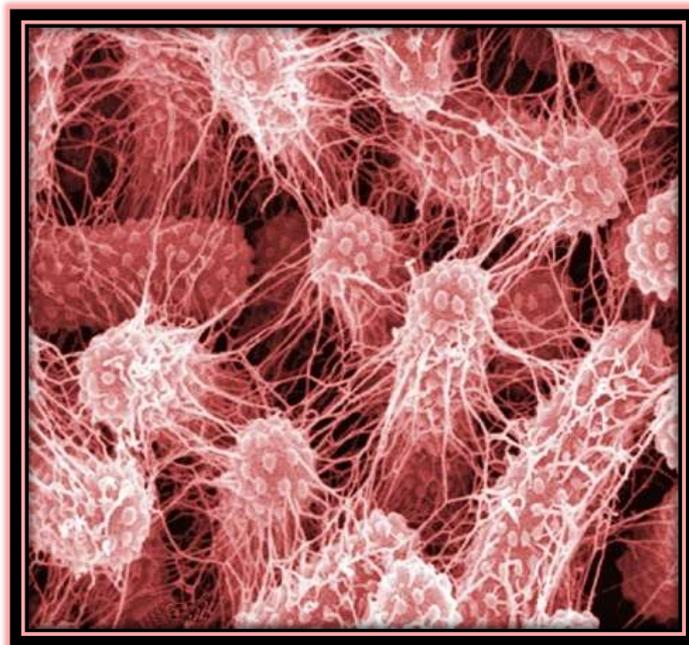




Tesina de Grado para la obtención del título de Licenciada en
Ciencias Biológicas, opción Microbiología.

**Caracterización molecular de aislamientos de
Klebsiella pneumoniae causantes de infecciones
hospitalarias**



Gabriela Khalil

Orientadora: Dra. Carolina Márquez Villalba

Lugar de ejecución: Laboratorio de Microbiología Clínica,
Facultad de Química.

Montevideo
2014

AGRADECIMIENTOS

Hay tantas personas a las que me gustaría agradecer que espero no olvidarme de ninguna de ellas.

Antes que nada darle las gracias a mi tutora de tesis la Dra. Carolina Márquez quien desde el primer día confió en mí para hacer este trabajo, por su apoyo, sus consejos y la oportunidad que me dio para crecer en esta área que tanto me gusta.

A todas mis compañeras/os del laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de Química, a las Dras. Graciela Borthagaray y Ana Acevedo por las tardes compartidas y su disposición a la hora de evacuar mis dudas; a Anita que desde el primer día que entre en el laboratorio estuvo para ayudarme, aconsejarme y enseñarme, a Naty por el apoyo, los consejos y por su paciencia para enseñarme. A Lu por las risas, charlas, tardes y noches compartidas en el laboratorio y ahora en la vida.

Gracias por estar ahí y darme para adelante siempre, por sus consejos y por todo lo que me enseñaron!!

A la Dra. Magela Laviña por su tiempo y por sus consejos certeros a la hora de elegir el mejor lugar para desarrollar mi tesis.

A mi familia, mi Abuela la mejor de todas las abuelas que en cada examen me daba para adelante y nunca dejo de apoyarme a pesar de todas las caídas, por sus “suerte, suerte, suerte” que nunca faltaban, a mi tía abuela también por ese apoyo incondicional y por su fe en mí.

A mi mamá por nunca dejarme bajar los brazos, por su confianza, paciencia, por siempre estar en mis logros y fracasos, por todo lo que me enseñaste que me hizo ser quien soy, gracias por compartir conmigo todo este camino y por nunca dejar de creer en mí...

Sin el apoyo de ustedes mi familia no hubiese podido llegar hasta acá!!!

Espero no olvidarme de nadie...a todos los que nombre y a los que no pero están ahí GRACIAS DE CORAZON!! Porque cada uno de ustedes puso su granito de arena para ayudarme a lograr esto!!

INDICE

Página

Resumen-----	
Introducción-----	
Objetivos-----	9
• Objetivo general-----	9
• Objetivos específicos-----	9
Materiales y métodos-----	10
Resultados-----	18
Discusión-----	23
Perspectivas-----	27
Referencias bibliográficas-----	28
Anexo I: Integrón de clase I-----	32

RESUMEN

Desde el 2007 en Uruguay, se viene observando una alta frecuencia de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), con fenotipo de resistencia a múltiples drogas (RMD), provenientes de pacientes hospitalizados. Considerando que el grupo de investigación ha demostrado la co-movilización de genes *bla*_{CTX-M-2} con otras regiones de ADN codificantes para la resistencia a otros antibióticos mediada por elementos genéticos móviles (EGM) como plásmidos, integrones, y secuencias de inserción, el objetivo de este trabajo fue continuar con el análisis de las poblaciones de *K. pneumoniae* de origen intrahospitalario en base a la variedad de BLEE, fenotipo RMD y contenido de EGM. Para ello se analizaron 26 aislamientos de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes hospitalizados durante marzo-mayo del 2011 en Uruguay. Se realizó la identificación mediante VITEK 2 GN y la detección fenotípica de BLEE por ensayo de sinergia con doble disco para AMC, CTX y CAZ. Se estudió la sensibilidad a los antibióticos FOX, CAZ, CTX, FEP, AMK, CIP, GEN, IPM mediante VITEK 2 AST-N082. La amplificación del gen *bla*_{CTX-M}, del gen *int11* y de las secuencias de inserción *ISEcp1* e *IS26* se realizó por PCR con el uso de cebadores específicos. La relación genética entre los aislamientos fue evaluada por electroforesis en gel por campo pulsante utilizando la enzima *XbaI*. Se analizaron los grupos de incompatibilidad Inc A/C, Inc FII e IncN por Inc/rep PCR. Doce de 26 aislamientos fueron productores de BLEE de los cuales 11 portaron la variante *bla*_{CTX-M-15} y el otro no amplificó para la familia CTXM. Se observaron 2 pulsotipos, uno de ellos fue idéntico al presentado por un aislamiento de *K. pneumoniae* aislado en 2008. Todos los aislamientos fueron resistentes a CIP, SXT, CTX, CAZ y uno fue además resistente a AMK y FOX. Todos fueron sensibles a GEN e IPM y presentaron la secuencia de inserción *ISEcp1* así como la *IS26*. Nueve portaron integrones de clase 1. Los grupos de incompatibilidad plasmídica buscados no rindieron producto de amplificación. En suma, si bien continúa predominando la familia CTX-M se observó un cambio hacia la variante genética *bla*_{CTX-M-15}. Estarían circulando 2 poblaciones clonales con fenotipo RMD y una de ellas estaría adaptada a persistir en este ambiente hospitalario desde el 2008. Debido a que las estrategias terapéuticas están limitadas a los carbapenemes es importante vigilar la sensibilidad a los mismos y su evolución. *K. pneumoniae* podría ser un reservorio de EGM comúnmente involucrados en la diseminación de fenotipos RMD.

INTRODUCCION

El género *Klebsiella* perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está formado por bacilos gram negativos, anaerobios facultativos y oxidasa negativos. Se caracterizan por ser generalmente capsulados y no móviles. (Edwards y Ewing, 1986). Este género presenta una amplia distribución en la naturaleza (aguas potables, residuales y de fábricas textiles, vegetales, suelos) de lo que se deriva que la especie *Klebsiella pneumoniae* sea un huésped habitual saprófito del hombre y los animales. Las personas inmunodeprimidas (neonatos, ancianos, pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI)) y especialmente el ambiente hospitalario, son los factores más importantes para la colonización y/o el riesgo de sufrir un proceso infeccioso causado por *K. pneumoniae* (Thom BT, 1970; Podschun y col, 1998).

En los últimos años su papel como agente etiológico responsable de una proporción muy significativa de las infecciones del tracto urinario, respiratorio, septicemias e infecciones de tejidos blandos ha ido en aumento. El principal reservorio de *K. pneumoniae* lo constituye el tracto gastrointestinal, siendo el más importante vehículo de transmisión las manos del personal hospitalario. Debido a su gran habilidad para extenderse por el ambiente hospitalario estas bacterias tienden a causar brotes nosocomiales de cepas multirresistentes productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Guerra y col, 2011).

