



De Belder, Denise

Caracterización epidemiológica y molecular de aislamientos clínicos productores de carbapenemasas



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

De Belder, D. (2019). *Caracterización epidemiológica y molecular de aislamientos clínicos productores de carbapenemasas (Tesis de doctorado)*. Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2018>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Caracterización epidemiológica y molecular de aislamientos clínicos productores de carbapenemasas

TESIS DOCTORAL

Denise Gisele De Belder

ddebelder@gmail.com

Resumen

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) en bacterias relevantes clínicamente, es uno de los problemas más graves que afronta la humanidad hoy en día. La Organización Mundial de la Salud reconoció a la RAM como una amenaza global a la seguridad sanitaria que requiere de acciones transversales entre gobiernos y agentes sociales como un todo. Puntualmente, los carbapenemes son drogas de último recurso disponibles para tratar las infecciones causadas por enterobacteriales. Por esto, la resistencia a estas drogas ocasiona aumentos significativos en la morbilidad y mortalidad, a los que se suman los problemas económicos para todo el sistema de salud que se desprenden de ésta problemática. El Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos (LNRRA) de Argentina recibe todos los aislamientos con perfiles de resistencia de difícil detección (89 laboratorios WHONET y aquellos laboratorios participantes del Programa de Control de Calidad). En éste contexto, en el período 2008-2016 un total de 1689 enterobacteriales fueron derivadas al LNRRA como sospechosas de ser productoras de carbapenemasa, de los cuales 46 aislamientos resultaron sospechosos por fenotipia de producir una carbapenemasa de tipo metalo- β -lactamasa donde seis aislamientos de *E. cloacae* fueron positivos para VIM y 40 aislamientos de nueve especies de enterobacteriales positivos para IMP. Por todo esto, planteamos como **objetivo general** estudiar las características epidemiológicas y moleculares de aislamientos clínicos de enterobacteriales productores de metalo- β -lactamasas de tipo IMP y VIM de Argentina. Como **Objetivo Específico I** planteamos describir la epidemiología de 40 enterobacteriales productoras de *bla*_{IMP} aislados de 12 hospitales de Argentina. Como **Objetivo Específico II** planteamos realizar la caracterización epidemiológica y

molecular de seis aislamientos de *Enterobacter cloacae* productores de bla_{VIM} . Para llevar adelante estos objetivos realizamos estudios fenotípicos, utilizando técnicas microbiológicas convencionales. Los ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos se realizaron siguiendo los protocolos y normas establecidas por CLSI y EUCAST, además de procedimientos desarrollados en nuestro laboratorio. Por otra parte, se utilizaron diversas metodologías moleculares (PCR, nucleasa S1-PFGE, Southern Blot, secuenciación por Sanger, secuenciación masiva de nueva generación o WGS) para la determinación de la relación genética entre aislamientos (PFGE, MLST) y la caracterización molecular de los elementos genéticos móviles (secuenciación de todos los integrones, de 6 plásmidos y 2 genomas).

Tras el estudio fenotípico y molecular detectamos la producción de metalo- β -lactamasa bla_{IMP-8} en 40 aislamientos mientras que en los 6 restantes detectamos bla_{VIM-2} (n=5) y bla_{VIM-11} (n=1). Todos los aislamientos fueron mayormente resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos incluyendo carbapenemes y a la fluoroquinolonas, siendo amicacina, fosfomicina, colistín y tigeciclina las drogas más activas. Detectamos la producción de β -lactamasa de espectro extendido en el 25% (10/40) de los aislamientos productores de IMP donde bla_{PER-2} fue la más frecuente (7/40), mientras que en las portadoras de VIM solo se detectó bla_{PER-2} en un aislamiento. Asimismo, el 75% (30/40) de los aislamientos de bla_{IMP-8} y 5/6 en los de bla_{VIM} portaron mecanismos plasmídicos de resistencia a las quinolonas. La secuenciación completa de los plásmidos de bla_{IMP-8} confirmó la característica conjugativa de los mismos, ya que 4 de ellos tuvieron un tamaño similar de aproximadamente 72 kb y que pertenecieron a los grupos de incompatibilidad M1 (n=3) o M2 (n=1) mientras que el plásmido de *C. farmeri* M19031 fue de 121 kb aproximadamente, con un grupo de incompatibilidad no determinado. Estos plásmidos portaron algunos genes de resistencia adicionales no detectados por PCR. Tras la secuenciación completa del plásmido de ECL-M15736, obtuvimos una secuencia de 52.630 pb, y determinamos que es un plásmido no conjugativo. Los plásmidos aquí descritos son novedosos dado que no existen secuencias con altos porcentaje de identidad en la base de datos de GenBank con los descriptos aquí. Por último, el WGS de ECL-M9921 y KPN-M19434 nos permitió determinar el secuencia tipo de cada aislamiento (ST37 y ST12 respectivamente), la presencia de genes de resistencia no sugeridas por fenotipia, los genes de virulencia y el número total de plásmidos en cada cepa y sus replicones.

Tras todos los estudios realizados comprobamos que tanto IMP como VIM se diseminan principalmente de manera horizontal intra e inter especie en plásmidos conjugativos. Estos resultados también sugieren la diseminación de los integrones a diversos plásmidos y diversas especies bacterianas. Considerando estos hallazgos, sigue siendo fundamental el

estudio y la vigilancia continua de estos microorganismos en nuestro país para poder alertar a tiempo (por ejemplo la aparición de un clon epidémico) y para poder colaborar con la implementación y diseño de estrategias de control de infecciones que frenen la diseminación de estas bacterias.

“CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS PRODUCTORES DE CARBAPENEMASAS”

LIC. DE BELDER DENISE GISELE

DIRECTORA: DRA. SONIA A. GOMEZ

CO-DIRECTOR: DR. DIEGO F. FACCONI

*Tesis para optar al Título de
Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes*

TRABAJO REALIZADO EN:

*Servicio de Antimicrobianos - Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas -
Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos C. Malbrán”-*

JEFA DEL SERVICIO ANTIMICROBIANOS: ALEJANDRA CORSO

Marzo 2019

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	6
ABREVIATURAS UTILIZADAS	9
INTRODUCCIÓN	
1. ENTEROBACTERALES	11
2. ANTIMICROBIANOS	13
2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS	14
2.2 ANTIMICROBIANOS NO B-LACTÁMICOS.....	15
2.2.1 Tetraciclinas.....	15
2.2.2 Sulfonamidas	16
2.2.3 Aminoglucósidos.....	17
2.2.4 Quinolonas y fluoroquinolonas.....	18
2.3 ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS	20
2.3.1 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.....	20
2.3.2 Antibióticos β -lactámicos de acción sobre enterobacteriales.....	22
2.3.3 Estructura de los carbapenemes.....	24
2.3.4 Mecanismo de acción de los carbapenemes	25
3. RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	26
3.1 CLASIFICACIÓN DE LAS B-LACTAMASAS	30
3.2 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS DEBIDO A METALO-B-LACTAMASAS.	31
3.2.1 Subclases de Metallo- β -lactamasas	32
4. EPIDEMIOLOGÍA DE IMP Y VIM	37
5. MECANISMOS DE DISEMINACIÓN DE IMP Y VIM.....	39
5.1 INTEGRONES.....	39
5.1.1 Integrones de clase I	41
5.1.2 Integrones de clase 2	43

5.1.3	<i>Integrones de clase 3</i>	44
5.1.4	<i>Integrones de clase 4 – Super integrones</i>	44
5.2	OTROS ELEMENTOS QUE CAPTURAN GENES DE RESISTENCIA: SECUENCIAS DE INSERCIÓN Y TRANSPOSONES	45
5.2.1	<i>Secuencias de Inserción</i>	45
5.2.2	<i>Transposones</i>	46
5.3	PLÁSMIDOS DE RESISTENCIA	47
6.	METODOLOGÍAS APLICADAS A ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR	49
7.	ESTADO DE SITUACIÓN	53
8.	OBJETIVOS	54
MATERIALES Y MÉTODOS		
9.	MATERIALES Y MÉTODOS	56
9.1	AISLAMIENTOS BACTERIANOS Y DATOS EPIDEMIOLÓGICOS	56
9.2	PRUEBAS FENOTÍPICAS DE TAMIZAJE Y DE DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS	56
9.2.1	<i>Pruebas fenotípicas de tamizaje</i>	56
9.2.2	<i>Prueba fenotípica de detección de carbapenemasas</i>	57
9.3	SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	60
9.3.1	<i>Sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión en agar</i>	60
9.3.2	<i>Concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de dilución en agar</i>	61
9.3.3	<i>Concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de microdilución</i>	62
9.4	PRUEBAS FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA ADICIONALES	62
9.4.1	<i>Detección de β-lactamasas de espectro extendido</i>	62
9.4.2	<i>Mecanismos de resistencia a quinolonas</i>	63
9.5	AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	64
9.6	CARACTERIZACIÓN DEL ENTORNO GENÉTICO DE <i>BLA_{IMP}</i> Y <i>BLA_{VIM}</i>	65
9.6.1	<i>Secuenciación de ácidos nucleicos por el método Sanger</i>	65
9.6.2	<i>Tipificación de replicones basada en PCR (PBRT)</i>	66
9.7	EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOS AISLAMIENTOS	66
9.7.1	<i>Electroforesis en campo pulsado (PFGE)</i>	66
9.7.2	<i>Tipificación de secuencias multilocus (MLST)</i>	68
9.8	CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS	69

9.8.1 Conjugación biparental.....	69
9.8.2 Perfil plasmídico: restricción con nucleasa S1-PFGE.....	69
9.8.3 Restricción con endonucleasa I-Ceu I.....	70
9.8.4 Transferencia por capilaridad y Southern blot.....	70
9.9 SECUENCIACIÓN MASIVA DE ADN (WGS).....	72
9.10 NÚMEROS DE ACCESO EN GENBANK.....	74

RESULTADOS

CAPÍTULO I: DESCRIPCIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS PORTADORES DE <i>BLA</i>_{IMP-8} EN <i>ENTEROBACTERIALES</i> DE ARGENTINA.....	76
10 RESULTADOS CAPÍTULO I.....	77
10.1 AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	77
10.2 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE LA PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASA.....	81
10.3 SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS DE LOS ENTEROBACTERIALES PRODUCTORES DE IMP.....	82
10.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA ADICIONALES.....	84
10.4.1 Producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	84
10.4.2 Mecanismos de resistencia a quinolonas.....	85
10.5 RESULTADOS CONFIRMATORIOS DE MECANISMOS DE RESISTENCIA MEDIANTE PCR.....	86
10.5.1 Determinación de mecanismos de resistencia a los carbapenemes.....	86
10.5.2 Determinación de los mecanismos de resistencia adicionales.....	88
10.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES QUE PORTAN <i>BLA</i> _{IMP-8}	89
10.7 RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOS AISLAMIENTOS ESTUDIADOS.....	91
10.8 CARACTERIZACIÓN DE MOLECULAR DE PLÁSMIDOS.....	94
10.8.1 Determinación de cantidad y tamaño de plásmidos de los aislamientos portadores de <i>bla</i> _{IMP-8}	94
10.8.2 Diseminación horizontal de los elementos genéticos móviles que portan el gen <i>bla</i> _{IMP-8}	98
10.8.3 Caracterización plasmídica por secuenciación masiva.....	99
10.9 SECUENCIACIÓN MASIVA DE GENOMA.....	103
10.10 RESUMEN DE RESULTADOS CAPÍTULO I.....	107
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE <i>ENTEROBACTER CLOACAE</i> PORTADORES DE <i>BLA</i>_{VIM-2} Y <i>BLA</i>_{VIM-11}.....	108
11 RESULTADOS CAPÍTULO II.....	109

11.1 AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y DATOS EPIDEMIOLÓGICOS	109
11.2 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE LA PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASA.....	110
11.3 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	110
11.4 PRUEBAS FENOTÍPICAS DE MECANISMOS DE RESISTENCIA ADICIONALES	111
11.4.1 <i>β-lactamasa de espectro extendido (BLEE)</i>	<i>111</i>
11.4.2 <i>Mecanismo de resistencia a quinolonas</i>	<i>111</i>
11.5 RESULTADOS CONFIRMATORIOS DE MECANISMOS DE RESISTENCIA MEDIANTE PCR.....	112
11.5.1 <i>Determinación de mecanismos de resistencia a los carbapenemes.....</i>	<i>112</i>
11.5.2 <i>Determinación de los mecanismos de resistencia adicionales.....</i>	<i>114</i>
11.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES QUE PORTAN <i>bla</i>_{VIM}.....	114
11.7 DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOS AISLAMIENTOS DE <i>E. CLOACAE</i> PRODUCTORES DE <i>bla</i>_{VIM}	116
11.7.1 <i>Evaluación de la relación genética de los aislamientos de E. cloacae mediante PFGE.....</i>	<i>116</i>
11.7.2 <i>Caracterización molecular de los aislamientos por MLST.....</i>	<i>117</i>
11.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLÁSMIDOS.....	118
11.8.1 <i>Diseminación horizontal de los elementos genéticos móviles que portan el gen <i>bla</i>_{VIM}.....</i>	<i>118</i>
11.8.2 <i>Determinación de la cantidad y tamaño de los plásmidos portadores de <i>bla</i>_{VIM}.....</i>	<i>118</i>
11.8.3 <i>Determinación de la localización del gen <i>bla</i>_{VIM}.....</i>	<i>119</i>
11.9 DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD DE LOS PLÁSMIDOS EN LOS <i>E. CLOACAE</i>.....	121
11.10 CARACTERIZACIÓN PLASMÍDICA POR SECUENCIACIÓN MASIVA DE PLÁSMIDO.	121
11.11 RESUMEN RESULTADOS CAPÍTULO II	124
12 DISCUSIÓN GENERAL	126
13 CONCLUSIÓN.....	135
14 PERSPECTIVAS.....	136
15 REFERENCIAS	137
16 ANEXO	144
A1- CRITERIOS DE SOSPECHA Y DETECCIÓN DE CARBAPENEMASA EN <i>ENTEROBACTERALES</i>	144
A2 - MATERIALES Y MÉTODOS.....	145
B - RESULTADOS CAPÍTULO I Y II	150

Agradecimientos

A mi familia, a mis padres por ser el pilar fundamental en mi vida y por su apoyo incondicional durante todos estos años.

A mis hermanas, por estar siempre presentes en cada momento de mi vida y compartir aquellos momentos inolvidables.

A mi compañero de vida, mi amor, gracias por apoyarme y acompañarme en cada sueño.

A Sonia Gómez, por la confianza y la paciencia que me tuvo, y por sobre todo, quiero agradecer su esfuerzo y dedicación para guiarme y enseñarme durante todos estos años.

A Diego Faccone por su apoyo constante, su predisposición y su colaboración en todo momento.

A Alejandra Corso por brindarme la posibilidad de continuar en el Servicio de Antimicrobianos.

A todos los que forman parte de Servicio de Antimicrobianos, Flor, Pauli, Stella, Naty, Cele, Pao, Mely, Eze A., Ale P., Ale M. Eze T., Fer, Juan, gracias a todos ustedes por su ayuda y enseñanza, y especialmente por su cariño constante.

Muchas gracias a todos.

Abreviaturas utilizadas

BLEA	β -Lactamasa de espectro ampliado
BLEE	β -Lactamasa de espectro extendido
ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
dNTP	Desoxi-nucleótido(s) tri-fosfato(s)
EDTA	Ácido etilem-diamino-tetra-acético
kb	Kilobase(s)
MLA	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBP	Proteínas ligadoras de penicilina
NAM	Ácido N-acetilmurámico
NAG	N-acetilglucosamina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QRDR	Mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas
LNRRA	Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration (FDA)</i>
VIM	Verona integron-encoded
IMP	Imipenemasa
NDM	New Delhi metalo- β -lactamasas
APB	Ácido fenil borónico
MBL	Metallo- β -lactamasas
ARN_r	Ácido ribonucleico ribosomal
ST	Secuenciotipo
CC	Complejo clonal
SVL	Variante de un solo locus

INTRODUCCIÓN

1. Enterobacterales

Los enterobacterales son una familia de bacilos Gram-negativos que consta de más de 50 géneros y 210 especies [1]. No pueden formar esporas y crecen de manera rápida tanto en forma aerobia como anaerobia [2]. Los miembros de esta familia se encuentran en diversas fuentes ecológicas, como el suelo, el agua, la vegetación y los animales [3]. Algunas especies son patógenos importantes de plantas y tienen relevancia económica en la producción de cultivos; mientras que otras especies forman parte de la flora normal de los animales, incluidos los humanos [3]. Muchos de estos enterobacterales se asocian con frecuencia a diversos tipos de infecciones que incluyen infecciones intraabdominales, infecciones del tracto urinario, neumonía y bacteriemias [4].

En el contexto de una enfermedad aguda, los enterobacterales colonizan la piel y el tracto digestivo en la mayoría de los pacientes hospitalizados y casi todos los individuos críticamente enfermos [5]. Una vez establecidos como agentes colonizantes, estos organismos pueden causar infecciones adquiridas por microaspiración o por su introducción en sitios estériles, ya que éstos pacientes poseen su sistema inmune debilitado (o suprimido) [5].

A nivel nosocomial, se ha observado que los pacientes con estadías hospitalarias prolongadas tienen más riesgo de sufrir infecciones por enterobacterales [2]. Los miembros mayormente responsables de estas infecciones son *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, los cuales se ven favorecidos por el uso de dispositivos que alteran las barreras mucosas (catéteres, vías aéreas artificiales), los tratamientos antibióticos inadecuados y la morbilidad asociada como son la diabetes, neoplasias malignas, tratamientos inmunosupresores, etc. [2].

Desde el punto de vista clínico, los enterobacterales se pueden clasificar en dos grupos:

- i. Enterobacterales patógenos primarios que producen principalmente cuadros gastrointestinales en personas con defensas indemnes o sanas (*Salmonella* entérica, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.* y algunas cepas de *E. coli*) [2];

ii. Enterobacteriales oportunistas que en determinadas situaciones pueden causar infecciones urinarias, colecistitis, peritonitis, neumonías, infecciones de herida quirúrgica o meningitis en personas que presentan alteraciones del sistema inmunológico o son portadores de dispositivos o sondas. Los patógenos más frecuentes dentro de este grupo son: *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* y *Morganella morganii* [2].

Algunas especies han tomado tanta relevancia que se generó una sigla conocida como ESKAPE que agrupa a los agentes etiológicos más relevantes causantes de infecciones nosocomiales resistentes a antibióticos de amplio espectro y que incluye: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y especies de *Enterobacter*) [6]. Puntualmente, se consideran de altísima preocupación la morbilidad y mortalidad en pacientes críticos causada por los patógenos ESKAPE Gram negativos, sobre todo debido a la falta de nuevos agentes antimicrobianos que puedan combatir a estos patógenos [6]. De los patógenos ESKAPE Gram negativos, *Klebsiella pneumoniae* y especies de *Enterobacter*, como *E. cloacae*, son los patógenos nosocomiales más reportados en todo el mundo [6].

K. pneumoniae puntualmente ha sido reconocido como un patógeno que representa una amenaza urgente para la salud humana debido a que es un patógeno nosocomial capaz de acumular genes de resistencia a diversas familias de antimicrobianos, aunque también es responsable de infecciones de la comunidad [7]. Por otra parte, *K. pneumoniae* posee una cantidad de mecanismos adaptativos que le proveen a éste patógeno herramientas para infectar (factores de virulencia) y evadir la respuesta inmune del huésped como la cápsula polisacáridica, proteínas de membrana externa, factores metabólicos que facilitan la incorporación de hierro, etc [8].

Por otra parte, en las últimas décadas han emergido, también como causantes de infecciones nosocomiales, especies del género *Enterobacter* productoras de carbapenemasas. *Enterobacter* es un género de Gram negativos bacilares, facultativos, anaerobios, no esporulantes que pertenecen a la familia de los enterobacterales y son saprofitos en el ambiente y pueden ser detectados en la tierra y en los desagües cloacales, pero también son parte de la microbiota en el tracto gastrointestinal de los humanos [9]. Puntualmente, *E. cloacae* se encuentra dentro de las especies de *Enterobacter* más comunes causantes de infecciones nosocomiales portadoras de mecanismos de resistencia [10]. Este microorganismo, al igual que *K. pneumoniae*, también posee factores de virulencia relevantes para la patogenicidad como la capacidad de formar biofilm y secretar algunas citotoxinas (enterotoxinas, hemolisinas, toxinas formadoras de poros) [10]. Hoy en día, *E. cloacae* se ha convertido en la segunda o tercera especie (luego de *K. pneumoniae* y *E. coli* dependiendo la región) de enterobacterales involucrada en infecciones nosocomiales [10].

2. Antimicrobianos

Los orígenes del descubrimiento de los antibióticos se remontan al año 1928 cuando Alexander Fleming reconoció la actividad antibacteriana de una sustancia secretada por el hongo *Penicillium notatum* a la que denominó penicilina, en una placa de cultivo sembrada con un aislamiento de un germen Gram positivo del género *Staphylococcus* [11]. Sin embargo, fue recién en el año 1940, gracias a una técnica de purificación desarrollada por Howard Florey y Ernst Chain que se logró purificar cantidades de penicilina suficientes para realizar pruebas clínicas. Eventualmente, dicho desarrollo condujo a la producción y distribución masiva de penicilina en 1945 [12].

Por otro lado, el hallazgo de las sulfonamidas comenzó cuando Gerhard Domagk, en su intento de salvar a su hija de la infección por estreptococos, observó que el colorante prontosil, era capaz de restringir selectivamente a las bacterias infectantes [13]. Posteriormente, Ernest Fourneau descubrió que éste colorante es una pro-droga que en el cuerpo humano se transformaba en sulfanilamida, una sustancia responsable de la actividad antimicrobiana observada inicialmente

por Domagk [13]. Este hallazgo condujo al descubrimiento de nuevas drogas antibacterianas derivadas de éste grupo químico, como la sulfapiridina que fue utilizada en neumonías, la sulfacetamida utilizada en infecciones del tracto urinario, y el succinilsulfatiazol que se utilizó contra las infecciones del tracto gastrointestinal [13]. Además, el sulfatiazol fue muy utilizado durante la Segunda Guerra Mundial para curar las infecciones de las heridas de los soldados [13].

El éxito clínico de la penicilina y las sulfonamidas, impulsó la búsqueda y el desarrollo de antibióticos sin precedentes, lo que resultó en la identificación de la mayoría de las clases de fármacos actualmente utilizados en el ámbito clínico [11].

2.1 Clasificación de los antimicrobianos

Los antimicrobianos se pueden clasificar según el efecto que produce sobre el microorganismo [14]. De acuerdo a esto, los antimicrobianos que producen la muerte de las bacterias se conocen como bactericidas [14]. Como ejemplo de éste grupo son los antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, polimixinas, fosfomicina, quinolonas (ej. ácido nalidíxico y ciprofloxacina) y nitrofurantoínas [14]. Por otro lado, los antimicrobianos que inhiben el crecimiento bacteriano se conocen como bacteriostáticos [14]. Pertenecen a este grupo los macrólidos (ej. eritromicina, azitromicina y claritromicina), las tetraciclinas (ej. tigeciclina, minociclina y tetraciclina) y cloranfenicol, entre otros [14]. Este efecto antibacteriano, ya sea bactericida o bacteriostático, depende del mecanismo de acción del antimicrobiano y, por tanto, de su estructura. Asimismo, existen otros factores como la concentración alcanzada en el sitio de la infección, el tipo de germen, el tamaño del inóculo, la patología de base del paciente, etc., que paralelamente contribuyen con dicho efecto [14].

A continuación se describen algunas familias de antimicrobianos utilizados en el ámbito clínico para el tratamiento de bacilos Gram negativos. Por otra parte, se describirán la estructura y función de los antimicrobianos con actividad bactericida o bacteriostática sobre los

enterobacteriales multirresistentes causantes de infección o colonización. El concepto de multirresistencia se detalla en la sección 3.

2.2 Antimicrobianos no β -lactámicos

2.2.1 Tetraciclinas

Las tetraciclinas constituyen una familia de antimicrobianos derivados de diferentes especies de *Streptomyces spp.* (clortetraciclina, tetraciclina, demeclociclina) y derivados semisintéticos como la doxiciclina o la minociclina [15]. Todas se caracterizan por una estructura compuesta de cuatro anillos hidrofóbicos fusionados y diversamente sustituidos, principalmente por grupos hidrofílicos hidroxilados (Figura 1) [16]. Asimismo, las alquilaminociclinas o glicilciclinas (tigeciclina, Figura 1b) poseen un sustituyente adicional voluminoso con un resto hidrofóbico y un grupo amino ionizable [17]. Estos antibióticos son agentes bacteriostáticos, con actividad frente a una gran variedad de microorganismos [16]. Las tetraciclinas traspasan la membrana externa de los Gram negativos a través de porinas mediante difusión pasiva y llegan al citoplasma por un mecanismo dependiente de energía [16]. Es allí donde interfieren con la etapa de iniciación de la síntesis de proteínas mediante la inhibición de la unión del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma. La proteína 7S y el ARN 16S muestran la mayor afinidad por las tetraciclinas y, por lo tanto, son las principales blancos de acción [17]. Esta unión inhibe la fijación de un nuevo aminoacil-ARNt en el ribosoma [17]. Además, las tetraciclinas se unen, o al menos sobresalen, en el sitio P por alteración en la conformación del ribosoma en el estado postranslocacional, y pueden modificar la conformación del ribosoma al nivel de la cabeza de la subunidad 30S y el lado de interfaz de la subunidad 50S [17].

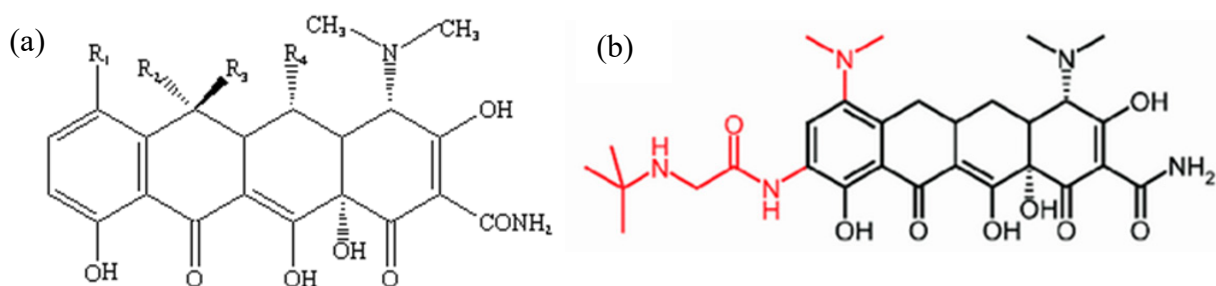


Figura 1. Estructura química de (a) la tetraciclina con los cuatro anillos hidrofóbicos fusionados y sustituidos, por grupos hidrofílicos hidroxilados y (b) de la tigeciclina con el sustituyente en color rojo.

2.2.2 Sulfonamidas

Las sulfonamidas son antimicrobianos bacteriostáticos, de amplio espectro, con actividad frente a una gran variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos [16]. Las sulfonamidas, como el sulfametoxazol, son derivados de p-amino-benceno-sulfonamida, que es un análogo estructural del ácido p-aminobenzoico (Figura 2) y compiten con él por la enzima dihidropteroato sintasa que interviene en el metabolismo del ácido fólico [17]. Para la actividad antimicrobiana se requiere un grupo amino libre en la posición 4 y un grupo sulfonamida en la posición 1. Los anillos heterocíclicos o aromáticos que sustituyen a la sulfonamida mejoran esta actividad al modificar la absorción y la tolerancia gastrointestinal [11]. Este ácido es un factor imprescindible para la síntesis de precursores de los ácidos nucleicos bacterianos. Por otro lado, las células eucariotas no se ven afectadas por la acción de las sulfonamidas ya que éstas requieren ácido fólico preformado [17].

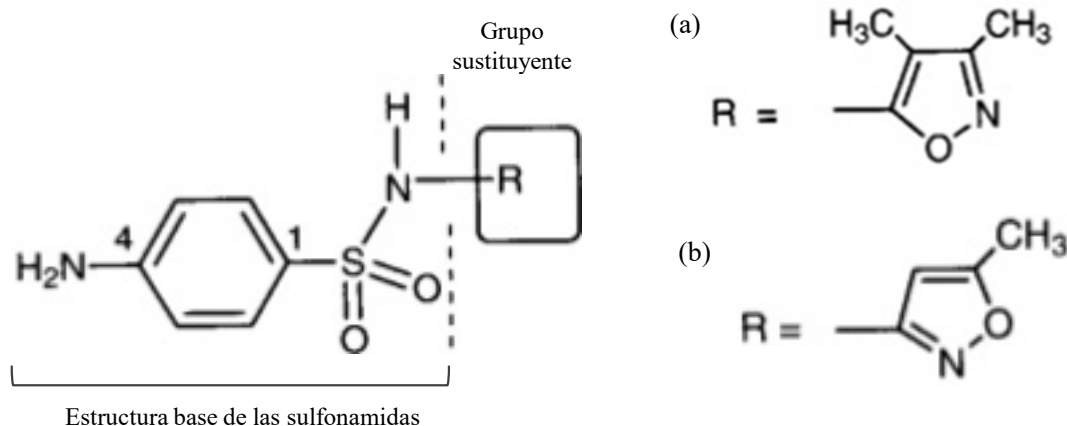


Figura 2. Estructura de sulfonamidas con los grupos sustituyentes (R). (a) sulfisoxazole y (b) 1 sulfametoxazol.

2.2.3 Aminoglucósidos

Los antibióticos aminoglucósidos son una familia compleja de compuestos caracterizados por tener un núcleo de aminociclitol (estreptamina, 2-deoxistreptamina o estreptidina) unidos a amino azúcares a través de enlaces glicosídicos [17]. Otros compuestos como la espectinomina, que es un aminociclitol que no está unido a amino azúcares, o compuestos que incluyen la fortamina aminociclitol también se incluyen en esta familia [17]. La mayoría de los aminoglucósidos son sustancias naturales producidas por actinomicetos del género *Streptomyces* o *Micromonospora*, como kanamicina, gentamicina y tobramicina (Figura 3) [18]. Mientras que posteriores modificaciones químicas para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, toxicológicas y/o microbiológicas dieron lugar a los aminoglucósidos semisintéticos como la amicacina (Figura 3), netilmicina o dibecacina [19].

Los aminoglucósidos generalmente tienen un amplio espectro antimicrobiano y una fuerte actividad bactericida contra la mayoría de las bacterias Gram-negativas, incluyendo *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella* [20]. El principal mecanismo involucrado es su capacidad para unirse a la región de decodificación de la subunidad 30S (en la molécula 16S del ARNr) e interferir con la síntesis de proteínas [20]. Cuando se produce esta unión en el sitio A, el ARNr experimenta un cambio conformacional que resulta en un estado similar al "estado de

decodificación", que conduce a una lectura errónea del ARNm [20]. La elongación de la cadena peptídica no se produce debido a la falla del mecanismo que asegura la precisión de la traducción, lo que resulta en la síntesis de proteínas defectuosas [20]. Además, se cree que las proteínas aberrantes insertadas y acumuladas en la membrana celular conducen a una permeabilidad alterada y el aumento resultante en las concentraciones intracelulares de aminoglucósidos tiene un papel importante en el efecto bactericida y el efecto post antibiótico de los aminoglucósidos [20]. Asimismo, se presume que los aminoglucósidos inhiben la translocación al inmovilizar el peptidil-ARNt en el sitio A del ribosoma, inhibiendo así la síntesis de proteínas [20].

