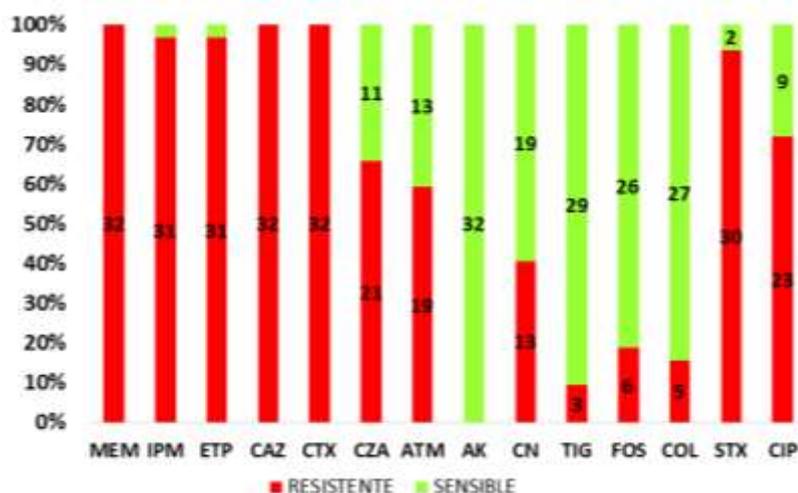


Figura 8. Se expresa el porcentaje de resistencia y sensibilidad antibiótica de los aislamientos estudiados. En los cuadros se indica el número de aislamientos. MEM, meropenem; IPM, imipenem; ETP, ertapenem; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; CZA, ceftazidime-avibactam; ATM, aztreonam; AK, amikacina; CN, gentamicina; TIG, tigeciclina; FOS, fosfomicina; COL, colistina; STX, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina.

Confirmación de presencia de carbapenemasas

Los aislamientos estudiados fueron previamente categorizados como EPC en el Departamento de Laboratorio Clínico (Área Microbiología, Hospital de Clínicas) mediante la utilización de sistemas automatizados VITEK®2 *Compact System*. Para confirmar estos resultados se procedió con la búsqueda fenotípica mediante test de sinergia y PCR, utilizando cebadores específicos.

En este sentido se encontró que 28 aislamientos portaron la enzima NDM-1, 3 la enzima KPC-2 y una cepa presentó la enzima VIM-2. Posteriormente se realizaron PCR con el fin de confirmar dichos datos obtenidos.

6.3 Amplificación de los genes *qnr* (A-E, S y VC), *aac(6')-Ib*, *bla_{CTX-M}* y *fosA*

Del total de aislamientos estudiados, 24/32 presentaron genes *qnr*, 13 presentaron únicamente el gen *qnrA*, 6 solamente *qnrB* y en 5 cepas se encontraron ambos genes. Además, se detectaron 8 aislamientos portadores del gen *aac(6')-Ib*, de los cuales 6 portaban genes *qnr*. Dichos resultados se visualizaron mediante geles de agarosa al 1%-(Figura 9) (Figura 10) (Figura 11) (Tabla 3).

La secuenciación de los productos de PCR, previamente amplificados, permitió constatar que la totalidad de los genes *qnrA* hallados pertenecían a la variante alélica *qnrA1* mientras que, en 9 de los 11 *qnrB* se trataba de la variante *qnrB1*, uno correspondía a la variante *qnrB2* y finalmente uno se trataba de *qnrB18* (Tabla 3).

Asimismo, 7/24 aislamientos presentaron genes *bla_{CTX-M}* grupo 1. Dichos resultados se visualizaron mediante geles de agarosa al 1% (Figura 13) (Tabla 3).

Mediante la secuenciación de estos productos se conoció que éstos correspondían al gen *bla_{CTX-M-15}*.

Finalmente, 2 de las cepas *qnr+* presentaron genes *fosA* (Figura 14) (Tabla 3). La secuenciación de dichos genes reveló que estos correspondían a la variante *fosA2*. También se realizó la búsqueda de otros mecanismos de resistencia a fosfomicina ofreciendo resultados negativos (datos no mostrados).

Tabla 3. Combinación de mecanismos de resistencia encontrados en los 24 aislamientos *qnr+*.

Cepa	Microorganismo	<i>qnr</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	Int1 / Int2	RV	ISCR1	Otros genes de resistencia
HC1 (NDM-1)	<i>E. cloacae complex</i>	<i>qnrA1</i>	-	Int1	<i>dfrA12-aadA2</i>	+	<i>fosA2</i>
HC2 (NDM-1)	<i>M. morgani</i>	<i>qnrA1</i>	-	Int1	<i>dfrA12-aadA2</i>	+	-
HC3 (NDM-1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrA1</i>	-	-	-	-	-
HC4 (NDM-1)	<i>E. coli</i>	<i>qnrA1</i>	-	-	-	-	-
HC5 (NDM-1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrA1</i>	-	Int1	<i>dfrA12-aadA2</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
HC6 (NDM-1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrA1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Int1	-	-	-
HC7 (NDM-1)	<i>P. rettgeri</i>	<i>qnrA1</i>	-	-	-	-	-
HC8 (NDM-1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrA1</i>	-	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
HC9 (NDM-1)	<i>E. coli</i>	<i>qnrA1</i>	-	-	-	-	-
HC10 (NDM-1)	<i>E. cloacae complex</i>	<i>qnrA1</i>	-	-	-	-	-
HC11 (NDM-1)	<i>E. cloacae complex</i>	<i>qnrA1</i>	-	-	-	-	<i>fosA2</i>
HC12 (NDM-1)	<i>P. mirabilis</i>	<i>qnrA1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Int1	<i>dfrA12-aadA2</i>	-	-
HC13 (NDM-1)	<i>K. oxytoca</i>	<i>qnrA1</i>	-	-	-	-	-
HC14 (NDM-1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrB1</i>	-	Int1	-	-	-
HC15 (NDM-1)	<i>C. freundii</i>	<i>qnrB18</i>	-	-	-	-	-
HC16 (NDM-1)	<i>E. cloacae complex</i>	<i>qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Int1	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
HC17 (NDM-1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrB1</i>	-	Int1	-	+	-
HC18 (KPC-2)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrB2</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Int1	<i>dfrA25</i>	+	-
HC19 (VIM-2)	<i>E. cloacae complex</i>	<i>qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Int1	<i>dfrA14-aadA1</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
HC20 (NDM-1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrA1/qnrB1</i>	-	Int1	<i>dfrA12-aadA2</i>	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
HC21 (NDM-1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrA1/qnrB1</i>	-	-	-	-	-
HC22 (NDM-1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrA1/qnrB1</i>	-	Int1	<i>dfrA12-aadA2</i>	+	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
HC23 (NDM-1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrA1/qnrB1</i>	-	Int1	<i>dfrA12-aadA2</i>	+	-
HC24 (NDM-1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrA1/qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Int1	<i>dfrA12-aadA2</i>	+	<i>bla</i> _{CTX-M-15}