Las β -lactamasas son enzimas producidas por diferentes especies bacterianas que tienen la capacidad de hidrolizar el anillo de los antibióticos β -lactámicos; éstas representan el mecanismo de resistencia más común para esta clase de antibióticos (Bush y Jacoby, 2010). Las BLEE hidrolizan tanto penicilinas, como cefalosporinas de tercera y cuarta generación, así como los monobactams; son inhibidas por inhibidores de betalactamasas tales como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, utilizándose esta propiedad como característica principal para la detección fenotípica de su producción.

Fueron descritas por primera vez a mediados de los años '80 y los ejemplos más tempranos fueron mutantes de las penicilinasas plasmídicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, con una o más sustituciones aminoacídicas que modifican el sitio activo de dichas enzimas.

En la actualidad existen más de 400 tipos distintos de BLEE. Estas constituyen un grupo heterogéneo de enzimas frecuentemente descritas en *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* y en menor medida en otras Enterobacterias. Las infecciones en las que están implicadas representan un reto ya que con frecuencia los genes que codifican las BLEE se encuentran en plásmidos junto con genes que codifican mecanismos de resistencia a otros antimicrobianos (como aminoglucósidos, trimetoprim-sulfametoxazol y fluoroquinolonas), limitando las opciones terapéuticas. La dispersión de estas enzimas en bacterias de la misma o de diferente especie está ampliamente facilitada gracias a su asociación con diversos elementos genéticos móviles como son secuencias de inserción, transposones, integrones y plásmidos conjugativos (Livermore DM, 2012).

Al presente la epidemiología de las BLEE ha variado debido a la amplia diseminación de las BLEE correspondientes a la familia CTX-M con el consiguiente desplazamiento de las familias TEM y SHV.

En 1990 comienza en América del Sur una diseminación explosiva de cepas de *Salmonella* resistentes a cefotaxima debido a la producción de la variante CTX-M-2 (Orman y col, AAC 2002). La familia CTX-M está compuesta por más de 130 variantes alélicas (<http://www.lahey.org/Studies>). Estas enzimas hidrolizan la cefotaxima más rápidamente que la ceftazidima. Se cree que estas enzimas han evolucionado a partir de genes de β -lactamasas cromosómicas naturales con actividad cefotaximasa presentes en especies de *Kluyvera* (Rodríguez y col., 2004), cuyo hábitat natural es el medio ambiente, a través de la movilización facilitada por la secuencia de inserción *ISEcp1* u otras secuencias de inserción relacionadas (Livermore y col., 2007). La diseminación de las CTX-M ocurriría desde la comunidad y el medio ambiente hacia el ambiente hospitalario. Los genes que codifican las β -lactamasas del tipo CTX-M se encuentran insertos en estructuras similares a transposones, muchas veces portados en plásmidos conjugativos, promoviendo la diseminación de esos genes entre diferentes bacterias.

Hasta el año 2008, CTX-M-2 era la variante alélica más frecuentemente reportada en nuestro país en diferentes aislamientos de Enterobacterias (Vignoli *et al.*, 2006; Márquez *et al.*, 2008). Sin embargo, posterior a esa fecha comenzaron a describirse aislamientos locales portadores de la variante CTX-M-15 (Bado *et al.*, 2010; García-Fulgueiras *et al.*, 2011; Roy Chowdhury *et al.*, 2011).

Para la mayoría de los patógenos la resistencia a drogas está causada fundamentalmente por la adquisición de nuevos genes y en menor medida por mutaciones. El surgimiento de bacterias patógenas resistentes, no solo a una familia de drogas, sino a más de un tipo de droga no relacionada químicamente, es observado en numerosas especies patógenas para el hombre. Esto se puede deber a la acumulación de varios mecanismos específicos, a la aparición de mecanismos inespecíficos únicos o a una combinación de ambos. Esta evolución, mediada por la acumulación de mecanismos de resistencia específicos es relativamente rápida ya que la principal fuerza que la ocasiona es la transferencia horizontal de genes, un proceso influenciado por una amplia gama de elementos genéticos móviles (EGM) (Ochman y col., 2000).

En las bacterias Gram negativas estos elementos incluyen plásmidos, transposones e integrones junto con sus elementos móviles asociados, los cassettes génicos. Estos elementos no actúan aisladamente, por el contrario es común que plásmidos conjugativos contengan varios elementos transponibles, los que a su vez contienen integrones con combinaciones diversas de cassettes génicos asociados (Walsh, 2006). Tales combinaciones que colectivamente pueden transferirse por conjugación, transposición o por sistemas de recombinación sitio-específicos, pueden diseminar la resistencia a una variedad de bacterias filogenéticamente muy distantes, muy rápidamente y reorganizar la información de varias maneras en el nuevo huésped antes de volver a transferirse.

Es así, que diferentes elementos genéticos móviles se han hallado en bacterias productoras de CTX-M-15, y en muchos casos en regiones discretas de ADN en los entornos del gen *bla*_{CTX-M-15}. Diferentes secuencias de inserción (IS) han sido asociadas con la movilización de genes *bla*_{CTX-M}. Todas ellas han sido encontradas corriente arriba del gen. Entre ellas destacan *ISEcp1*, *ISCR1*, *IS10* e *IS26*, si bien las combinaciones más frecuentemente observadas involucran *ISCR1-bla*_{CTX-M-2} e *ISEcp1-bla*_{CTX-M-15} (Cantón *et al.*, 2012; Eckert *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2003). Por otra parte, la diseminación de CTX-M-15 se ha visto asociada a la dispersión de plásmidos del grupo de incompatibilidad plasmídico IncFII mayoritariamente (Coque *et al.*, 2008).

En lo que refiere a los integrones, que son sistemas de recombinación específica de sitio que capturan, rearreglan y expresan casetes móviles (Stokes y Hall, 1989) estos son conocidos por su contribución a la emergencia de resistencia antibiótica mundial.

En los entornos de estos integrones (y en algunos casos enmarcados dentro del integrón mismo) es que pueden encontrarse diferentes genes *bla*_{CTX-M}.

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

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

Los integrones de clase 1 clásicos (o típicos) contienen un módulo conocido como segmento conservado 5' (5'-CS), compuesto por el gen *int11* que codifica para una recombinasa sitio específica; un sitio *att11* en donde se incorpora el *cassette* y un promotor Pc que dirige la transcripción del gen codificado. A continuación del último *cassette* de gen o del segmento 5'-CS, se encuentra una región conservada que se conoce como 3'-CS (complejo *qacE 1/su11*) (Stokes y Hall, 1989). Se han descrito asimismo variantes de integrones de clase 1 con el extremo 3'-CS variable (Antunes, Machado, Sousa, y Peixe, 2005) (**Anexo I**).

La variante CTX-M-2 se ha encontrado dentro de los llamados integrones inusuales, los cuales presentan una segunda región 3' conservada, y una secuencia de inserción ISCR1 río arriba del gen de la BLEE (Arduino *et al.*, 2002). Por el contrario, en nuestro país se ha descrito al menos un aislamiento en el cual el gen para la variante CTX-M-15 se encuentra por fuera de los entornos de un integrón de clase 1 atípico (al cual estructuralmente no se le detectaron algunos de los módulos clásicos que componen un integrón convencional en su extremo 3'CS) (Roy Chowdhury *et al.*, 2011).

La gran dispersión de las enterobacterias productoras de BLEE en el mundo ha comprometido el uso de cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas y aminoglicósidos. Por lo tanto, los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las infecciones por estos microorganismos son los carbapenemes, ya que no son hidrolizados por la acción de las BLEE. Por lo expuesto, es entonces de gran interés caracterizar molecularmente los aislamientos de bacterias productoras de BLEE de origen intrahospitalario de nuestro medio.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al entendimiento de la epidemiología de la resistencia antibiótica y su diseminación en Enterobacterias de origen intrahospitalario. Mediante el análisis de una población proveniente de un centro asistencial público de Montevideo de *K. pneumoniae* causante de infecciones hospitalarias en base a características fenotípicas y genotípicas.