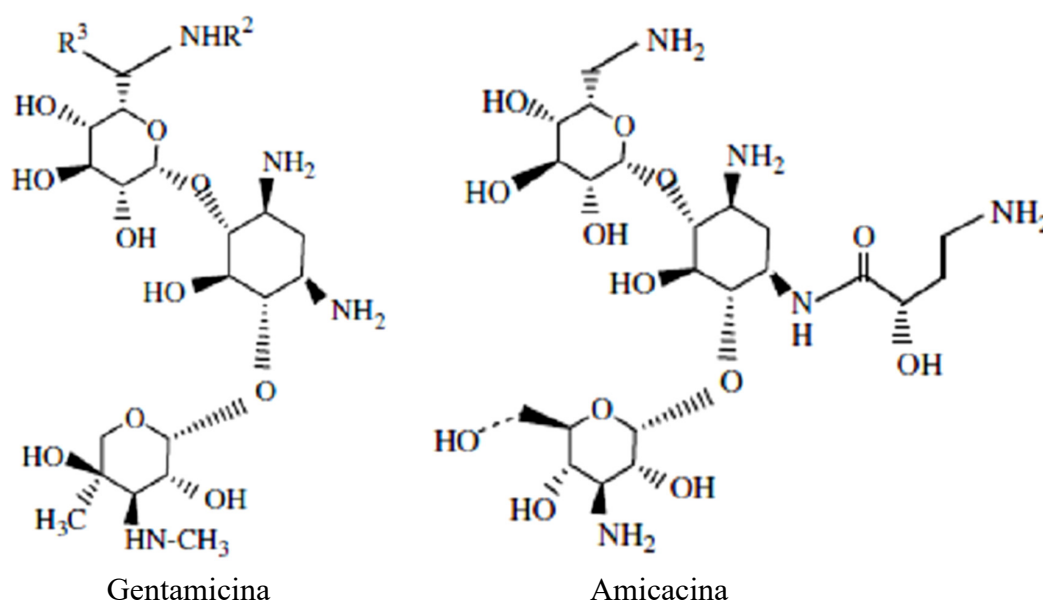


Figura. 3. Estructura de los aminoglucósidos. Amicacina compuesto de origen semisintético y gentamicina de origen natural.

2.2.4 Quinolonas y fluoroquinolonas

Las quinolonas son una familia de antimicrobianos sintéticos de amplio espectro que fueron desarrollados a partir de la modificación del ácido 1-alkil-1,8-naftiridina-4-ona-3-carboxílico [21]. La primer quinolona introducida en la terapia clínica fue el ácido nalidíxico (Figura 4 b) que se obtuvo durante la síntesis de la cloroquina, fármaco utilizado para la prevención de la malaria [22].

Las quinolonas están compuestas por dos anillos fusionados con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carboxilo en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4 (Figura 4) [23]. Posteriores mejoras farmacológicas dieron origen a un nuevo grupo de agentes antimicrobianos llamados piperazinil fluoroquinolonas o simplemente fluoroquinolonas. Estas modificaciones fueron la adición de un átomo de flúor en la posición 6 y un anillo de piperazina en el carbono 7 (ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, etc), las cuales presentaron un aumento tanto en la actividad biológica como en las propiedades farmacocinéticas, mejora de la absorción oral y amplia distribución tisular [23].

Por otro lado, su actividad antimicrobiana consiste en inhibir la síntesis del ADN de las bacterias al interferir con la acción de dos enzimas esenciales, la ADN girasa y la topoisomerasa IV. Ambas son enzimas topoisomerasas tipo II heterotetraméricas que cortan transitoriamente ambas cadenas de ADN de un dúplex por hidrólisis de ATP y pasan a través de la ruptura otro segmento de doble hélice. La ADN girasa introduce superenrollamientos negativos o relaja los superenrollamientos positivos en el ADN, mientras que la topoisomerasa IV muestra una potente actividad de decatenación. Estas enzimas son esenciales para el crecimiento bacteriano ya que controlan el estado topológico del ADN cromosómico para facilitar la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN [24].

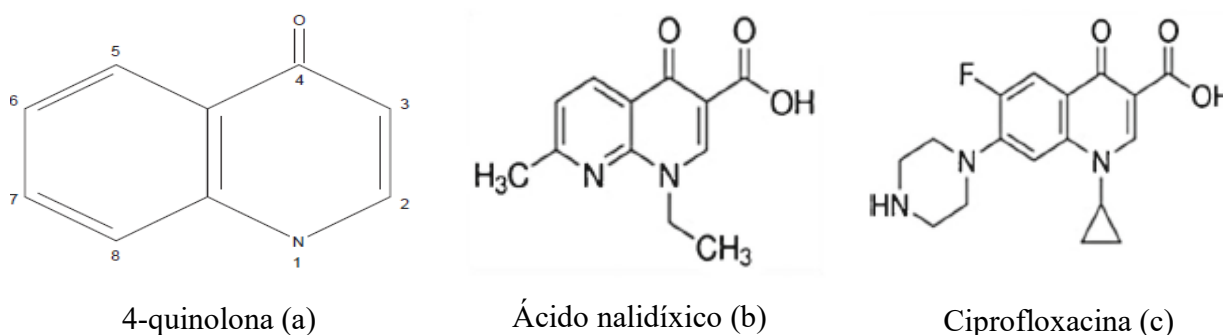


Figura. 4. Estructura del precursor de las quinolonas (a). Estructura del ácido nalidíxico (b). Estructura de la ciprofloxacina (c).

2.3 Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son la clase más utilizada debido a su fácil administración, baja toxicidad, potente actividad antimicrobiana y bajo costo [22]. Estos antibióticos son una extensa familia que inhiben la síntesis de la pared bacteriana e inducen la autólisis de la bacteria [25]. Estos compuestos se caracterizan por presentar en su estructura un anillo heterocíclico de cuatro miembros (3 carbonos y un nitrógeno) conocido como anillo β -lactámico (Figura 5) [26]. Dentro de ésta familia se definen subclases según la naturaleza de los anillos que se unen al anillo β -lactámico, con excepción de las monobactamas. Estas subfamilias son las penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemes [27]. En ésta tesis se describe a continuación el mecanismo de acción de esta familia de antibióticos y luego se detallan los modos de acción de las tres últimas familias de β -lactámicos ya que las penicilinas (ej. ampicilina) no se utilizan para tratar infecciones causadas por enterobacteriales debido a los mecanismos de resistencia intrínsecos que poseen (CLSI, apéndice, tabla B1, p198).

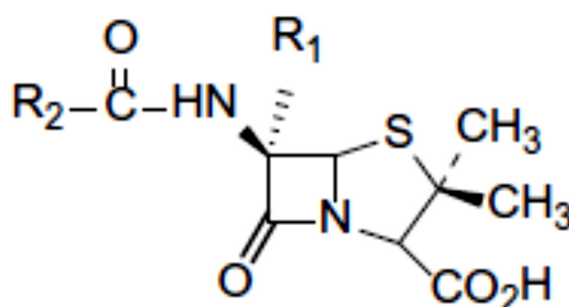


Figura 5. Estructura de un antibiótico β -lactámico con el anillo heterocíclico de cuatro miembros (3 carbonos y un nitrógeno) conocido como anillo β -lactámico.

2.3.1 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos

La integridad de la pared celular bacteriana es esencial para mantener la forma de la célula en un entorno hipertónico y hostil, como es el suero, la orina, el moco pulmonar o el tracto gastrointestinal [28]. La bacteria conserva la estabilidad osmótica mediante una pared celular

rígida compuesta por unidades alternadas de ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG) [28]. Estas unidades glicosídicas se unen mediante una enzima transglicosidasa. Cada unidad de NAM se encuentra unida a un pentapéptido que contiene un aminoácido D-alanina el cual se une con un residuo D-alanina de un pentapéptido adyacente o cercano; este entrecruzamiento es catalizado por proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que actúan como transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas [28]. Este proceso de formación de la pared celular es dinámico ya que también actúan las autolisinas que hidrolizan al peptidoglicano al mismo tiempo que se sintetiza [28].

Los antibióticos β -lactámicos poseen una estructura que imita a los residuos aminoacídicos D-alanina-D-alanina y al unirse a las PBPs forman una unión covalente irreversible en el sitio catalítico de la enzima produciendo su inactivación [28]. Como la descomposición del peptidoglicano continúa ayudado por las autolisinas, se genera el debilitamiento de la pared y por tanto una mayor permeabilidad de la célula que finalmente estalla por la presión osmótica [28].

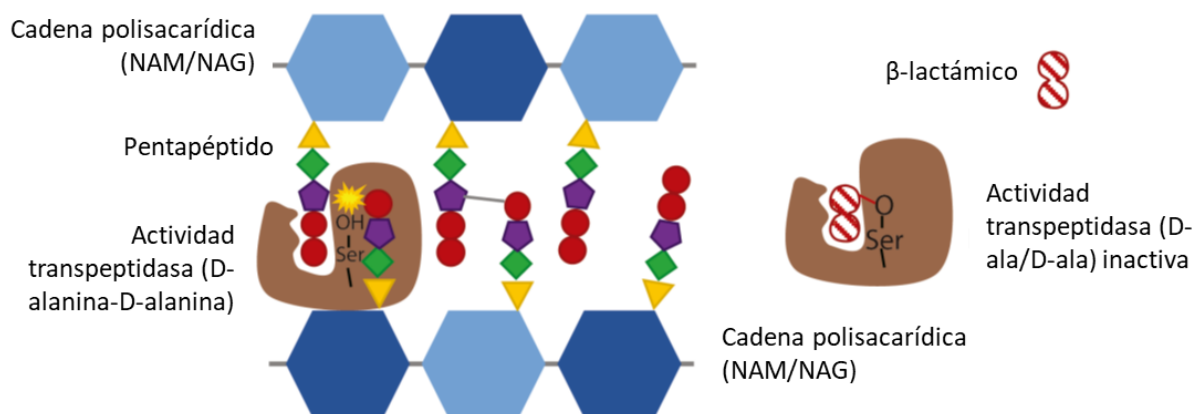


Figura 6. Representación esquemática del mecanismo de acción de un antibiótico β -lactámico. El peptidoglicano conformado por unidades de NAM y NAG se representa en celeste y azul. A éstas cadenas polisacarídicas se adhieren cadenas de pentapéptidos que poseen dos D-alanina finales (D-ala-D-ala). La enzima transpeptidasa en color marrón, cataliza la formación de los puentes entre las cadenas peptídicas uniendo específicamente los terminales D-ala-D-ala (círculos rojos). El β -lactámico (círculos con rayas blancas y rojas) se une covalentemente a la PBP y la inactiva.

2.3.2 Antibióticos β -lactámicos de acción sobre enterobacteriales

2.3.2.1 Cefalosporinas

Las cefalosporinas presentan un anillo dihidrothiacínico (ácido 7 α -cefalosporínico) unido al anillo β -lactámico y se clasifican en cinco generaciones de acuerdo al espectro de actividad [18]. Las cefalosporinas de primera generación (ej. cefalotina) tienen muy buena actividad contra gérmenes Gram positivos pero no poseen actividad sobre gérmenes Gram negativos [16]. Las cefalosporinas de segunda generación (ej. cefoxitina) tienen mayor actividad sobre gérmenes anaerobios [29]. Las cefalosporinas de tercera generación tienen mejor actividad sobre los gérmenes Gram negativos, pero su actividad contra los gérmenes Gram positivos es variable (ej. cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona) [29]. Cefepime y cefpirome son cefalosporinas de cuarta generación con eficacia demostrada contra los representantes más importantes tanto en Gram positivos como Gram negativos [29]. La ceftarolina es una cefalosporina de quinta generación con actividad mejorada contra *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) [29].

2.3.2.2 Monobactamas

El aztreonam, es el único monobactam actualmente disponible para uso clínico y fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos en 1986 y ha sido utilizado desde entonces para tratar infecciones causadas por enterobacteriales y *P. aeruginosa* [30]. Tiene una estructura química única en la que el anillo β -lactámico no está unido a un anillo adyacente de 5 o 6 miembros, pero tiene adiciones químicas al anillo que mejoran la actividad y la estabilidad frente a enzimas que pueden hidrolizarlo como las β -lactamasas (Figura 7) que se describen a continuación [18]. Esta droga posee una cualidad única frente al resto de los antibióticos β -lactámicos ya que no puede ser hidrolizado por metalo- β -lactamasas que son enzimas pertenecientes a la clase B de Ambler y que se describen en la siguiente sección [30]. Por otra parte, ésta droga resulta de mucha utilidad para la detección de β -lactamasas de espectro extendido con el método de difusión en agar. Las bacterias productoras de dichas enzimas

suelen ser no sensibles al aztreonam y además generan un efecto sinérgico observable (ver sección 9.4) entre los discos de aztreonam y amoxicilina/ácido clavulánico por lo que facilita la sospecha en el laboratorio de microbiología clínica de la presencia de dicho mecanismo de resistencia.

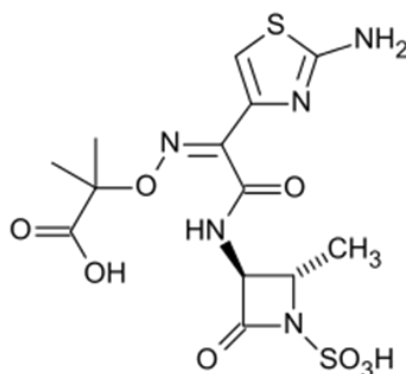


Figura 7. Estructura de un monobactam (aztreonam)

2.3.2.3 Carbapenemes

Los carbapenemes son una subfamilia de antibióticos β -lactámicos derivados de *Streptomyces spp.* El primer carbapenem descrito fue el ácido olivánico producido por *Streptomyces olivaceus* [31]. Este fue seguido por el descubrimiento de la tienamicina en 1976, hallada como resultado de un estudio de suelos para identificar inhibidores de la síntesis de peptidoglicano. La tienamicina es producida por *Streptomyces catleya* y es considerada la precursora de los carbapenemes actualmente utilizados en la terapia antimicrobiana [31].

Los carbapenemes tienen un amplio espectro antibacteriano que abarca la mayoría de los microorganismos Gram negativos y Gram positivos, aerobios y anaeróbicos, cocos y bacilos. Los carbapenemes poseen el mayor espectro de actividad y la mayor potencia tanto contra bacterias Gram negativas como contra Gram positivas [32]. Estos antibióticos se utilizan como drogas de último recurso en ocasiones donde los pacientes graves cursan infecciones por bacterias resistentes a múltiples drogas [32].

Las únicas especies bacterianas que normalmente son resistentes a los carbapenemes son *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Corynebacterium jeikeium*, *Enterococcus*

faecium y algunas otras especies de *Enterococcus* [33]. Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina y los estafilococos coagulasa negativos tienen una sensibilidad variable a los carbapenemes [33]. Con motivo de la temática de ésta tesis, describiremos a continuación en mayor detalle esta subfamilia de antibióticos.

2.3.3 Estructura de los carbapenemes

Los carbapenemes presentan una estructura similar a las penicilinas (Figura 8). Su estructura consiste en un anillo insaturado de 5 miembros fusionado con el típico anillo β -lactama de cuatro miembros (Figura 8). A diferencia de las penicilinas, los carbapenemes poseen un doble enlace entre C2-C3, un carbono en lugar del azufre en C1 y un sustituyente *trans*-1-hidroxietilo en el anillo β -lactámico (Figura 8). Esta cadena lateral se extiende debajo del plano del anillo β -lactámico y desempeña un papel importante en la resistencia a la hidrólisis por la β -lactamasa [32][34]. Los carbapenemes disponibles para la clínica presentan características estructurales que potencian su actividad en comparación con otros β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas) [34]. Entre estas características se encuentran: la configuración *R* en C8, la configuración *trans* en el enlace C5-C6 (Figura 8) y la cadena lateral en la posición 2 cargada positivamente debido a la amina básica (o amidina) que se protona a pH fisiológico [34].

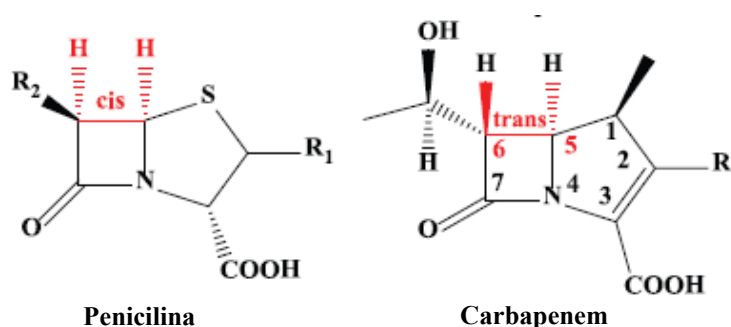


Figura 8. Estructura química de la penicilina en comparación con la estructura de un carbapenem. El carbapenem posee un doble enlace entre C2-C3, un carbono en lugar del azufre en C1, un sustituyente *trans*-1-hidroxietilo en el anillo β -lactámico y un enlace *trans* entre C6-C5.

2.3.4 Mecanismo de acción de los carbapenemes

Los carbapenemes penetran la membrana externa de bacterias Gram negativas a través de las porinas y luego de atravesar el espacio periplásmico acilan de manera permanente a las PBPs, por lo tanto se frena la transpeptidación del peptidogluano y por lo tanto su síntesis, tal como se describió en el punto 2.3.1 [32]. Un factor que determina la eficacia de los carbapenemes por sobre otros antibióticos β -lactámicos es su capacidad para unirse a múltiples PBPs (PBP-2, PBP-4, PBP-3 y PBP-1b) de una amplia gama de bacterias [32]. El imipenem se une preferentemente a PBP2, luego a PBP1a y 1b, y tiene alta afinidad por PBP3. En cambio meropenem y ertapenem se unen más fuertemente a PBP2, y luego PBP3, aunque también tienen alta afinidad por PBP1a y 1b. Doripenem tiene alta afinidad por PBPs que son específicas de cada especie, por ejemplo por la PBP3 de *P. aeruginosa* o PBP1, 2 y 4 de *S. aureus* o PBP2 de *E. coli* [35]. Como se dijo anteriormente, el proceso de síntesis de pared celular es dinámico y tridimensional y la descomposición (por autolisinas) ocurre en simultáneo con la síntesis. Por lo tanto, cuando el carbapenem inhibe a las PBPs la degradación del peptidoglicano continúa, causando en consecuencia que se debilite y por lo tanto la célula se lisa como consecuencia del shock osmótico [32]. Los carbapenemes, a diferencia de las cefalosporinas, no producen el incremento de la masa celular antes de la lisis (filamentación), por lo tanto, la bacteria libera menos endotoxina [35]. Por otra parte, la actividad mejorada de los carbapenemes se debe también a que son moléculas más pequeñas que las cefalosporinas y son *zwitteriones* (es decir, tienen cargas positivas y negativas en solución), cuyas propiedades facilitan la rápida penetración a través de la membrana externa Gram negativa [31]. Por último, los carbapenemes no pueden ser degradados por enzimas conocidas como β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) y de espectro extendido (BLEE) producida por bacterias Gram positivas y Gram negativas, por este motivo son ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones intrahospitalarias [31]. Desafortunadamente los carbapenemes son hidrolizados por enzimas conocidas como carbapenemasas [31], tema central de ésta tesis.

3. Resistencia a los antimicrobianos

Las bacterias son microorganismos que poseen habilidades adaptativas (fitness) únicas para hacer frente a condiciones ambientales desfavorables o extremas para la supervivencia e involucran características tales como poseer altas tasas reproductivas y la capacidad para intercambiar material genético inter e intra especies entre otras cosas [14].

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de una bacteria para sobrevivir y replicarse en presencia de sustancias bacteriostáticas o bactericidas [36]. La presencia de estas sustancias en el medio impone una presión selectiva sobre las bacterias y éstas responden mediante el desarrollo de diferentes mecanismos que se detallarán en los próximos incisos [36].

Durante más de 60 años, los antimicrobianos fueron utilizados en la cura de infecciones con una gran eficiencia [37]. Sin embargo, desde la utilización de la penicilina, la introducción de cualquier nuevo antibiótico vino acompañada del aislamiento y detección de microorganismos resistentes a ese nuevo agente [38]. El mayor problema reside en que la emergencia de bacterias resistentes limita el uso clínico de éstas drogas [39]. Actualmente la resistencia antimicrobiana (RAM) amenaza nuestra capacidad para tratar infecciones bacterianas y de llevar a cabo tratamientos y procedimientos médicos, incluida la quimioterapia, los trasplantes y la cirugía, que requieren antibióticos eficaces para reducir las complicaciones post operatorias [39]. Además, la RAM se asocia con el aumento de la morbilidad y la mortalidad del paciente internado, aumento de la estadía en el hospital y en consecuencia un gran gasto económico para las instituciones de salud [40].

Existen denominaciones consensuadas internacionalmente para definir la “categoría” de resistencia de un aislamiento bacteriano. Estas definiciones que se describen a continuación, son solo para uso en salud pública y con fines epidemiológicos y no pretenden reemplazar el juicio clínico, contribuir a la toma de decisiones terapéuticas u ofrecer una guía en las prácticas de control de infecciones [41]. Por otra parte, los criterios de sensible, resistente o intermedio (S, R o

I) a un agente o categoría antimicrobiana se adoptan si el aislamiento cumple con los criterios interpretativos establecidos por la *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST*, *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* o la *Food and Drug Administration (FDA)*.

Se considera resistente a una categoría antimicrobiana cuando es "no sensible al menos a un agente de una categoría":

MDR o resistencia a múltiples drogas: no sensible al menos a un agente de tres o más categorías antimicrobianas [41].

XDR o resistencia extrema a drogas: no sensible al menos a un agente de todas las categorías excepto en una o dos de ellas (es decir, sensibles solo a una o dos categorías) [41].

PDR o pan-resistencia: no sensible a todos los agentes de todas las categorías antimicrobianas (es decir, resistente a todos los antimicrobianos ensayados o disponibles) [41].

Entre los mecanismos por los cuales las bacterias se vuelven resistentes a los antimicrobianos se pueden mencionar cuatro que son considerados los principales:

i. Bombas de eflujo (Figura 9a)

Las bombas de eflujo son proteínas de membrana que transportan activamente varias sustancias al exterior de la célula contribuyendo de esta manera a la resistencia intrínseca a muchos de los antimicrobianos que pueden utilizarse para tratar las infecciones producidas por bacterias Gram negativas (Figura 9a) [42]. Dependiendo de la exposición a antibióticos o toxinas, las bombas de eflujo pueden ser el mecanismo de resistencia más eficaz y de acción más rápida en el repertorio bacteriano de respuestas al estrés. La exposición a antibióticos y otras drogas a menudo desencadena reacciones bacterianas que implican cambios en el nivel de expresión de genes que codifican para transportadores de moléculas [43]. Cuando las bombas de eflujo son sobreexpresadas, pueden conferir altos niveles de resistencia a los antimicrobianos clínicamente útiles. Algunas bombas de eflujo tienen especificidad de sustrato, mientras que la mayoría

transportan una amplia gama de sustancias estructuralmente diferentes y se conocen como bombas de eflujo de resistencia a múltiples fármacos [42].

ii. Modificación del sitio blanco (Figura 9b)

La mayoría de los antimicrobianos se unen específicamente a un sitio blanco con alta afinidad evitando así la actividad del mismo. Sin embargo, modificaciones en la estructura de este sitio impiden o disminuyen la afinidad con el antimicrobiano y en consecuencia, ese cambio estructural confiere resistencia [42]. Por ejemplo las alteraciones por mutaciones del sitio blanco de las topoisomerasas reducen la afinidad de las quinolonas sin comprometer la función de la enzima. Éste es en general el mecanismo más común de resistencia adquirida a las quinolonas y se han informado en muchas especies bacterianas. Las mutaciones asociadas con la resistencia se agrupan en regiones discretas de las subunidades enzimáticas, que se denominan regiones determinantes de la resistencia a la quinolona (QRDR). En la mayoría de los casos, las sustituciones de aminoácidos dentro del QRDR implican el reemplazo de un grupo hidroxilo con un residuo hidrófobo voluminoso que altera la geometría del bolsillo de unión a quinolona presente en la enzima e impide la unión de la quinolona [42].

iii. Alteración de expresión de porinas (Figura 9c)

Las bacterias Gram negativas son intrínsecamente menos permeables a muchos antimicrobianos ya que su membrana externa forma una barrera de permeabilidad [42]. Los antimicrobianos hidrofílicos atraviesan la membrana externa mediante difusión a través de canales acuosos que actúan como tamices moleculares, permitiendo únicamente la entrada de moléculas según lo determinado por el diámetro del canal [13]. Estas proteínas de membrana externa, llamadas porinas (OMP), son ubicuas en bacterias Gram negativas [36]. Estas porinas desempeñan un papel en la adaptación bacteriana a los cambios ambientales y se encuentran asociadas con la resistencia a los antibióticos (Figura 9c) [36]. El grado de resistencia conferida depende del número y tipo de porina que posee la bacteria [22].

iv. Inactivación enzimática del antimicrobiano (Figura 9d)

La modificación enzimática de antimicrobianos es un mecanismo de resistencia significativo que ha sido relevante desde el primer uso de antimicrobianos. La primera β -lactamasa que hidrolizó la penicilina fue identificada en 1940 en *E. coli*, varios años antes de la introducción real de la penicilina en la práctica clínica y hoy es conocida como cefalosporinasa AmpC [44]. Desde entonces, se han identificado miles de enzimas que pueden degradar y modificar los antibióticos de diferentes clases, incluidos los β -lactámicos, aminoglicósidos, fenicoles y macrólidos. También hay subclases de enzimas que pueden degradar diferentes antibióticos dentro de la misma subfamilia. Por ejemplo, dentro de la familia de los β -lactámicos, hay enzimas que pueden hidrolizar tanto penicilinas como cefalosporinas [42].

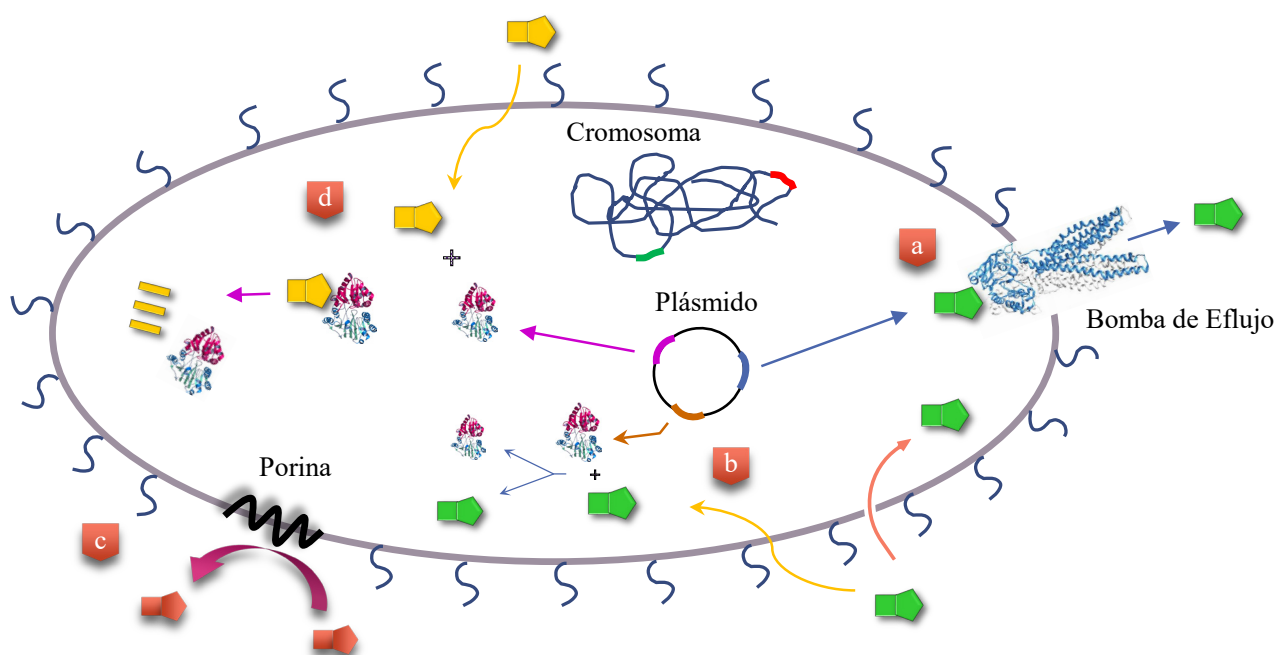


Figura 9. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. Las bacterias pueden resistir la acción de los antimicrobianos a través de cuatro mecanismos. (a) Bombas de eflujo. Proteínas transmembrana que expulsan las moléculas que penetraron en la célula hasta que alcanza una concentración por debajo de la necesaria para que el antimicrobiano tenga actividad antibacteriana; (b) Cambios en el sitio blanco o alteración de proteínas bacterianas que son dianas de los antimicrobianos; (c) Reducción de la expresión de porinas, disminuye la permeabilidad de la membrana al antimicrobiano e impide que alcance su objetivo intracelular; (d) Degradación o modificación del antimicrobiano. Las enzimas producidas degradan o modifican el antibiótico, que entra en la célula bacteriana [45].

3.1 Clasificación de las β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas versátiles de estructuras moleculares similares pero presentes en una gran variedad de especies bacterianas [46]. Su característica común es la capacidad de hidrolizar compuestos químicos que contienen un anillo β -lactámico. Actualmente existen dos esquemas de clasificación de éstas enzimas (Figura 10). Uno de los métodos fue propuesto por Ambler y clasifica a éstas enzimas de acuerdo a la secuencia proteica agrupando a las β -lactamasas en cuatro clases moleculares que contemplan los motivos aminoacídicos conservados y distintivos: A, B, C y D [47]. Las clases A, C y D incluyen enzimas que hidrolizan a su sustrato formando acil-enzimas a través de una serina presente en el sitio activo, en cambio las enzimas de clase B, son metalo enzimas que utilizan al menos un ion de zinc presente en el sitio activo para facilitar la hidrólisis del antibiótico β -lactámico. Por éste motivo, éstas enzimas se denominan metalo- β -lactamasas [47].

El segundo método de clasificación de β -lactamasas fue propuesto por Karen Bush y col. [48]. Este método de clasificación, considera los perfiles de sustrato y de inhibidores que afectan la actividad enzimática, por lo tanto, se puede correlacionar la actividad enzimática con el fenotipo observado en el aislamiento clínico [48]. El método propuesto por Bush sufrió modificaciones que se adaptaron a la epidemiología mundial. Hoy en día el sistema incluye a las enzimas con actividad cefalosporinasa en el Grupo 1 (clase C, Ambler); las serin-enzimas, β -lactamasas de amplio espectro (BLEA), β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y β -lactamasas resistentes a los inhibidores dentro del Grupo 2 (clases A y D, Ambler); y por último, las metalo- β -lactamasas que se ubican dentro del grupo 3 (clase B de Ambler) [47] [46]. En la Figura 10 se pueden ver ambos esquemas de clasificación, los grupos funcionales asociados con las cuatro clases moleculares y la diferenciación entre enzimas en función de las reacciones con los inhibidores de β -lactamasas: las β -lactamasas de clase A son inhibibles por el ácido clavulánico, la serin β -lactamasa de amplio espectro inhibibles por avibactam y las metalo- β -lactamasas son inhibibles por quelantes de iones metálicos como el EDTA [46].

Característica	Sitio Activo	Clasificación Molecular	GF	Clasificación Funcional	Inhibidor			Sustrato		
					A V	C A	EDTA			
β-lactamasas	Serina	A	2	2a	+	+	-	P		
				2b	+	+	-	P, Csp		
				2be	+	+	-	P, Csp, CspE, M		
				2br	+	-	-	P		
				2c	+	+/-	-	P		
				2f	+	+/-	-	P, Csp, CspE, M, Cb		
		C	1	1	+	-	-	Csp		
				1e	+	-	-	Csp, CspE		
				D	2d	2d	+	+/-	-	P
						2de	+	+/-	-	P, CspE, M
	B	3	3a	-	-	+	P, Csp, CspE, Cb			
			3b	-	-	+	Cb			
	Metallo (Zn ²⁺)	D	2d	2df	+	-	-	P, Cb		

Figura 10. Clasificación de β-lactamasas: características moleculares y funcionales de los principales grupos de β-lactamasas. Las clases moleculares A, B, C y D se basan en la nomenclatura propuesta por Ambler [46]. Los grupos funcionales con perfiles de sustrato e inhibidor se basan en la nomenclatura inicialmente propuesta por K. Bush como se detalla en el texto [48]; GF: grupo funcional; AV: avibactam; CA: ácido clavulánico; P: penicilinas; Csp: cefalosporinas; CspE: cefalosporinas de espectro extendido; M: monobactam; Cb: carbapenem. [Adaptación Bush 2018].