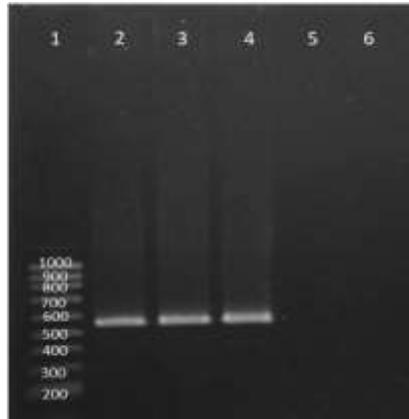


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el gen *qnrA*. Carriles: (1) Marcador de peso molecular 1kb Invitrogen™, Life Technologies; (2) Control positivo de *qnrA* (516 pb); (3) HC1; (4) HC2; (5) Control negativo para *qnrA*; (6) Control de mezcla.

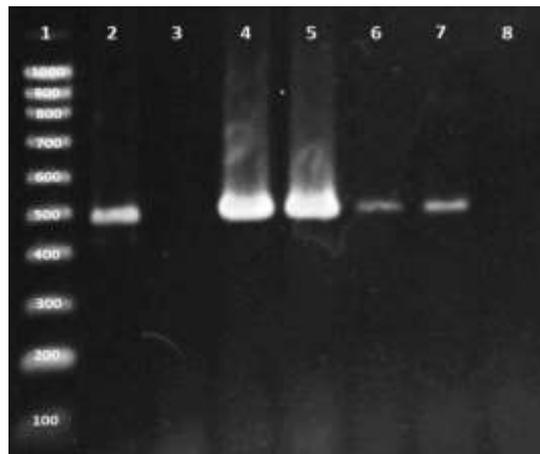


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el gen *qnrB*. Carriles: (1) Marcador de peso molecular 1kb Invitrogen™, Life Technologies; (2) Control positivo de *qnrB* (469 pb); (3) Control negativo de *qnrB*; (4) HC14; (5) HC15; (6) HC16; (7) H17; (8) Control de mezcla.



Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para el gen *aac(6')-Ib*. Carriles: (1) Marcador de peso molecular 1kb Invitrogen™, Life Technologies; (2) Control positivo de *aac(6')-Ib* (481 pb); (3) HC6; (4) HC12; (5) Control negativo de *aac(6')-Ib*; (6) Control de mezcla.

En lo que respecta al ensayo de restricción llevado a cabo en aquellas cepas *aac+*, éste arrojó que la totalidad de éstas presentaban la variante alélica *aac(6')-Ib-cr* (Figura 12). Cabe destacar que si los aislamientos presentan el gen *aac(6')-Ib* la enzima *BseGI* es capaz de digerir a dicho gen por lo cual se obtendrían dos bandas, una de 270 pb y una de 200 pb. Por el contrario, si los aislamientos presentan la variante alélica de este gen, *aac(6')-Ib-cr*, *BseGI* no es capaz de digerir a este y por consiguiente se observa una única banda correspondiente a 500 pb. Asimismo, si los aislamientos presentan al gen *aac(6')-Ib* en combinación con *aac(6')-Ib-cr* se obtienen 3 bandas de 200, 270 y 500 pb respectivamente (Park *et al.* 2006).



Figura 12. Digestión de los productos de PCR para el gen *aac(6')-Ib*. (1) Marcador de peso molecular 1kb Invitrogen™, Life Technologies; (2) Amplicón de *aac(6')-Ib* (481 pb); (3) Producto BseGI HC6; (4) Control de digestión de *aac(6')-Ib*, BseGI digiere (270y 200 pb); (5) Producto BseGI HC12; (6) Producto BseGI HC18; (8) Control *aac(6')-Ib* + *aac(6')-Ib-cr* K (500, 270 y 200 pb); (9) Producto BseGI HC19.

Asimismo, mediante secuenciación se pudieron corroborar los resultados del ensayo de restricción previamente realizado dado que el total de genes *aac(6')-Ib* encontrados, efectivamente correspondían a la variante *aac(6')-Ib-cr*.

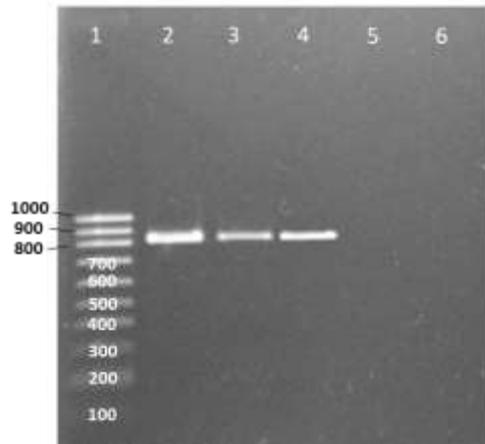


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el gen *bla*_{CTX-M-grupo 1}. Carriles: (1) Marcador de peso molecular 1kb Invitrogen™, Life Technologies; (2) Control positivo de *bla*_{CTX-M-grupo 1} (830 pb); (3) HC5; (4) HC16; (5) Control negativo para *bla*_{CTX-M-grupo 1}; (6) Control de mezcla.

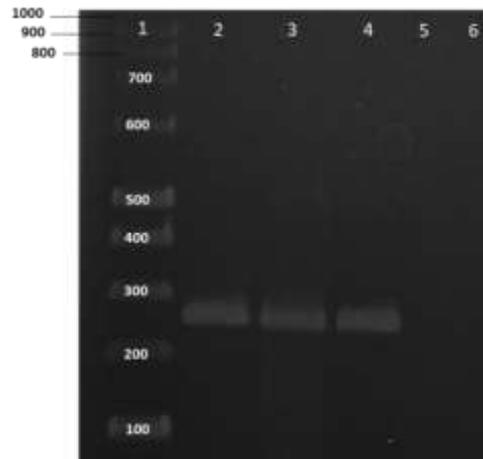


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el gen *fosA*. Carriles: (1) Marcador de peso molecular 1kb Invitrogen™, Life Technologies; (2) Control positivo de *fosA* (271 pb); (3) HC1; (4) HC11; (5) Control negativo para *fosA*; (6) Control de mezcla.