Objetivos específicos

1- Clasificar los aislamientos

2- Detectar fenotípicamente la presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante ensayos de sinergia por enfrentamiento de disco de ácido clavulánico con varios discos de Cefalosporinas de 3° generación.

3- Analizar la relación genética entre los aislamientos productores de BLEE por comparación de los perfiles de macrorestricción del ADN cromosomal separados mediante electroforesis en gel por campo pulsante (PFGE).

4- En aislamientos productores de BLEE investigar la presencia de genes codificantes para las cefotaximasas de la familia CTX-M mediante la amplificación por la técnica de PCR con el uso de cebadores específicos y el uso de cepas control productoras de CTX-M.

5- Identificar elementos genéticos móviles potencialmente involucrados en la diseminación de genes *bla*_{CTX-M}: plásmidos, integrones y secuencias de inserción, mediante extracción de plásmidos, tipificación de sus grupos de incompatibilidad por Inc/rep PCR, amplificación por PCR de integrones de clase 1 y las secuencias de inserción IS26 e *ISEcp1*.

MATERIALES Y METODOS

Objetivo 1 –

Se analizaron 26 aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes internados en un mismo centro hospitalario en el período comprendido entre los meses de marzo-mayo del 2011. Estos aislamientos fueron previamente identificados en el laboratorio de dicho centro por procedimientos estándar obteniendo datos de sensibilidad a 13 antibióticos que se utilizan de rutina para Enterobacterias en un laboratorio de diagnóstico. Los antibióticos utilizados fueron Piperacilina-Tazobactam (TZP), Cefalotina (CEP), Cefoxitín (FOX), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Cefepime (FEP), Imipenem (IPM), Meropenem (MER), Amicacina (AMK), Gentamicina (GEN), Ácido nalidíxico (NAL), Ciprofloxacina (CIP), Sulfametoxazol (SXT). Se utilizó para ello método de microdilución automatizado, VITEK 2, tarjeta GN (para la identificación de bacilos gran negativos) y tarjeta AST-GN QC (para determinar la sensibilidad antimicrobiana). Se categorizó cada aislamiento como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) a cada antibiótico según los criterios interpretativos de la norma propuesta por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) y se los agrupó teniendo en cuenta que un aislamiento pertenece a un grupo de sensibilidad distinto cuando su antibiograma difiere del presentado por otro aislamiento en el dato de sensibilidad a una clase de antibióticos. Las muestras fueron subcultivadas y conservadas en medio Infusion cerebro-corazon - glicerol (BHI-glicerol) por congelación a -20°C. (**Tabla 1**).

Objetivo 2-

La detección fenotípica de BLEE se realizó mediante ensayos de sinergia por enfrentamiento de disco de ácido clavulánico con varios discos de Cefalosporinas de 3^o generación. Los antibióticos ensayados fueron Ampicilina/Ác.clavulánico 20/10 µg (AMC), Ceftazidime 30 µg (CAZ), Cefotaxime 30 µg (CTX), Cefoxitin 30 µg (FOX) y Cefpodoxime 10 µg (CPD). Los discos fueron colocados a una distancia de 20 mm de centro a centro. Se consideró como un ensayo de sinergia positivo aquél que presentara un ensanchamiento del halo de inhibición de cualquiera de los discos de Cefalosporinas de 3^o generación ante la presencia del disco con ácido clavulánico.

Objetivo 3 –

Preparación de bloques para PFGE

Se descongelaron las cepas en medio Blood Agar Base (BAB) y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las colonias fueron suspendidas en 1ml de TE (Tris-EDTA, pH 8.0, 10mM Tris y 1mM EDTA), una cantidad suficiente de bacterias para alcanzar una solución 0,5 Mc Farland. Luego se centrifugó durante 2 minutos a 10.000 r.p.m y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 ml de agarosa LPM 1% (Low melting point agarose 0.5X TBE), termostatazada a 50°. Se cargaron 200 µl de la suspensión en 3 bloques por cepa. Se dejó enfriar y se desmoldó cada bloque en una placa de petri y se comenzó con el tratamiento agregándoles 5ml de TE buffer, 100µl de SDS 20% y 100µl de Proteínasa K a cada uno. Finalmente, se los incubó a 50°C durante 48 horas.

Lisis y digestión enzimática

Se realizaron 3 lavados con 10ml de TE colocando las placas en el agitador por 30 minutos entre cada lavado. Después del último lavado los bloques fueron colocados en una nueva placa de petri la cual contenía 15ml TE, estas fueron selladas con parafilm y conservadas a 4°C por un período no mayor a 2 semanas.

Para realizar el tratamiento con la enzima de restricción, se colocaron los bloques previamente preparados en tubos eppendorf a los cuales se les agregó 150µl de agua destilada, 22µl de tampón de reacción y 3µl de la enzima *Xba* I. Se mezcló la solución y se incubó durante toda la noche a 37°C.

Separación de los fragmentos por PFGE

Los bloques se separaron en gel de agarosa al 1%, la corrida fue realizada en un sistema de electroforesis de campos pulsados CHEF-DR III (Laboratorios Bio-Rad)

Condiciones de corrida:

- Tiempo inicial: 5s, tiempo final: 30s
- $V = 6 \text{ V/cm}$
- Tiempo de corrida = 20 horas
- $T \text{ } ^\circ\text{C} = 14^\circ \text{ C}$
- Tampón de corrida: 2 litros TBE 0.5X

Visualización de Electroforesis

Después de realizada la corrida, el gel se tiñó con bromuro de etidio (1µl/ml) en agitación constante durante 30 minutos para luego ser visualizado con un transiluminador UV, la imagen se registró con una cámara Kodak Digital Science. La interpretación de los mismos se realizó según el criterio propuesto por Tenover (*Tenover y col*, en 1995).

Preparación y cuantificación del templado de ADN para las reacciones de amplificación.

Se procedió a la extracción de ADN genómico mediante el siguiente protocolo:

- I) A partir de un cultivo puro de crecimiento *overnight* en placa de TSA (Agar Tripticasa de Soja), se tomó una ansada y se resuspendió en 600µl de suero fisiológico (de modo que la suspensión fuera equivalente a 3 Mac Farland). Se centrifugó a 10000 r.p.m por 10 minutos a 4°C.
- II) El pellet obtenido se resuspendió en 200µl de Buffer TE (pH 8, 10mM Tris, 1mM EDTA) y se le agregó 20µl de lisozima 50mg/ml. Luego de vortexear, se incubó a 37°C por 15 minutos.
- III) Posteriormente se agregaron 250µl de Buffer TE (pH 8), 25µl de SDS 10% y 3µl de proteinasa K 20mg/ml. Se mezcló por inversión y se incubó a 37°C por una hora.
- IV) Se agregó 2,5µl de ARNasa A libre de ADNasa 1mg/ml y se incubó a 37°C por 30 minutos.
- V) Inmediatamente cada tubo fue colocado en hielo durante 5 minutos y luego se agregó 285µl de NaCl 5M frío y se agitó por inversión. Se incubó 10 minutos más en hielo, agitando por inversión 5 veces durante la incubación.
- VI) Se centrifugó a 13000 r.p.m por 15 minutos a 4°C.
- VII) El sobrenadante fue transferido a otro tubo. A éste se le agregó igual volumen de i sopropanol frío y se agitó por inversión al menos 20 veces.
- VIII) Se centrifugó a 13000 r.p.m por 15 minutos a 4°C.
- IX) Se eliminó el sobrenadante por inversión y el precipitado se lavó con 900µl de Etanol 70% frío. Se centrifugó a 13000 r.p.m por 2 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante cuidadosamente. El precipitado se dejó secar al aire.
- X) Una vez comprobada la evaporación de restos de etanol, se resuspendió el precipitado en 100µl de agua milli Q incubando a 65°C por 20 minutos.