3.2 Resistencia a los antimicrobianos debido a metalo-β-lactamasas.

Como se dijo anteriormente, los carbapenemes son antibióticos β-lactámicos de último recurso para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos multirresistentes. En las últimas dos décadas, las metalo-β-lactamasas emergieron como el principal mecanismo de resistencia contra dichos antibióticos [49]. La primera metalo-β-lactamasas (BcII de *Bacillus cereus*) fue descubierta por Sabath y Abraham en 1966, dos décadas antes de la implementación clínica de

carbapenemes. Estos autores mostraron que la actividad cefalosporinasa mostrada por el aislamiento productor de ésta enzima podía ser inhibida por el tratamiento con un quelante de metales como el EDTA [49]. Esta enzima de amplio espectro fue inicialmente considerada una curiosidad bioquímica ya que se encontró en una bacteria del suelo, siendo el único ejemplo de este tipo a lo largo de dos décadas. No obstante, BcII fue ampliamente utilizada en estudios estructurales y mecanísticos de metalo- β -lactamasas [49].

En 1980, comenzó a reportarse la emergencia de aislados clínicos de *Bacteroides fragili*, *Stenotrophomonas maltophilia*, diversas especies de *Aeromonas* y *Chryseobacterium* que expresaban diversas β -lactamasas dependientes de Zn(II) codificadas en el cromosoma. Entre las bacterias Gram negativas, se encontró un gen silencioso que codifica una metalo- β -lactamasas en *Bacillus anthracis* [49]. La situación se volvió más preocupante cuando se encontraron genes de metalo- β -lactamasas en elementos genéticos móviles, portadores de otros genes de resistencia adicionales en varios patógenos Gram negativos, incluyendo *Enterobacterales*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* y *Acinetobacter* [49]. La asociación entre estos genes que codifican metalo- β -lactamasas y los elementos genéticos móviles ha facilitado la diseminación de estas enzimas entre los patógenos más prevalentes de interés clínico ya que se convirtieron en un grave problema para la salud pública [49].

3.2.1 Subclases de Metalo- β -lactamasas

Las β -lactamasas de clase B o metalo- β -lactamasas se clasifican en 3 subclases B1, B2 y B3 en base al alineamiento de las secuencias de genes [50]. Debido a que los porcentajes de identidad entre secuencias de éstas subfamilias es muy bajo, también se utiliza un esquema de numeración estándar llamado numeración BBL, que se sustenta en estructuras de rayos-X obtenidas para miembros distintivos de cada grupo y que ha permitido la identificación de elementos correspondientes a estructuras secundarias, aun en casos donde la similitud entre secuencias no era obvia [50].

Las metalo- β -lactamasas pertenecientes a la subclase B1 comparten más del 23% de identidad con las otras subclases. Esta subclase de enzimas une un ion de Zinc (Zn1) a tres residuos de histidina (Figura 11) y un segundo ion de Zinc (Zn2) que une tres residuos distintos que incluyen una cisteína (C), un ácido aspártico (D) y una histidina (H) (Figura 11) [51].

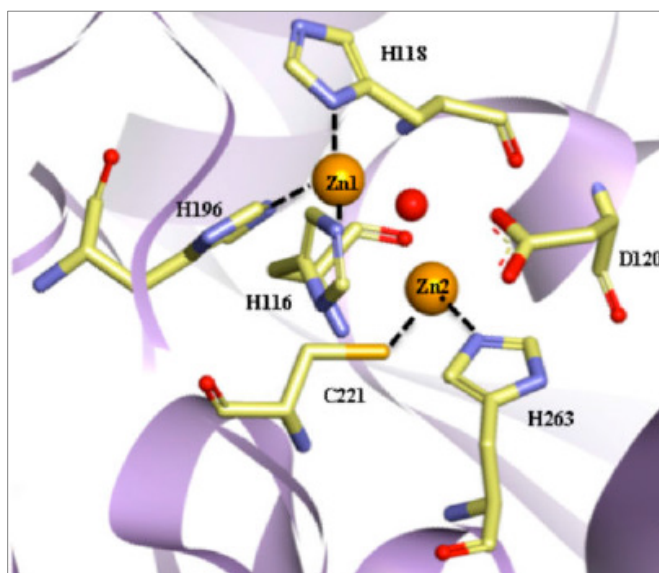


Figura 11. Sitio activo de una metalo- β -lactamasa del subgrupo B1. La figura muestra los átomos de zinc en color naranja. El Zn1 se une a tres residuos de histidina (H118, H196, H116) y el Zn2 a tres residuos distintos (C221, H263, D120). En azul se muestran los átomos de nitrógeno, en amarillo los de azufre, en rojo los de oxígeno, en tostado claro los átomos de carbono. La esfera roja representa un puente de hidrógeno [51].

La subclase B1 incluye a la enzima BcII propia de *B. cereus* [52][50], la enzima CcrA de *B. fragilis* [53], BlaB de *Elizabethkingia meningoseptica* [54] y EBR-1 de *Empedobacter brevis* [55]. A esta clase también pertenecen las enzimas adquiridas, es decir aquellas enzimas cuyos genes codificantes se localizan en elementos genéticos móviles (ej. plásmido) donde se encuentran las enzimas GIM, DIM, SIM, IMP, KHM, VIM, NDM y SPM aisladas de diversos gérmenes Gram negativos. En la Figura 12 se muestra un árbol filogenético donde se puede apreciar la diversidad de las enzimas agrupadas en la subclase B1 [56].

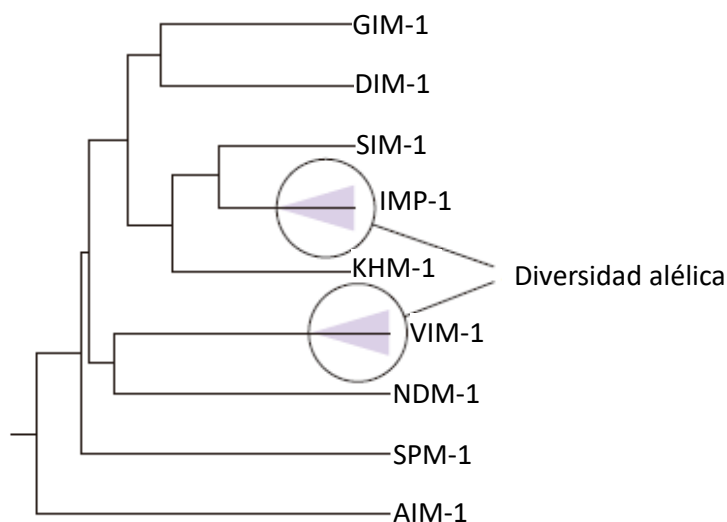


Figura 12. Diversidad de metalo- β -lactamasas de la subclase B1. El dendograma muestra la diversidad entre los distintos tipos de enzimas adquiridas de metalo- β -lactamasas. Los triángulos lila en las enzimas de tipo IMP y VIM indican que estas enzimas tienen muchas variantes alélicas. Adaptado de Cornaglia y col. [56]

Las metalo- β -lactamasas pertenecientes a la subclase B2 comparten el 11% de identidad con la subclase B1 y a diferencia de ésta, la subclase B2 utiliza únicamente un átomo de zinc (Zn1) en el sitio activo con tres residuos, dos de histidina y uno de asparagina aunque también retienen un segundo átomo de zinc (Zn2) que no utilizan [57]. La subclase B2 posee solamente tres enzimas producidas por distintas especies de *Aeromonas*, tales como CphA e ImiS producida por *Aeromonas veronii* [58] así como la enzima Sfh-I producida por *Serratia fonticola* entre otras [51].

Por último, la subclase B3 de metalo- β -lactamasas tiene un átomo de zinc (Zn1) en el sitio de unión del sustrato asociado a nueve residuos conservados (en lugar de tres como mencionamos para B1 y B2) y un segundo átomo de zinc (Zn2) asociado a tres residuos, uno de ácido aspártico y dos histidinas [57]. La subclase B3 es numerosa e incluye a las enzimas L1 y GOB-1 aisladas de cepas clínicas *S. maltophilia* y *E. meningoseptica* y FEZ-1 aislada de *Legionella gormanii* [51]. La enzima AIM es la única enzima perteneciente a la subclase B3 que se localiza en un plásmido [57].

Todas las enzimas mencionadas pertenecientes a las subclases B1, B2 y B3, a excepción de L1, son monoméricas.

En el árbol filogenético que se muestra en la Figura 13 se pueden ver todas las metalo- β -lactamasas conocidas hasta el año 2017 asociadas a los metadatos como el espectro hidrolítico de las enzimas, la localización del gen y la subclase a la que pertenecen [57]. En ese árbol, se puede observar primero que las subclases B1 y B3 son las mayoritarias y que además se encuentran más relacionadas filogenéticamente entre sí en comparación con la subclase B2 (Figura 13) [57]. Por otra parte, tanto B1 como B3 tienen un poder hidrolítico de amplio espectro, es decir que hidrolizan a un amplio número de antibióticos β -lactámicos mientras que la subclase B2 solo hidroliza carbapenemes [57]. Por último, también podemos ver que las enzimas que se encuentran dentro de las subclases B2 y B3 son mayormente cromosómicas (solo AIM de la subclase B3 plasmídica) mientras que las enzimas de la subclase B1 se localizan mayormente en plásmidos [57].

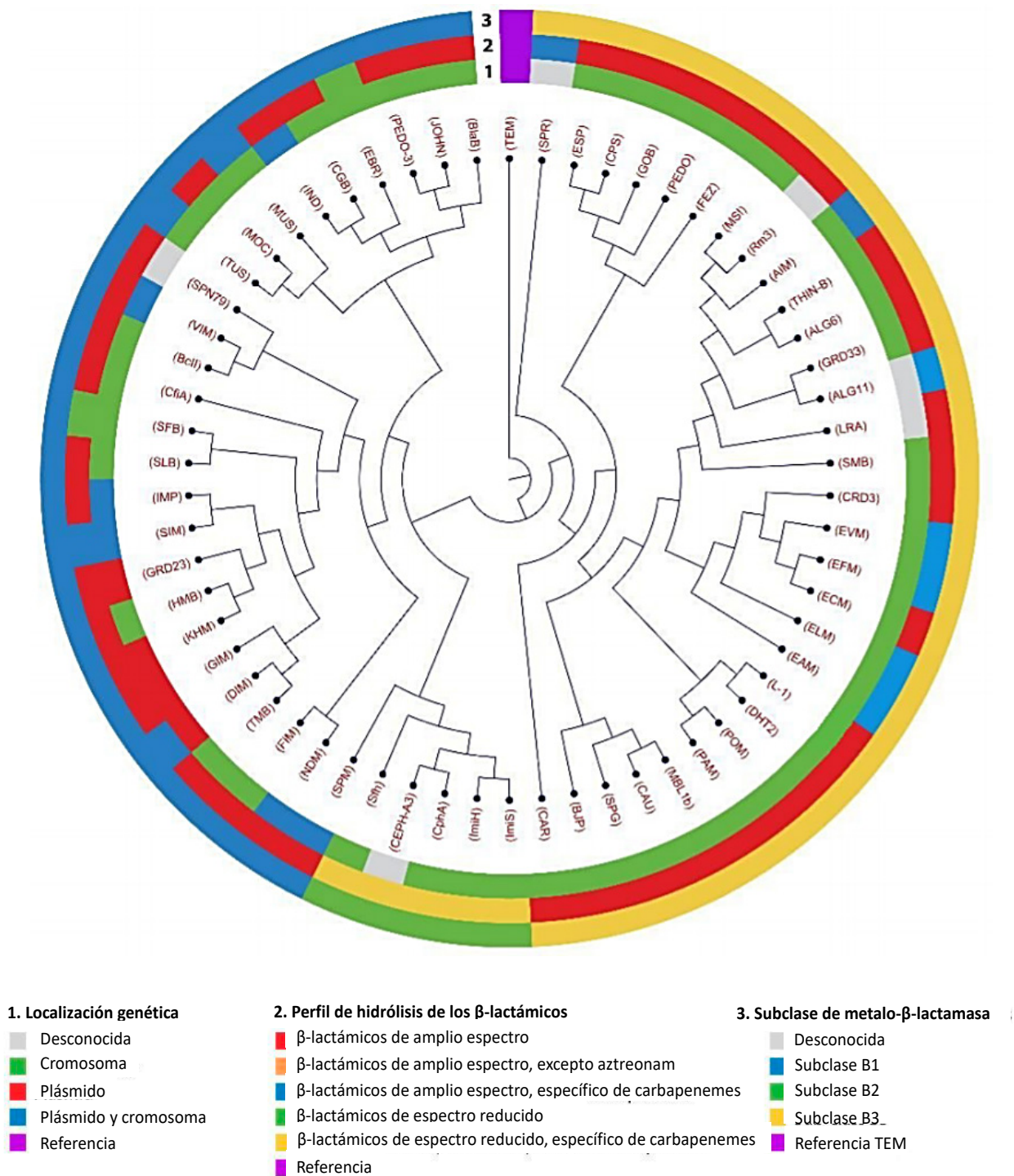


Figura 13. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con metadatos de las metalo- β -lactamasas descritas hasta el año 2017. TEM-1 perteneciente a β -lactamasas de la clase A de Ambler fue incorporada al árbol como referencia para “enraizar” (*root*) al árbol y como grupo externo (*outgroup*). Los colores en los círculos por fuera del filograma corresponden a: 1) Localización genética del gen (anillo interno), 2) perfil hidrolítico de la metalo- β -lactamasa (anillo medio) y 3) subclase de metalo- β -lactamasa (anillo externo). Adaptado de Somboro y col. 2018 [57].

4. Epidemiología de IMP y VIM

Si bien se han descrito un gran número de metalo- β -lactamasas, solo algunas tienen alta relevancia clínica y epidemiológica, siendo las más importantes aquellas que fueron capaces de diseminarse local e internacionalmente. Las tres enzimas más reportadas son la verona integron-encoded (VIM), la imipenemasa (IMP) y la New Delhi metalo- β -lactamasas (NDM) [46]. Los genes codificantes para dichas enzimas se localizan generalmente en plásmidos y pertenecen a la subclase B1 [46]. Su diseminación representa una amenaza para los sistemas de salud ya que son mecanismos de resistencia que fueron detectados en casos de infecciones o colonizaciones tanto de la comunidad como del hospital [57]. La enorme preocupación que generan también se fundamenta en los elevados porcentajes de muerte causadas por bacterias portadoras de estos genes [57]. La situación se volvió tan alarmante que la Organización Mundial de la Salud emitió un listado de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos para guiar y promover la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos a fin de combatir esta creciente amenaza. Dentro de esta lista, los enterobacteriales resistentes a los carbapenemes, se encuentran en la categoría crítica debido a la gravedad de las infecciones que causan y a la prácticamente nula opción de tratamiento [57]. Es importante recordar que si bien las metalo- β -lactamasas son inhibibles por quelantes de metales como el EDTA/SMA, el cual secuestra cationes Zn^{+2} necesarios para la actividad hidrolítica de las metalo- β -lactamasas, éstos son utilizados únicamente para la detección fenotípica de bacterias productoras de metalo- β -lactamasas dado que no pueden ser utilizados en la clínica [57]. Por todo esto, resulta fundamental conocer la epidemiología de los microorganismos productores de éstas enzimas y la manera en la que se diseminan ya que actualmente las únicas medidas posibles para contener brotes o epidemias de mayor envergadura ante infecciones con éstos patógenos son el aislamiento del paciente infectado, el diagnóstico rápido y las acciones efectivas llevadas adelante por los comités de control de infecciones [57].

Hoy en día, las tres enzimas mencionadas arriba se reportan con frecuencia y si bien en los últimos años NDM-1 se diseminó en diversos países, principalmente India, Balcanes y Oriente medio [50][57], en esta tesis se desarrollará en mayor profundidad lo referente a IMP y VIM.

La primer metalo enzima transmisible fue IMP-1 descrita en 1988 en *P. aeruginosa* en Japón [59]. Después de ese descubrimiento inicial, se han identificado al menos 53 variantes de genes IMP con distribución mundial [60] en al menos 26 especies de Gram negativos como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* y diversos miembros de *Enterobacteriaceae* [61][62]. Las especies de enterobacteriales que más se asocian a IMP son las *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter spp.* [62]. Los enterobacteriales productores de IMP solo se describen como endémicas en China, Japón y Taiwán y sobre todo en especies como *A. baumannii* [63][64]. Pero también han sido descritas en otros países como Argentina [65], Brasil, Australia, India, Tailandia, Filipinas y España [62]. Por otra parte, IMP ha sido también detectada en bacterias provenientes del medio ambiente como en un río en Túnez, aguas cloacales en Alemania y en mascotas en China [61].

VIM-1 fue identificada en 1997 en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* en Italia [63]. Poco después, se conoció la variante VIM-2, que surge de un aislamiento clínico anterior a 1996 en Francia [66]. Desde entonces, 47 variantes de VIM surgieron en todo el mundo y hasta la fecha ha sido reportada en más de 40 países o regiones [61][60] [66]. En los primeros tiempos se creía que VIM era una enzima que se restringía a bacilos Gram negativos no fermentadores pero paulatinamente fue identificada en diversas especies (al menos 23) de enterobacteriales siendo *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter spp.* las más comunes [63][67][61]. También se identificaron algunas variantes de VIM en el ambiente, por ejemplo VIM-13 en *Brevundimonas diminuta*, *Rhizobium radiobacter*, *Pseudomonas spp.* y *Ochrobactrum anthropi* en aguas cloacales de un hospital de Mallorca, España [61].

5. Mecanismos de diseminación de IMP y VIM.

El alarmante aumento en la resistencia antimicrobiana es atribuible a la emergencia y diseminación de nuevos mecanismos, como los detallados en ésta tesis [68]. La captura, acumulación y diseminación de genes de resistencia se deben en gran medida a la “actividad” o funcionamiento propio de elementos genéticos que promueven la movilidad del ADN bacteriano ya sea dentro de la célula, por ejemplo, del cromosoma a un plásmido, o entre plásmidos así como entre bacterias de igual o distinta especie (ej. por conjugación) [69]. Muchos genes de resistencia se encuentran en plásmidos que pueden transferirse entre diferentes cepas o especies bacterianas, lo que facilita la transferencia horizontal de genes [68]. Además, la movilidad de los genes de resistencia se puede incrementar o mejorar mediante la integración en elementos transponibles (transposones), que pueden movilizarse de manera autónoma entre diferentes ubicaciones genómicas [68]. Puntualmente, las metalo enzimas del tipo IMP y VIM suelen hallarse en forma de cassettes génicos dentro de estructuras conocidas como integrones de clase 1 que a su vez se asocian a transposones o plásmidos [64] y que se describen a continuación.

5.1 Integrones

Los integrones son elementos genéticos que contienen un sistema de recombinación sitio específico capaz de capturar, expresar e intercambiar marcos de lectura abiertos (MLA) exógenos sin promotor propio a través de un mecanismo de recombinación sitio específica, convirtiendo a los MLA en genes funcionales al asegurar la expresión de los mismos (Figura 14) [70]. Los integrones se clasifican como sedentarios cuando se localizan en el cromosoma bacteriano de diversas especies, y móviles cuando se localizan en elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones [71]. Todos los integrones caracterizados hasta la fecha poseen los siguientes tres elementos necesarios para la inserción de genes exógenos (Figura 14): (i) un gen que codifica para una integrasa (*intI*) que pertenece a la familia de las tirosina-recombinasas; (ii) un sitio de

recombinación (*attI*) y un promotor (Pc) que direcciona la transcripción de los genes capturados [70].

Los MLA se conocen como cassettes génicos (~0,5 a 1 kb) que pueden existir de manera libre circular y son no-replicativos [70][69]. Los genes integrados en forma de cassettes poseen una secuencia invertida repetida imperfecta en el extremo 3' del gen, llamado sitio *attC* o elemento 59-be, porque suelen tener entre 57 y 141 bases, y funcionan como sitios de reconocimiento específicos para las integrasas [70].

El *attI* es un sitio simple que contiene dos secuencias invertidas que son reconocidas por la integrasa, y dos sitios de enlace de integrasa adicionales conocidos como el enlace fuerte (DR1) y el débil (DR2) [72]. Mientras que la región *attC* contiene dos sitios simples compuestos por un par de sitios core o "core site" conservados de 7 u 8 pb, denominados R" y R', L' y L" respectivamente [72]. En términos de dinámica de inserción y escisión de cassettes génicos, la integrasa puede catalizar la escisión del cassette génico mediante eventos de recombinación *attC* x *attC* y la integración del cassette mediante eventos de recombinación *attC* x *attI* [73]. La integración de los cassettes ocurre en el sitio *attI*, río abajo del promotor Pc, lo que permite la expresión de los genes integrados (Figura 14) [70]. Por último, la expresión de los genes en un integrón ocurre gracias a la presencia del promotor común Pc y aquellos genes que se ubiquen como primer cassette, más cerca del promotor, se expresarán más fuertemente [74].

Existen cinco clases de integrones móviles que se clasifican de acuerdo a las divergencias halladas en los genes que codifican para la integrasa (ej. *IntI1*, *IntI2*, etc) [61]. Si bien se fueron nombrando en el orden de su descubrimiento, hoy en día existe una base de datos llamada INTEGRALL que provee número a integrones con arreglos de cassettes nuevos y acceso a las secuencias de ADN de los mismos (<http://integrall.bio.ua.pt/>) [75]. Hasta el momento INTEGRALL han reportado 1509 genes de integrasas y 8562 cassettes génicos (<http://integrall.bio.ua.pt/>). A pesar de la enorme diversidad de los integrones, aquellos de clase 1 son los más reportados en el ámbito clínico.

5.1.1 Integrones de clase I

En 1980 se reportó el primer integrón de clase 1 de un aislamiento clínico [61]. Desde entonces, han sido intensamente estudiados debido a que portan múltiples genes de resistencia y están asociados a otros elementos genéticos móviles como transposones y plásmidos conjugativos que facilitan y amplifican la diseminación de los mismos a nivel intra e inter especies [61][76]. Estas estructuras se describen principalmente en bacterias Gram negativas de aislamientos provenientes de humanos, animales y del ambiente, y están involucrados en la captura y diseminación de genes de metalo- β -lactamasas [61].

Los integrones de clase 1, llamados así por haber sido los primeros descritos, derivan del transposón Tn402 que capturó la combinación *intI1/attI1/Pc* del cromosoma de betaproteobacterias [69]. En los integrones de clase 1 clínicos, parte del transposón original fue reemplazada por lo que se conoce como región 3'CS conservada y que contiene el gen trunco *qacAEl*, que originalmente formaba el cassette *qacE* que confiere resistencia a los antisépticos, al *sulI*, que confiere resistencia a las sulfonamidas, y a uno o dos marcos de lectura abiertos de función desconocida, *orf5* y *orf6* (Figura 14) [69][77]. Están flanqueados por una secuencia invertida (IRi) de 25 pb que se ubica al final del gen de la integrasa y por IRt que se ubica al final del módulo 3'CS o módulo *tni* (Figura 14). La región que abarca desde el IRi al *attI1* se denomina región 5'CS conservada e incluye al gen *intI1* y al promotor Pc (Figura 14) [69]. El 5'CS termina con una secuencia AAACAAAG que se ubica dentro del sitio *core* del *attI1* (Figura 14) [78] y la T que le sigue da comienzo al primer cassette del integrón [77]. El último cassette del integrón es seguido inmediatamente por la estructura del 3'CS descrita arriba [77]. Muchas veces, el 3'CS es seguido por algunas secuencias de inserción [77] o se asocian a transposones funcionales y no funcionales derivados del Tn402 que a su vez pueden estar embebidos en transposones más grandes como el Tn21 (Figura 14) [70].

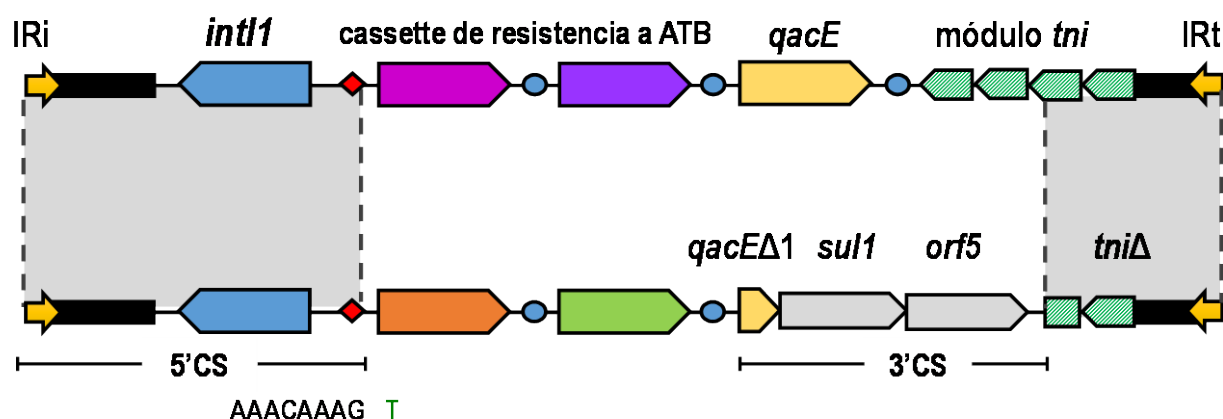


Figura 14. Mapa esquemático del integrón de clase 1 y elementos asociados. La secuencia de arriba es un ejemplo de integrón Tn402 y abajo se esquematiza la estructura de un integrón de clase 1 típico de aislamientos clínicos. Los símbolos son los siguientes: *attI1*, diamantes rojos; 59-be, círculos azules; las flechas son genes que indican la orientación de la transcripción; flechas con rayas diagonales verdes representan transposasas, recombinasas o secuencias de inserción. Las flechas con colores sólidos representan genes de resistencia (ATB) en cassettes e *IntI1* (flecha celeste). Se indica también el final del 5'CS AAACAAAG en el sitio *core* del *attI1* y la T verde da inicio al primer cassette. También se indican como flechas amarillas a las secuencias invertidas IRI e IRT asociadas al Tn402. Las zonas sombreadas de gris indican el 99% de homología nucleotídica (o identidad) entre ambos elementos. Figura adaptada de [79]

La incorporación de un cassette en la primera posición en el integrón ocurre a través de la reacción de recombinación mediada por la *IntI* entre el sitio *attI* doble cadena y el sitio *attC* plegado en simple cadena mientras que la escisión de un cassette mediada por *IntI* ocurre entre dos sitios *attC* simple cadena plegados (Figura 15) [69].

En los integrones de clase 1 multiresistentes, los promotores Pc se localizan dentro de la secuencia codificante de la integrasa [69]. Existen muchas variantes de los promotores de integrones de clase 1, pero las que predominan son cuatro: el PcW que es el más débil (W por *weak*, débil en inglés); PcH1 (H de *hybrid*, híbrido en inglés), PcH2 (híbrido 2) y PcS el más fuerte (S por *strong*, fuerte en inglés) [80]. Los polimorfismos dentro de la secuencia de *intI1* podrían influenciar la actividad recombinasa de la integrasa y podría definir distintas variantes catalíticas de la *IntI1* [74][81]. De hecho, se observó que existe una relación inversa entre la fuerza del promotor y expresión del gen en cassette, primer cassette versus último cassette, y la actividad recombinasa de la *IntI1* [74][69]. Por otra parte, en muchos integrones de clase 1, la inserción de tres guaninas entre las posiciones -35 y -10 del promotor genera un espaciador de 17 pb óptimo que active un segundo promotor denominado Pc2 [69].

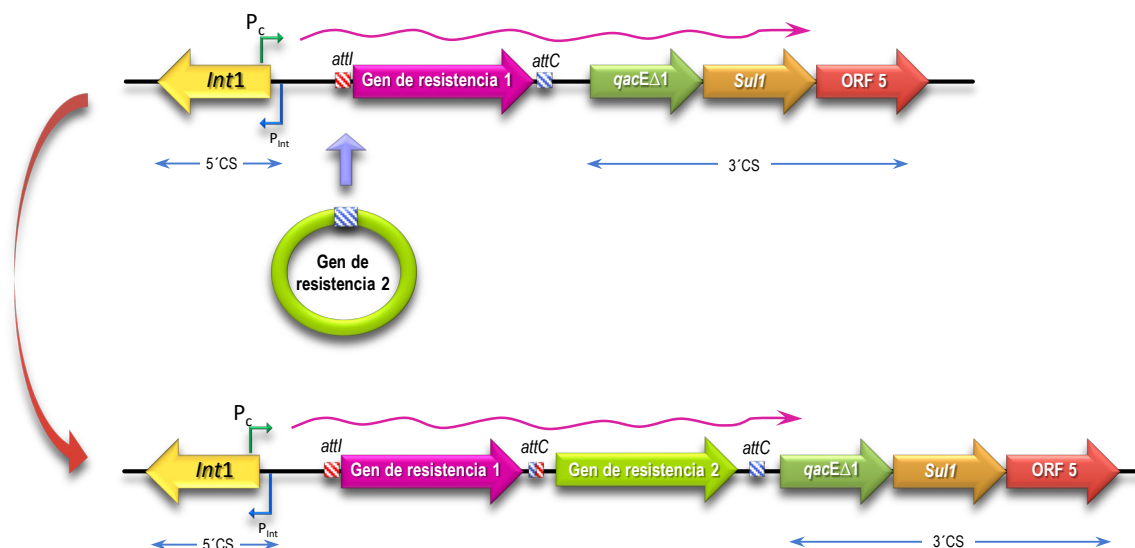


Figura 15. Representación esquemática de un integrón de clase 1 y modelo de la adquisición de cassette génico. El proceso por el cual un cassette del gen circularizado (gen de resistencia 2) se inserta en el sitio *attI* de un integrón de clase 1 que contiene un cassette génico residente (gen de resistencia 1) como se describe en la figura. Los genes y los marcos de lectura abiertos se indican mediante flechas. Los cuadrados de barras azules representan sitios de recombinación *attC*. P_c es el promotor asociado al integrón; P_{int} es el promotor del gen de la integrasa (*IntI1*). Los genes *qacEΔ1* y *Sul1* en el extremo 3'-CS confieren resistencia a los compuestos de amonio cuaternario y sulfonamidas, respectivamente.

5.1.2 Integrones de clase 2

El integrón de clase 2 se encuentran comúnmente asociados a la familia de transposones Tn7 y sus derivados, como Tn1825, Tn1826 y Tn4132, que llevan su sitio de recombinación *attI2* y el promotor P_c dentro de esos transposones [72]. En general los integrones de clase 2 portan en su región variable a los genes *dfrA1-sat2-aadA1-orfX* que confieren resistencia a trimetoprima, estreptotericina y estreptomycin/espectinomycin, seguidos por los genes adicionales *ybfA*, *ybfB*, *ybgA*, insertos en un módulo de transposición de Tn7 (*tnsABCDE*) ya que la mayoría de estos integrones se asocian a derivados del Tn7 [71]. El segmento 3' conservado (3'-CS) contiene 5 genes *tns* (*tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD* y *tnsE*) que participan en los movimientos del transposón, mediando la movilidad del integrón a través de la inserción preferencial en un sitio único dentro de cromosomas bacterianos [72].

La homología de las secuencias de aminoácidos del gen *IntI2* típico es inferior al 50% en comparación con *IntI1*, y además la secuencia se encuentra interrumpida por un codón de terminación y, por lo tanto, se sintetiza una proteína más corta e inactiva y se cree que este

potencial pseudogen posee una función reguladora o que permite el funcionamiento de otro tipo de integrasa (como *IntI1*) [72]. Los integrones de clase 2 se han reportado en algunas especies de microorganismos Gram negativos como *Acinetobacter*, enterobacteriales, *Salmonella* y *Pseudomonas*, con una baja incidencia y prevalencia en comparación con los integrones de clase 1 [72].

5.1.3 Integrones de clase 3

Los integrones de clase 3 fueron identificados por primera vez en Japón en 1993 en aislamientos de *S. marcescens*, y luego se encontró asociado con *bla*_{GES-1} en una cepa de *K. pneumoniae* [72]. Se describió en pocos microorganismos incluyendo *Acinetobacter spp.*, *Alcaligenes*, *Citrobacter freundii*, se limita a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella spp* y *S. marcescens* y en su mayoría se informó en baja ocurrencia con la asociación con la metalo- β -lactamasa IMP-1 [72].