6.4 Determinación del entorno genético

Integrones

En primera instancia se realizó el estudio del entorno genético de los genes *qnr* previamente amplificados, mediante PCRs con cebadores para la amplificación de *int1* e *int2* (Figura 15).

De los 24 aislamientos *qnr+*, en 14 se detectó la presencia de integrones de clase 1, sin embargo, no se obtuvieron productos de amplificación para los genes codificantes de integrasas de clase 2.

Regiones variables

Asimismo, se llevó a cabo la búsqueda de regiones variables de integrones de clase 1 en aquellos *int1* positivos, observándose bandas correspondientes a regiones variables en 10 aislamientos con un tamaño de 800 pb y 1800 pb (Figura 16).

ISCR1

Además, en dichos aislamientos se buscó la presencia del elemento genético móvil ISCR1, encontrándose asociado a 10 de estos (Figura 17) (Tabla 3).

Finalmente, se buscó la combinación ISCR1-*qnrA* en la totalidad de las cepas *qnr+*, sin embargo, no se encontró en ninguna de éstas.

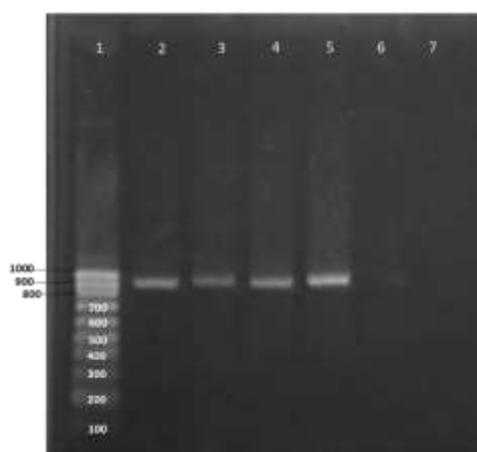


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para el gen *int1*. Carriles: (1) Marcador de peso molecular 1kb Invitrogen™, Life Technologies; (2) Control positivo de *int1* (928 pb); (3) HC1; (4) HC2; (5) HC5; (6) Control negativo de *int1*; (7) Control de mezcla.

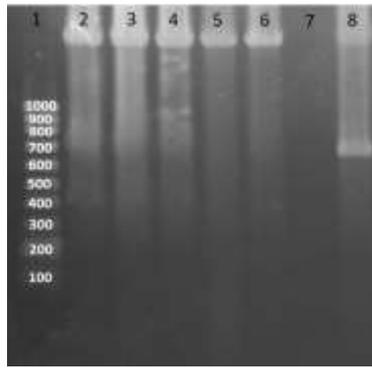


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de regiones variables. Carriles: (1) Marcador de peso molecular 1kb Invitrogen™, Life Technologies; (2,3,4,5,6) regiones variables mayores a 1000 pb. (8) Región variable de aproximadamente 800 pb.



Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el gen *ISCR1*. Carriles: (1) Marcador de peso molecular 1kb Invitrogen™, Life Technologies; (2) Control positivo de *ISCR1* (1210 pb); (3) HC1; (4) HC2; (5) Control negativo para *ISCR1*; (6) Control de mezcla.

Secuencias adyacentes

Con el fin de conocer aún más el entorno genético de los genes *qnr* hallados, se llevaron a cabo ensayos de PCR para determinar secuencias adyacentes a los mismos.

Asimismo, en el marco de un proyecto de investigación se llevaron a cabo estudios de secuenciación mediante un secuenciador Illumina MiniSeq™ Sequencing System, equipo de próxima generación (NGS), en dos cepas, HC1 (*qnrA1*) y HC14 (*qnrB1*). Esto nos permitió determinar el entorno genético de estos genes en particular. Posterior a esta secuenciación se utilizaron los programas *Center for Genomic Epidemiology* y luego el programa Proksee - *Genome Analysis* para la visualización gráfica de los resultados (*Center for*

Genomic Epidemiology 2011. <https://www.genomicepidemiology.org>) (Grant et al. 2023).

En cuanto a la cepa HC1, el nodo conteniendo el gen *qnrA1* fue el 229 y dicho gen presentó de manera adyacente, un gen de 1214 pb codificante para la resistencia a cloranfenicol denominado *cmlA5*. Dicho gen codifica para una proteína llamada “*chloramphenicol resistance protein*” perteneciente a la familia de bombas de eflujo “Superfamilia de facilitadores principales” (MFS) cuya función es exportar al antibiótico fuera de la célula bacteriana (Figura 18).

Por otro lado, con respecto a la cepa HC14, se halló que el gen *qnrB1* se encontraba en el nodo 52. Corriente abajo de éste se detectó el gen que codifica para la proteína YghA, oxidoreductasa con un tamaño de 615 pb, mientras que corriente arriba se encuentra el gen *pspF* de 387 pb, codificante de una transcriptasa de igual nombre. A su vez, se localizó al gen codificante para la Tn3 transcriptasa con un tamaño de 3018 pb y finalmente, dos proteínas hipotéticas de 354 y 240 pb, respectivamente (Figura 18).