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

Objetivo 4 –

Sobre aquellos aislamientos productores de BLEE se investigó la presencia de genes de la familia CTX-M mediante amplificación por PCR y la detección de sus variantes alélicas por secuenciación. Las reacciones de PCR a tiempo final se llevaron a cabo en un termociclador automático (Labnet – Multi Gene II). La visualización de los productos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1-2% teñidos posterior a la corrida con una solución de Bromuro de Etidio. Posterior a la corrida electroforética, se fotografiaron los geles bajo luz UV con una cámara Kodak Digital Science. En todos los casos en los cuales se realizaron PCR, se utilizó H₂O_mq como control negativo.

Para detectar la presencia de los genes que codifican para las cefotaximasas de la familia CTX-M se utilizaron los cebadores CTXMA1/CTXM2. Estos son cebadores universales para la familia CTX-M que amplifican un fragmento de 543 pb (**Tabla 2**). Dado que no amplifican el gen de la BLEE en su totalidad, no permiten discriminar la variante alélica en caso de que se trate de alguna perteneciente al grupo 1. De ser así es necesario la amplificación con un segundo par de cebadores más externos a modo de abarcar la mayor parte del gen.

Como control positivo se utilizó la cepa *K.pneumoniae* U20 productora de CTX-M-15 (Roy Chowdhury *et al.*, 2011). Los amplicones que presentaron el tamaño esperado fueron enviados para su secuenciación a Macrogen Inc (Korea) y luego se analizaron las secuencias obtenidas utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y se buscaron homologías con secuencias previamente caracterizadas.

Objetivo 5-

a_ Extracción de ADN plasmídico

Se realizó la extracción de plásmidos mediante la técnica descrita por Kado y Liu modificada (*Kado y Liu, 1981*)

Las muestras fueron sembradas en placas de agar Müller-Hinton (MH) a 37°C durante 18 hs, se realizó un raspado del cultivo y se preparó una suspensión del cultivo 0.5 Mac Farland en 200 µl de una solución de lisis con pH ajustado (Enterobacterias pH: 12,6). Las suspensiones se incubaron en un baño a 55°C durante 1 hora, homogeneizando la mezcla cada 20 min. Luego se retiraron las muestras del baño, y se le agregaron 200 µl de una mezcla fenol-cloroformo (1:1), fueron centrifugadas durante 15 minutos a 14000 rpm, se retiró el sobrenadante cuidadosamente y se lo transfirió a otro tubo. Se sembraron 30 µl del sobrenadante en un gel de agarosa (0,8%) y fueron sometidos a electroforesis en tampón 1x TAE, a 2 V/cm durante 3 horas. Posteriormente se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio por 30 minutos y fue sometido a un lavado con agua destilada previo a ser fotografiado mediante iluminación UV.

Este mismo procedimiento fue realizado en varias oportunidades modificando algunos de los pasos claves de la técnica a modo de realizar la puesta a punto de la misma, dichas modificaciones incluyeron cambios: en el tiempo de corrida, en el voltaje de corrida, en el porcentaje del gel de agarosa utilizado y en el tiempo y temperatura de incubación de las suspensiones.

Como control positivo se utilizó la cepa *E.coli* R388 que contiene un plásmido de peso molecular conocido (40kb).

b- Se analizaron los grupos de incompatibilidad más frecuentemente detectados en Enterobacterias mediante la técnica de Inc/rep PCR descrita por Carattoli (Carattoli y col., 2005). Se analizó la presencia de los siguientes grupos: Inc A/C, Inc FII e Inc N.

Las PCR fueron realizadas en un volumen final de 25 μ l y los cebadores utilizados fueron los descritos por Carattoli (Carattoli y col., 2005) El tamaño esperado para los diferentes grupos de incompatibilidad fue de 465 pb para Inc A/C, 270 pb para Inc F II y 559 pb para Inc N.

Se realizó un ciclo de desnaturalización de 94 $^{\circ}$ C / 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 $^{\circ}$ C / 1 minuto; 60 $^{\circ}$ C/ 30 segundos; 72 $^{\circ}$ C/ 1 minutos, y un ciclo de extensión de 72 $^{\circ}$ C / 5 minutos.

Como controles positivos se utilizaron las cepas Kp 296 (Inc A/C e Inc F II positiva) y Ec 20/2 (Inc N positiva) previamente caracterizadas en el laboratorio por el grupo de investigación.

Como marcador de peso molecular se utilizó el 100 pb DNA Ladder (Fermentas).

c- Sobre los aislamientos productores de CTX-M-15 se analizó la presencia de integrones por amplificación por PCR del gen *int11* con los cebadores HS464/HS463 (Stokes *et al.*, 2006) cuyo producto esperado es de 490 pb. Como controles positivos se utilizaron las cepas R388 de *E.coli* y *K.pneumoniae* 296.

d- Se analizó asimismo la presencia de dos secuencias de inserción no relacionadas entre sí, pero que podrían estar contribuyendo a la dispersión del gen *bla*_{CTX-M-15}. Para ello se amplificó la región intragénica de *ISEcp1* usando los cebadores ISEcp1A/ ISEcp1B, cuyo producto esperado es de 526 pb (Poirel *et al.*, 2003). Adicionalmente se buscó la presencia IS26 utilizando los cebadores IS26 rv/IS26 fw cuyo producto esperado es de 339 pb (Martinez *et al.*, 2013).

Tabla 1. Aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* estudiados en búsqueda de productores de CTX-M. CIMs expresadas en µg/ml determinados por VITEK.

Nº aislamiento	Toma de muestra	Tipo de muestra	Perfil	BLEE	TZP	CEP	FOX	CTX	CAZ	FEP	IPM	MER	AMK	GEN	NAL	CIP	SXT
1101	22/03/2011	S/d	1	(+)	S/d	S/d	R (32)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	S (≤1)	S (≤0,25)	R (≥64)	S (≤1)	S/d	R (≥4)	R (≥320)
1102	27/03/2011	Secr. resp.●	3	(+)	S (16)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1103	28/03/2011	Líqu. perit.§	3	(+)	I (32)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (≥64)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1104	28/03/2011	urocultivo		(-)													
1105	28/03/2011	hemocultivo		(-)													
1106	28/03/2011	catéter uri.#		(-)													
1107	29/03/2011	urocultivo		(-)													
1108	29/03/2011	Secr. resp.		(-)													
1109	29/03/2011	Secr. resp.	3	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1110	30/03/2011	lesión quir.o		(-)													
1111	31/03/2011	catéter uri.	3	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1112	31/03/2011	Secr. resp.		(-)													
1113	31/03/2011	Secr. resp.	3	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (32)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1114	01/04/2011	urocultivo		(-)													
1115	02/04/2011	urocultivo		(-)													
1116	04/04/2011	Secr. resp.	3	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (32)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1117	05/04/2011	urocultivo		(-)													
1118	09/04/2011	urocultivo		(-)													
1119	10/04/2011	Secr. resp.		(-)													
1120	11/04/2011	Secr. resp.	2	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (2)	S (≤1)	S (≤0,25)	R (≥64)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1121	12/04/2011	Secr. resp.	3	(+)	S (16)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1122	13/04/2011	urocultivo		(-)													
1123	13/04/2011	urocultivo		(-)													
1124	02/05/2011	urocultivo	3	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (8)	R (≥64)	R (≥64)	R (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1125	04/05/2011	catéter uri.	2	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (8)	R (≥64)	R (≥64)	R (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	R (≥64)	S (2)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)
1126	07/05/2011	urocultivo	3	(+)	R (≥128)	R (≥64)	S (≤4)	R (≥64)	R (≥64)	R (16)	S (≤1)	S (≤0,25)	S (≤2)	S (≤1)	R (≥32)	R (≥4)	R (≥320)

S/d: Sin dato; ● Secreción respiratoria; § Líquido peritoneal; # Catéter urinario; o lesión quirúrgica; BLEE (β-lactamasas de espectro extendido); TZP – Piperacilina-Tazobactam; CEP – Cefalotina; FOX – Cefoxitín; CTX – Cefotaxima; CAZ – Ceftazidima; FEP – Cefepime; IPM – Imipenem; MER – Meropenem; AMK – Amicacina; GEN – Gentamicina; NAL – Ácido nalidíxico; CIP – Ciprofloxacina; SXT – Sulfametoxazol.