La integrasa de los integrones de clase 3 posee 60 % de similitud con la *IntI1* y 47% con la *IntI2* [82]. Tanto la *IntI1* como *IntI3* son enzimas que forman parte de un grupo de proteobacterias de suelo y agua dulce, mientras que *IntI2* es una enzima codificada en bacterias del grupo de γ -proteobacterias marinas [72]. *IntI3* realiza una función similar a la de *IntI1*, y se ha descrito que *IntI3* es capaz de catalizar la escisión de cassettes de integrones y la integración de cassettes circularizados en el sitio *attI3* con una frecuencia de recombinación significativamente menor a la ocurrida entre un sitio *attC* y sitios secundarios a los observados con *IntI1* [72].

5.1.4 Integrones de clase 4 – Super integrones

El integrón de clase 4 se detectó por primera vez en aislamientos de *Vibrio spp.* y su existencia data desde antes de la era de los antimicrobianos [72]. Esta clase distintiva de integrón se diferenció de otros por poseer dos características claves que incluyen la incorporación de cientos de cassettes (ej. para *V. cholerae*, se identificaron al menos 179 cassettes con 216 genes no identificados separados por secuencias cortas repetidas e invertidas conocidas como VCR, que en

conjunto ocupan aproximadamente el 3% del genoma) y la alta homología entre los sitios *attC* de los cassettes reunidos en el arreglo génico [72]. A pesar de su variedad única de cassettes, la identificación de integrones de clase 4 se ha limitado a microorganismos tales como *Vibrionaceae*, *Shewanella*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y otras proteobacterias [72].

5.2 Otros elementos que capturan genes de resistencia: Secuencias de Inserción y Transposones.

Las secuencias de inserción (IS) y los transposones (Tn) son otros elementos genéticos móviles involucrados en la movilización de genes de resistencia mayormente detectados en bacterias Gram negativas. Tanto las IS como los Tn poseen características en común para movilizar genes a través de distintos mecanismos [83].

5.2.1 Secuencias de Inserción

Una secuencia de inserción es el elemento autónomo y transponible más pequeño que se conoce y constituye un componente relevante en los genomas bacterianos [61]. La definición original de IS refiere a un segmento de ADN corto, fenotípicamente críptico, que codifica para enzimas necesarias para su transposición y que es capaz de insertarse repetidas veces en sitios de inserción distintos dentro de un mismo genoma utilizando mecanismos independientes de las regiones de ADN homólogas entre la IS y el sitio blanco [84][85]. Las ISs clásicas poseen entre 0,7 y 2,5 kb y son genéticamente compactas con uno o dos marcos de lectura abiertos que ocupan toda la longitud de la IS con ambos extremos flanqueados por secuencias terminales imperfectas invertidas y repetidas (IRs, que tienen entre 10 y 40 pb en cada extremo de la IS) y también poseen secuencias que sirven de señal para la unión de la transposasa (Figura 16) [86]. Los marcos abiertos de lectura codifican para transposasas (*tnps*, que pueden incluir proteínas regulatorias también) que catalizan el clivaje y transferencia del ADN uniéndose a los IRs y causando la movilización de la IS [86]. También pueden presentar promotores que facilitarán la

transcripción de aquellos genes que se encuentren río abajo de la IS [61]. Estas particularidades hacen que las IS causen mutaciones y rearrreglos genómicos, así como también la movilidad de genes entre integrones, transposones, plásmidos y el cromosoma bacteriano [61]. Hoy en día se conocen aproximadamente 3000 secuencias de inserción individuales que pertenecen tanto a bacteria como arquea (IS finder) [61].

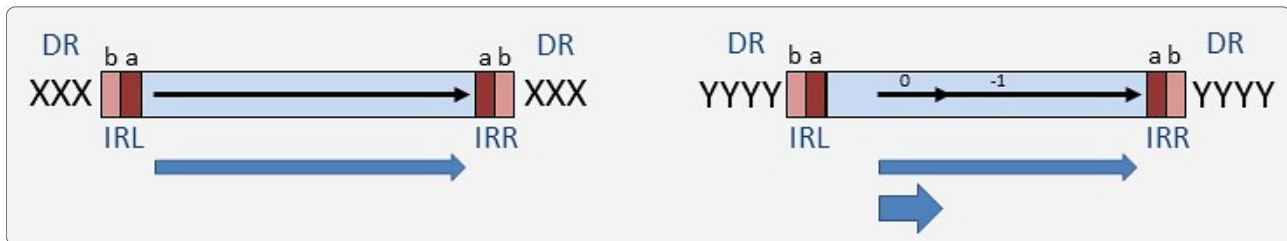


Figura 16. Estructura de secuencias de inserción típicas. Se muestran los marcos abiertos de lectura en su dirección transcripcional, los segmentos invertidos repetidos imperfectos en ambos extremos, izquierda (IRL, *inverted repeat left*) y derecha (IRR, *inverted repeat right*) ubicados de acuerdo a la dirección de la transcripción de la transposasa. También se indica (a) el sitio de clivaje del ADN y (b) la secuencia necesaria para la movilidad; también se muestran las repeticiones directas (DR, *direct repeats*) que se generan tras la inserción de la IS en el sitio blanco. Diagrama tomado de [86].

5.2.2 Transposones

Los transposones (Tns), elementos transponibles y los retrotransposones son elementos de ADN que pueden moverse desde una molécula de ADN a otros sitios dentro de la misma molécula de ADN de forma repetida u otras moléculas [83][87]. Los transposones poseen una enzima llamada transposasa (*tnp*) que realiza la transposición. Al igual que los integrones y las secuencias de inserción, los transposones son responsables de la diseminación de genes de resistencia a los antibióticos [83].

A diferencia de la IS descritas arriba, cuando los transposones se encuentran flanqueados por dos copias de la misma IS y a su vez ésta estructura se encuentra cerca de un gen de resistencia, pasa a denominarse transposón compuesto, también llamados transposones de Clase I, y tienen la capacidad de movilizar a dicho gen ya que puede moverse como una unidad (Figura 17) [69].

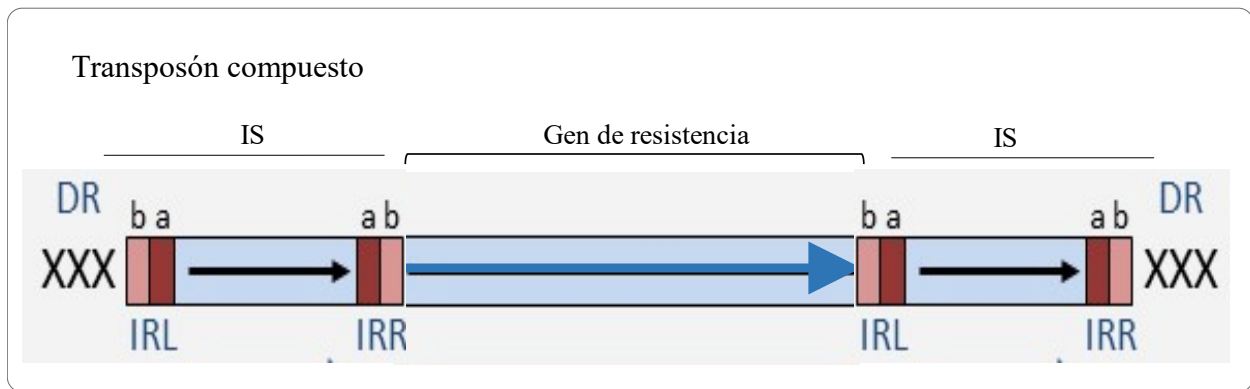


Figura 17. Estructura de transposón compuesto. En la figura se indican las repeticiones directas (DR), los IRs y el gen de la transposasa con la dirección transcripcional. La flecha azul representa el gen de resistencia en el transposón compuesto [77].

Los transposones compuestos poseen características estructurales y funcionales idénticas y suelen portar genes de resistencia [88]. Los transposones complejos (conocidos como transposones de Clase II), constituyen tres familias diferentes pero interrelacionadas: Tn3, Tn21 y Tn2501 [88]. Están flanqueados por un IR de 38 pb e incluyen al gen de la transposasa (*tnpA*), el gen de la resolvasa *tnpR* y un sitio de resolución (*res*) [69]. Estos transposones se mueven por un proceso replicativo que involucra al reconocimiento de los IR por la TnpA y la generación de un intermediario co-integrado que consiste en las moléculas dadora y receptora separadas por dos copias del transposón [69]. El co-integrado se resuelve con la TnpR que actúa por recombinación sitio específica creando un fragmento de repetición directa (DR) de 5 pb [69][77].

5.3 Plásmidos de Resistencia

Los plásmidos son fragmentos de ADN doble cadena extra cromosómico que varían ampliamente en tamaño y se encuentran tanto en bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas [69]. Estas moléculas pueden autoreplicarse en la célula hospedadora y por lo tanto heredarse a las células hijas en una población bacteriana en crecimiento. Por otra parte, los plásmidos también pueden transmitirse horizontalmente intra e inter especie a través de la conjugación biparental o la movilización [69].

El conjunto de genes que codifican funciones que le permitan al plásmido replicarse, heredarse y/o transferirse se conocen como genes troncales o “*backbone*” [69]. Los plásmidos pueden contener genes accesorios que pueden proveerle al huésped ventajas adaptativas en un ambiente determinado. Puntualmente, en los plásmidos de resistencia, las regiones accesorias están compuestas por uno o más genes de resistencia y estos a su vez se asocian a alguno de los elementos genéticos mencionados más arriba (ej. integrones, transposones) [69]. En consecuencia, los plásmidos pueden tener estructuras troncales similares con regiones variables formada por distintos transposones, secuencias de inserción y/o genes de resistencia [69].

Los plásmidos tienen un origen de replicación definido (*ori*), que es reconocido por una proteína de iniciación (Rep) codificada por los genes *rep* que se encuentran en el plásmido cercanos a una región repetida de ADN conocida como *iteron* [69]. El resto de la maquinaria para sintetizar el ADN del plásmido suele ser la propia de la célula huésped (helicasa, primasa, polimerasa, etc.). Los plásmidos pueden ser categorizados de acuerdo al rango de hospedadores. Entonces, un plásmido capaz de perdurar eficientemente en taxas bacterianas relacionadas son llamados plásmidos de rango angosto (del inglés *narrow host range plasmids*) [69]. Mientras que aquellos plásmidos que pueden replicarse en diversos géneros bacterianos se los conoce como plásmidos de rango ampliado (del inglés, *broad host range plasmids*) [69]. Por otra parte, el rango de hospedadores de un plásmido también puede verse alterado por la capacidad del plásmido de conjugarse o movilizarse a una bacteria de igual o distinta especie [69].

La transferencia horizontal de plásmidos puede producirse por conjugación si un plásmido porta todos los genes: un módulo de movilidad que incluye relaxasa (MOB) y un complejo de formación de pares de apareamiento (MPF) asociado a la membrana. Los plásmidos que carecen de MPF pueden movilizarse utilizando un sistema de secreción diferente para la transferencia y se denominan movilizables.

En 1971, Hedges y Datta propusieron un esquema de clasificación plasmídica basado en la estabilidad de los plásmidos durante la conjugación, un fenómeno llamado incompatibilidad de

plásmidos [89]. Esta incompatibilidad se define como la incapacidad de dos plásmidos co-residentes de ser heredados, en ausencia de factores de selección. O lo que es lo mismo, si la introducción de un segundo plásmido en una bacteria desestabiliza la herencia del primero, ambos son incompatibles [90][91]. Esto se debe principalmente a un “problema de comunicación” entre los sistemas de iniciación de la replicación de ambos plásmidos que se confunden el control de número de copias dado que los dos plásmidos si bien son distintos son percibidos como el mismo, por lo tanto lleva a que uno de los dos termine con un número reducido de copias y por lo tanto la misma célula lo segrega y elimina. Por todo esto, los plásmidos incompatibles se consideran relacionados y se clasifican dentro del mismo grupo Inc [90].

Existen diversos métodos para determinar el grupo de incompatibilidad de un plásmido. Desde el año 2005 se publicó un esquema de PCR multiplex conocido como *PCR-based replicon typing* (PBRT) que detecta los replicones de las familias de plásmidos más comunes en enterobacterales [91]. Esa PCR multiplex inicialmente detectaba 18 grupos pero con el advenimiento de la secuenciación masiva de genoma (WGS), el número de nuevos plásmidos y replicones descritos aumentó constantemente hasta 25 replicones en la actualidad [91]. Por este motivo, las reacciones de PCR se actualizan pero también comienzan a aparecer herramientas que se utilizan *in silico* para poder determinar el grupo de incompatibilidad de los plásmidos secuenciados por WGS [91].

6. Metodologías aplicadas a estudios de epidemiología molecular

Existen diversos esquemas de tipificación bacteriana y cada uno está diseñado para medir diferentes tipos de variaciones genotípicas o fenotípicas de una especie [92]. Es importante tener en cuenta a la hora de elegir un esquema de tipificación, el tipo de patógeno en estudio y las preguntas que se quieren responder [92]. No es lo mismo estudiar las variaciones genéticas o microvariaciones que pueden ocurrir durante un brote individual o un evento epidémico en una

ubicación geográfica particular (epidemiología a corto plazo o local), que establecer un vínculo entre el linaje de la cepa y la enfermedad a escala global (epidemiología a largo plazo o global) [92]. A continuación se describen dos técnicas que son utilizadas para el estudio epidemiológico de enterobacteriales.

6.1 Electroforesis en gel de campo pulsado

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es una metodología que permite diferenciar cepas bacterianas mediante la comparación y análisis de los patrones de restricción de ADN genómico [92]. El cromosoma bacteriano es digerido por una enzima de corte poco frecuente que genera un número moderado de fragmentos de ADN, generalmente entre 10 y 20 fragmentos. Los fragmentos de ADN inmersos en tacos de agarosa (plugs) y se separan mediante electroforesis de campo pulsado [92]. La comparación de los patrones de PFGE de distintos aislamientos bacterianos permite definir si estos están o no relacionados genéticamente. En base al criterio propuesto por Tenover y col. [93] los aislamientos con patrones de PFGE idénticos se agrupan dentro de un subtipo clonal dado que probablemente se originaron de un ancestro en común [92]. Cuando los aislamientos presentan pocas diferencias, entre 1 y 6 bandas de diferencia, entre sus perfiles de restricción, se agrupan en distintos subtipos clonales. Estas diferencias pueden deberse a cambios genéticos recientes como una mutación puntual, eliminación, inserción y pérdida o adquisición de plásmidos. Aquellos aislamientos que presenten más de 7 bandas de diferencia se los considera no relacionados genéticamente según el criterio propuesto por Tenover [93]. Dependiendo del germen en estudio, esta metodología permite confirmar estudios de brotes y evaluar la presencia de clones internacionales.

6.2 Tipificación por secuenciación de múltiples locus

La tipificación por secuenciación de múltiples locus (MLST) es una técnica molecular que se basa en la detección de polimorfismos de secuencia de ADN en 7 u 8 genes metabólicos o *housekeeping* [94]. A las diferentes secuencias en cada locus se les asignan números de alelos, y

cada cepa se define por el perfil de alelos en los siete loci (perfil alélico). A cada perfil alélico único se le asigna un secuencia tipo (ST) [95].

Inicialmente el MLST se desarrolló para la identificación de patógenos, pero con el tiempo ésta técnica comenzó transformarse en una herramienta fundamental para especialidades tales como la epidemiología molecular en el estudio de transmisión de enfermedades, evolución de la virulencia, etc. Así como también en salud pública en el monitoreo de programas de vacunación, y en filogenética, filogeografía, taxonomía, especiación, genética de poblaciones, bioseguridad y hasta en estudios de inferencias en migraciones humanas [96]. Por todo esto, el MLST provee conocimiento sobre la diversidad, la estructura de poblaciones en escalas temporales y geográficas y la dinámica de patógenos bacterianos en todo el mundo y ha sido muy útil para confirmar la estructura clonal de muchos microorganismos como *S. aureus*, pero también para identificar complejos clonales epidémicos en otras taxas [96].

Los métodos utilizados para el análisis de MLST son dos. El primer método se basa en los alelos y en la asignación de los secuenciotipos (ST) para poder estimar la relación genética entre aislamientos, por lo tanto éste método ignora el número de diferencias nucleotídicas entre alelos. Este método funciona bien en organismos no clonales (ej., *Helicobacter pylori*) [96]. El segundo método se basa directamente en las secuencias nucleotídicas para poder estimar la relación genética entre aislamientos y parámetros poblacionales [96]. Este método funciona bien con organismos clonales como *S. aureus* [96]. En la práctica, todos los microorganismos muestran algún grado de relación genética en sus poblaciones que se agrupan en complejos clonales [96]. Ambas metodologías de análisis se utilizan en estudios de poblaciones y epidemiológicos [96]. En ésta tesis en particular utilizamos el primer método basado en las diferencias entre alelos y la asignación de STs.

6.3 Secuenciación completa de genoma

La secuenciación masiva de ADN ha cambiado bruscamente en los últimos años con la aparición de distintas tecnologías (ej. Illumina, Nanopore) que permiten obtener en cuestión de

horas la secuencia completa del genoma (del inglés, *Whole-Genome Sequencing*, WGS) desde microorganismos como virus y bacterias, hasta organismos superiores, incluyendo plantas y animales. Estas nuevas plataformas de secuenciación se distinguen por su capacidad de secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela, además de tener el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales y pequeñas inserciones y/o deleciones [97]. Actualmente la plataforma Illumina es una de las más utilizadas que genera millones de lecturas cortas (*short reads*) de 100-150 bases [97]. Estas millones de lecturas se ensamblan utilizando distintas estrategias y generando ensambles o *contigs*. Esta tecnología permite detectar variantes alélicas en forma muy precisa, mientras presenta problemas con el ensamble de secuencias repetidas [97]. Por lo tanto, por lo general, la secuenciación de plásmidos por ésta técnica es problemática dado que las IRs generan brechas o gaps en las secuencias (se obtienen varios “*contigs*” del plásmido) que luego deben ser cerradas por PCRs convencionales para obtener una molécula cerrada y continua del tamaño real.

7. Estado de situación

En el marco de la vigilancia activa de carbapenemasas, el Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos (LNRRA) recibe de los 95 laboratorios pertenecientes a la red WHONET y de aquellos participantes del Programa de Control de Calidad, todos los aislamientos con perfiles de resistencia de difícil caracterización fenotípica y molecular, siguiendo criterios de derivación pre-establecidos (www.antimicrobianos.com.ar). De ésta manera, la Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos-WHONET tiene como objetivo implementar y optimizar estrategias de diagnóstico y vigilancia de la resistencia para orientar la terapia empírica suministrando información a nivel nacional sobre los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de patógenos hospitalarios y de la comunidad. En éste contexto, en el período 2008-2016 un total de 1689 enterobacterales fueron derivados al LNRRA como sospechosos de ser productores de alguna carbapenemasa (algoritmo para sospecha de carbapenemasas en *Enterobacterales* anexo A1), de los cuales 46 de ellos fueron sospechosos de producir una carbapenemasa de tipo metalo- β -lactamasa por mostrar sinergia positiva entre un disco de carbapenem y EDTA/SMA y sinergia negativa entre un carbapenem y el ácido fenil borónico (APB). Se confirmaron, seis aislamientos de *E. cloacae* que fueron positivos por PCR para VIM y 40 aislamientos de nueve especies de enterobacterales (principalmente *K. pneumoniae* y *E. cloacae*) que fueron positivos para IMP.

Por todo esto, hipotetizamos que *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP} se diseminan verticalmente generando brotes intrahospitalarios y también horizontalmente, a través de la movilización de los elementos genéticos móviles, como plásmidos o transposones.

Para poder aceptar o refutar ésta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

8. Objetivos

Objetivo General

Estudiar las características epidemiológicas y moleculares de los aislamientos clínicos de enterobacteriales productores de IMP y VIM, recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos (LNRRA) en el período 2008-2016 de 18 hospitales de Argentina.

Objetivo Específico I

Describir la epidemiología de 40 *Enterobacteriales* productores de IMP.

Objetivo Específico II

Describir la epidemiología de 6 *Enterobacter cloacae* productores de VIM.

MATERIALES Y MÉTODOS

9. Materiales y Métodos

9.1 Aislamientos bacterianos y datos epidemiológicos

En el presente trabajo se estudiaron 46 aislamientos de enterobacteriales que fueron derivados en el periodo 2008-2016 al LNRRA por ser sospechosos de producir una carbapenemasa. Se consideraron aislamientos de infección o colonización, consecutivos en el tiempo y uno por paciente (Tabla 1 capítulo I y Tabla 8 capítulo II).

Los aislamientos fueron crecidos en placas con agar tripticasa soja (TSA) (Britania, Buenos Aires, Argentina) e incubados a 35°C durante 16-20 horas. Luego fueron criopreservados a -70° C en caldo tripticasa soja (Britania) al 30% de glicerol.

La identidad bacteriana a nivel de género y especie se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales y por MALDI-TOF MS (Bruker® Daltonics, Bremen, Alemania) disponible en el ANLIS.

9.2 Pruebas fenotípicas de tamizaje y de detección de carbapenemasas.

9.2.1 Pruebas fenotípicas de tamizaje

La sospecha fenotípica de carbapenemasas se realizó siguiendo el algoritmo diseñado y puesto a punto en el LNRRA según se describe (<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2018/05/Carbapenemasa.pdf>). Brevemente, se consideraron sospechosos de producir carbapenemasa a aquellos aislamientos que presentaron halos de inhibición a imipenem iguales o menores a 22 mm en un ensayo de difusión en agar del laboratorio derivante (la metodología se describe en la sección 9.3.1). La sospecha de metalo-β-lactamasas fue inferida cuando el ensayo de sinergia entre un disco de carbapenem y EDTA/SMA (concentración final por disco: 750 µg de EDTA + 1900 µg de SMA) dio un resultado positivo y cuando la sinergia

resultó negativa entre un disco de carbapenem y un disco de ácido fenil borónico (APB). Los discos fueron colocados estratégicamente con el fin de evidenciar el efecto sinérgico en el crecimiento bacteriano inducido entre ambos discos (Figura 18) (<http://antimicrobianos.com.ar/2013/01/enterobacterias-colocacion-estrategica-de-discos/>).

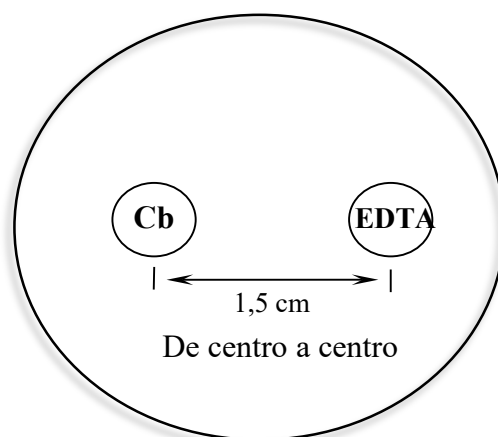


Figura 18. Diagrama de la colocación estratégica de discos para el tamizaje de carbapenemasas. Cb: carbapenem (imipenem, ertapenem, meropenem), EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

9.2.2 Prueba fenotípica de detección de carbapenemasas

Para confirmar la actividad enzimática se realizó el ensayo microbiológico Tritón Hodge Test mientras que para la confirmación de actividad carbapenemasa se realizaron los ensayos colorimétricos BlueCarba Test y Carba NP Direct que se describen a continuación.

(i) *Triton Hodge Test (THT)*

Este test se basa en la inactivación del carbapenem por la carbapenemasa producida por una cepa incógnita, lo que permite a la cepa indicadora extender su crecimiento cerca del disco del carbapenem y a lo largo de la estría de la cepa incógnita productora de la carbapenemasa [98].

Para este ensayo se agregó 50 μ l de detergente TritonX-100 en la superficie de una placa con agar Mueller-Hinton (MHA, 4 mm de espesor). El detergente se distribuyó rápidamente mediante un hisopo sobre toda la superficie de la placa hasta su absorción completa. Luego se realizó una suspensión de turbidez equivalente al 0,5 McFarland de la cepa indicadora:

Escherichia coli ATCC® 25922. La placa se inoculó con la cepa indicadora utilizando un hisopo embebido en la suspensión bacteriana siguiendo las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para el método del antibiograma [99]. En el centro de la placa se colocó un disco de carbapenem según la especie bacteriana de la cepa incógnita:

- a) *Klebsiella* y *Enterobacter spp*: meropenem*
- b) Enterobacterales distintas de *Klebsiella* y *Enterobacter spp*: ertapenem*

*Ertapenem aumenta los resultados de falsos positivos de los no productores de carbapenemasas de las especies de *Klebsiella* y *Enterobacter*. Para reducir el número de falsos positivos de estos aislamientos se utiliza al meropenem [98].

Posteriormente con un ansa se tomaron de 5 colonias de un cultivo fresco de la cepa incógnita y se realizó una estría desde el borde del disco hacia la periferia de la placa (longitud de 20-25 mm aprox.). Luego se incubó la placa a 35°C durante 16-18 horas y se interpretó el resultado.

Interpretación:

- ✓ THT positivo: se observará una invaginación o un sobrecrecimiento de la cepa indicadora hacia el disco de carbapenem en la intersección de la estría con la zona de inhibición. La producción de carbapenemasa por parte de la cepa incógnita permitirá que la cepa indicadora pueda crecer dentro de la zona de inhibición.
- ✓ THT negativo: se observará la zona de inhibición inalterada en su intersección con la estría de la cepa incógnita.
- ✓ THT indeterminado: se observará una zona clara a lo largo de la estría de la cepa incógnita. Esto se debe a que algunas cepas pueden producir sustancias que inhiben el crecimiento de *E. coli* ATCC® 25922.

(ii) BlueCarba Test

Este método colorimétrico se basa en el cambio de pH del medio producto de la hidrólisis del imipenem en presencia de una carbapenemasa [100]. Efecto que se evidencia por el viraje del indicador de pH azul de bromotimol.

Para este ensayo se utilizaron dos microtubos de 0,5 ml. En el tubo control se agregó 100 μ l de Solución A (Anexo A2, inciso 1) y en el tubo de reacción se agregó 100 μ l Solución A + imipenem 3 mg/ml. En cada microtubos se resuspendieron aproximadamente unas 5 colonias de la cepa incógnita crecidas en placa con agar TSA, luego se incubó en agitación a 35-37°C como máximo 2 horas y se interpretó el resultado a ojo desnudo según el color desarrollado en cada tubo inoculado.

Interpretación

Tubos control (sin imipenem)	Tubos reacción (con imipenem)	Interpretación
Azul	Amarillo	Carbapenemasa positivo
Azul	verde	Carbapenemasa positivo
Verde	Amarillo	Carbapenemasa positivo
Azul	Azul	Carbapenemasa negativo
Verde	Verde	Carbapenemasa negativo
Amarillo	Azul o verde o amarillo	Test inválido

El tiempo de reacción usualmente requerido por los distintos mecanismos es:

KPC: 2 a 30 minutos

MBLs (NDM, VIM, IMP, SPM): 30 minutos a 1 hora

OXAs: 1 a 2 horas.

(iii) CarbaNP Direct

Este método se basa en la detección colorimétrica de la hidrólisis del imipenem [101]. Cuando se produce esta hidrólisis, hay un cambio de pH y, en consecuencia, un cambio de color rojo a amarillo/naranja que confirma la producción de carbapenemasa.

Para este ensayo se utilizaron dos microtubos de 0,5 ml. En el tubo control se agregó 100 µl de Solución A y en el tubo de reacción se agregó 100 µl Solución B (Anexo A2, inciso 2). Se inoculó cada microtubo con 5 colonias la cepa incógnita a partir de un cultivo fresco crecido en placa con agar TSA. Se agitó vigorosamente en vórtex por 5 a 10 segundos y se incubó a 35-37°C por un máximo de 2 horas.

Interpretación

tubo control (sin imipenem)	tubo reacción (con imipenem)	Interpretación
Rojo	Naranja	Carbapenemasa positivo
Rojo	Amarillo	Carbapenemasa positivo
Naranja	Amarillo	Carbapenemasa positivo
Rojo	Rojo	Carbapenemasa negativo
Naranja	Naranja	Carbapenemasa negativo
Amarillo	Rojo o Naranja o Amarillo	Test inválido

El tiempo de reacción usualmente requerido por los distintos mecanismos es:

KPC: 2 a 30 minutos

MBLs (NDM, VIM, IMP, SPM): 30 minutos a 1 hora

OXAs: 1 a 2 horas

9.3 Sensibilidad a los antimicrobianos

9.3.1 Sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión en agar.

La sensibilidad a los antimicrobianos se evaluó por difusión en agar por la técnica de Kirby-Bauer, según normas del CLSI. Brevemente, se inoculó la superficie seca de una placa con agar Mueller-Hinton con un hisopo embebido en la suspensión bacteriana siguiendo las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para el método del antibiograma [99]. La inoculación se realizó en 3 direcciones a fin de obtener un crecimiento bacteriano homogéneo y confluyente. Luego se colocaron los discos sobre la superficie del agar inoculado y se incubaron las placas en estufa a 35° C durante 16-20 horas. El antibiograma se realizó con los antimicrobianos detallados en la Tabla 1C del anexo C. Los halos de inhibición se midieron con calibre y se interpretaron según CLSI (Tabla 5A, M100). Los halos de inhibición de tigeiciclina y fosfomicina fueron interpretados según Pasteran y col. [102].

9.3.2 Concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de dilución en agar.

La determinación de la concentración inhibitoria mínima por la metodología de dilución en agar se realizó siguiendo los protocolos (M07, 11thEd.) y las recomendaciones establecidas por el CLSI (Tabla 5A, M100). Se utilizaron rangos de concentraciones de antibióticos a ensayar de acuerdo a las cepas ATCC utilizadas como control (*E. coli* ATCC[®]25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®]27853, *Staphylococcus aureus* ATCC[®]29213) que se encuentran listados en la Tabla 5A del manual M100 del CLSI. Se hicieron diluciones seriadas al medio de cada droga, y se plaquearon en placas de 15 cm de diámetro (38 ml agar Mueller-Hinton + 2 ml de la solución de antibiótico). Para cada antibiótico se prepararon dos placas sin antibiótico para control de crecimiento. Luego se inocularon las placas con un Replicador de Steers de 93 clavos, con las suspensiones de los aislamientos en estudio y los controles. Las suspensiones bacterianas fueron preparadas a partir de una dilución 1/10 de una suspensión de turbidez de 0,5 en la escala de McFarland. El crecimiento bacteriano fue evaluado luego de 16-20 horas de incubación a

35°C y los valores de CIM fueron interpretados según la CLSI, excepto tigeciclina y fosfomicina que fueron interpretados según Pasteran y col. [102].

9.3.3 Concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de microdilución.

Debido a la heteroresistencia que presentan las cepas productoras de carbapenemasas y a la imposibilidad de comparar los resultados de diferentes técnicas, se utilizó como *Gold Standard* a la técnica de microdilución para los carbapenemes.

La CIM por microdilución se ensayó para imipenem y meropenem siguiendo protocolos e indicaciones recomendados por CLSI. Brevemente, los rangos de concentración de ambos antibióticos se definieron igual que en la sección anterior. Se hicieron las diluciones seriadas al medio de cada droga en caldo Mueller-Hinton (MHB) y se dispensó 25 μ l de cada dilución en los pocillos de una policubeta de 96 well con fondo redondo. En el primer pocillo se dispensó 25 μ l de caldo MHB sin antibiótico como control de crecimiento bacteriano. Luego se realizaron las suspensiones de bacterias partiendo de una turbidez comparable al 0,5 de McFarland, y una posterior dilución 1/100 de esas suspensiones en caldo MHB. Se inoculó cada pocillo de la policubeta con 25 μ l del inóculo diluido utilizando una pipeta multicanal. Finalmente, las policubetas inoculadas se incubaron a 35°C por 16-20 horas en estufa y se evaluó el crecimiento bacteriano para determinar el valor de CIM. Dichos valores fueron interpretados según la normativa de la CLSI.