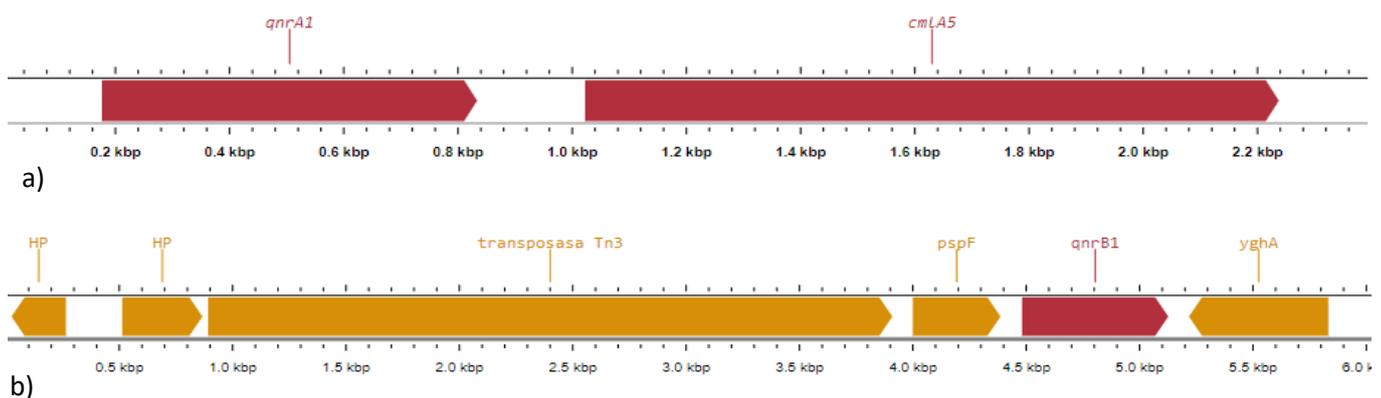


Figura 18. Representación esquemática del entorno genético de las cepas HC1 (18a) y HC14 (18b). HP: Proteína hipotética; *pspF*: Proteína de choque fágico F. El sentido de las flechas es análogo al sentido de los genes. En bordó se evidencian los genes de resistencia y en mostaza los genes codificantes para proteínas accesorias.

Por otro lado, la secuenciación de la región comprendida entre los extremos 5'CS y 3'CS en los 10 aislamientos permitió constatar que en 8 de estos se encontraba la combinación de genes casete *dfrA12-aadA2* (Figura 19a) correspondiente a 1800pb, tratándose del integrón In27. Asimismo, en un aislamiento se encontraba la combinación *dfrA14-aadA1* (Figura 19b) también correspondiente a 1800 pb y al integrón In387, y finalmente en otro aislamiento de 800 pb, se encontró al gen *dfrA25*, formando parte del Integrón In1305. (Figura 19c) (Tabla 3). Estas variantes *dfrA* y *aadA1*, otorgan resistencia a trimetoprim y estreptomicina/espectinomicina, respectivamente.

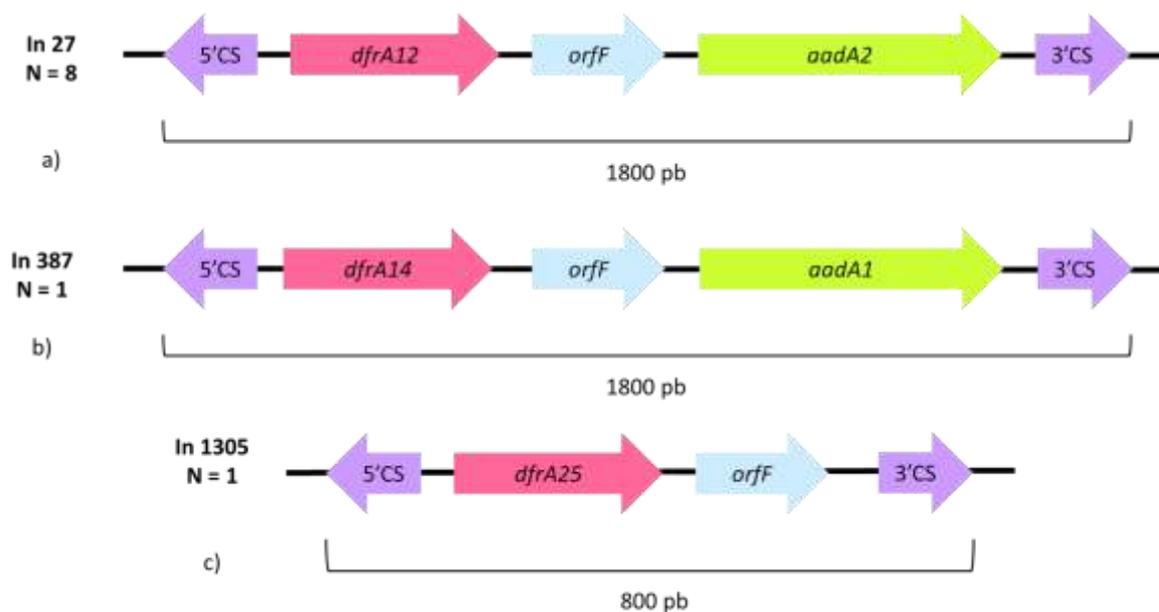


Figura 19. Representación esquemática de las regiones variables 5'CS y 3'CS. Cada flecha representa un gen con su respectiva orientación de transcripción. In refiere al número de integrón previamente descrito con estas mismas características.

6.5 Ensayos de conjugación

Con el fin de determinar si los genes de resistencia detectados se encontraban en plásmidos conjugativos, se realizaron ensayos de conjugación utilizando como donantes aquellas cepas *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* (+), y como cepa receptora *Escherichia coli* J53- 2.

De estos ensayos, se obtuvieron 7 transconjugantes (Tabla 4). En cuanto a la susceptibilidad antibiótica estudiada en las cepas de *Escherichia coli* transconjugantes, 5 de los aislamientos fueron resistentes a meropenem, imipenem, ceftazidime, ceftriaxona y cefepime. Además, 4 cepas presentaron resistencia a ciprofloxacina y aztreonam mientras que dos aislamientos presentaron resistencia intermedia a éste antimicrobiano. La totalidad de los aislamientos presentaron sensibilidad a amikacina, gentamicina y ceftazidime-avibactam. (Tabla 4).

El gen con mayor tasa de transferencia fue *qnrA1*, habiéndose encontrado en los 7 aislamientos. A su vez, el mecanismo de resistencia *qnrB1* se detectó en 2/2 microorganismos. Por otra parte, la variante *aac(6')-Ib-cr* solo fue transferida en un aislamiento de dos aislamientos, y los genes codificantes para las integrasas de clase 1 se encontraron en dos de las cepas estudiadas. Asimismo, el gen *bla_{CTX-M-15}* fue transferido exitosamente en el único aislamiento portador del mismo. Finalmente, la enzima NDM fue transferida en casi la totalidad de los aislamientos, hallándose en 5 de 7 de estos.

Tabla 4. Perfil de sensibilidad de la cepa receptora *Escherichia coli* J53-2 y transconjugantes.