Tabla 2. Cebadores y condiciones de reacción PCR para genes individuales y regiones de ADN.

Gen/región	Nombre	Secuencia (5´- 3´)	Pre - desnat Δ	Ciclos Φ	Desnat	Hibri	Extensión	Extension final	Producto (pb)	Referencia
bla_{ctx-m}	CTXMA1	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	55°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	543	(Saladin et al., 2002)
	CTXMA2	CCGCRATATGRTTGGTGGTG								
int11	HS463a	CTGGATTTTCGATCACGGCACG	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	60°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	490	(Labbate, Roy Chowdhury, y Stokes, 2008)
	HS464	ACATGCGTGTAATCATCGTCC								
IS26	IS26_fw	GGCATCAGTTACCGTGAGC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	52°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	339	(Martinez et al., 2013)
	IS26_rv	CGTGTTGATGAATCGTGG								
ISEcp1	ISEcp1A	GCAGGTCTTTTTCTGCTCC	94°C - 3min	35	94°C - 45seg	50°C - 30seg	72°C - 1min	72°C - 7min	526	(Poirel et al., 2003)
	ISEcp1B	TTTCCGCAGCACCGTTTGC								

Δ Pre- desnaturalización; Φ Cada ciclo comprende tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión.

RESULTADOS

Los 26 aislamientos estudiados fueron sensibles a GEN e IPM. Contrario a esto, el 100% fueron resistentes a más de 2 drogas químicamente no relacionadas (CIP, SXT, CTX y CAZ) exhibiendo por tanto un fenotipo de resistencia a múltiples drogas (RMD) y se observaron 3 perfiles de sensibilidad (**Tabla 1**). Se consideró como perfil n°1 el aislamiento 1101 el cual fue resistente a FOX, FEP, AMK, CIP, SXT y sensible a GEN; como perfil n°2 a los aislamientos 1120 (sensible a FOX, FEP, GEN y resistente a AMK, CIP y SXT) y 1125 (sensible a FOX, GEN, intermedio para FEP y resistente a AMK, CIP y SXT), y como perfil n°3 el exhibido por los aislamientos 1102,1103,1109, 1111,1113,1116, 1121, 1124, y 1126, los cuales fueron sensibles a FOX, GEN, AMK, intermedios a FEP y resistentes a CIP y SXT.

Doce de los 26 aislamientos presentaron un fenotipo consistente con la producción de BLEE. De éstos,11 revelaron ser portadores del gen *bla*_{CTX-M}. Para el aislamiento 1109 no se obtuvo producto de amplificación para esta familia de BLEE (**Fig. 1**). Por análisis de secuencia se pudo determinar que en todos los casos, la variante alélica se trataba de CTX-M perteneciente al cluster 1, pero con los cebadores universales no se logró discriminar cuál era específicamente. Paralelamente a esta tesis, y en el marco de una tesis de maestría, la MSc. Natalia Echeverría diseñó cebadores específicos que permitieron discriminar la variante alélica CTX-M-15.

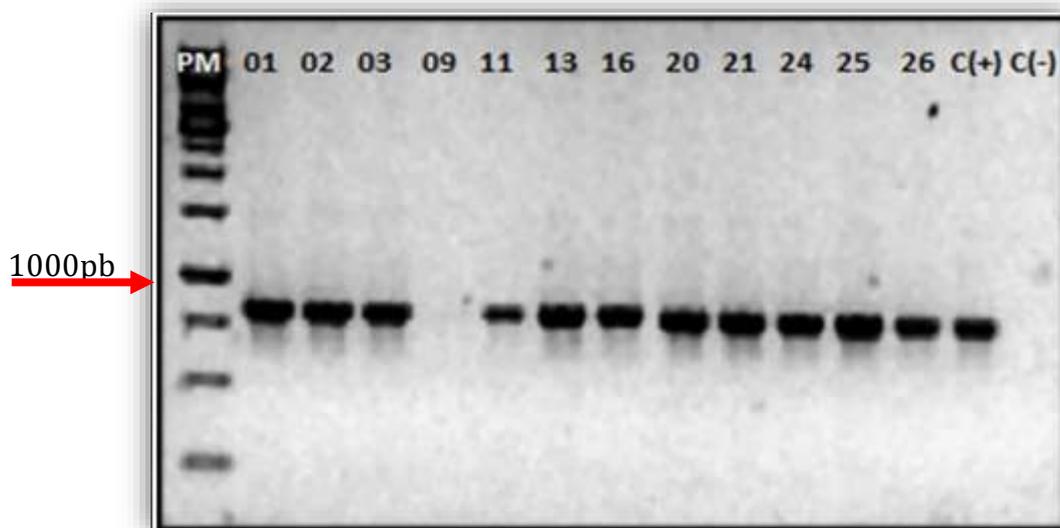


Figura 1. Amplificación por PCR de genes *bla*_{CTX-M}. Tamaño esperado 823 pb (cebadores diseñados en el marco de una Tesis de Maestría), únicamente el aislamiento 09 resulto negativo.

En lo que refiere a la búsqueda de elementos genéticos móviles mediante PCR, 10 de los 11 aislamientos codificantes para CTX-M-15 presentaron la secuencia de inserción *ISEcp1*, para el aislamiento 26 el resultado fue dudoso ya que la banda del tamaño esperado fue tenue y se observó la presencia de bandas inespecíficas, (**Fig. 2**), 9 de ellos revelaron ser portadores de integrones de clase 1 (**Fig. 3**) y 10 presentaron la secuencia de inserción IS26. (**Tabla 3**).

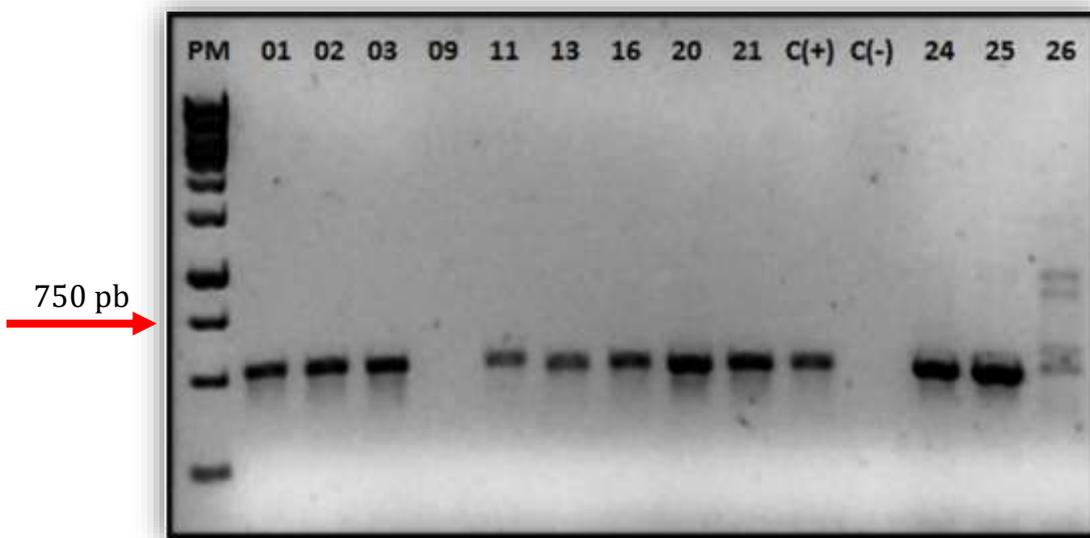


Figura 2. Amplificación por PCR de la secuencia de inserción *ISEcp1*, tamaño esperado 526 pb. El aislamiento 09 también fue negativo en este caso, mientras que el 26 resultó dudoso.