9.4 Pruebas fenotípica de mecanismos de resistencia adicionales

9.4.1 Detección de β -lactamasas de espectro extendido.

La producción de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) fue confirmada en los aislamientos que presentaron las siguientes características fenotípicas:

- (i) *No sensibilidad a aztreonam: halos de inhibición de aztreonam menores o iguales a 20 mm.*
- (ii) *Sinergia positiva entre los discos de aztreonam y amoxicilina/ác. clavulánico*

9.4.2 Mecanismos de resistencia a quinolonas.

9.4.2.1 Mecanismos de resistencia a quinolonas asociado a plásmidos (PMQR)

La sensibilidad disminuida o resistencia a quinolonas asociada a plásmidos se sospechó en los aislamientos que presentaron los siguientes resultados:

- (i) *qnr*: halos de inhibición a ciprofloxacina menor a 30 mm y halos de inhibición del ácido nalidíxico mayor a 6 mm;
- (ii) *aac(6')Ib-cr*: una diferencia entre los halos de inhibición de levofloxacina y ciprofloxacina mayor o igual a 5 mm ($\Delta\text{LEV-CIP} \geq 5\text{mm}$)

9.4.2.2 Mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR)

Las mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) se sospecharon en los aislamientos que presentaron halos de inhibición de ácido nalidíxico igual a 6 mm.

9.5 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los extractos de ADN se prepararon mediante la técnica por hervor. Brevemente, se suspendieron 2-4 colonias en 100 μ l de H₂O destilada estéril, se mezcló con vórtex 10 segundos y se incubó durante 10 minutos en bloque térmico (100°C). Los tubos fueron centrifugados 5 minutos a 13000 rpm, se recuperó el sobrenadante conteniendo el ADN y se conservó a -20°C hasta su utilización como templado de reacción.

Para realizar las amplificaciones por PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1X del buffer ADN Taq polimerasa, 1U de la enzima ADN Taq polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTP's, 10 pmol de cada cebador y 2,5 μ l de ADN molde. El volumen final de reacción fue de 25 μ l. Todos los reactivos utilizados en la reacción de PCR fueron de Invitrogen (CA, USA).

Los programas de ciclado que se utilizaron para la detección de genes de resistencia fueron: 94°C durante 5 minutos; seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a temperatura de *annealing* (TA), 1 minuto a 72°C; y un período de extensión final de 5 minutos a 72°C. El termociclador utilizado fue marca Applied Bioystems, 2720 (*Life Technologies*, USA). Los cebadores utilizados para la amplificación de genes se encuentran listados en la Tabla A1 en el anexo A2.

Como control de extracción de ADN se utilizaron cebadores para el gen que codifica el ARNr 16S. Como controles positivos de la amplificación de los genes de resistencia se utilizaron extractos de cepas productoras de IMP *Pseudomonas aeruginosa* M7017, VIM *P. aeruginosa* M5109 y NDM *Klebsiella pneumoniae* M13713, respectivamente; que fueron previamente caracterizados en el LNRRA [103].

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (Tris-ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM) a 6 V/cm. Para evaluar

los tamaños de los productos obtenidos se utilizó un marcador molecular de 100 pares de bases (pb) y uno de 1000 pb (Invitrogen, CA, USA).

Los genes de resistencia adicionales y el entorno genético de los aislamientos productores de *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM}, se estudiaron por PCR, empleando cebadores específicos para β-lactamasa de espectro extendido (BLEE) de tipo: PER (*bla*_{PER}), TEM (*bla*_{TEM}), CTX-M (*bla*_{CTX-M}), y SHV (*bla*_{SHV}); para proteínas de resistencia a la quinolona mediada por plásmidos (*qnr*), tipo B y S, y aminoglucósido 6'-N-acetil transferasa tipo Ib-cr (*aac(6')Ib-cr*). Posteriormente se secuenciaron por el método de Sanger (Tabla A1 del Anexo A2).

9.6 Caracterización del entorno genético de *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM}.

Los arreglos de cassettes de los integrones de clase 1 se realizaron por PCR combinando cebadores 5'CS (*IntI1*), 3'CS (*qacEΔ1/sulI*) o *sulI*, o el cebador *TniC* en el caso de integrones de clase 1 derivados del *Tn402*, con los cebadores de los genes *bla*_{IMP} o *bla*_{VIM}.

Todos los cebadores utilizados se encuentran listados en la Tabla A1 del Anexo A2.

9.6.1 Secuenciación de ácidos nucleicos por el método Sanger.

Los amplicones obtenidos por PCR se precipitaron con PEG8000 (polietilenglicol 10%, NaCl 2,5 mM, SIGMA St. Louis MO, USA) luego se estimó la concentración y se secuenció. La secuenciación del ADN fue realizada sobre ambas hebras por el Método de Sanger, usando terminadores de cadena *Big Dye* (AppliedBiosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), de acuerdo al protocolo del fabricante. Las reacciones se corrieron en un secuenciador ABI *Prism 377 ADN Sequencer* (AppliedBiosystems/Perkin Elmer). El análisis de las secuencias se efectuó mediante los programas Seqman (Lasergene, DNASTAR, Inc., Madison USA), Editseq (Lasergene, DNASTAR, Inc., Madison USA) y Chromas. Se empleó la herramienta *Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI

(*National Center for Biotechnology Information*) para comparar las secuencias obtenidas con las depositadas en base de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) y el programa informático Clustal X para alineamientos de secuencias.

9.6.2 Tipificación de replicones basada en PCR (PBRT)

Se caracterizó el grupo de incompatibilidad de los plásmidos mediante el método *PCR-based replicon typing* (PBRT) [104] y se clasificaron según su grupo de incompatibilidad (Inc) como se describió anteriormente (García-Fernández y Carattoli, 2010). Este método consiste en cinco PCR múltiples que reconocen tres tipos diferentes de replicones, y tres PCR simples para F, K y B/O (Tabla A2 en el anexo A2). Los controles positivos para cada replicón fueron generosamente provistos por la Dra. Carattoli.

Todas las amplificaciones de PCR, excepto para la detección de IncF, se realizaron con el siguiente esquema de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 60°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 1 minuto. La amplificación se concluyó con un programa de extensión de 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos. La PCR de detección de IncF se realizó con el mismo programa de amplificación, pero a una temperatura de *annealing* de 52°C.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con buffer TBE 0,5X (Tris, ácido bórico, EDTA 1 mM) a 35 mA durante 2-3 horas. Para evaluar los tamaños de los productos obtenidos se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb GeneO'rule.

9.7 Evaluación de la relación genética entre los aislamientos

9.7.1 Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

A partir de un cultivo bacteriano de 16-20 horas de crecimiento se realizó un repique de una sola colonia y se incubó 18 horas a 35°C. Se preparó una suspensión bacteriana en buffer de suspensión de células (BSC = 100 mM Tris: 100 mM EDTA pH 8) a una DO_{620nm} final de 5 unidades y se incubó 10 minutos a 42°C. Se mezcló con un volumen de agarosa de bajo punto de fusión 1,5% en PIV (Tris 10 mM pH 8, NaCl 1M) precalentada a 42°C, se homogeneizó con vortex y se distribuyó en gotas de 20 μ l sobre un soporte de vidrio. Se cubrieron con cubreobjeto para aplastar a la gota de agarosa y de esa forma armar el disco (plug). Luego se llevó 5 minutos a -20°C y luego 10 minutos a temperatura ambiente.

Los plugs de agarosa se incubaron a 50°C durante 17 horas en 1 ml de buffer de lisis (BLC = 50 mM Tris: 50mM EDTA pH 8 + 1% Sarcosyl) con 1 mg de proteinasa K. Luego se lavaron cinco veces con buffer TE 1X (Tris 10 mM; EDTA 1mM pH=8) durante 30 minutos en agitación y se almacenaron a 4°C en buffer TE 1X.

Los plugs fueron digeridos con 20 U/plug de enzima XbaI (Invitrogen) en baño térmico a 37°C durante al menos cuatro horas, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las condiciones de corrida para el equipo CHEF DR-III (BioRAD) que se utilizaron fueron las siguientes: gel de agarosa calidad PFGE (BioRAD) 1%, buffer TBE 0,5X (Tris, ácido bórico, EDTA 1 mM), voltaje 6V/cm, temperatura 14°C. Para *E. cloacae* la corrida se realizó en dos bloques: primer bloque fue de 1 segundo de tiempo inicial de pulsado, 15 segundos de tiempo final de pulsado y el tiempo de corrida fue de 7 horas. El segundo bloque fueron 15 segundos de tiempo inicial de pulsado, 35 segundos de tiempo final de pulsado y 19 horas de tiempo de corrida. Para *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii* y *C. farmeri* fue un solo bloque de 2,2 segundos de tiempo inicial, 54,2 segundos de tiempo final y 20 horas de corrida.

Como marcador de peso molecular se utilizó concatémicos de fago lambda PFGE ladder (New England Biolabs) y *Salmonella* serotipo Braenderup [105] (*S. Braenderup*). El revelado se llevó a cabo tiñendo los geles con bromuro de etidio durante 30 minutos en

agitación seguido de una decoloración con H₂O destilada durante 30 minutos. Se realizó un registro fotográfico con el equipo Gel Doc™ XR+ (BioRAD) para el posterior análisis e interpretación. La relación genética entre los aislamientos se evaluó mediante el criterio de Tenover *et al.*[93] Aquellos aislamientos con patrones de bandas idénticos se los consideró indistinguibles entre si y se los agrupó dentro del mismo subtipo clonal. Los aislamientos con hasta 6 bandas de diferencia se consideraron relacionados genéticamente, y se clasificaron como distintos subtipos del mismo clon. Aquellos aislamientos con más de 6 bandas de diferencia se consideraron no relacionados y se clasificaron como clones distintos.

9.7.2 Tipificación de secuencias multilocus (MLST)

La tipificación de secuencias multilocus (MLST) se realizó siguiendo las instrucciones descritas en el sitio web *E. cloacae* MLST (<http://pubmlst.org/ecloacae/>). Los cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los siete genes *housekeeping* se detallan en la tabla A3 del anexo A2. El número alélico y el secuencia tipo (ST) se asignaron utilizando el sitio web *E. cloacae* MLST. El complejo clonal (CC) se definió como un grupo de STs con un fundador primario ubicado centralmente en el diagrama de eBURST (<http://eburst.mlst.net>) en el que todos los ST se encuentran relacionados como variantes de un solo locus (SVL) de al menos otro ST. Para cada CC, eBURST identifica el ST que probablemente represente el genotipo fundador (tipo ancestral) y basándose en la parsimonia predice al ST primario como el ST con mayor número de SVL dentro del CC. Los ST fundadores de CCs se predijeron mediante la realización de 1000 re-muestras de bootstrap. Dos o más ST pertenecientes al mismo grupo SLV sin fundador según eBURST fueron designados concatémicos. Los STs sin un SVL que contenían otras ST se denominaron *singletons*.

9.8 Caracterización de plásmidos

9.8.1 Conjugación biparental.

Este ensayo se realizó utilizando un protocolo previamente descrito [65]. Brevemente, *E. coli* J53 resistente a azida (AzR) fue utilizada como cepa aceptora. En el centro de una placa con agar TSA se mezclaron en relación 3:1 la cepa aceptora (*E. coli* J53) y la cepa dadora. La mezcla fue incubada durante 20 horas a 35°C. El crecimiento bacteriano se suspendió en 1 ml de solución fisiológica y se realizaron diluciones seriadas 1/10 de las cuales se inocularon 100 µl en placas de agar TSA con 50 µg/ml de ampicilina y 200 µg/ml de azida. Las placas fueron incubadas a 35°C durante 18 horas. Como control del ensayo se prepararon 2 placas de agar TSA, una con 200 µg/ml de azida y otra con 50 µg/ml de ampicilina. Las dos placas se dividieron en 3 partes y en cada una se estrió por separado la cepa aceptora, la cepa dadora y la mezcla de conjugación. En las placas donde se obtuvo crecimiento (colonias aisladas), se repicaron colonias al azar, se confirmó la identificación como *E. coli* y la transferencia horizontal de genes se confirmó por antibiograma y PCR.

9.8.2 Perfil plasmídico: restricción con nucleasa S1-PFGE

Para realizar la caracterización de los plásmidos se realizó la restricción con nucleasa S1 de los plugs que previamente fueron preparados como se detalló en la sección 9.6.1. Brevemente, cada plug de agarosa se equilibró con 100 µl de buffer S1 1X (Acetato de sodio 500 mM pH 4.5, NaCl 2,8 mM, ZnSO₄ 45 mM) durante 30 minutos a 37°C. Luego se retiró el buffer y se trató con 0,5 U de nucleasa S1 (Promega) en un volumen final de reacción de 100 µl. Se incubó a 37°C durante 45 minutos y se frenó la restricción adicionando 70 µl de buffer de *stop* 1X (EDTA 0,5M pH 8, N-laurilsarcosina 1%, SIGMA) y se incubó en hielo.

La condición de corrida electroforética fue la siguiente: tiempo inicial de pulsado 5 segundos, tiempo final de pulsado 35 segundos, tiempo de corrida 20 horas, 6 V/cm, 14°C, TBE 0,5 X, gel de agarosa calidad PFGE al 1%.

Posteriormente se tiñó el gel con bromuro de etidio y se registraron los resultados fotográficamente con el equipo Gel Doc™ XR+ (BioRAD). Posteriormente se procedió a la transferencia del gel a una membrana de nylon y la hibridación (ver sección 9.7.4).

9.8.3 Restricción con endonucleasa I-Ceu I

Para determinar la localización física del gen se realizó la restricción con I-Ceu I según las condiciones del fabricante. Brevemente, los plugs preparados como se detalló en la sección 9.6.1 se equilibraron con 100 ul de buffer NEB4 1X durante 30 minutos a 37°C. Luego se retiró el buffer y se digirió con 4U de I-Ceu I (New England & amp; Allabs, Beverly, MA) en un volumen final de reacción de 50 ul. Se incubó toda la noche a 37°C.

La condición de corrida electroforética de los bloques fue la siguiente: tiempo inicial de pulsado 10 segundos, tiempo final de pulsado 120 segundos, tiempo de corrida 20 horas, 6 V/cm, 14°C, TBE 0,5X, gel de agarosa calidad PFGE 1%.

A continuación se tiñó el gel con bromuro de etidio y se registraron los resultados fotográficamente con el equipo Gel Doc™ XR+ (BioRAD). Luego se procedió a la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa y la posterior hibridación (ver sección 9.7.4).

9.8.4 Transferencia por capilaridad y Southern blot

Los geles obtenidos de las restricciones con S1 e I-Ceu I fueron posteriormente desteñidos con agua destilada, depurinados con HCl 0,25M y desnaturalizados con NaOH 0,5M. Lavando en cada paso con agua destilada para retirar el excedente de cada solución.

Una vez que el gel fue desnaturalizado, se realizó la transferencia por capilaridad colocando el gel invertido y sobre éste la membrana de nitrocelulosa (Amersham Protran Premium 0,45 µm NC. GE Healthcare Life Science, Germany). Se humedeció con buffer SSC 10X (87,65 g de NaCl, 44,1 g de citrato de sodio, pH=7,8) y se dejó transferir toda la noche con buffer SSC 10X. Posteriormente se marcaron las calles con lápiz y dejó secar la membrana a temperatura ambiente. Luego se procedió a la fijación del ADN a la membrana mediante luz UV utilizando el programa C2 del equipo *cross-linker* (Bio-Rad™ GS Gene linker. UV chamber). A continuación se realizó preparación de las sondas a partir de productos de PCR de los genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, ARNr 16S con la estrategia de random priming utilizando el *DIG DNA Labeling and Detection kit* (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) según el protocolo del fabricante. Al momento de utilizarlas en cada ensayo, primero se las desnaturalizó 10 minutos a 100°C en bloque térmico e inmediatamente se colocaron en hielo durante 15 minutos.

Posteriormente, se realizó la pre-hibridación de la membrana colocándola en un tubo de hibridación con buffer standard de hibridación (SSC 5X, 0,1% p/v lauroilsarcosinato de sodio, agente bloqueante 1X, 0,02% SDS) durante 30 minutos a 68°C a baja velocidad (posición 5) en un horno de hibridación (*Hybridization Incubator, Lab Line System*). Luego se agregó en la solución de pre-hibridación la sonda del gen correspondiente y se dejó hibridar durante toda la noche a 68°C a alta velocidad (posición 12). Al término de la hibridación, se realizaron una serie de lavados con diferentes soluciones. Dos lavados de 5 minutos cada uno con SSC 2X/SDS 0,1 % a temperatura ambiente y en el tubo de hibridación otros dos lavados de mayor astringencia de 15 minutos cada uno con SSC 0,1X/SDS 0,1 % a 68°C y a alta velocidad (posición 12). Posteriormente se hizo otro lavado con ácido maleico 1X (0,1 M de ácido maleico, 0,15 g de NaCl, pH=7,5) e inmediatamente se incubó 30 minutos en solución bloqueante 1X a temperatura ambiente en agitación. A continuación se incubó la membrana durante 30 minutos con 10 µl de anticuerpo anti-DIG con una dilución 1:10.000 en 1X de solución bloqueante y luego se lavó

dos veces durante 15 minutos con buffer de ácido maleico 1X, a temperatura ambiente en agitación. Finalmente se incubó la membrana en una solución de color (5 ml de buffer de detección: Tris-HCl 0,1M/NaCl 0,1M/MgCl₂ 50 mM pH= 9,5), 66 µl de NBT (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) y 33µl de BCIP (X-fosfato) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) preparada en el momento, en una bolsa plástica sellada y en oscuridad. Las señales de color comenzaron aparecer en minutos y cuando la intensidad de las bandas fueron adecuadas se detuvo la reacción lavando la membrana con agua.

9.9 Secuenciación masiva de ADN (WGS)

Secuenciación de plásmidos: Brevemente, se realizó la extracción del ADN plasmídico usando el *Large-Construct Kit* (Qiagen) de las células transformantes obtenidas en la sección 8.7.a, conjugación biparental, que portan el plásmido con el gen *bla*_{IMP} o *bla*_{VIM}. El ADN plasmídico se cuantificó utilizando el método fluorométrico del sistema comercial *Qubit dsDNA BR Assay* y el fluorómetro Qubit® 2.0 (Life Technologies, Burlington, Canadá). Para la construcción de las bibliotecas se utilizó el sistema comercial Nextera® XT *DNA Sample Preparation Kit* (Illumina). Este consistió en la tagmentación del ADN en segmentos de ~2500pb mediante el transposón Nextera XT y la marcación de los extremos con secuencias adaptadoras; luego se amplificó por PCR de los fragmentos marcados, con adición de index i5, index i7 y las secuencias requeridas para la formación de clusters; posteriormente se purificó y removió los productos de PCR que no tuvieron el tamaño adecuado mediante el uso de *AMPure XP beads*; a continuación se realizó la normalización de las bibliotecas para equilibrar la representatividad de cada una en la muestra combinada; luego se combinaron volúmenes iguales de las bibliotecas normalizadas diluidas en buffer de hibridación y desnaturalización; finalmente se realizó la generación de clusters y posterior secuenciación en la plataforma Illumina MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, Estados Unidos).

Procedimiento para el análisis de la secuencia de los plásmidos: se evaluó la calidad de las secuencias reads obtenidas con el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y luego se procedió al ensamblaje y comparación de secuencias con el software CLC WorkBeanch (Qiagen) y PATRIC. Para el análisis de secuencias se utilizaron las páginas del BLAST, ResFinder [106], RAST [107], PlasmidFinder [91]. Para el análisis de elementos genéticos móviles se utilizaron los programas específicos IS Finder (<http://www-is.biotoul.fr/is.html>) e INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>). La generación y visualización de mapas plasmídicos se utilizó el programa CGview (http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/).

Secuenciación de genoma: Brevemente, se realizó la extracción del ADN genómico usando *DNeasy blood and tissue Kit* (Qiagen) de los aislamientos clínicos *Enterobacter cloacae* ECL-M9921 y *Klebsiella pneumoniae* KPN-M19434, que portan el plásmido con el gen *bla_{IMP}*. El ADN genómico se cuantificó utilizando el método fluorométrico del sistema comercial *Qubit dsDNA BR Assay* y el fluorómetro Qubit® 2.0 (Life Technologies, Burlington, Canadá). Para la construcción de las bibliotecas se utilizó el mismo procedimiento de la secuenciación de plásmidos.

Procedimiento para el análisis de la secuencia de genoma: se evaluó la calidad de las secuencias reads obtenidas con el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/Projects/fastqc/>) y luego se procedió al ensamblaje de secuencias con el software CLC WorkBeanch (Qiagen) y PATRIC. Para el análisis de secuencias se utilizaron las páginas del BLAST, ResFinder [106], PlasmidFinder [91], Virulence Factor Database (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>).

9.10 Números de acceso en GenBank

Los números de integrones fueron asignados por INTEGRALL [75]. Las secuencias de *In883*, *In885* e *In900* se han depositado en GenBank con los números de acceso KJ668593, KJ668592 y KJ668594, respectivamente.

RESULTADOS

CAPÍTULO I:

Descripción de Aislamientos Clínicos

Portadores de *bla*_{IMP-8} en *Enterobacterales*

de Argentina.

10 Resultados capítulo I

10.1 Aislamientos clínicos y datos epidemiológicos.

Los estudios de rutina fenotípicos y genotípicos realizados determinaron que un total de 40 aislamientos fueron positivos para *bla*_{IMP} y por lo tanto fueron considerados para los estudios que aquí se desarrollan. Los 40 aislamientos de enterobacteriales correspondieron a 9 especies de acuerdo a las pruebas realizadas (pruebas bioquímicas y MALDI-TOF MS). La distribución de enterobacteriales productoras de IMP fue la siguiente (Figura 19): 17 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* (42,5%), 12 aislamientos de *Enterobacter cloacae* (30 %), 3 aislamientos de *Citrobacter freundii* (7,5%), 2 aislamientos de *E. coli* (5%), 2 aislamientos de *Citrobacter farmeri* (5%), y 1 aislamiento de *Serratia marcescens* (2,5%), *Raoultella ornithinolytica* (2,5%), *Klebsiella oxytoca* (2,5%) y *Enterobacter aerogenes* (2,5%).

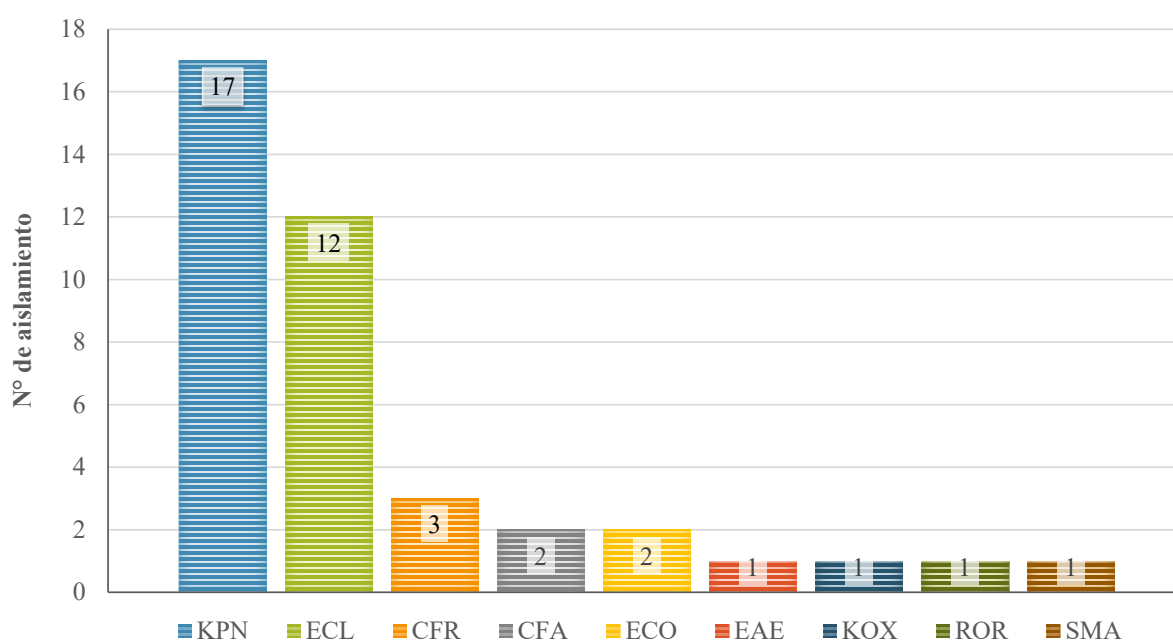


Figura 19. Distribución de enterobacteriales productoras de IMP. El gráfico de barras representa la distribución de especies productoras de *bla*_{IMP}. Los números en las barras indican el número total de aislamientos hallados para cada especie. KPN: *K. pneumoniae*, ECL: *E. cloacae*, CFR: *C. freundii*, CFA: *C. farmeri*, ECO: *E. coli*, EAE: *E. aerogenes*, KOX: *K. oxytoca*, ROR: *R. ornithinolytica*, SMA: *S. marcescens*.

Los aislamientos se recuperaron de 38 pacientes: 33 adultos con un rango de edad de 21-88 años y 6 menores con un rango de edad de 2 meses a 11 años. En dos de los pacientes se recuperaron dos aislamientos de diferente especie y ambos fueron incluidos en este trabajo. Tres de los pacientes tuvieron estadía prolongada en el hospital (de 30 a 45 días) y múltiples tratamientos con antibióticos. Once de los pacientes se encontraban cursando una enfermedad o condición subyacente grave (Tabla 1).

Tabla 1: Datos epidemiológicos de los enterobacteriales productores de *bla*_{IMP}.

N° Aislamiento	Años (género)	Hospital	Provincia	Sitio de aislación	Fecha de aislación	Enfermedad de base	Diagnóstico	Tratamiento con ATB ^a (días de tratamiento)
ECL-M9921	84 (f)	H1	Bs. As.	Sangre	25/8/2008	Hipertensión, enfermedad de Chagas	nd	nd
KOX-M13063	78 (f)	H1	Bs. As.	Sangre	21/10/2010	hipertension/divertículos	Infección abdominal	AMS (7d)
ECL-M13280	79 (f)	H2	Bs. As.	Sangre	10/2/2010	Fractura de cadera	Fractura de cadera	CTN
CFR-M13281	56 (f)	H3	Bs. As.	Sangre	10/2/2010	HTA-tabaquismo	nd	CAZ-VAN
ECL-M13624	nd (m)	H4	Bs. As.	Orina	13/9/2011	nd	EPOC	nd
ECL-M13795	62 (f)	H5	Bs. As.	Sangre	22/12/2011	nd	Bacteriemia	sin tto
ECO-M15732	76 (f)	H11	CABA	Colonización	17/6/2013	nd	nd	nd
KPN-M15885	82 (m)	H1	Bs. As.	Sangre	4/9/2013	Cáncer gástrico	Sepsis	nd
SMA-M15888	82 (m)	H1	Bs. As.	Sangre	4/9/2013	Cáncer gástrico	Sepsis	nd
EAS-M17109	36 (m)	H1	Bs. As.	Sangre	17/12/2013	nd	Sepsis	VAN-COL
ECL-M17212	74 (m)	H1	Bs. As.	Orina	20/2/2014	nd	ITU a repetición	PTZ
ECL-M17324	70 (f)	H9	CABA	Orina	19/5/2014	Diabetes tipo 2	Cirrosis	CIP-CLIN (4d)
KPN-M17343	61 (f)	H2	Bs. As.	Colonización	27/5/2014	Cáncer de mama	Linfagitis carcinomatosa	CIP
ECO-M17431	77 (m)	H9	CABA	Orina	17/6/2014	nd	Cáncer de colon probable sospecha	CAZ-VAN; CIP-VAN
ROR-M17614	11 (m)	H7	CABA	Sangre	13/8/2014	Disqueratitis congénita	Aplasia medular, trasplante de médula ósea	PTZ-AKN
CFA-M19020	62 (f)	H1	Bs. As.	Sangre	2/2/2015	Neoplasia	Sepsis	nd
CFA-M19031	57 (m)	H1	Bs. As.	Sangre	9/2/2015	Cardiopatía	FOD	nd
ECL-M19340	71 (m)	H1	Bs. As.	Sangre	23/5/2015	nd	Sepsis	PTZ
KPN-M19368	4 (m)	H3	CABA	nd	23/6/2015	nd	nd	nd
KPN-M19434	54 (m)	H1	Bs. As.	Sangre	30/6/2015	nd	nd	nd
CFR-M19571	62 (m)	H9	CABA	Líquido ascítico	2/9/2015	HIV positivo	Peritonitis purulenta	PTZ-VAN; LZD-TGC-AMK
ECL-M19671	44 (m)	H12	CABA	Colonización	16/10/2015	Gastruyeyurectomía	Neumonía intrahospitalaria	nd
KPN-M19708	63 (m)	H1	Bs. As.	Sangre	3/11/2015	nd	Sepsis	AMS-CLA
KPN-M19709	2m*(f)	H6	Santa Fe	Sangre	11/11/2015	lla congénita	nd	nd
KPN-M19711	82 (f)	H1	Bs. As.	nd	30/10/2015	Meningitis	ITU	C3G

KPN-M19723	22m*(f)	H4	CABA	Sangre	30/10/2015	Quemadura	nd	AFB (5d); AFB-MER-AMK (2d); COL-AMK
KPN-M19732	79 (f)	H1	Bs. As.	Sangre	7/11/2015	nd	Bacteriemia	nd
ECL-M19783	21 (m)	H1	Bs. As.	Piel y partes blandas	26/11/2015	nd	Fasciotomía	PTZ-VAN (6d)
CFR-M19802	48 (m)	H10	CABA	Bilis	14/12/2015	Linfoma no-Hodkin	Síndrome colestásico	PTZ (6d); IMI-AMK
KPN-M19805	21 (m)	H1	Bs. As.	Piel y partes blandas	26/11/2015	nd	Fasciotomía	PTZ-VAN (6d)
KPN-M19810	73 (f)	H1	Bs. As.	Sangre	14/12/2015	nd	nd	nd
ECL-M19846	48 (m)	H9	CABA	nd	6/1/2016	Diabetes	nd	CIP-CLIN
KPN-M19917	68 (m)	H1	Bs. As.	Sangre	18/12/2015	nd	nd	nd
KPN-M19918	88 (f)	H1	Bs. As.	Sangre	18/12/2015	nd	nd	nd
KPN-M19931	58 (f)	H1	Bs. As.	Sangre	27/1/2016	nd	nd	nd
KPN-M21002	56 (f)	H1	Bs. As.	Sangre	17/2/2016	Adenopatía	nd	CLIN
ECL-M21030	66 (m)	H5	CABA	Catéter	6/3/2016	nd	nd	nd
ECL-M21059	4m*(m)	H8	Bs. As.	Sangre	16/3/2016	nd	nd	nd
KPN-M21064	35 (f)	H12	CABA	Colonización	19/3/2016	nd	nd	nd
KPN-M21105	10m*(m)	H6	Santa Fe	nd	8/1/2016	nd	nd	nd

ATB: antibiótico; f: femenino; m: masculino, m*: meses; H: hospital; Bs. As.: Buenos Aires; nd: no determinado; HTA: hipertensión arterial; FOD: fiebre de origen desconocido; ITU: infección del tracto urinario; LLA: leucemia linfoide aguda; AMS: ampicilina-sulbactam; CTN: cefalotina; CAZ: ceftazidima; VAN: vancomicina; COL: colistín; PTZ: piperacilina-tazobactam; CIP: ciprofloxacina; CLIN: clindamicina; AMK: amicacina; LZD: linezolid; TGC: tigeciclina; CLA: claritromicina; C3G: cefalosporina de tercera generación; AFB: anfotericina B; MER: meropenem; IMI: imipenem. KPN: *K. pneumoniae*, ECL: *E. cloacae*, CFR: *C. freundii*, CFA: *C. farmeri*, ECO: *E. coli*, EAE: *E. aerogenes*, KOX: *K. oxytoca*, ROR: *R. ornithinolytica*, SMA: *S. marcescens*

Los 40 aislamientos se recibieron de 13 centros de salud, principalmente de la Ciudad de Buenos Aires (CABA) y la provincia de Buenos Aires. Veinticuatro aislamientos de ellos fueron derivados de un solo hospital de agudos (H1) y dos aislamientos de la provincia de Santa Fe. La figura 20 representa la incidencia de los enterobacteriales portadores de IMP reportados en el periodo de tiempo estudiado, donde se puede observar que el número de aislamientos productores de IMP se fue incrementando año tras año principalmente por el aporte de un único hospital (H1). El año 2015 fue el que se aislaron el mayor número de aislamientos (Figura 20). Cabe aclarar que para ésta tesis se tomó como punto de corte el mes de abril de 2016, por lo tanto los aislamientos recibidos en fechas posteriores no fueron considerados aquí.