Microorganismo	IPM	MEM	CAZ	CRO	FEP	ATM	CN	AK	CIP	CZA	Mecanismos de Resistencia	
											Donante	Transconjugante
<i>E.coli</i> J53- 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-
TC_HC3	R	R	S	S	R	I	S	S	R	S	QnrA1/NDM-1	QnrA1/NDM-1
TC_HC4	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	QnrA1/NDM-1	QnrA1
TC_HC7	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	QnrA1/NDM-1	QnrA1/NDM-1
TC_HC12	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	QnrA1/Aac(6')Ib-cr/NDM/DfrA12-AadA2	QnrA1/NDM/Aac(6')Ib-cr/DdfrA12-AadA2
TC_HC20	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	QnrA1/QnrB1/CTX-M-15/NDM-1/DfrA12-AadA2	QnrA1/QnrB1/CTX-M-15
TC_HC21	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	QnrA1/QnrB1/NDM-1	QnrA1/NDM-1
TC_HC24	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	QnrA1/QnrB1/ Aac(6')Ib-cr /NDM-1/DfrA12-AadA2	QnrA1/QnrB1/NDM-1/ DfrA12-aadA2

IPM: imipenem; MEM, meropenem; CAZ, ceftazidime; CRO, ceftriaxona; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; CN, gentamicina; AK, amikacina; CIP, ciprofloxacina; CZA, ceftazidime-avibactam.

7. Discusión

En el presente trabajo, se determinó a través de ensayos fenotípicos de sinergia utilizando EDTA como inhibidor, que 29 de los 32 aislamientos arribados al laboratorio como sospechosos de portadores de carbapenemasas presentaban una metalo-carbapenemasa. Posteriormente, mediante métodos moleculares, se estableció que la enzima predominante era del tipo NDM, encontrándose en 28 de esos 29 aislamientos, mientras que solo uno era del tipo VIM. A su vez, al utilizar ácido borónico como inhibidor, se detectó la presencia de tres carbapenemasas de clase A, que fueron caracterizadas molecularmente como KPC.

En cuanto al estudio de susceptibilidad, se observó que la totalidad de las cepas presentaban resistencia a al menos un β -lactámico (carbapenem, cefalosporina de tercera generación o monobactámico), además de demostrar resistencia a alguna otra familia de antibióticos. 30 aislamientos exhibieron resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, 23 a ciprofloxacina, 13 a gentamicina, 10 a colistina, 7 a fosfomicina y finalmente 3 aislamientos expresaban resistencia a tigeciclina. Esto indica que el 100% de los aislamientos exhibieron un perfil de multiresistencia (Magiorakos *et al.* 2012). Si bien el número de aislamientos estudiados es pequeño, se resalta la problemática de desafíos terapéuticos que enfrentan diariamente las unidades sanitarias. Esto dificulta considerablemente la administración de tratamientos antibióticos efectivos, teniendo como consecuencia probables fallas terapéuticas. Existen diversos reportes sobre fracasos en el tratamiento antimicrobiano inicial, debido a la resistencia primaria del agente infeccioso (Robino *et al.* 2013)

Continuando el estudio de los aislamientos portadores de genes *qnr*, se detectó la presencia de la gen *aac(6')-Ib* en 6 de los aislamientos que tras realizar ensayos de restricción y secuenciación se evidencio que se trataba de la variante *aac(6')-Ib-cr*. La presencia de estos genes y la expresión de los mismos es lo que podría explicar el alto grado de resistencia de los aislamientos a ciprofloxacina.

Asimismo, en 7 aislamientos *qnr+* se detectó el gen codificante para la BLEE *bla_{CTXM-Grupo-1}*, que mediante secuenciación se reveló que los 7 correspondían a *bla_{CTX-M-15}*. A pesar de que estos aislamientos portaban *bla_{NDM-1}*, presentaron resistencia a aztreonam. Es sabido que las carbapenemasas de clase B no presentan la capacidad de hidrolizar monobactámicos tales como el aztreonam (Correa *et al.* 2017) (Vera-Leiva *et al.* 2017) por lo cual la resistencia a dicho antibiótico en estos aislamientos se atribuye a la presencia de estos genes codificantes para BLEE.

Siguiendo con el estudio de los aislamientos que portaban genes *qnr*, se identificó la presencia de genes *fosA2* en 2 de los 6 aislamientos estudiados, asociándose a la resistencia observada a fosfomicina en estos casos específicos. En cuanto a los 4 aislamientos restantes, 2 de ellos correspondían a cepas de *K. pneumoniae* y según Diéz-Aguilar *et al.* 2021, en los géneros *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Kluyvera spp.*, *Serratia marcescens* y *P. aeruginosa* se han identificado variantes cromosómicas del gen *fosA*, que, si bien difieren en la secuencia, se conserva el centro activo, lo que podría explicar la baja actividad de la fosfomicina. En cuanto a los 2 aislamientos restantes, es posible que presenten otro mecanismo de resistencia, ya sean defectos en los transportadores a través de la membrana citoplasmática o sustitución de aminoácidos en el sitio activo de MurA, disminuyendo así la afinidad de unión entre la fosfomicina y su sitio blanco de acción (Ito *et al.* 2017).

En relación a la colistina, se encontró que 5 de los 32 aislamientos presentaban una CIM >4, que según los puntos de corte de la CLSI indica resistencia. Dicha resistencia no ha sido estudiada en profundidad en el presente trabajo, sin embargo, podría deberse a diversos mecanismos tales como los mencionados en Vignoli *et al.* 2019, Mcr. Es crucial investigar estos mecanismos de resistencia, dado que la colistina se considera un antibiótico de último recurso terapéutico según Gurjar 2015 y Bergen *et al.* 2015.

Asimismo, se detectaron múltiples combinaciones de mecanismos de resistencias en varios de los aislamientos *qnr+*. Dentro de éstas, las combinaciones más simples fueron *qnrA1-fosA2-bla_{NDM}* hallada en 2 cepas, *qnrA1-bla_{CTXM-15}* y *qnrA1-aac(6')-Ib-cr*, ambas halladas en un aislamiento. Además, en dos aislamientos se detectaron la combinaciones *bla_{NDM-1}-qnrB1-aac(6')-Ib-cr-bla_{CTXM-15}* y *bla_{VIM-2}-qnrB1-aac(6')-Ib-cr-bla_{CTXM-15}*, respectivamente.

De igual manera, en otros dos aislamientos se encontró la combinación *bla_{NDM}-qnrA1-qnrB1-bla_{CTXM-15}*. Finalmente, la asociación más compleja de mecanismos de resistencia se halló en un solo aislamiento y se trataba de *bla_{NDM}-qnrA1-qnrB1-aac(6')-Ib-cr- bla_{CTXM-15}*.