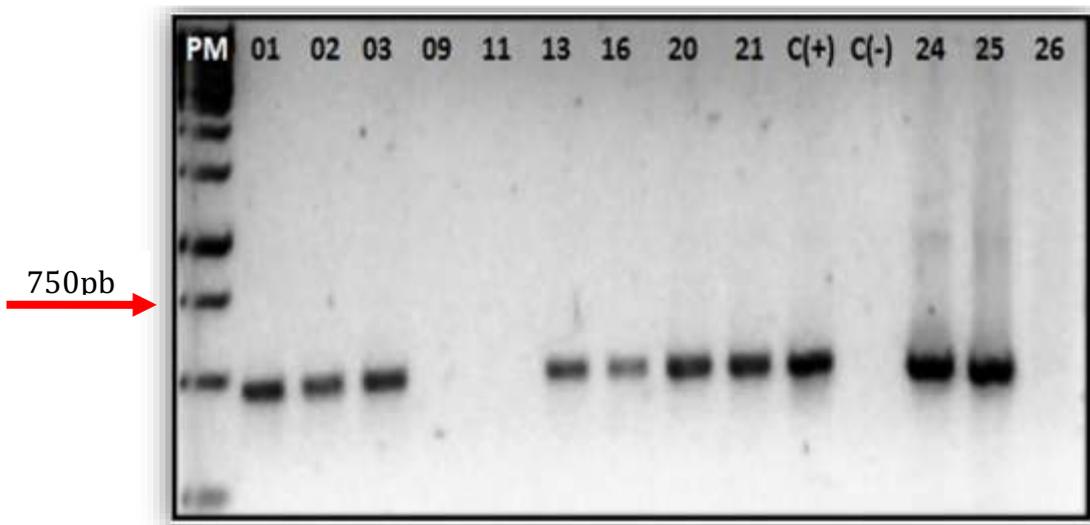


Figura 3. Detección de integrones de clase 1 por amplificación por PCR del gen de la integrasa *int1*. Tamaño esperado: 490pb. Nueve de los 12 aislamientos evidenciaron la presencia del gen *int1*.

Los ensayos para la detección fenotípica de BLEE revelaron el agrandamiento del halo para los discos de CAZ, CTX y CPD. En comparación con discos del mismo antibiótico con ácido clavulánico, indicando la presunta producción de una BLEE. Asimismo, el ensayo de sinergia evidenció la “cola de pescado”, confirmándose así la producción de una enzima BLEE (**Fig. 4**)

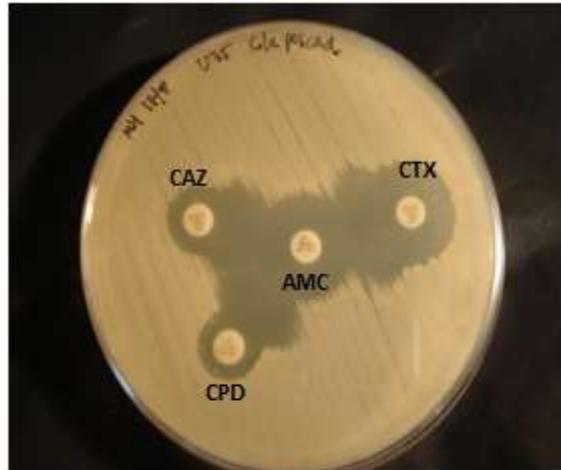


Figura 4. Prueba de sinergismo del doble disco en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*. Detección del sinergismo entre CAZ 30 ug, CTX 30 ug, CPD 10 ug y AMC 20/10 ug. Típica apariencia (halos en forma de cola de pescado o incremento en extensión del halo) de una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE.

La restricción con la enzima *XbaI* permitió discriminar 2 linajes clonales (**Fig 5**). Sin embargo, se observaron 3 grupos fenotípicos según la sensibilidad a antibióticos. Esta falta de correlación puede deberse a la presencia de genes de resistencia asociados a EGM los cuales pueden no revelarse en el análisis por campo pulsante. Por otra parte, el análisis de macrorestricción se llevó a cabo utilizando una única enzima de restricción. Alternativamente, se podría utilizar otra enzima de corte poco frecuente que permita comparar los resultados con los obtenidos con *XbaI* y ver si el ensayo con otra enzima correlaciona de mejor manera con los perfiles de sensibilidad.

Se observó que los aislamientos 1120, 1124, 1125 y 1126 presentan una diferencia de 1 a 3 bandas con respecto a la cepa U20 productora de CTX-M-15, aislada en el año 2008 del mismo centro hospitalario. Si bien estos aislamientos en estudio fueron recuperados con 3 años de diferencia, no se descarta la presencia de una clona circulante endémica que persiste en el centro asistencial estudiado.

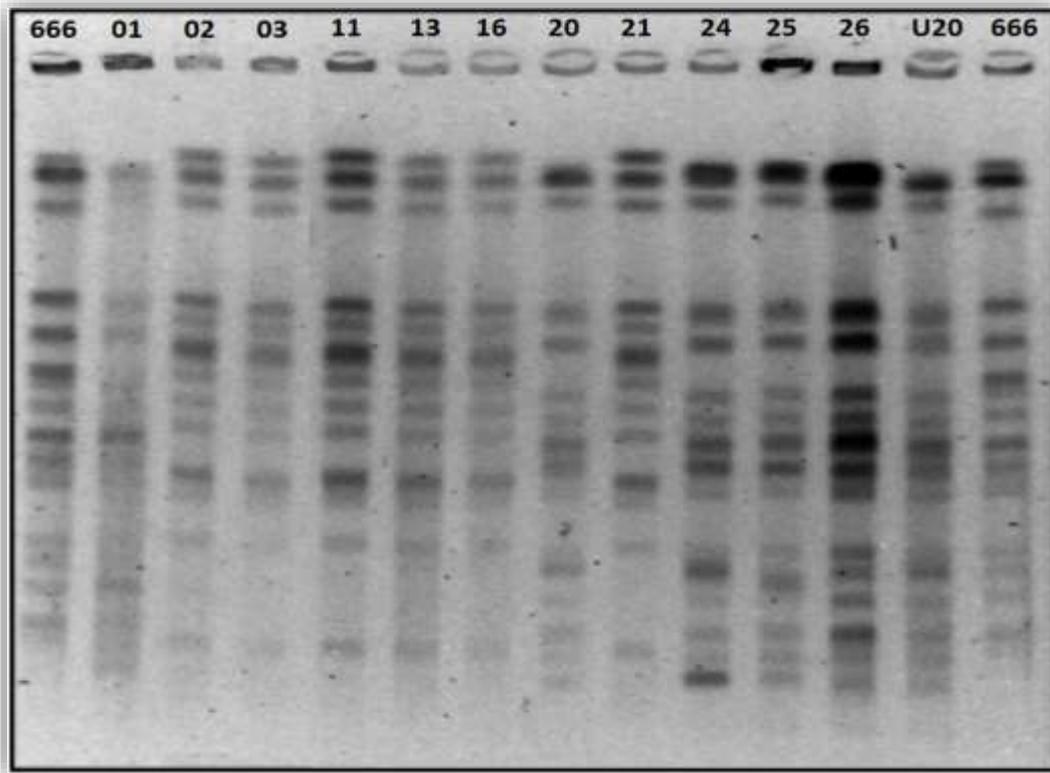


Figura 5. Electroforesis en gel por campo pulsado. La digestión del ADN fue realizada con la enzima de restricción *Xba*I. Las cepas 666 (*K. pneumoniae* perteneciente a otro centro hospitalario) y U20 (CTX-M-15 positiva) se usaron como controles representativos de dos pulsotipos diferentes.