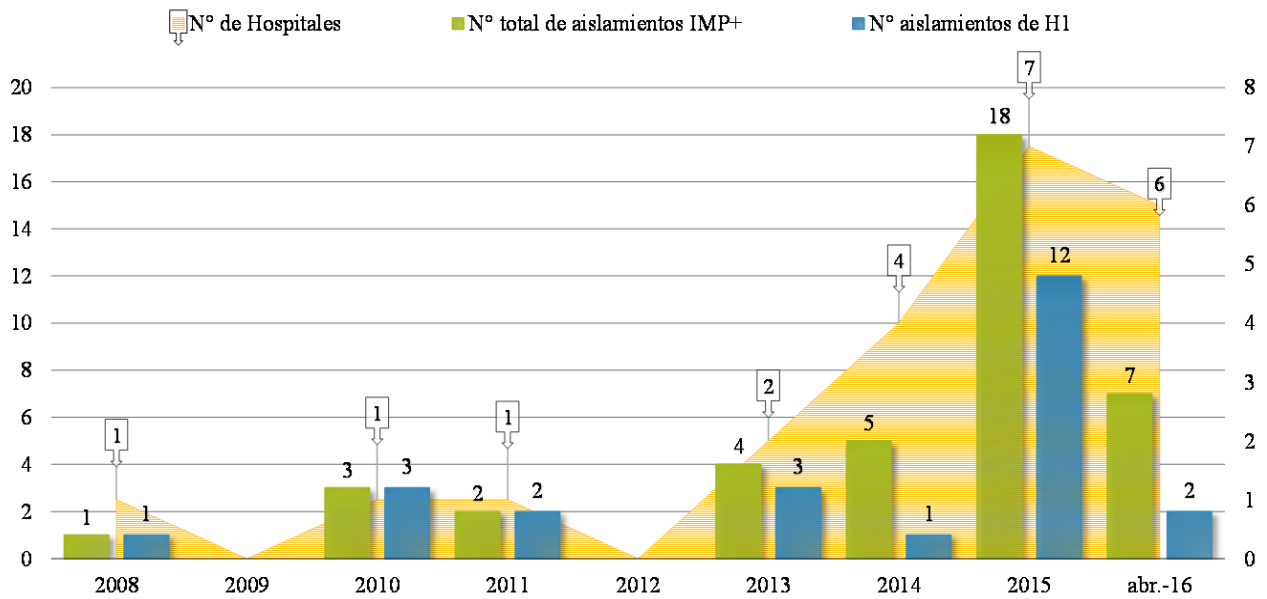


Figura 20. Incidencia de enterobacteriales portadores de IMP. Número total de aislamientos productores de IMP recibidos en el LNRRA por año (barras de color verde). Las barras azules representan el número de aislamientos recibidos del hospital H1. Los números sobre las barras indican el número de aislamientos por año. El área detrás de las barras representa el número total de hospitales y los números dentro de las cajas con flecha indican el número de hospitales por año.

El análisis del sitio de aislamiento y la especie causante de infección reveló que el 57% (23/40) de los *Enterobacteriales* estudiados fueron recuperados de hemocultivos (Figura 21, Tabla 1) de los cuales la mayoría de éstas infecciones fueron causadas por *K. pneumoniae*, 27,5% (11/40). Mientras que la especie *E. cloacae* se aisló de diversos sitios de infección (Tabla 1).

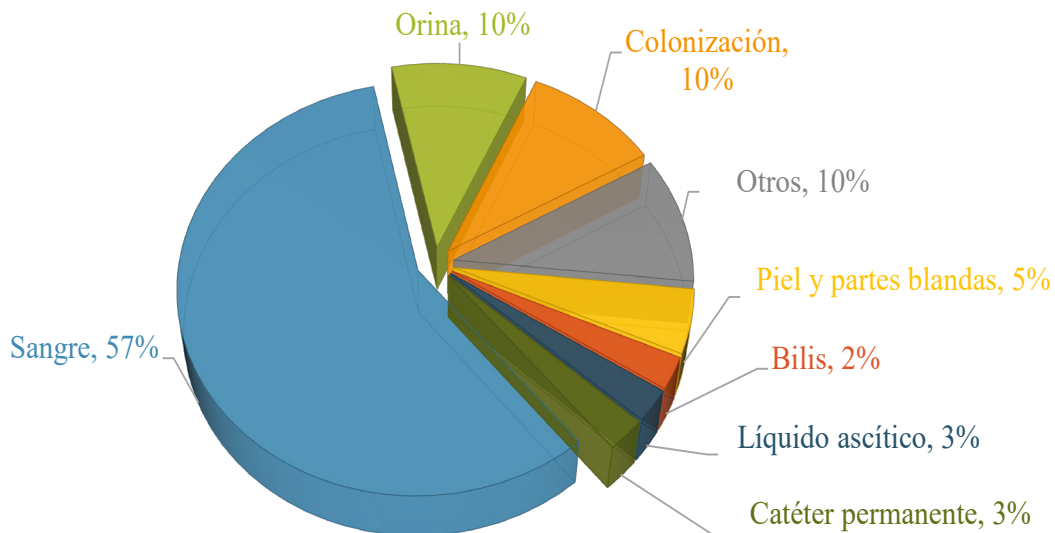


Figura 21. Porcentaje del sitio de aislamiento de los enterobacteriales productores de carbapenemasa tipo IMP. Las fracciones representan los diferentes sitios de los cuales se recuperó la muestra.

10.2 Detección fenotípica de la producción de carbapenemasa.

El ensayo de THT confirmó la actividad enzimática ya que se observó crecimiento (o invaginación) de la cepa indicadora hacia el disco de carbapenem [según especie, ver sección 9.2.2 (i)] en la intersección de la estría con la zona de inhibición (Figura 22, A).

Los ensayos colorimétricos dieron positivo para todos los aislamientos confirmando la actividad de una carbapenemasa. En la figura 22, B y C, se muestran resultados positivos para los ensayos BlueCarba y Carba NP para la detección de carbapenemasas.

La sinergia entre un disco EDTA y los discos de ertapenem e imipenem resultó positiva en todos los aislamientos de enterobacterales estudiados confirmando la producción de metalo- β -lactamasa. En la figura 22 D, se puede observar la deformación del halo de inhibición en los discos de imipenem y ertapenem que ocurre como producto de la acción quelante del EDTA. Las metalo- β -lactamasas producidas por la bacteria son inhibidas por el EDTA por lo tanto, la bacteria no puede hidrolizar el imipenem o ertapenem y por ende hay muerte celular.

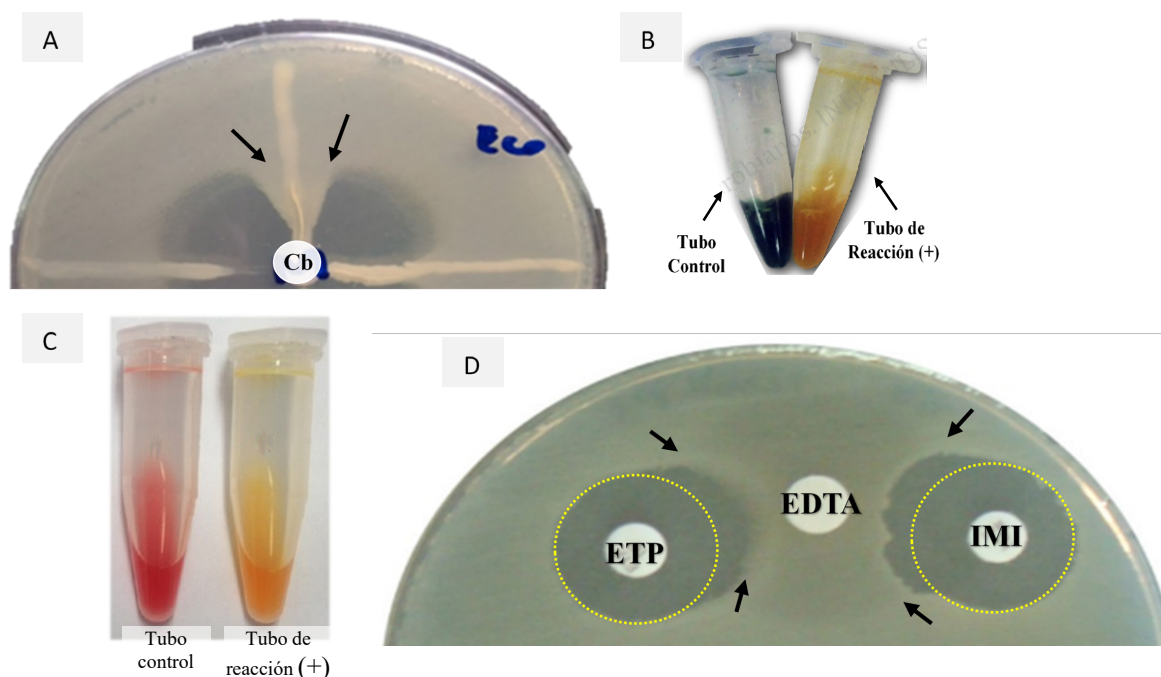


Figura 22. Detección fenotípica y colorimétrica de carbapenemasas. Pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas. (A) Triton Hodge test, Las flechas señalan la invaginación que se menciona en el texto.

Cb: carbapenem. (B) BlueCarba test. (C) Carba NP-Direct. (D) Sinergia positiva entre los discos de imipenem (IMI) y ertapenem (ETP) y EDTA de los aislamientos productores de metalo- β -lactamasa. La flecha señala el efecto sinérgico que da como resultado la deformación del halo de inhibición de los discos de carbapenemes.

10.3 Sensibilidad a los antimicrobianos de los enterobacteriales productores de IMP.

Se evaluó la sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión en agar y la concentración inhibitoria mínima (CIM) por dilución en agar con excepción de los carbapenemes a los cuales se les determinó la CIM por el método de microdilución. Se ensayaron once antimicrobianos que se detallan en la figura 23 (Tabla B1 y B2 anexo B) considerando aquellos que son relevantes en términos clínicos, como opciones de tratamiento (aztreonam, minociclina, ampicacina, fosfomicina, colistín y tigeciclina) y también aquellos utilizados en la detección de mecanismos de resistencias acompañantes como las fluorquinolonas o los aminoglucósidos.

Todos los aislamientos fueron no sensibles a imipenem por el método de difusión en agar mientras que los valores de CIM obtenidos presentaron una diferencia de un 5% menos de aislamientos no sensibles (I+R) con respecto al valor obtenido por difusión. En el caso de meropenem, el porcentaje de no sensibilidad (I+R) fue menor que el observado para el imipenem, 95% por difusión en agar y 87,5% por microdilución (Figura 23). Del mismo modo, se observaron valores de no sensibilidad a ciprofloxacina y a gentamicina en más de la mitad de los aislamientos.

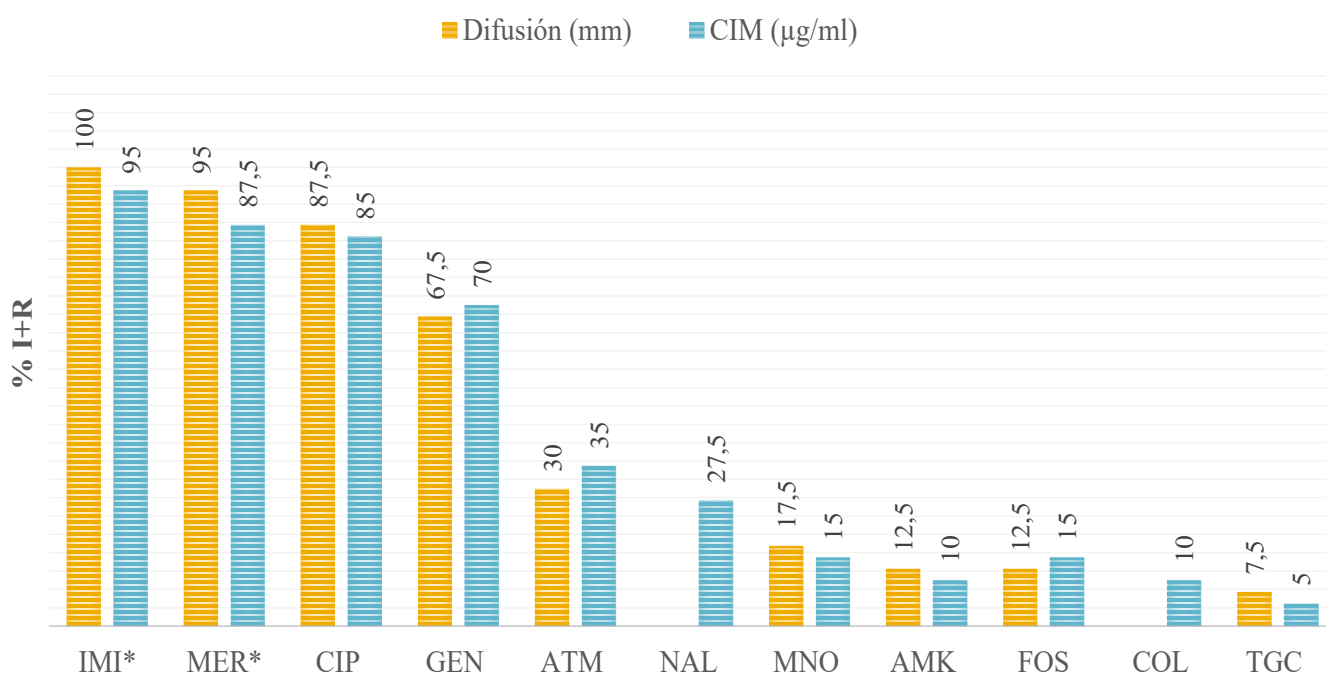


Figura 23. Porcentaje de no sensibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos productores de *bla*_{IMP}. Los resultados se muestran como porcentaje de no sensibilidad [considerando los puntos intermedio (I) + resistente (R)]. Las barras naranjas corresponden a los valores de sensibilidad por difusión en agar mientras que las barras celestes indican los valores de CIM por dilución en agar, excepto los carbapenemes que fueron testeados por microdilución (*). IMI*: imipenem, MER*: meropenem, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, ATM: aztreonam, NAL: ácido nalidíxico, MNO: minociclina, AMK: amicacina, FOS: fosfomicina, COL: colistín, TGC: tigeciclina.

Por otro lado, los valores de no sensibilidad a minociclina, amicacina, fosfomicina, colistín y tigeciclina, fueron menores al 20% tanto para difusión como para dilución (Figura 23). Estas fueron las drogas más activas frente a estos aislamientos, con CIM₅₀ de 4 µg/ml, 0,25 µg/ml, 1 µg/ml y 0,5 µg/ml, respectivamente. Es preciso destacar que, en el caso de colistín, la diferenciación entre aislamientos resistentes y sensibles por el método de difusión se dificulta ya que su naturaleza anfipática y su alto peso molecular obstaculiza la difusión en el agar, dando zonas de inhibición típicamente pequeñas que pueden corresponder con valores de CIM en las distintas categorías de interpretación. Por tal motivo, en los laboratorios de microbiología clínica no se recomienda usar el método de difusión para evaluar la sensibilidad a colistín.

Tabla 2. CIM₅₀ y CIM₉₀ de los enterobacteriales productores de IMP.

	IMI*	MER*	CIP	GEN	ATM	NAL	MNO	AMK	FOS	COL	TGC
Rango	1-32	0,25-≥32	0,016-≥128	0,25-≥128	≤0,06-256	2-≥64	0,5-≥64	1-128	≤0,25-256	0,5-≥128	0,12-2
CIM ₅₀ (μg/ml)	4	4	1	32	0,12	16	1	4	8	0,5	0,25
CIM ₉₀ (μg/ml)	16	8	16	128	128	≥64	8	16	64	1	0,5

IMI*: imipenem microdilución, MER*: meropenem microdilución, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, ATM: aztreonam, NAL: ácido nalidíxico, MNO: minociclina, AMK: ampicilina, FOS: fosfomicina, COL: colistin, TGC: tigeciclina.

10.4 Caracterización fenotípica de los mecanismos de resistencia adicionales.

10.4.1 Producción de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Catorce aislamientos (Tabla 3) presentaron halos de inhibición de aztreonam menores o iguales a 20 mm y sinergia positiva entre el aztreonam y el ácido clavulánico (presente en el disco de amoxicilina/ácido clavulánico). En la figura 24 se observa la deformación del halo de inhibición del aztreonam en la cercanía del disco de amoxicilina/ácido clavulánico, efecto de inhibición de la BLEE por parte del ácido clavulánico.

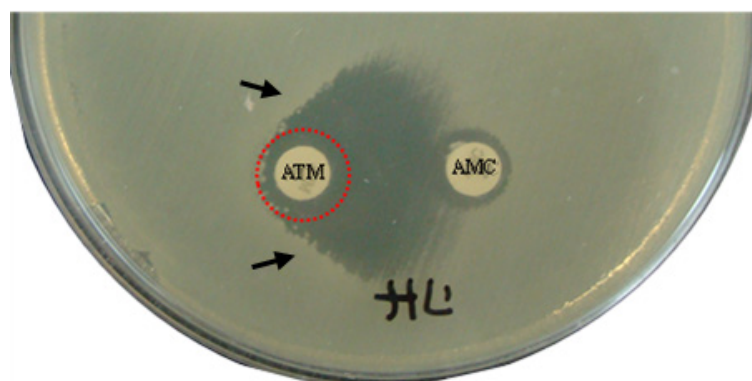


Figura 24. Fenotipo observado en aislamientos productores de β-lactamasa de espectro extendido. Halo de inhibición de aztreonam ≤ 20 mm y la sinergia positiva entre los disco de aztreonam (ATM) y amoxicilina/ácido clavulánico (AMC). Las fechas negras señalan la deformación del halo de aztreonam.

10.4.2 Mecanismos de resistencia a quinolonas

Se evaluó la presencia de mecanismos de resistencia a quinolonas por el método de difusión en agar.

≈ *Mecanismo de resistencia a quinolonas asociada a plásmidos (PMQR):*

Veintiséis de los aislamientos fueron sospechosos de portar *qnr* por presentar halos de inhibición de ciprofloxacina menor a 30 mm y halos de inhibición de ácido nalidíxico mayor a 6 mm (Tabla 3). Por otro lado, doce aislamientos presentaron una diferencia mayor o igual a cinco entre los halos de inhibición de levofloxacina y ciprofloxacina (Tabla 3) sugiriendo la producción de *aac(6')-Ib-cr*.

≈ *Mutaciones en la región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR):*

Nueve aislamientos fueron sospechosos de tener mutaciones en la región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR) por presentar halos de inhibición de ácido nalidíxico igual a seis milímetros (Tabla 3). Este mecanismo puede enmascarar el fenotipo de sospecha de *qnr* por lo tanto estos nueve aislamientos fueron evaluados por PCR (inciso 10.5.2.2).

Tabla 3. Aislamientos con fenotipo sospechosos de presentar mecanismos de resistencia adicionales.

N° Aislamiento	Sospecha de BLEE	Sospecha de PMQR		Sospecha de QRDR
		<i>qnr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	
ECL-M9921	+	+	+	-
KOX-M13063	+	-	-	+
ECL-M13280	+	+	+	-
CFR-M13281	+	-	-	+
ECL-M13624	+	+	+	-
ECL-M13795	-	-	-	+
ECO-M15732	-	+	-	-
EAE-M17109	-	-	-	+
ECL-M17324	-	+	+	-
ROR-M17614	+	+	-	-
CFA-M19020	+	+	+	-
CFA-M19031	+	+	+	-
ECL-M19340	+	+	-	-

KPN-M19368	-	+	+	-
KPN-M19434	-	+	+	-
CFR-M19571	-	-	-	+
ECL-M19671	-	-	-	+
KPN-M19708	-	+	-	-
KPN-M19709	+	+	+	-
KPN-M19711	-	+	-	-
KPN-M19723	-	+	-	-
KPN-M19732	+	+	+	-
ECL-M19783	-	+	-	-
CFR-M19802	-	-	-	+
KPN-M19805	-	+	+	-
KPN-M19810	-	+	-	-
ECL-M19846	+	-	-	+
KPN-M19917	-	+	-	-
KPN-M19918	-	+	-	-
KPN-M19931	-	+	-	-
KPN-M21002	-	+	-	-
ECL-M21030	+	+	+	-
ECL-M21059	-	+	-	-
KPN-M21064	-	-	-	+
KPN-M21105	+	+	-	-
Total	14	26	12	9

BLEE: β -lactamasa de espectro extendido, PMQR: mecanismos de resistencia a quinolonas asociado a plásmidos, QRDR: mutaciones en la región determinante de la resistencia a las quinolonas. KPN: *K. pneumoniae*, ECL: *E. cloacae*, CFR: *C. freundii*, CFA: *C. farmeri*, ECO: *E. coli*, EAE: *E. aerogenes*, KOX: *K. oxytoca*, ROR: *R. ornithinolytica*, SMA: *S. marcescens*. Las filas color gris indican los aislamientos sospechosos de producir QRDR.

10.5 Resultados confirmatorios de mecanismos de resistencia mediante PCR.

10.5.1 Determinación de mecanismos de resistencia a los carbapenemes.

En los cuarenta aislamientos clínicos se confirmó por PCR la amplificación positiva para el gen *bla*_{IMP}. La secuenciación de ácidos nucleicos determinó que todos los aislamientos portaban el alelo *bla*_{IMP-8}.

A continuación se muestra el alineamiento de secuencias de aminoácidos de las variantes de IMP descritas en nuestro país, IMP-1, IMP-8, IMP-13 e IMP-16 (Figura 25).

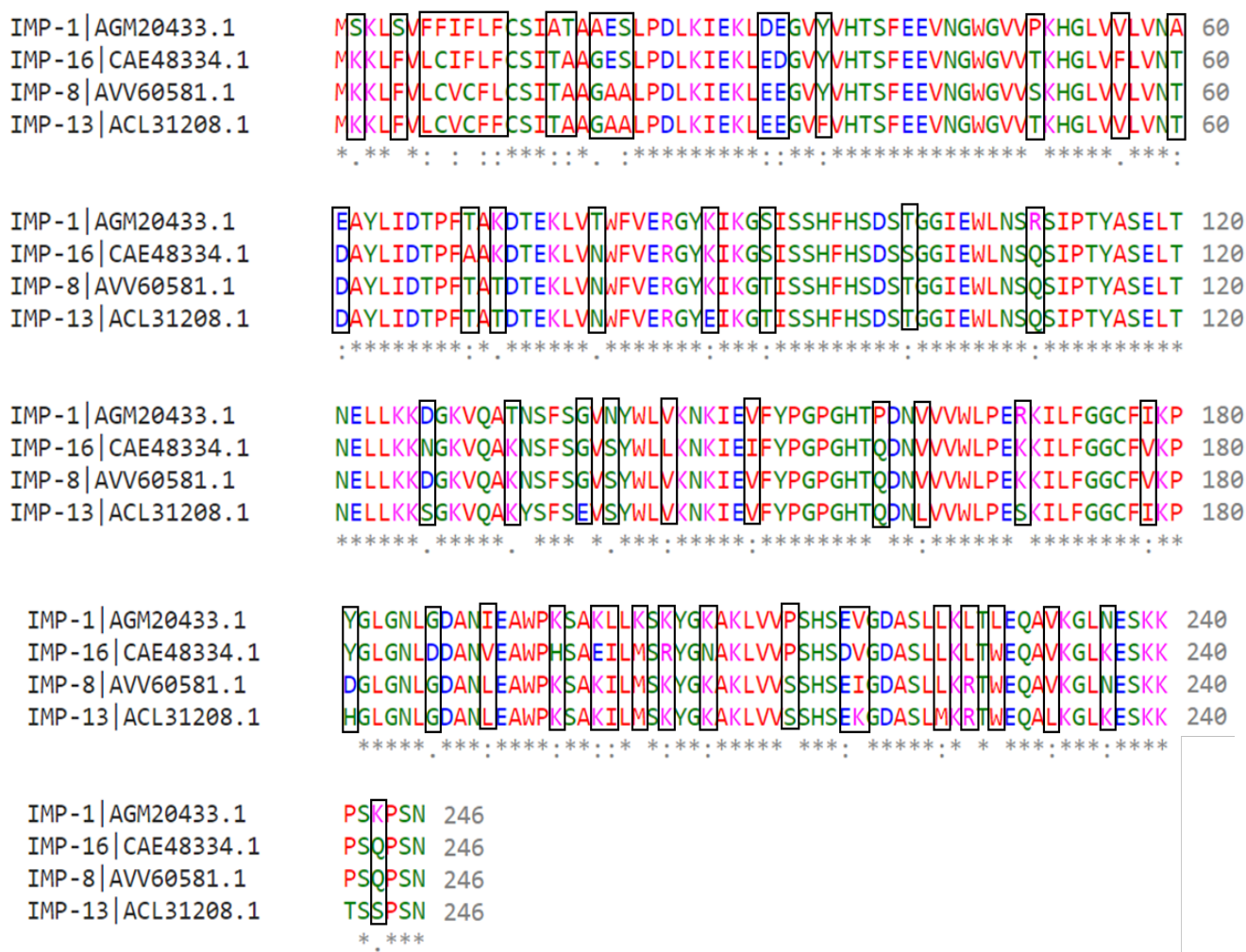


Figura 25. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de IMP-1, IMP-8, IMP-13 e IMP-16. Los colores de los residuos de aminoácidos indican sus propiedades fisicoquímicas. El color rojo indica residuos pequeños e hidrofóbicos, incluido el residuo aromático Tirosina (Y). El color azul indica los residuos ácidos y el magenta los básicos. Los residuos de color verde son los aminoácidos que integran los grupos: Hidroxilo, sulfhidrido, amina y la glicina (G). El asterisco (*) señala los residuos conservados. Los dos puntos (:) indica conservación entre grupos de propiedades fuertemente similares aproximadamente equivalente a un scoring de > 0,5 en la matriz de Gonnet PAM 250, mientras que un punto (.) debajo del residuo aminoacídico indica conservación entre grupos de propiedades débilmente similares aproximadamente equivalente a un scoring de ≤0,5 y >0 en la matriz de Gonnet PAM 250 (PAM 250: distancia evolutiva en la que las proteínas comparten cerca del 20% de identidad. Es decir en la que el 80% de los aminoácidos se han cambiado). Los recuadros negros señalan las diferencias de aminoácidos entre las variantes de IMP.

Como se observa en la figura 25, las distintas variantes de IMP presentan varias diferencias aminoacídicas entre sí. IMP-8 e IMP-13 son más similares entre sí, respecto a IMP-1 e IMP-16.

10.5.2 Determinación de los mecanismos de resistencia adicionales.

10.5.2.1 Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido

Los 14 aislamientos con fenotipo sospechoso de producir una β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) fueron confirmados por PCR para las BLEE más prevalentes y se hallaron los siguientes genes: *bla*_{PER} en siete aislamientos, *bla*_{CTX-M} en dos y *bla*_{SHV} en un aislamiento (Tabla 4). El gen *bla*_{SHV} fue secuenciado y se halló el alelo SHV-12. Además, las PCRs de grupo para *bla*_{PER} y *bla*_{CTX-M} determinaron, el alelo PER-2 en los siete aislamientos y CTX-M2 en un aislamiento. El otro aislamiento con *bla*_{CTX-M} resultó PCR negativo para todos los cebadores de grupo de CTX-M disponibles en el laboratorio. Posiblemente se deba a variaciones en la secuencia donde se unen los cebadores, lo mismo ocurrió con los cuatro aislamientos restantes que resultaron negativos para los genes de BLEE.

Tabla 4. Producción de β -lactamasas de espectro extendido.

<i>Especie</i>	<i>n</i>	<i>Fenotipo BLEE +</i>	<i>bla</i> _{PER-2}	<i>bla</i> _{CTXM (grupo)}	<i>bla</i> _{SHV-12} ^a
<i>K. pneumoniae</i>	17	3	2	1	0
<i>E. cloacae</i>	12	6	3	1 (2)	1
<i>C. farmeri</i>	2	2	0	0	0
<i>C. freundii</i>	3	1	1	0	0
<i>E. coli</i>	2	0	0	0	0
<i>E. aerogenes</i>	1	0	0	0	0
<i>K. oxytoca</i>	1	1	1	0	0
<i>R. ornithinolytica</i>	1	1	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	1	0	0	0	0
Total	40	14	7	2	1

^aAlelos secuenciados para definir BLEE a partir de β -lactamasas de amplio espectro.

10.5.2.2 Mecanismos de resistencia a quinolonas asociada a plásmidos

Al total de los aislamientos se les confirmó la presencia de mecanismos de resistencia a quinolonas asociada a plásmidos (PMQR) y la presencia de mutaciones en la región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR) por PCR. Los PMQR confirmados fueron: 29

aislamientos con la combinación de los mecanismos *qnrB* más *aac(6')Ib-cr* (tabla 5), un aislamiento con *qnrB* y un aislamiento con *qnrS* más *aac(6')Ib-cr*.

Por otro lado, se confirmó la presencia de mutaciones en el codón 83 del gen *gyrA* en los nueve aislamientos sospechosos de contener modificaciones en el QRDR. En el aislamiento KPN-M21064 la mutación fue Ser83Ile, mientras que en KOX-M13063, EAE-M17109 y los *C. freundii* fueron Thr83Ile. En cambio, en los *E. cloacae* la mutación fue de Ser83Tyr.

Tabla 5. Mecanismos de resistencia a quinolonas: PMQR y QRDR.

N° Aislamientos	MPRQ: Gen/es detectado/s			QRDR
	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i>	
1	+	-	-	+
25	+	-	+	-
4	+	-	+	+
1	-	+	+	+
3	-	-	-	+

MPQR: mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas

10.6 Caracterización molecular de los elementos genéticos móviles que portan *bla*_{IMP-8}.

El análisis del entorno genético del gen *bla*_{IMP-8} se determinó en todos los aislamientos estudiados y se diferenciaron cuatro estructuras diferentes. En todos los casos el gen *bla*_{IMP-8} se localizó como el primer cassette en integrones de clase 1. Se definió un nuevo integrón In1165 el cual presentó un nuevo arreglo, donde en el segundo cassette se hallaron fusionados los genes de aminoglucósido 3"-nucleotidiltransferasa, *aadA1y*, y β -lactamasa de espectro extendido tipo OXA, *bla*_{OXA-9} (Figura 26 A, Tabla 6). Esta fusión ocurrió entre el *attC* truncado de la *aadA1y* y el gen *bla*_{OXA-9}. Este integrón se detectó en dos *C. farmeri* y en una *K. oxytoca* (Figura 26 A, Tabla 6). Del mismo modo, se determinó el nuevo integrón In1330 que tiene como segundo cassette una *aadA1a* la cual confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina. Esta nueva estructura se halló en 17 aislamientos en las

siguientes especies: 13 *K. pneumoniae*, 3 *E. cloacae* y 1 *R. ornithinolytica* (Figura 26 B, Tabla 6). Por otro lado, se encontró un nuevo integrón al cual no se le asignó numeración dado que no se logró amplificar la región 3'CS. Esta estructura, presente en el aislamiento *E. cloacae* M9921, contenía como segundo cassette una *aadA1* donde la secuencia del sitio de recombinación (*attC*) se halló interrumpida por un intrón del grupo IIc (Figura 26 C, Tabla 6). Este intrón se encuentra interrumpido por la secuencia de inserción IS26. En los 19 aislamientos restantes (ocho *E. cloacae*, cuatro *K. pneumoniae*, tres *C. freundii*, dos *E. coli*, un *E. aerogenes* y una *S. marcescens*) no se logró determinar la secuencia completa del integrón (Figura 26 D, Tabla 6) y solo se identificó *bla_{IMP-8}* como primer cassette.