Estos resultados de multiresistencia debido a asociaciones múltiples de mecanismos de resistencia en los aislamientos estudiados eran esperables ya que en Uruguay se ha reportado la presencia de cepas portadoras de múltiples mecanismos de resistencia. En particular, en Papa-Ezdra *et al.* 2021 se hallaron Enterobacteriales que presentaron combinaciones múltiples y similares a las detectadas en el presente trabajo. Específicamente, la combinación observada de *qnrA1-qnrB1-aac(6')-Ib-cr- bla_{CTXM-15}*.

En relación al entorno genético de los genes hallados, se detectó que 10/24 aislamientos presentaban integrones clase 1 y que además 7 de estos se encontraban a su vez asociados a secuencias de inserción del tipo ISCR1. Por

el contrario, en ninguno de los aislamientos se amplificó el gen codificante para la integrasa de clase 2, *intl2*. Era de esperar que el 50% de los aislamientos portara integrones clase 1 ya que se han realizado múltiples ensayos que revelaron sistemáticamente que la prevalencia de *IntI1*, si bien varía en función del origen de los aislados, es siempre del orden de decenas por ciento (Poey *et al.* 2018).

Al amplificar las regiones variables de los integrones de clase 1 detectados se encontraron tres disposiciones, 2 correspondientes a 1800 pb y una de 800 pb. La primera combinación fue la *dfrA12-aadA2*, hallada en 8 aislamientos, previamente descrita en la base de datos INTEGRALL como In27. Dicha combinación además fue hallada en trabajos previos realizados en Uruguay como es el caso de Papa-Ezdra *et al.* 2021 donde fue detectada en el 83% de los aislamientos.

La segunda combinación *dfrA14-aadA1* fue encontrada en un solo aislamiento y también fue previamente descrita en INTEGRALL como In387, pero no había sido reportada en Uruguay. Finalmente, en un aislamiento se detectó el gen *dfrA25* ya descrita como In1305. Además, en ésta plataforma existen numerosos reportes de integrones clase 1 descritos en aislamientos portadores de genes *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* (Moura *et al.* 2009).

Asimismo, en trabajos anteriores como Bado *et al.* 2010 se detectó la presencia de la asociación entre genes *qnrA1* e integrones clase 1 complejos, es decir portando la secuencia de inserción *ISCR1* en diversos aislamientos. Cabe destacar que en el presente trabajo si bien se detectaron cepas portadoras de *qnrA1* y *ISCR1* concomitantemente, estos no se encontraban en un entorno similar a lo descrito antes, mediante técnicas de secuenciación de genoma es que se pudo establecer que *qnrA* no se encontraba en integrones compuestos.

En cuanto a las cepas transconjugantes, se constató en 3/7 que, si bien portaban genes *qnrA* luego de una transferencia exitosa, estos presentaban sensibilidad a ciprofloxacina. Esto podría explicarse quizás por una falta de expresión de dichos genes ya que según lo propuesto por Garoff *et al.* 2018, el contexto genético en el que se expresa un gen *qnr* desempeña un rol clave en la determinación del fenotipo. A su vez, se sabe que los genes *qnr* de aislamientos naturales en general se encuentran en múltiples plásmidos diferentes planteando así la posibilidad de que exista una diferencia significativa en la susceptibilidad antimicrobiana asociada a diferencias en el número de copias del plásmido (Garoff *et al.* 2018).

Asimismo, múltiples genes de resistencia a diferentes familias antibióticas fueron transferidos de manera exitosa, dentro de éstos encontramos genes de resistencia a quinolonas *qnrA1*, *qnrB1* y *aac(6')-Ib-cr*, genes de resistencia a

cefalosporinas de tercera generación tal como *bla*_{CTXM-15}, de resistencia a carbapenemes *bla*_{NDM-1} y finalmente genes pertenecientes a regiones variables de integrones clase 1, *dfrA12-aadA2*.

Esta transferencia pudo comprobar entonces la presencia de estos genes en plásmidos conjugativos.

Asimismo, a raíz de la creciente resistencia antimicrobiana, recientemente en Febrero de 2022, la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), convocaron al Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP) para sumarse a este plan estratégico denominado “*One health joint plan of action*” (OH JPA) reafirmando la importancia del pilar ambiental en el concepto de “Una Salud”, volviéndolo al mismo un concepto compuesto de cuatro pilares fundamentales, no de tres como se consideraba previamente (Salud, O. M *et al.* 2022).

Dicho plan tiene como objetivo guiar a las cuatro organizaciones para trabajar de manera conjunta y propone un set de actividades a realizar por estas con el fin de fortalecer el vínculo y comunicación entre las mismas a la hora de abordar los problemas relacionados a la salud humana, animal, vegetal y ambiental además de (Salud O. M *et al.* 2022).

El OH JPA será implementado por un periodo de cinco años, desde 2022 hasta 2026 inclusive y se pretende se use como un documento libre, abierto a ajustes que reflejen el progreso obtenido y evidenciar nuevos desafíos que podrán presentarse a lo largo del tiempo (Salud, O. M *et al.* 2022)

8. Conclusiones

Según Marin GH *et al.* 2022, el uso total de antibióticos entre el periodo 1997-2007 aumentó en Brasil, Perú, Uruguay y Venezuela, y se espera siga aumentando. Además, se estudió qué grupos farmacológico de antibióticos era más consumido en estos países, siendo el grupo principal los β -lactámicos seguido de las quinolonas. Este consumo a nivel nacional podría ser una de las causas de la creciente resistencia antimicrobiana que amenaza a los sistemas de salud (Marin GH *et al.* 2022).

En suma, en el presente trabajo se hallaron genes de resistencia transferible a fluoroquinolonas en enterobacterias portadoras de carbapenemasas, donde además dichos aislamientos presentaban otros genes de resistencia a diferentes familias de antimicrobianos de amplio espectro de uso intrahospitalario. A su vez, se detectó la presencia de algunos de estos genes en plásmidos conjugativos, siendo estos elementos móviles que permiten la diseminación de los distintos mecanismos no solo en el ámbito nosocomial sino también en la comunidad.

Es imprescindible el abordaje multidisciplinario para el diseño de estrategias que permitan evitar la dispersión de este tipo de microorganismos y de sus mecanismos de resistencia.

9. Perspectivas

Con el propósito de profundizar en algunos de los resultados obtenidos, nos proponemos continuar con nuestro trabajo mediante la realización de las siguientes tareas:

- Realizar ensayos de concentración inhibitoria mínima a ciprofloxacina en los tres aislamientos que dieron sensible a este antimicrobiano y a sus respectivas cepas donantes para observar si existe un aumento en la CIM de los transconjugantes con respecto a los donantes.
- Ahondar en el estudio de los posibles mecanismos de resistencia presentes en las cepas resistentes a fosfomicina y colistina que no lograron ser caracterizadas molecularmente.
- Llevar a cabo la secuenciación de genoma completo de las cepas portadoras de genes *qnr* en plásmidos conjugativos, y así caracterizar posteriormente sus grupos de incompatibilidad y reconocer los entornos genéticos de las carbapenemasas y los Qnr que albergan.