La extracción de plásmidos no se logró poner a punto por lo tanto se desconoce el contenido plasmídico de los aislamientos analizados. A pesar de haber realizado diferentes variaciones en la técnica no se obtuvieron resultados reproducibles. Ante la imposibilidad de caracterizar el contenido plasmídico mediante su extracción, se decidió investigar la presencia de los grupos de incompatibilidad más frecuentemente hallados en Enterobacterias, no detectándose ninguno de los 3 grupos buscados (IncA/C, IncFII, IncN). Es interesante destacar, que el aislamiento U20 mencionado, fue caracterizado como IncFIIA (Roy Chowdhury *et al.*, 2011), y si bien pertenece a la misma clona que la mitad de los aislamientos estudiados, éstos no amplificaron para este grupo.

Tabla 3. Caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE.

N° de aislamiento	Perfil Fenotípico	Perfil Genotípico	gen <i>bla</i> _{CTX-M}	<i>ISEcp1</i>	<i>IS26</i>	<i>intl1</i>
1101	1	A	(+)	(+)	(+)	(+)
1102	3	B	(+)	(+)	(+)	(+)
1103	3	B	(+)	(+)	(+)	(+)
1109	3	ND	(-)	(-)	ND	(-)
1111	3	B	(+)	(+)	(+)	(-)
1113	3	B	(+)	(+)	(+)	(+)
1116	3	B	(+)	(+)	(+)	(+)
1120	2	A	(+)	(+)	(+)	(+)
1121	3	B	(+)	(+)	(-)	(+)
1124	3	A	(+)	(+)	(+)	(+)
1125	2	A	(+)	(+)	(+)	(+)
1126	3	A	(+)	(+)	(+)	(-)

ND – no determinado; Perfil fenotípico determinado por sensibilidad a varios antibióticos (materiales y métodos). Perfil genotípico determinado por PFGE.

DISCUSIÓN

La proporción de aislamientos productores de BLEE fue de 46% (12/26), (46%, Intervalo de confianza: 28%-64%). Esta alta frecuencia de aparición de *K. pneumoniae* productoras de BLEE es similar a la descrita para aislamientos de esta especie de origen hospitalario provenientes de la región, siendo Argentina el país en el que se reportó la frecuencia más alta (Gales *et al.*, 2012).

La variante CTX-M-15, la cual fue hallada en 11 aislamientos, se correlaciona usualmente con un fenotipo sensible a ceftazidime, por lo tanto, considerando que los aislamientos analizados resultaron resistentes a esta droga, no se puede descartar la co-producción de otras BLEE del tipo ceftazidimasas, así como otros mecanismos de resistencia inespecíficos mediados por la disminución de la permeabilidad de membrana (Livermore *et al.*, 2007).

El aislamiento 1109, al ser el único dentro de los productores de BLEE que no dio un resultado positivo para CTX-M, amerita la búsqueda de otras familias de BLEE prevalentes en la región como son las derivadas de TEM, SHV y PER.

La IS26 es una secuencia de inserción que ha sido detectada con alta frecuencia en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* locales, y principalmente asociada a plataformas genéticas complejas que sostienen integrones de clase 1 y regiones de ADN con resistencia a múltiples drogas (Roy Chowdhury *et al.*, 2011). A pesar de que en este trabajo no se detectó su localización genética, y considerando los frecuentes reportes de la amplia diseminación de esta secuencia de inserción en Enterobacterias, es probable que IS26 esté jugando un rol muy importante en la diseminación de regiones de ADN codificantes para la resistencia a múltiples drogas, en torno a las cuales podría encontrarse el gen *bla*_{CTX-M-15}.

Se estima que la movilización de los genes *bla*_{CTX-M} ha sido facilitada por la secuencia de inserción *ISEcp1* u otras secuencias de inserción relacionada; parece existir una asociación física muy frecuente con la variante alélica *bla*_{CTX-M-15} (Canton *et al.*, 2012; Livermore *et al.*, 2007). Por lo tanto, el hallazgo de que todos los productores de CTX-M-15 son asimismo portadores de *ISEcp1* podría estar sugiriendo un modo de dispersión probable del gen de β-lactamasa.

Sin embargo, habría que analizar la plataforma completa que abarca la asociación de ambos elementos, para verificar que en efecto se encuentran físicamente asociados en regiones discretas de ADN.

El grupo de incompatibilidad Inc A/C fue detectado en una población de *K. pneumoniae* productora de CTX-M-2 y fue responsable de la diseminación de este gen de resistencia entre diferentes clonas aisladas en el año 2008 en el mismo centro hospitalario del cual fueron recolectados los aislamientos analizados en el marco de esta tesis. Sin embargo, a diferencia de lo esperado, en este trabajo no se detectó la presencia de ninguno de los grupos de incompatibilidad buscados (IncA/C, IncN, IncFII). A los efectos de conocer el potencial de movilización del gen *bla*_{CTX-M-15} sería necesario realizar ensayos de conjugación bacteriana con otras Enterobacterias.

Cabe destacar que en el año 2008 se observó una alta frecuencia de la variante alélica CTX-M-2 en este mismo centro hospitalario, mientras que durante el periodo que comprendió este estudio se observó un cambio notorio en la variante predominante de la familia CTX-M, detectándose únicamente CTX-M-15. Considerando que en este trabajo se analizaron aislamientos consecutivos de *K. pneumoniae* estos datos sugieren que hubo un desplazamiento de la variante alélica CTX-M-2 por CTX-M-15. entre los años 2008 y 2011.

Analizando el genotipo y los diferentes EGM presentes en la población de *K. pneumoniae* productora de CTX-M-2 previamente caracterizada por el grupo de investigación (Márquez *et al.*, 2008) y la población productora de CTX-M-15 aquí analizada, se puede observar un diferente comportamiento epidemiológico de la resistencia a los β -lactámicos del tipo cefalosporinas de 3° generación ya que la diseminación de CTX-M-2 ocurrió tanto vertical como horizontalmente, mientras que en este estudio se reveló principalmente una diseminación vertical de CTX-M-15 representada por 2 clonas únicamente en un total 12 aislamientos.

Este hallazgo es consistente con lo descrito en la bibliografía que indica un comportamiento policlonal para la población productora de CTX-M-2 y monoclonal o de un bajo número de clonas para la población productora de CTX-M-15.

Las clonas de alto riesgo juegan un rol primordial en la diseminación de la resistencia debido a su habilidad para persistir en una comunidad y la flexibilidad que estas presentan para acumular e intercambiar fenotipos de resistencia y no así por mantener una batería constante de determinantes de resistencia (Woodford et al., 2011). Es aquí que la gran diversidad de EGM actúa movilizándose diferentes determinantes de resistencia a antibióticos.

Como resultado de este trabajo detectamos aislamientos de *K. pneumoniae* productores de CTXM-15 y basándonos en un resultado de secuenciotipo obtenido por nuestro grupo de investigación, una de las 2 clonas detectadas pertenece al secuenciotipo 258 (ST258) descrito como una clona de alto riesgo para adquirir resistencia a los carbapenems mediado por la carbapenemasa KPC-2 (Woodford y col, 2011). Si bien durante el periodo de estudio en el centro hospitalario no habían sido detectados aún *K. pneumoniae* productoras de KPC-2 pertenecientes al ST258, el potencial para el surgimiento de éstas ya existiría.

Finalmente debemos recalcar que la mayoría de los aislamientos productores de BLEE aquí analizados, evidenciaron ser asimismo portadores de integrones clínicos de clase 1. Si bien con los años se ha desmitificado a éstos como grandes concentradores de genes de resistencia de gran importancia clínica (ya que usualmente no expresan genes que confieran resistencia a los antibióticos más usualmente utilizados a nivel hospitalario), igualmente representan elementos genéticos con el potencial de generar rearrreglos varios, y más recientemente se los ha asociado con regiones de resistencia a múltiples drogas. Por lo tanto, la detección de la integrasa es el primer paso en la caracterización de estos elementos, lo cual debería de continuarse con la caracterización de sus regiones variables y aún de regiones discretas en los entornos del integrón, donde ya se ha encontrado a *bla*_{CTX-M-15} (Roy Chowdhury et al., 2011).