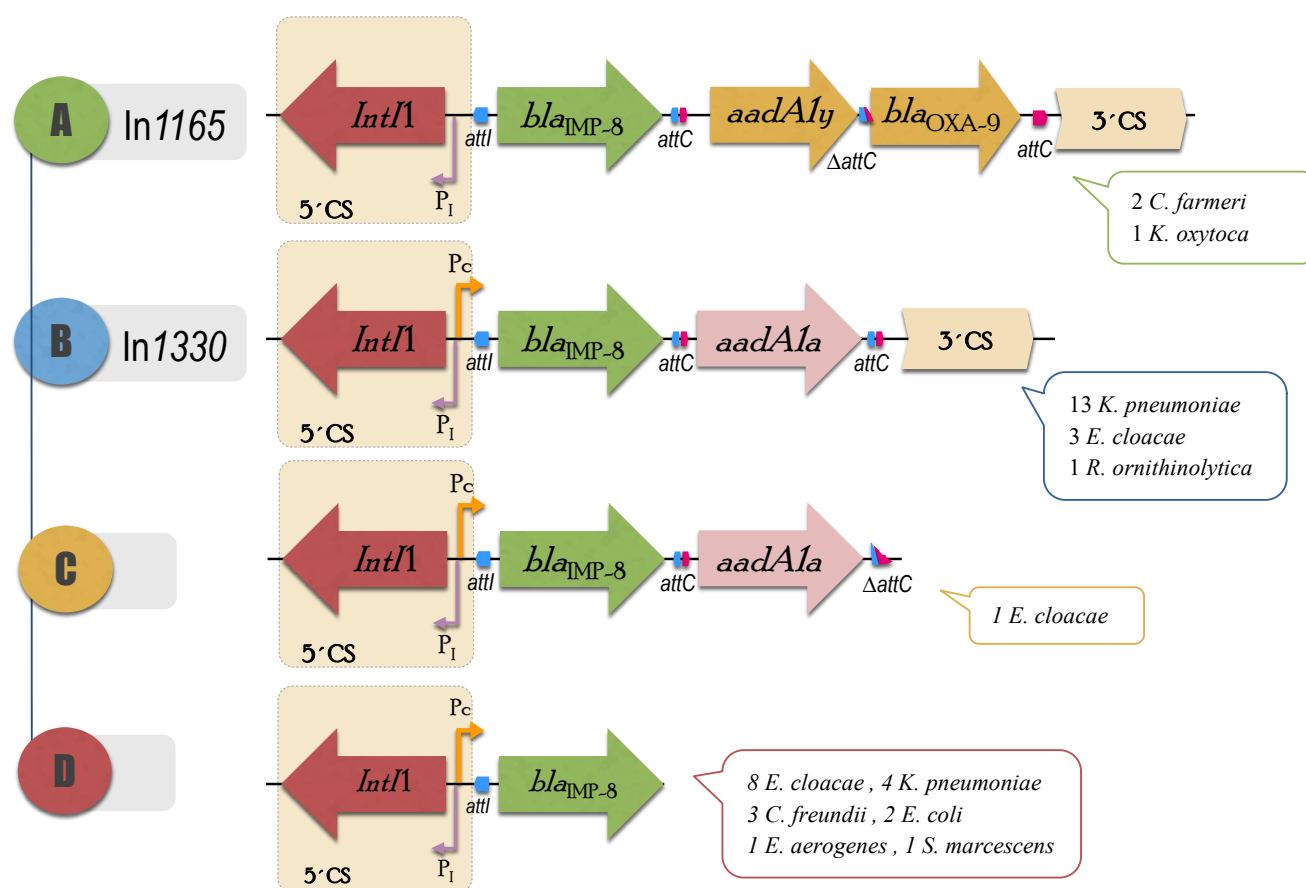


Figura 26. Entornos genéticos de *bla_{IMP-8}*. Estructuras de los arreglos de integrones de clase 1 hallados en las enterobacteriales estudiadas en el presente trabajo. *IntI1*: gen de la integrasa; 5'-CS: extremo 5' conservado; P_C : promotor asociado al integrón; P_I : promotor de la integrasa; *attI*: sitio de recombinación adyacente reconocido por la integrasa *IntI1*; *attC*: sitio de recombinación específica; 3'-CS: extremo 3' conservado. $\Delta attC$: sitio de recombinación específica truncado.

10.7 Relación genética entre los aislamientos estudiados

Se estudiaron por PFGE los 17 aislamientos de *K. pneumoniae* y se obtuvieron 12 patrones de bandas diferentes (A-L). Cuatro de los aislamientos presentaron un patrón de bandas idéntico y se los agrupó como clon A (Figura 27, Tabla 6). Estos aislamientos fueron recuperados en el periodo de tiempo de junio a diciembre del 2015 del hospital H1 (Figura 27, Tabla 6) y dos de los pacientes cursaban una condición de enfermedad grave (meningitis y sepsis). Por otro lado, se observaron dos aislamientos provenientes del H1 (enero-febrero 2016) con el mismo patrón de bandas y se los agrupó como clon B (Figura 27, Tabla 6). De la misma forma, los dos aislamientos provenientes de Santa Fe (H6, 2015-2016) presentaron el mismo perfil de restricción y se los agrupó como el clon C (Figura 27, Tabla 6). El resto de los aislamientos presentaron diferentes patrones de PFGE y no se encontró relación clonal entre ellos. Asimismo, no se observó relación clonal entre los tres aislamientos de *C. freundii* ni entre los dos aislamientos de *E. coli* (Figura 27, Tabla 6).

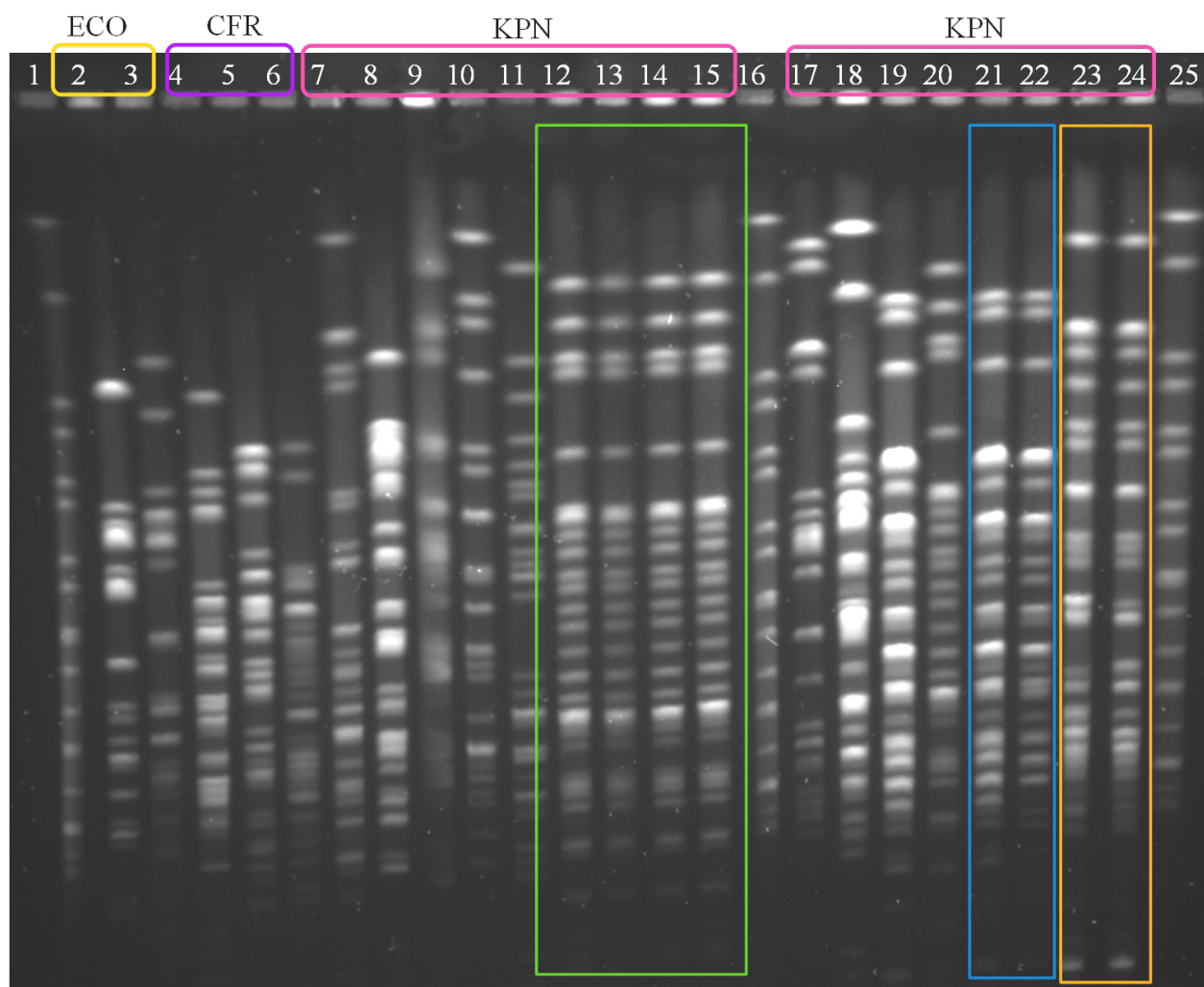


Figura 27. XbaI-PFGE de los aislamientos de *K. pneumoniae*, *C. freundii* y *E. coli*. Calle 1: Ladder: *S. Braenderup*; calle 2: ECO-M15732; calle 3: ECO-M17431; calle 4: CFR-M13281; calle 5: CFR-M19802; calle 6: CFR-M19571; calle 7: KPN-M19368; calle 8: KPN-M19723; calle 9: KPN-M21064; calle 10: KPN-M15885; calle 11: KPN-M17343; calle 12: KPN-M19434; calle 13: KPN-M19711; calle 14: KPN-M19708; calle 15: KPN-M19810; calle 16: Ladder: *S. Braenderup*; calle 17: KPN-M19732; calle 18: KPN-M19805; calle 19: KPN-M19917; calle 20: KPN-M19918; calle 21: KPN-M19931; calle 22: KPN-M21002; calle 23: KPN-M19709; calle 24: KPN-M21105; calle 25: Ladder *S. Braenderup*. El recuadro verde señala los aislamientos pertenecientes al clon A, el recuadro azul los aislamientos del clon B y el recuadro naranja los aislamientos del clon C.

Del mismo modo, se estudiaron los 12 aislamientos de *E. cloacae* y se determinaron 12 patrones de PFGE, por lo que se concluye que estos aislamientos no están genéticamente relacionados (Figura 28, Tabla 6).

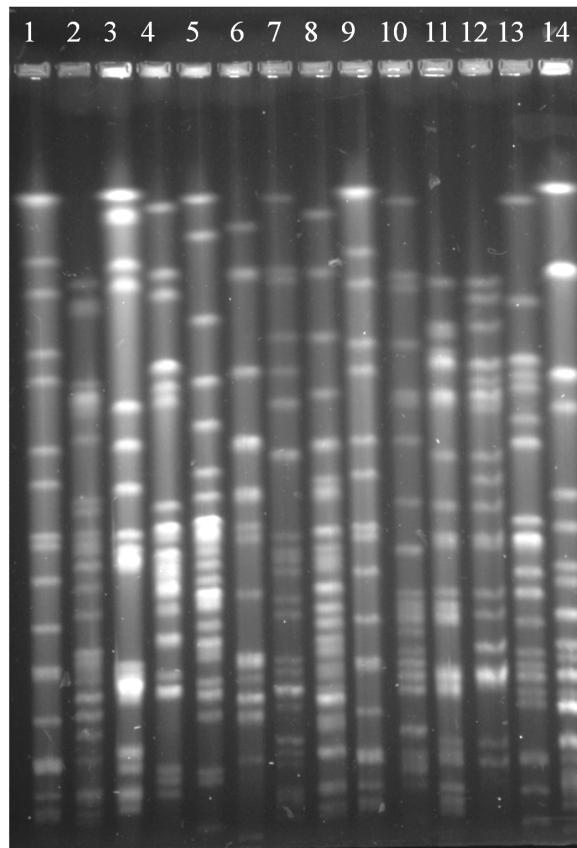


Figura 28. XbaI-PFGE de los aislamientos de *E. cloacae*. Calle 1: Ladder: *S. Braenderup*; calle 2: ECL-M9921; calle 3: ECL-M13280; calle 4: ECL-M13624; calle 5: ECL-M13795; calle 6: ECL-M17212; calle 7: ECL-M19340; calle 8: ECL-M19783; calle 9: Ladder: *S. Braenderup*; calle 10: ECL-M17324; calle 11: ECL-M19846; calle 12: ECL-M19671; calle 13: ECL-M21030; calle 14: ECL-M21059.

Los dos aislamientos de *C. farmeri*, también fueron caracterizados por PFGE y mostraron patrones de bandas indistinguibles entre sí (Figura 29, Tabla 6). Estos dos aislamientos provenían del mismo hospital (H1), uno de los pacientes presentaba una neoplasia con insuficiencia renal y el otro paciente presentaba una cardiopatía.

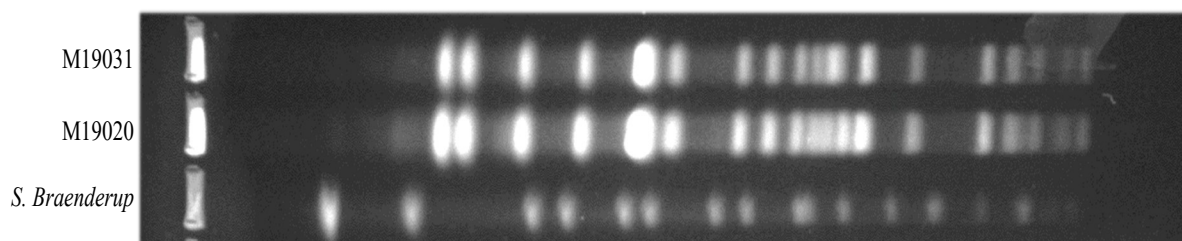


Figura 29. XbaI-PFGE de los *C. farmeri*, CFA-M19031 y CFA-M19020. *S. Braenderup* se utilizó como marcador de peso molecular.

10.8 Caracterización de molecular de plásmidos

10.8.1 Determinación de cantidad y tamaño de plásmidos de los aislamientos portadores de *bla*_{IMP-8}

La digestión con nucleasa S1 mostró que todos los aislamientos contenían entre uno y cinco plásmidos de tamaños aproximadamente entre <48, y 378 Kb (Figuras 30 y 31, Tabla 6). Los plásmidos que portan los 24 aislamientos provenientes del hospital H1 (Bs. As.) se muestran en la Figura 30, además de otros dos aislamientos del H2 y H8 (Bs.As.). Pudimos observar que, como se mencionó arriba, todos los aislamientos poseen varios plásmidos, 11 aislamientos (10 del H1) poseen un plásmido de aproximadamente 70 Kb. Por otra parte, tres de los aislamientos de *K. pneumoniae* pertenecientes al clon A provenientes del H1 (Figura 27, Tabla 6), KPN-M19434, KPN-M19708 y KPN-M19711, mostraron cuatro plásmidos del mismo tamaño (aproximadamente de <48,5, 125, 270 y 358 Kb) mientras que el cuarto aislamiento de este tipo clonal, KPN-M19810, solo presentó dos plásmidos de aproximadamente 116 y 260 kb (Figura 30, Tabla 6). Los dos *C. farmeri*, CFA-M19020 y CFA-M19031, presentaron tres plásmidos iguales de un tamaño aproximado de 60, 116 y 292 Kb (Figura 31, Tabla 6). Los dos casos de aislamientos obtenidos del mismo paciente pero de distinta especie mostraron situaciones distintas (Tabla 6). KPN-M15885 y SMA-M15888 tuvieron el mismo plásmido (~66 kb) e integrón (5'CS-*bla*_{IMP-8}-?) mientras que ECL-M19783 y KPN-M19805 tuvieron distinto plásmido (~332 o 360 kb y ~236 kb, respectivamente) y distinto integrón (5'CS-*bla*_{IMP-8}-?, e In1330, respectivamente) sugiriendo que en el primer caso hubo transferencia horizontal, tal vez intrapaciente, mientras que en el segundo se trató de dos infecciones independientes.

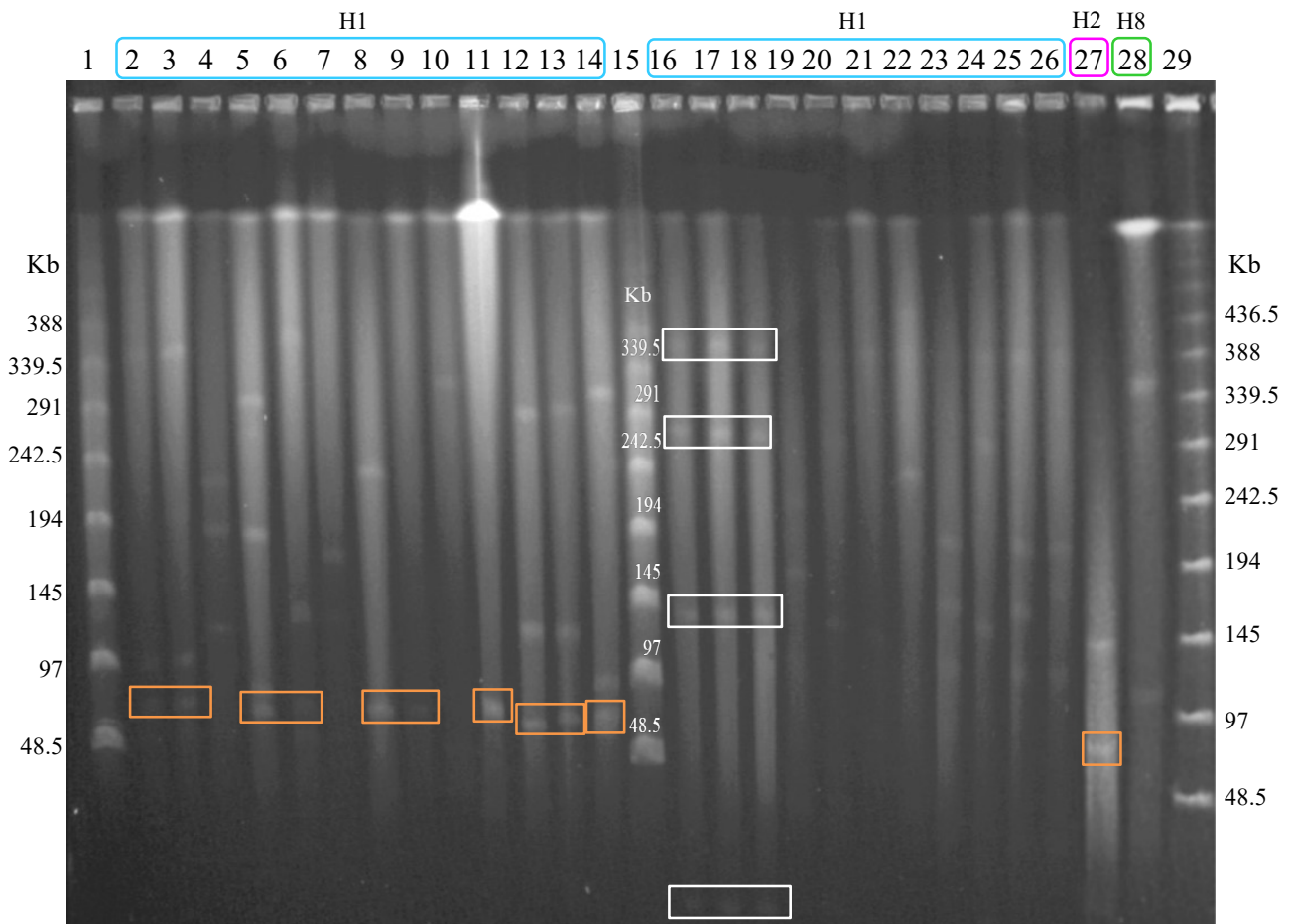


Figura 30. Nucleasa S1-PFGE de los aislamientos productores de *bla*_{IMP-8} provenientes de hospitales de la provincia de Buenos Aires. Calle 1: λ Ladder; calle 2: ECL-M9921; calle 3: ECL-M13280; calle 4: CFR-M13281; calle 5: KOX-M13063; calle 6: ECL-M13624; calle 7: ECL-M13795; calle 8: KPN-M15885; calle 9: SMA-M15888; calle 10: EAE-M17109; calle 11: ECL-M17212; calle 12: CFA-M19020; calle 13: CFA-M19031; calle 14: ECL-M19340; calle 15: λ Ladder; calle 16: KPN-M19434; calle 17: KPN-M19708; calle 18: KPN-M19711; calle 19: KPN-M19732; calle 20: KPN-M19810; calle 21: ECL-M19783; calle 22: KPN-M19805; calle 23: KPN-M19917; calle 24: KPN-M19918; calle 25: KPN-M19931; calle 26: KPN-M21002; calle 27: KPN-M17343; calle 28: ECL-M21059; calle 29: λ Ladder. KPN: *K. pneumoniae*, ECL: *E. cloacae*, CFR: *C. freundii*, CFA: *C. farmeri*, EAE: *E. aerogenes*, SMA: *S. marcescens*. Los recuadros blancos indican los plásmidos de igual tamaño en los aislamientos de *K. pneumoniae* pertenecientes al clon A. Los recuadros naranjas señalan los plásmidos en los que se presume se encuentra el gen *bla*_{IMP-8}. Los recuadros celestes indican los aislamientos provenientes del hospital H1, el recuadro rosa el aislamiento proveniente del hospital H2 y el recuadro verde el aislamiento proveniente del hospital H8.

En la figura 31 se muestran los 14 aislamientos provenientes de 8 hospitales de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (H3 al H5, H7 y del H9 al H12), además de otros dos aislamientos de la provincia de Santa Fe (H6). Como se puede observar, los aislamientos presentan más de un plásmido, 5 aislamientos (2 del H12) poseen un plásmido de aproximadamente 70 Kb (Figura 31, Tabla 6). Por otra parte, los *E. cloacae* mostraron de uno a cuatro plásmidos con tamaños aproximados entre 50 y 378 kb, mientras que los tres *C. freundii* presentaron entre dos y tres plásmidos de aproximadamente 120 a 230 kb (Figura 31, Tabla 6). En cuanto a los

dos aislamientos de *E. coli*, se observó un plásmido de aproximadamente 75 kb en la ECO-M15732 y dos plásmidos en la ECO-M17431 de aproximadamente 85 y 104 kb. Asimismo, las dos *K. pneumoniae* provenientes del mismo hospital de Santa Fe (H6), KPN-M19709 y KPN-M21105, presentaron tres plásmidos de igual tamaño (Figura 31, Tabla 6). Por otro lado, los aislamientos de *S. marcescens* y *E. aerogenes* mostraron un solo plásmido de aproximadamente 66 y 318 kb respectivamente, mientras que *R. ornithinolytica* mostró cuatro plásmidos con un rango de tamaño aproximado de 68 a 370 Kb (Figura 31, Tabla 6).

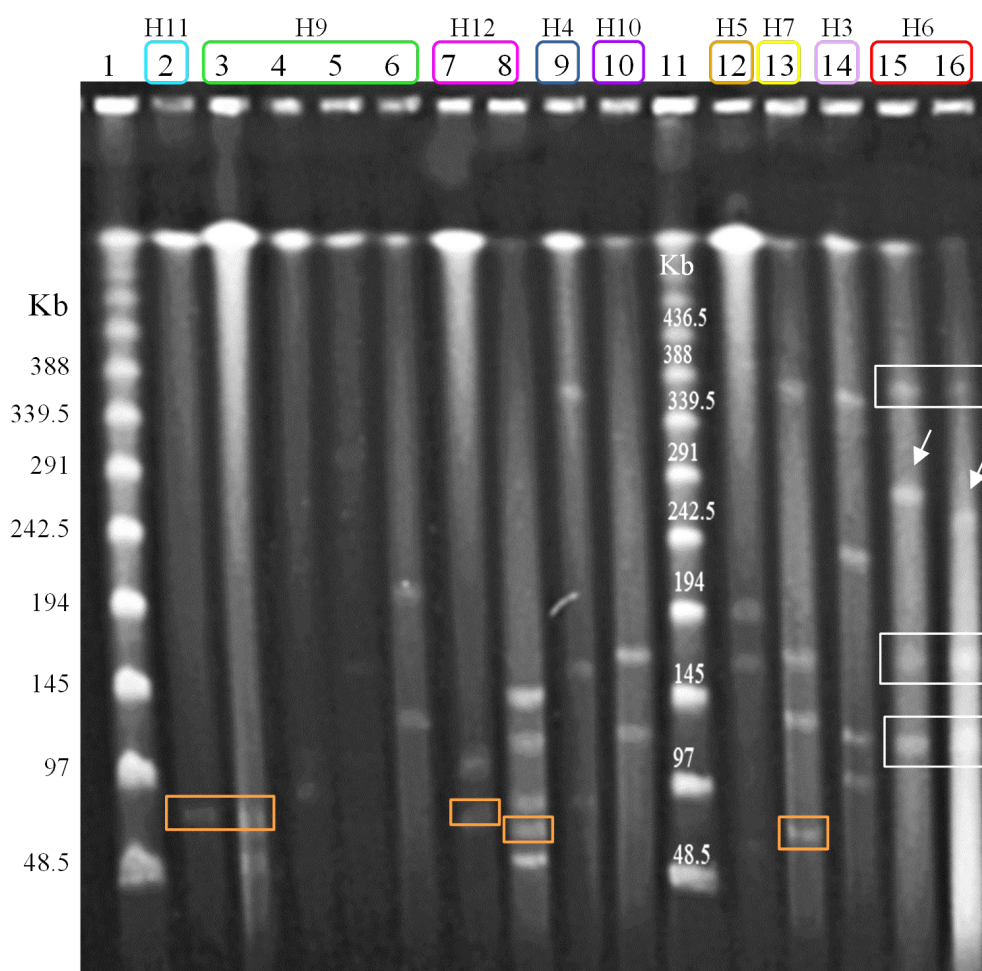


Figura 31. Nucleasa S1-PFGE de los enterobacteriales provenientes de hospitales de CABA y Santa Fe. Calle 1: Ladder λ ; calle 2: ECO-M15732; calle 3: ECL-M17324; calle 4: ECO-M17431; calle 5: ECL-M19846; calle 6: CFR-M19571; calle 7: ECL-M19671; calle 8: KPN-M21064; calle 9: KPN-M19723; calle 10: CFR-M19802; calle 11: Ladder λ ; calle 12: ECL-M21030; calle 13: ROR-M17614; calle 14: KPN-M19368; calle: 15: KPN-M19709; calle 16: KPN-M21105. KPN: *K. pneumoniae*, ECL: *E. cloacae*, CFR: *C. freundii*, ROR: *R. ornithinolytica*. Los recuadros blancos en las dos *K. pneumoniae* pertenecientes al clon C indican los plásmidos de igual tamaño y las flechas blancas los plásmidos de diferente tamaño.

Tabla 6. Características genéticas de los enterobacteriales portadores de *bla*_{IMP-8}.

Nº Aislamiento	Hospital	Fecha de aislación	PFGE	Nº Plásmidos	Tamaño plásmido (Kb)	Integrón
KPN-M15885 ^a	H1	4/9/2013	D	2	66- 236	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
KPN-M17343	H2	27/5/2014	E	2	48 - 108	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
KPN-M19368	H3	23/6/2015	F	4	104 - 123 - 227 - 370	In1330
KPN-M19434	H1	30/6/2015	A	4	<48,5 - 125 - 270 - 358	In1330
KPN-M19708	H1	3/11/2015	A	4	<48,5 - 125 - 270 - 358	In1330
KPN-M19709	H6	11/11/2015	C	4	119 - 166 -276 - 370	In1330
KPN-M19711	H1	30/10/2015	A	4	<48,5 - 125 - 270 - 358	In1330
KPN-M19723	H4	30/10/2015	G	3	85 -157 - 370	In1330
KPN-M19732	H1	7/11/2015	H	2	155 - 217	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
KPN-M19805 ^b	H1	26/11/2015	I	1	236	In1330
KPN-M19810	H1	14/12/2015	A	2	116 - 260	In1330
KPN-M19917	H1	18/12/2015	J	3	97-130 -176	In1330
KPN-M19918	H1	18/12/2015	K	3	116 - 260 - 349	In1330
KPN-M19931	H1	27/1/2016	B	4	85 - 130 - 176 - 349	In1330
KPN-M21002	H1	17/2/2016	B	3	85 - 176 - 349	In1330
KPN-M21064	H12	19/3/2016	L	5	55 -75 - 85 -121 -145	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
KPN-M21105	H6	8/1/2016	C	4	119 - 166 - 255 -370	In1330
ECL-M9921	H1	25/8/2008	A	3	70 - 100 - 340	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} - <i>aadA1</i> -intron grupo II-like
ECL-M13280	H1	10/2/2010	B	3	70 - 100 - 358	In1330
ECL-M13624	H1	13/9/2011	C	4	50 - 66 - 125 - 378	In1330
ECL-M13795	H1	22/12/2011	D	2	125 - 165	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
ECL-M17212	H1	20/2/2014	E	1	66	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
ECL-M17324	H9	19/5/2014	F	2	55 - 75	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
ECL-M19340	H1	23/5/2015	G	3	59 - 85 - 310	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
ECL-M19671	H12	16/10/2015	H	2	75 -104	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
ECL-M19783 ^b	H1	26/11/2015	I	2	332 - 358	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
ECL-M19846	H9	6/1/2016	J	4	68 -104 -157 -300	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
ECL-M21030	H5	6/3/2016	K	2	166 - 194	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
ECL-M21059	H8	16/3/2016	L	2	104 -332	In1330
CFR-M13281	H3	10/2/2010	A	3	120 - 182 - 230	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
CFR-M19571	H9	2/9/2015	B	2	131 -200	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
CFR-M19802	H10	14/12/2015	C	2	120 - 166	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
CFA-M19020	H1	2/2/2015	A	3	60 - 116 -292	In1165
CFA-M19031	H1	9/2/2015	A	3	60 - 116 - 292	In1165
ECO-M15732	H11	17/6/2013	A	1	75	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
ECO-M17431	H9	17/6/2014	B	2	85 - 104	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
KOX-M13063	H1	21/10/2010	nd	4	66 - 75 -180 - 304	In1165
SMA-M15888 ^a	H1	4/9/2013	nd	1	66	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
EAE-M17109	H1	17/12/2013	nd	1	317	5'CS- <i>bla</i> _{IMP-8} -nega
ROR-M17614	H7	13/8/2014	nd	4	68 -130 -166 - 370	In1330

nd: no determinado, KPN: *K. pneumoniae*, ECL: *E. cloacae*, CFR: *C. freundii*, CFA: *C. farmeri*, ECO: *E. coli*, KOX: *K. oxytoca*, SMA: *S. marcescens*, EAE: *E. aerogenes*, ROR: *R. ornithinolytica*. ^a: aislamiento recuperado del paciente A, ^b: aislamiento recuperado del paciente B, 5'CS: extremo 5' conservado, 3'CS: extremo 3' conservado, In1330: 5'CS-*bla*_{IMP-8}-*aadA1*-3'CS, In1165: 5'CS-*bla*_{IMP-8}-*aadA1y-bla*_{OXA-9}-3'CS. Las filas de color gris indican los aislamientos del mismo tipo clonal según la especie. El tamaño de plásmido en negrita indica el plásmido que se transfirió por conjugación.

10.8.2 Diseminación horizontal de los elementos genéticos móviles que portan el gen *bla*_{IMP-8}.

Se evaluó la transferibilidad de los elementos genéticos portadores de *bla*_{IMP-8} en ocho aislamientos seleccionados de acuerdo al tipo de integrón que portaban y se comprobó la transferencia horizontal en siete de ellos. Cuatro *E. cloacae* (ECL-M9921, ECL-M13280, ECL-M13624 y ECL-M13795), una *K. oxytoca* (KOX-M13063), un *C. farmeri* (CFA-M19031) y un *C. freundii* (CFR-M13281). Todos los transconjugantes obtenidos presentaron sinergia positiva entre un disco de meropenem y EDTA, y resultado positivo para el gen *bla*_{IMP-8} por PCR. En el *C. freundii* M13281 se obtuvieron dos transconjugantes de perfiles distintos: uno productor de *bla*_{IMP-8} y *bla*_{PER} mientras el otro resultó solo productor de *bla*_{IMP-8}, indicando que en el primer caso *bla*_{PER} estaba localizado en un plásmido transferible diferente al plásmido que portaba *bla*_{IMP-8}.