10. Bibliografía

1. Andrade, F. F., Silva, D., Rodrigues, A., & Pina-Vaz, C. (2020). *Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. Microorganisms.*
2. Bado I, Cordeiro N, García V, Robino L, Seija V, Vignoli R. (2008). Principales grupos de antibióticos. Temas de Bacteriología y Virología. 3ª ed Oficina del libro FEFMUR.
3. Bado I, García V, Robino L, Cordeiro N, Seija V, Vignoli R. (2008). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Temas de Bacteriología y Virología. 3ª ed Oficina del libro FEFMUR.
4. Bado, I., Cordeiro, N., Robino, L., Garcia-Fulgueiras, V., Seija, V., Bazet, C., Gutkind, G., Ayala, J., Vignoli, R. (2010). *Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum β -lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients, International Journal of Antimicrobial Agents.*
5. Bado, I., Papa-Ezdra, R., Cordeiro, N., Outeda, M., Caiata, L., García-Fulgueiras, V., Seija, V., & Vignoli, R. (2018). *Detection of qnrVC6, within a new genetic context, in an NDM-1-producing Citrobacter freundii clinical isolate from Uruguay. Journal of global antimicrobial resistance.*
6. Bergen, P. J., Bulman, Z. P., Landersdorfer, C. B., Smith, N., Lenhard, J. R., Bulitta, J. B., Nation, R. L., Li, J., & Tsuji, B. T. (2015). *Optimizing Polymyxin Combinations Against Resistant Gram-Negative Bacteria. Infectious diseases and therapy.*
7. Biswas, S., Brunel, J. M., Dubus, J. C., Reynaud-Gaubert, M., & Rolain, J. M. (2012). *Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. Expert review of anti-infective therapy.*
8. Bush, K., Bradford, P.A. (2019). *Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. Nature Reviews Microbiology.*
9. Bush, N.G.; Diez-Santos, I.; Abbott, L.R.; Maxwell, A. (2020). *F Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. Molecules.*
10. Cambray, G., Guerout, A-M., Mazel, D. (2010) Integrons. Annual Review of Genetics.

11. Catarina A, Lopes S, Veras DL (2010). *bla CTX-M-2 and bla CTX-M-28 extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro.
12. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM (2009). *qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in Salmonella enterica serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin*. Antimicrobial Agents Chemotherapy.
13. *Clinical & Laboratory Standards Institute Guidelines*. (2021)
14. Correa, Cristian & Castro, Elena & Salamanca, Diana & Bustacara, Luz & Lemos, Elkin. (2016). *Escherichia coli productora de Nueva Delhi metalo- β -lactamasa en Colombia: reporte de caso*. Infectio..
15. Coppola, N., Freire, B., Umpiérrez, A., Cordeiro, N. F., Ávila, P., Trenchi, G., Castro, G., Casaux, M. L., Fraga, M., Zunino, P., Bado, I., & Vignoli, R. (2020). *Transferable Resistance to Highest Priority Critically Important Antibiotics for Human Health in Escherichia coli Strains Obtained From Livestock Feces in Uruguay*. Frontiers in veterinary science.
16. De Gaetano, G.V.; Lentini, G.; Famà, A.; Coppolino, F.; Beninati, C. (2023) *Antimicrobial Resistance: Two-Component Regulatory Systems and Multidrug Efflux Pumps*. Antibiotics.
17. Di Conza J, Ayala JA, Power P, Mollerach M, Gutkind G. *Novel class 1 integron (InS21) carrying blaCTX-M-2 in Salmonella enterica serovar infantis*. Antimicrob Agents Chemother. 2002.
18. Díez-Aguilar, M., & Cantón, R. (2019). *New microbiological aspects of fosfomicin*. Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia.
19. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. (2023)
20. Driscoll, J., Brody, S., Kollef, M. (2007). *The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections*. Drugs; 67(3): 351-68
21. Falagas, M. E., Vouloumanou, E. K., Samonis, G., & Vardakas, K. Z. (2016). *Fosfomicin*. Clinical microbiology reviews.
22. García-Fulgueiras, V., Bado, I., Mota, M. I., Robino, L., Cordeiro, N. F., Varela, A., Algorta, G., Gutkind, G., Ayala, J. A., & Vignoli, R. (2011). *Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in*

enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. The Journal of antimicrobial chemotherapy.

23. Garcia-Fulgueiras, V., Magallanes, C., Reyes, V., Cayota, C., Galiana, A., Vieytes, M., Vignoli, R., & Márquez, C. (2021). *In Vivo High Plasticity of Multi-Drug Resistant ST258 Klebsiella pneumoniae. Microbial drug resistance.*

24. García, J., Martínez, D., Caña, L., González, D., Rodríguez, L., Rodolfo, H., Donato, M., & Guzmán, M. (2018). *qnr genes in Enterobacteriaceae isolated from at a hospital in Venezuela. Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología.*

25. Garoff, L., Yadav, K., & Hughes, D. (2018). *Increased expression of Qnr is sufficient to confer clinical resistance to ciprofloxacin in Escherichia coli. The Journal of antimicrobial chemotherapy.*

26. *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report (2020).*

27. Gonzales Escalante, E., Yauri Condor, K., Di Conza, J. A., & Gutkind, G. O. (2020). *Phenotypic Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Enterobacteriaceae. Journal of clinical microbiology.*

28. Gómez, J., García-Vázquez, E., & Hernández-Torres, A. (2015). *Los betalactámicos en la práctica clínica [Betalactams in clinical practice]. Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia.*

29. Grant JR, Enns E, Marinier E, Mandal A, Herman EK, Chen C, Graham M, Van Domselaar G, and Stothard P (2023). *Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. Nucleic Acids Research.*

30. Gurjar M. (2015). *Colistin for lung infection: an update. Journal of intensive care.*

31. Gutiérrez C, Bado I, Cordeiro N, Palacio R, R V. (2011) *Resistencia a carbapenems y detección de Pseudomonas aeruginosa en el Hospital de Clínicas. Revista Uruguaya Patología Clínica.*