En suma, los resultados de esta tesina permitieron evidenciar un cambio en la epidemiología local en lo que respecta a la diseminación de genes de la familia CTX-M dentro de aislamientos intrahospitalarios de *K. pneumoniae* y aportaron asimismo información respecto de diferentes EGM que parecen estar circulando en la población bacteriana estudiada.

PERSPECTIVAS

Claramente el abordaje de esta tesina fue la detección de genes y elementos genéticos móviles independientes, sin embargo sería necesario unificar la información recabada mediante el análisis de plataformas que involucren 2 o más de los elementos aquí detectados a modo de generar información integral respecto de la epidemiología de la resistencia en *K. pneumoniae*.

Asimismo, sería muy beneficioso poder realizar los ensayos de transferencia de los genes de BLEE mediante ensayos de conjugación y poder tipificar el o los plásmidos transferidos, ya sea con la técnica de Inc/rep PCR involucrando la detección de otros grupos de incompatibilidad, así como con una técnica de extracción de plásmidos pesados que permita identificar perfiles plasmídicos y estimar los tamaños de los plásmidos portadores de los genes de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arduino, S. M., Roy, P. H., Jacoby, G. A., Orman, B. E., Pineiro, S. A., y Centron, D.** 2002. blaCTX-M-2 is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(7), 2303-2306.
- Bado, I., Cordeiro, N. F., Robino, L., Garcia-Fulgueiras, V., Seija, V., Bazet, C., Vignoli, R.** 2010. Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum beta-lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *Int J Antimicrob Agents*, 36(5), 453-458. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.06.042
- Bush, K., y Jacoby, G. A.** (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3), 969-976. doi: 10.1128/AAC.01009-09
- Canton, R., Gonzalez-Alba, J. M., y Galan, J. C.** (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol*, 3, 110. doi: 10.3389/fmicb.2012.00110
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L. V., Falbo, Hopkins, KL., Threlfall, EJ.** 2005. Identificación de los plásmidos escribiendo replicón basado en la PCR. *J Métodos Microbiol.* 63 (3): 219-28.
- Chowdhury, PR., Ingold, A., Vanegas, N., Martinez, ME., Merlino, J., Merkier, AK., Castro, M., González, Rocha, G., Borthagaray, G., Centrón, D., Bello-Toledo, H., Márquez, C., Stokes, HW.** 2011. Dissemination of multiple drug resistance genes by Class 1 integrons in *Klebsiella* isolates from four countries: A comparative study. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 3140-3149.
- CLSI.** 2013. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23. Wayne, PA, USA: CLSI.
- Coque, T. M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Nordmann, P.** 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*, 14(2), 195-200. doi: 10.3201/eid1402.070350
- Eckert, C., Gautier, V., y Arlet, G.** 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes. *J Antimicrob Chemother*, 57(1), 1423. doi: 10.1093/jac/dki398

Edwards, PR., Ewing, WH. 1986. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4thed. Elsevier Science Publishing Co. Inc. New York, N.Y. 102-465-686

Gales, A. C., Castanheira, M., Jones, R. N., y Sader, H. S. (2012). Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010).

Diagn Microbiol Infect Dis, 73(4), 354-360. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007

Garcia-Fulgueiras, V., Bado, I., Mota, M. I., Robino, L., Cordeiro, N. F., Varela, A.,

Vignoli, R. 2011. Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated

quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric

hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother*, 66(8), 1725-1729. doi:

10.1093/jac/dkr222

Guerra, SE., Albornoz, H., Rosa, R., Godino, M., Camou, T., Galiana, A., Martínez, S., Ríos,

G., Rehermann, G., Bagnulo, H. 2011. Incidences of nosocomial infections in Uruguayan adult intensive care units 2010. *BMC Proc.* 5(6): 77.

Kado, CI., Liu, ST.1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol.* 145:1365-73.

Livermore, DM. y Hawkey, P.M. 2005. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 56:451-454.

Livermore, DM., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordamm, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford, N. 2007.

CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 59: 165-174.

Livermore, DM. 2012. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med.* 27(2): 128-142

Márquez, C., Labbate, M., Raymondo, C., Fernandez, J., Gestal, A.M., Holley, M.,

Borthagaray, G., Stokes, H.W. 2008. Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *J Clin Microbiol.* 46: 3417-3425.

Ochman, H; Lawrence, JG; Groisman, EA. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* 405: 299-304.

- Orman, B. E., S. A. Pineiro, S. Arduino, M. Galas, R. Melano, M. I. Caffer, D. O. Sordelli, and D. Centron.** 2002. Evolution of multiresistance in nontyphoid salmonella serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3963–3970.
- Oteo, J., Cuevas, O., López-Rodríguez, I., Banderas-Florido, A., Vindel, A., Pérez- Vázquez, M., Bautista, V., Arroyo, M., García-Caballero, J., Marín-Casanova, P., González-Sanz, R., Fuentes-Gómez, V., OñaCompán, S., García-Cobos, S., Campos, J.** 2009. Emergence of CTXM-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother.* 64: 524-528.
- Poirel, L., Decusser, J. W., y Nordmann, P.** 2003. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a bla(CTX-M) beta-lactamase gene *Antimicrob Agents Chemother*, 47(9), 2938-2945.
- Podschun, R., Ullmann, U.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 11(4):589-603.
- Rodriguez, M.M., Power, P., Radice, M., Vay, C., Famiglietti, A., Galleni, M., Ayala, J.A., Gutkind, G.** 2004. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1 derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 4895–7.
- Stokes, H. y Hall R.** 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene integration functions: integrons. *Mol Microbiol.* 3: 1669-83
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Muray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239.
- Thom B.T.** 1970. *Klebsiella* in faeces. *Lancet.* ii:1033
- Vignoli, R., Cordeiro, N., Seija, V., Schelotto, F., Radice, M., Ayala, J., Power, P., Gutkind, G.** 2006. Genetic environment of CTX-M-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in Uruguay. *RevArg Microbiol.* 38: 84-88.
- Villegas, M.V., Kattan, J.N., Quinteros, M.G., Casellas, J.M.** 2008. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect.* 14(S1):154-158.

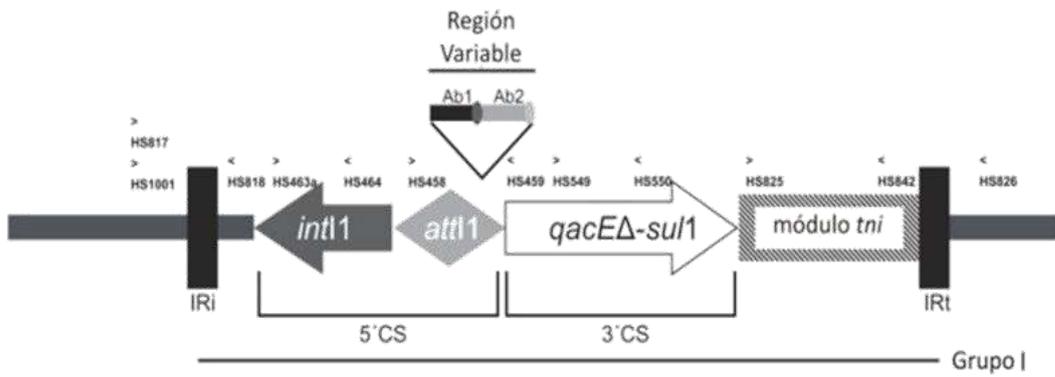
Vranic-Ladavac, M., Bosnjak, Z., Belder, N., Barisic, N., Kalenic, S., Bedenic, B. 2010. Clonal spread of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Croatian hospital. *J Med Microbiol.* 59: 1069-1078.

Walsh, TR. 2006. Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr Opin Microbiol.* 9:476-82.

Woodford, N., Turton, J. F., y Livermore, DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 35(5), 736-755. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.

ANEXO I: Integrón de clase I

A. Integrón clínico de clase 1 convencional



Anexo I. Representación esquemática de integrones de clase 1 de acuerdo a sus estructuras genéticas. Integrones clínicos de clase 1 convencionales (Grupo estructural I). Los *cassettes* génicos se indican como Ab1 y Ab2.