32. R.M. Hall. (2013) *Gene Cassettes, Brenner's Encyclopedia of Genetics.*

33. Hammoudi Halat, D., & Ayoub Moubareck, C. (2020). *The Current Burden of Carbapenemases: Review of Significant Properties and Dissemination among Gram-Negative Bacteria. Antibiotics.*
34. Ito, R., Mustapha, M. M., Tomich, A. D., Callaghan, J. D., McElheny, C. L., Mettus, R. T., Shanks, R. M. Q., Sluis-Cremer, N., & Doi, Y. (2017). *Widespread Fosfomycin Resistance in Gram-Negative Bacteria Attributable to the Chromosomal fosA Gene.*
35. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. (2003). *Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrobial Agents Chemotherapy.*
36. Jeong SH, Bae IK, Kwon SB. (2005). *Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in Korea. J Appl Microbiol.*
37. Klugman, K. P., & Levin, B. R. (2006). One enzyme inactivates two antibiotics. *Nature medicine.*
38. Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH (2007). *First report of the emergence of CTX-M-type extended spectrum β -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. Antimicrobial Agents Chemotherapy.*
39. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.*
40. Marin GH, Giangreco L, Dorati C (2022). *Antimicrobial Consumption in Latin American Countries: First Steps of a Long Road Ahead. Journal of Primary Care & Community Health.*
41. Michael T. Madigan, Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley, W. Matthew Sattley and David A. Stahl. (2018). *Brock Biology of Microorganisms* 15th edition.
42. M, M. & L, Jessica & P, Paola & Afani, Alejandro. (2004). Alergia a betalactámicos. *Revista Chilena De Infectología - REV CHIL INFECTOL.*

43. Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A (2009). *INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes*.
44. Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman MA, Walsh TR (2011). *How to detect NDM-1 producers*. *Journal of Clinical Microbiology*.
45. Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). *Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria*. *Frontiers in microbiology*.
46. O'Neill, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations*. *The review on antimicrobial resistance*.
47. Paciel, D., Seija, V., Prieto J, Vignoli, R., Medina, J., Savio, E. (2011). *Enterobacterias productoras de KPC*.
48. Palencia-Gándara, C., Getino, M., Moyano, G., Redondo, S., Fernández-López, R., González-Zorn, B., & de la Cruz, F. (2021). *Conjugation Inhibitors Effectively Prevent Plasmid Transmission in Natural Environments*
49. Papa-Ezdra, R., Caiata, L., Palacio, R., Outeda, M., Cabezas, L., Bálsamo, A., Vignoli, R., Bado, I., & Seija, V. (2021). *Prevalence and molecular characterisation of carbapenemase-producing Enterobacterales in an outbreak-free setting in a single hospital in Uruguay*. *Journal of global antimicrobial resistance*.
50. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC (2006). *Prevalence in the United States of aac(6)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*.
51. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). *Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance*. *Clinical microbiology reviews*.
52. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L. (2008). *Klebsiella pneumoniae carbapenemase-2*, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*.
53. Poey, M. E., & Laviña, M. (2018). *Horizontal transfer of class 1 integrons from uropathogenic Escherichia coli to E. coli K12*. *Microbial pathogenesis*.
54. Reygaert W. C. (2018). *An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria*. *AIMS microbiology*.

55. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. (2006). *qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States*. Antimicrobial Agents Chemotherapy.
56. Robino, L., Cordeiro, N., García-Fulgueiras, V., Bado, I., Algorta, G., & Vignoli, R. (2013). Fallo terapéutico por resistencia antibacteriana intra-tratamiento, a propósito de dos casos clínicos. Revista chilena de infectología : órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología.
57. Rui, Y., Lu, W., Li, S., Cheng, C., Sun, J., & Yang, Q. (2018). *Integrins and insertion sequence common region 1 (ISCR1) of carbapenem-non-susceptible Gram-negative bacilli in fecal specimens from 5000 patients in southern China*. International journal of antimicrobial agents.
58. Sabbagh, P., Rajabnia, M., Maali, A., & Ferdosi-Shahandashti, E. (2021). *Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens*. Iranian journal of basic medical sciences.
59. Sherrard LJ, Tunney MM, Elborn JS. (2014). *Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis*. Lancet.
60. Salud, O. M. (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos.
61. Salud, O. M. (2017). Lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos.
62. Salud, O. M. (2019). Lista OMS de antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana.
63. Salud, O. M., FAO., OMSA., UNEP (2022) Plan de acción conjunta. Trabajando juntos para el bienestar de humanos, animales, plantas y el medio ambiente.
64. Serra, A. (2008) Quinolonas. Cátedra de Farmacología Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.
65. Shin, S. Y., Kwon, K. C., Park, J. W., Song, J. H., Ko, Y. H., Sung, J. Y., Shin, H. W., & Koo, S. H. (2009). *Characteristics of aac(6)-Ib-cr gene in extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from Chungnam area*. The Korean journal of laboratory medicine.

66. Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). *Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy*. *Frontiers in Microbiology*.
67. Sussmann, O., Mattos, L., Restrepo, A. (2020). Unidad de Infectología, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá. Resistencia bacteriana.
68. Varsha Prakash Shetty, Sadanand Dangari Akshay, Praveen Rai, Vijaya Kumar Deekshit, (2023). *Integrans as the potential targets for combating multidrug resistance in Enterobacteriaceae using CRISPR- Cas9 technique*, *Journal of Applied Microbiology*.
69. Vera-Leiva, Alejandra, Barría-Loaiza, Carla, Carrasco-Anabalón, Sergio, Lima, Celia, Aguayo-Reyes, Alejandro, Domínguez, Mariana, Bello-Toledo, Helia, González-Rocha, Gerardo. (2017). KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*.
70. Vignoli R, Cordeiro N, Seija V. (2006). Entorno genético de CTX-M-2 en aislamientos de Klebsiella pneumoniae provenientes de pacientes hospitalizados en Uruguay. *Rev Argent Microbiol*.
71. Vignoli, R., & Gales, A. (2019). Mecanismos de resistencia a los antibióticos. *Microbiología Clínica; Desde el laboratorio al manejo del paciente*.
72. Wang A, Yang Y, Lu Q. (2008). *Presence of qnr gene in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China*.
73. Wang M, Guo Q, Xu X (2009). *New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*.
74. Zhanel, G., Hoban, D., Schurek, K, Karlowsky, J. (2004) *Role of efflux mechanisms on fluoroquinolone resistance in Streptococcus pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*.