Por otro lado, se determinó la composición plasmídica de los transconjugantes obtenidos por nucleasa S1-PFGE. Como se muestra en la figura 32, sólo un plásmido fue transferido por conjugación en los transconjugantes TC-ECL-M9921, TC-ECL-M13280, de aproximadamente 70 Kb y en el TC-ECL-M13795 de aproximadamente 165 Kb (Figura 32, Tabla 6). En cambio, en el TC-ECL-M13624 se transfirieron dos plásmidos (de aproximadamente 66 y 378 Kb) de los cuatro plásmidos que presentaba el aislamiento original (Figura 32, Tabla 6). Es preciso aclarar que todos los geles de nucleasa S1-PFGE fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente hibridados con sonda *bla*_{IMP} pero no se obtuvo resultado positivo, pese a los varios intentos realizados, lamentablemente debido a cuestiones estrictamente técnicas y económicas.

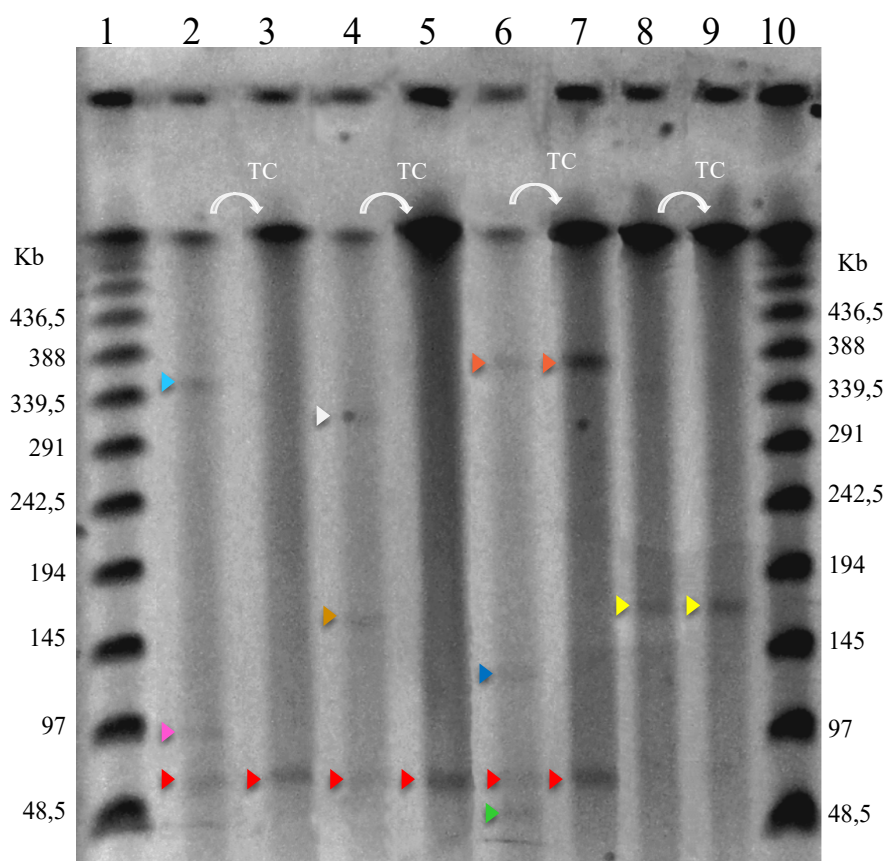


Figura 32. Nucleasa S1-PFGE de los transconjugantes obtenidos por conjugación de los aislamientos portadores de *bla*_{IMP-8}. Calle 1: Ladder λ ; calle 2: ECL-M9921; calle 3: TC-ECL-M9921; calle 4: ECL-M13280; calle 5: TC-ECL-M13280; calle 6: ECL-M13624; calle 7: TC-ECL-M13624; calle 8: ECL-M13795; calle 9: TC-ECL-M13795; calle 10: Ladder λ . ECL: *E. cloacae*, TC-ECL: transconjugante de *E. cloacae*. Los triángulos del mismo color señalan los plásmidos del mismo tamaño.

10.8.3 Caracterización plasmídica por secuenciación masiva.

Se realizó la secuenciación de los plásmidos portadores de *bla*_{IMP-8} presentes en los aislamientos ECL-M9921, ECL-M13280, ECL-M13624, KOX-M13063 y CFA-M19031, los cuales fueron elegidos de acuerdo al tipo de integrón que portaban. Se utilizaron los transconjugantes obtenidos (ver inciso 10.8.2) por lo que a partir de ahora nos referiremos a ellos como TC-ECL-M9921, TC-ECL-M13280, TC-ECL-M13624, TC-KOX-M13063 y TC-CFA-M19031. Los plásmidos presentaron un rango de tamaños aproximados de 72.821 a 121.062 pb y el número de *contigs* obtenidos fue de 3 a 5 *contigs* (Tabla 7). Por otro lado, el contenido de GC de los plásmidos fue entre 52,64 a 53,88% en cuatro de ellos y de 47,55% en el plásmido contenido en la TC-CFA-M19031. El número de marcos de lectura abierto (MLA) fue de 105 a 182 mientras que la cantidad

de genes de resistencia a los antimicrobianos fueron de 4 a 11 según la base de datos CARD (Tabla 7). En cuanto al grupo de incompatibilidad de los plásmidos, se definieron dos tipos, IncM1 e IncM2. Los tres plásmidos de TC-KOX-M13063, TC-ECL-M13280 y TC-ECL-M13624 portaron el replicón M1, mientras que el plásmido presente en TC-ECL-M9921 fue positivo para el grupo de incompatibilidad M2 (IncM2) y el quinto plásmido presente en TC-CFA-M19031 fue no tipable (Tabla 7). El análisis de la región promotora de los integrones de clase 1 determinó la presencia del promotor P_cS (S de strong, promotor fuerte, ver 5.1.1) en los siguientes aislamientos: TC-ECL-M9921, TC-KOX-M13063, TC-CFA-M19031 (Tabla 7) (GenBank U12441). Mientras que en la TC-ECL-M13624 se encontró el promotor P_cH1 (H de hybrid, promotor híbrido, ver 5.1.1) (Tabla 7) (GenBank M95287). En cuanto al aislamiento TC-ECL-M13280 no se pudo determinar el promotor. Para cerrar la brecha o gap generados por la técnica de secuenciación entre el extremo 3'CS del integrón hallado en el aislamiento TC-ECL-M9921 (5'CS-*bla*_{IMP-8}-*aadA1a*-?), diseñamos cebadores y realizamos diversas estrategias de PCRs. Al igual que con todas las técnicas moleculares convencionales probadas (ver 10.6), no obtuvimos amplificación alguna. Por lo tanto, los plásmidos no fueron cerrados por lo que puede haber regiones dentro del plásmido no descritas aquí. Por otro lado, se realizó un análisis *in silico* previo para inferir el orden de los *contigs* obtenidos utilizando como referencia la secuencia previamente descrita GenBank CP029138.1, por ser la que presentó mayor cobertura (89%) y mayor porcentaje de identidad (99,8%) con nuestras secuencias. Para ver la similitud entre los plásmidos secuenciados, se realizó gráfico con el programa *BLAST Ring Image Generator* (BRIG), que es una herramienta que nos permite visualizar de manera comparativa secuencias de ADN en forma de anillos concéntricos alineados contra una referencia [108]. Cada anillo representa una secuencia de ADN o genoma bacteriano coloreado en forma de gradiente de acuerdo al porcentaje de homología del alineamiento contra la referencia y en consecuencia, las regiones presentes en una o más de las secuencias de consulta y ausentes en la referencia, no se mostrarán [108].

En nuestro caso, utilizamos como referencia para realizar el BRIG concatenado del plásmido ECL-M13280 (Figura 33).

Pudimos observar, que los 4 plásmidos presentan una gran similitud entre sí, además se hallaron genes de resistencia que no detectados por PCR y varios genes involucrados en la transferencia horizontal (Figura 33). Por otro lado, se encontraron varias secuencias de inserción, entre ellas, la IS26, confirmando lo que se encontró en el mapeo por PCR cuando se caracterizó el integrón en el aislamiento ECL-M9921.

Por otro lado, el plásmido en TC-CFA-M19031 resultó ser muy distinto a lo descrito previamente y a su vez a los otros 4 plásmidos secuenciados. Aun así, en la figura 34, podemos observar la presencia de genes de transferencia, algunos genes involucrados en la replicación, el integrón que ya describimos y varias secuencias de inserción diferentes a las halladas en los plásmidos descritos anteriormente.

Tabla 7. Características genéticas de los plásmidos portadores de *bla*_{IMP-8}.

Aislamiento	Nº Contigs	Σ contigs (pb)	Cobertura GC (%)	MLA	Replicon (Inc)	Promotor Pc de <i>bla</i> _{IMP-8}	Genes de Resistencia	Genes de resistencia ATB	
TC-ECL-M9921	5	74693	5489,94	52,64	113	IncM2	PcS	5	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aadA1a</i> , <i>bla</i> _{IMP-8} , <i>mphA</i> , <i>dfrA8</i>
TC-KOX-M13063	3	72821	680,27	53,21	106	IncM1	PcS	3	<i>aadA1y</i> , <i>bla</i> _{IMP-8} , <i>mphA</i>
TC-ECL-M13280	3	72776	453,23	53,21	105	IncM1	ND	3	<i>aadA1y</i> , <i>bla</i> _{IMP-8} , <i>mphA</i>
TC-ECL-M13624	2	73036	601,25	53,88	106	IncM1	PcH1	3	<i>aadA1y</i> , <i>bla</i> _{IMP-8} , <i>mphA</i>
TC-CFA-M19031	12	121062	392,61	47,55	182	NT	PcS	10	<i>bla</i> _{IMP-8} , <i>sull</i> , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>mphA</i> , <i>catB3</i> , <i>aadA1y</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>arr-3</i> , <i>bla</i> _{OXA-9} , <i>aac(3)-IIa</i>

Σ : sumatoria, MLA: marco de lectura abiertos, ATB: antimicrobiano, Inc: Incompatibilidad, NT: no tipable, ND: no determinado, TC-ECL: transconjugante de *E. cloacae*, ECL: *E. cloacae*, KOX: *K. oxytoca*, CFA: *C. farmeri*. [74]

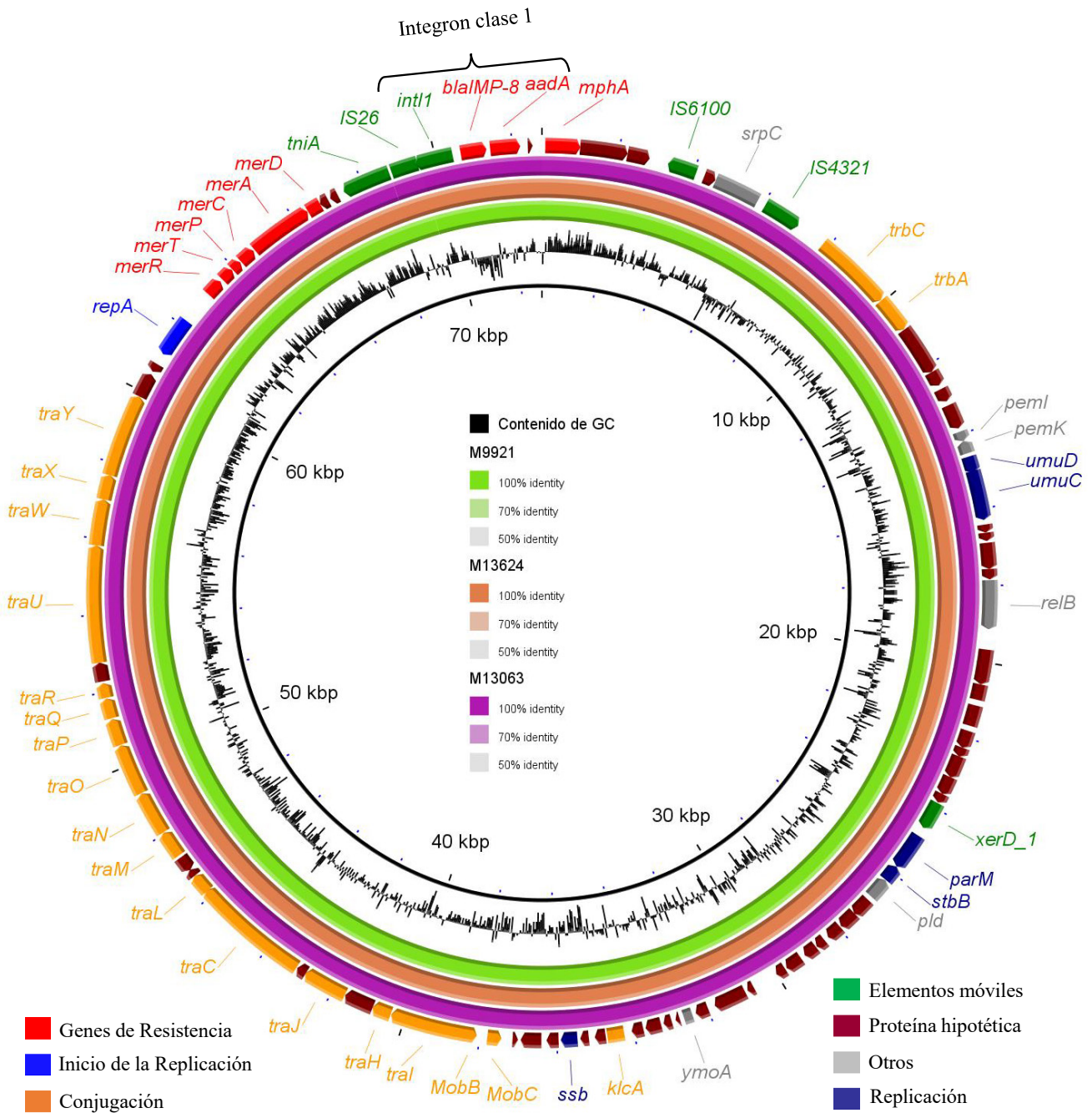


Figura 33: Análisis comparativo de cuatro plásmidos portadores de bla_{IMP-8}. De adentro hacia fuera, el primer anillo negro corresponde al plásmido TC-ECL-M13280 utilizado como referencia para el alineamiento. El segundo anillo (negro) corresponde al porcentaje de GC del plásmido TC-ECL-M13280. Los anillos cuatro, cinco y seis corresponden a los plásmidos de TC-ECL-M9921 (verde claro), TC-ECL-M13624 (naranja) y TC-KOX-M13063 (rosa), respectivamente. El porcentaje de identidad entre los plásmidos se grafica con un código de colores en degradé en el centro de la figura. En el anillo más externo se indican los genes y/o regiones de mayor importancia, con un código de colores asociado a su función que se encuentra en el marco inferior izquierdo y derecho. La imagen se realizó con *Blast Ring Image Generator* (<http://sourceforge.net/projects/brig>).

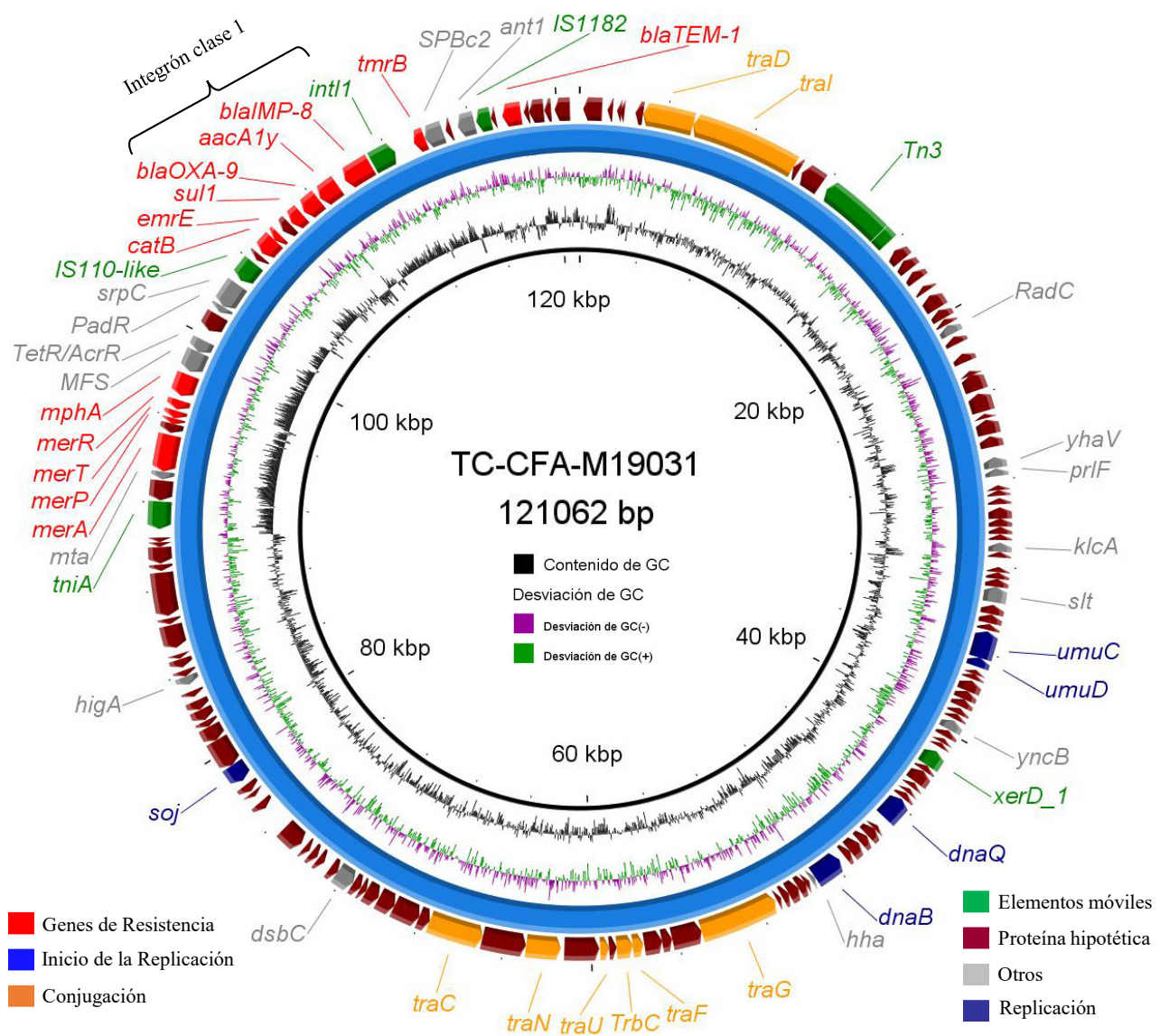


Figura 34. Representación gráfica del draft del plásmido TC-CFA-M19031. De adentro hacia fuera. El anillo negro y el tercer anillo verde y púrpura, corresponden al porcentaje y a la desviación de GC del plásmido TC-CFA-M19031. El anillo azul corresponde al plásmido TC-CFA-M19031. En el anillo más externo se indican los genes y/o regiones de mayor importancia, con un código de colores asociado a su función que se encuentra en el marco inferior izquierdo y derecho. La imagen se realizó con *Blast Ring Image Generator* (<http://sourceforge.net/projects/brige>).

10.9 Secuenciación masiva de genoma

Se realizó la secuenciación masiva de ADN genómico del *E. cloacae* M9921 y *K. pneumoniae* M19434, las dos especies mayoritarias en este estudio. Del ensamblado de los dos genomas se obtuvieron valores indicadores no muy buenos, tal vez debido a la calidad de la secuencia, aunque el análisis de calidad de las lecturas fue aceptable (fastQC). El ensamblado resultó en un gran número de contigs 666 y 316 en *E. cloacae* ECL-M9921 y *K. pneumoniae* KPN-M19434,

respectivamente; y bajos valores de N50 de 13911 pb y 51946 pb (Tabla 8). A pesar de esto, se confirmó la presencia de *bla*_{IMP-8} en el ensamblado preliminar o *draft* del genoma de los dos aislamientos y se determinó el secuencia tipo (el eBurst del *E. cloacae* se muestra en la sección siguiente 11.7 y en la Figura 39), el número de marcos de lectura abiertos y los genes de resistencia (Tabla 8). A grandes rasgos, entre los genes de resistencia se hallaron bombas de eflujo, transportadores de membrana, algunas secuencias reguladoras y las β-lactamasas descritas aquí (*bla*_{IMP-8}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{PER-2}) (Tabla B5, 1 y 2 anexo B). Asimismo, se determinó la presencia de secuencias codificantes para enzimas modificadores de aminoazúcaros, *aadA1* y *aac(6′)-Ib3*, presentes en los dos aislamientos. Los genes de resistencia a fluoroquinolonas que se hallaron fueron *qnrB10* y *aac(6′)-Ib-cr*, en los dos aislamientos mientras que, *oqxB* y *oqxA*, fueron hallados solo en KPN-M19434 ya que son genes propios de especie. En la figura 35 se resumen los genes de resistencia hallados en cada aislamiento.

Tabla 8. Caracterización genómica de *E. cloacae* M9921 y *K. pneumoniae* M19434 por secuenciación masiva de ADN.

Aislamiento	ECL-M9921	KPN-M19434
<i>N° Contigs</i>	666	316
<i>Tamaño ADN (pb)</i>	5280768	5893880
<i>GC (%)</i>	54,31	56,68
<i>Contigs N50 (bp)</i>	13911	51946
<i>MLST</i>	ST 32	ST 12
<i>MLA</i>	5722	6072
<i>Genes de Resistencia ATB^a</i>	59	67
<i>Genes de virulencia^b</i>	24	20
<i>N° plásmidos</i>	4	2
<i>Contenido Rep</i>	IncFIB(K), IncHI2, IncHI2a, IncL/M	IncFIA, IncFII

MLA: marco de lectura abierto, ATB: antimicrobiano, Rep: replicón, ECL: *E. cloacae*, KPN: *K. pneumoniae*, ^a CARD: *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*, ^b VFDB: *Virulence Factors Database*.

Por otro lado, se analizó el contenido plasmídico en ambos genomas y se encontraron cuatro replicones en ECL-M9921 (IncFIBk, IncHI2, IncHI2a e IncL/M), mientras que KPN-M19434 se encontraron dos replicones (IncFIA e IncFII). En los estudios de caracterización plasmídica convencionales mostrados en la sección 10.8, determinamos por nucleasa S1-PFGE que ECL-M9921 portaba tres plásmidos en lugar de 4. Esto puede deberse a que la técnica que nosotros realizamos detecta megaplásmidos que poseen tamaños superiores a las 45 kb por lo tanto es posible que alguno de éstos plásmidos sea más pequeño. De cualquier forma, los datos obtenidos confirmaron la localización del gen *bla*_{IMP-8} en un plásmido de 74693 pb, cuyo replicón fue IncM1 (Figura 32, inciso 10.8.2, Tabla 7, inciso 10.8.3). En cambio, en el aislamiento KPN-M19434, a pesar de realizar el ensamblado por diversas herramientas bioinformáticas (Velvet y Spades), no pudimos determinar en cuál de los tres plásmidos se localiza *bla*_{IMP-8}, ya que todos los casos obtuvimos contigs muy pequeños.

Los genes de virulencia hallados fueron 24 y 20 en *K. pneumoniae* KPN-M19434 y *E. cloacae* ECL-M9921, respectivamente (Tabla 8). Entre los factores de virulencia de *K. pneumoniae* KPN-M19434, se determinaron cinco genes que codifican proteínas para la biosíntesis fimbrial (*fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimE*, *fimH*), cuatro genes que codifican proteínas de tipo adhesina/invasina (*yagY/ecpB*, *yagX/ecpC*, *yagW/ecpD*, *yagZ/ecpA*) y siete genes que codifican proteínas involucradas en la captación de hierro (*entB*, *entA*, *entE*, *fepD*, *fepB*, *fepC*, *fepG*). Por otro lado, en *E. cloacae* ECL-M9921, se hallaron tres genes que codifican proteínas para la biosíntesis fimbrial (*csgG*, *csgE*, *csgD*), cinco genes involucrados en la biosíntesis flagelar (*fliP*, *flgG*, *flgH*, *fliM*, *fliG*), un gen que codifica una endotoxina implicada en la modificación antígeno O (*gtrB*), cinco genes que codifican proteínas involucradas en la captación de hierro (*entA*, *fepB*, *fepC*, *fepG*, *fepD*) y un gen codificante del sistema de secreción tipo VI (*hsiB1/vipA*).

	ECL-M9921	KPN-M19434	
<i>aac(6')-Ib3</i>	■	■	AG
<i>aadA1</i>	■	■	
<i>bla_{IMP-8}</i>	■	■	β-lactamasas
<i>bla_{OXA}</i>	■	■	
<i>bla_{TEM-1}</i>	■	■	
<i>bla_{SHV-12}</i>	■	■	
<i>bla_{PER-2}</i>	■	■	
<i>oqxB</i>	■	■	FQ
<i>oqxA</i>	■	■	
<i>qnrB10</i>	■	■	
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	■	■	
<i>ere(A)</i>	■	■	MLS
<i>mph(A)</i>	■	■	
<i>catB3</i>	■	■	Fenicoles
<i>catA1</i>	■	■	
<i>ARR-3</i>	■	■	Rifampicina
<i>sul1</i>	■	■	Sulfonamidas
<i>dfrA8</i>	■	■	Trimetoprima
<i>fosA</i>	■	■	Fosfomicina

Figura 35. Genes de resistencia a los antimicrobianos hallados en *E. cloacae* M9921 y *K. pneumoniae* M19434. AG: aminoglucósidos, FQ: fluoroquinolonas, MLS: macrólidos, lincosamida y estreptogramina B. Los cuadros azules (■) indican presencia del gen con un 100% de homología y el cuadro celeste (■) indica la presencia del gen con un 96% de homología con GenBank M85195. Los cuadros verdes (■) indican ausencia del gen.

10.10 Resumen de resultados capítulo I

- En este estudio detectamos *bla*_{IMP-8} en diferentes especies de enterobacteriales, siendo *K. pneumoniae* y *E. cloacae* las más frecuentes. A su vez, estos aislamientos fueron principalmente recuperados de pacientes con bacteriemias (57%, 23/40) y provenían casi todos del Área Metropolitana de Buenos Aires (Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Conurbano de la provincia de Buenos Aires), especialmente de un único hospital.
- Detectamos la producción de BLEE en el 25% (10/40) de los aislamientos portadores de *bla*_{IMP-8} de los cuales, *bla*_{PER-2} fue la más frecuente (7/40). Asimismo, el 75% (30/40) de los aislamientos contenían PMQR debido a un mecanismo combinado de *qnr* más *aac-(6')-Ib-cr*.
- Observamos gran diversidad clonal entre los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. Sin embargo, cuatro aislamientos de *K. pneumoniae* (clon A) formaron parte de un brote en el hospital H1 durante el segundo semestre del año 2015.
- *bla*_{IMP-8} se halló como primer cassette en integrones de clase 1, dos nuevos (In1165, In1330) y otras estructuras que no pudieron ser caracterizadas completamente.
- Los resultados obtenidos sugieren que, al menos en los 7 aislamientos testeados, los plásmidos portadores de *bla*_{IMP-8} pueden transferirse horizontalmente.
- Cuatro de los plásmidos secuenciados presentaron gran similitud entre ellos mismos y con plásmidos previamente descritos.
- Se observó correlación entre los resultados previos y la secuenciación de los genomas de ECL-M9921 y KPN-M19434. Además, la secuenciación masiva aportó conocimiento respecto de genes de virulencia y múltiples genes de resistencia adicionales no hallados por PCR.

CAPÍTULO II:

Caracterización de aislamientos clínicos de
Enterobacter cloacae portadores de *bla*_{VIM-2}
y *bla*_{VIM-11}.

11 Resultados capítulo II

11.1 Aislamientos clínicos y datos epidemiológicos.

En el presente capítulo, se estudiaron seis aislamientos de *E. cloacae* los cuales fueron derivados al LNRRA entre 2008 y 2016 por sospecha de producción de carbapenemasa. Los aislamientos se recuperaron de seis pacientes: cinco adultos con un rango de edad de 59-84 años y un recién nacido. Tres de los pacientes estaban cursando una enfermedad o condición subyacente grave, tres de ellos tuvieron estadía prolongada en el hospital (>10 días) y múltiples tratamientos con antibióticos (Tabla 9). Los aislamientos se detectaron en cinco provincias: tres del norte de Argentina (Chaco, Salta y Jujuy), dos de la ciudad de Buenos Aires (CABA) y una del sur (Neuquén) (Tabla 9).

Tabla 9. Datos epidemiológicos de los aislamientos.

N° Aislamiento	Años (genero)	Hospital	Provincia	Fecha de aislación	Sitio de aislación	Enfermedad de base	Duración de la estadía en días	Tratamiento con ATB ^a (días de tratamiento por MBL)	Diagnóstico	Desenlace
ECL-M13532	61 (f)	H13	Chaco	3/6/2011	Absceso de pie	Diabetes tipo I	10	CIP (15d*), CLI ^b	Infección pie de diabetico	ND
ECL-M13768	84 (f)	H14	CABA	1/11/2011	Drenaje abdominal	Cáncer de colon	ND	CRO, MET, PTZ, VAN ^b , COL+IMI (3d*), COL+AMS (14d*)	Peritonitis purulenta	Mejora
ECL-M13832	80 (f)	H15	CABA	1/1/2012	Colonización rectal	Obesidad, hipertensión	62	AMS, CLA ^b , LEV, PTZ, VAN ^b	ND	Alta por mejora
ECL-M15008	62 (m)	H16	Salta	05/05/2012	Orina	la vejiga, colecistitis	>50	COL (10d*)	Infección Intraabdominal	Pronostico reservado
ECL-M15428	17 d*(f)	H17	Jujuy	1/1/2013	Sangre	Bebé prematuro con malformación renal y bacteriemia	375	AMP, GEN, PTZ (7d*)	Bacteremia	Deceso
ECL-M15736	59 (f)	H18	Neuquén	6/6/2013	Orina	ataque hemorragico	140	IM+COL; TMS, VAN; PZT; TMS+PZT; VAN+IMI; PZT-COL-FLUCO-AKN (12d*)	Infección del tracto urinario	Deceso

f: femenino, m: masculino, H: hospital, d*: días, CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires, CIP: ciprofloxacina, CLI: clindamicina, CRO: ceftriaxona, MET: metronidazol, PTZ: piperacilina/tazobactam, VAN: vancomicina, COL: colistín, IMI: imipenem, AMS: ampicilina/sulbactam, AMP: ampicilina, GEN: gentamicina, LEV: levofloxacina, CLA: claritromicina, FLUCO: fluconazol, ND: no determinado. ATB: antimicrobiano. ^aATB

tratamiento durante la estadía hospitalaria; ^b Antimicrobianos utilizados para tratar bacterias Gram positivas. MBL: metalo- β -lactamasa.

11.2 Detección fenotípica de la producción de carbapenemasa.

Los seis aislamientos de *E. cloacae* dieron sinergia positiva entre un disco EDTA y los discos de ertapenem e imipenem. De la misma forma, en el ensayo de Triton Hodge Test se obtuvo un resultado confirmatorio para carbapenemasa ya que se observó el crecimiento (o invaginación) de la cepa indicadora hacia el disco de meropenem en la intersección de la estría con la zona de inhibición (ver Figura 22). La producción de carbapenemasa en los seis aislamientos fue confirmada mediante los ensayos colorimétricos BlueCarba y CarbaNP (Ver Figura 22).

11.3 Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos

La CIM a los carbapenemes y agentes antimicrobianos relevantes se resumen en la Tabla 10. Cinco de los aislamientos fueron no sensibles (I+R) a imipenem, mientras que todos fueron sensibles a meropenem. Asimismo, se observó resistencia a piperacilina/tazobactam, ceftazidima y ciprofloxacina en los seis *E. cloacae*. La mayoría de los aislamientos fueron sensibles a cefepime y cuatro aislamientos fueron resistentes al aztreonam. Por otro lado, se observó una sensibilidad variable a los antimicrobianos: trimetoprima/sulfametoxazol y aminoglucósidos.

Tabla 10. Sensibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de *E. cloacae* portadores de *bla*_{VIM} por dilución en agar.

Antibiótico	ECL-M13532		ECL-M13768		ECL-M13832		TC-ECL-M13832		ECL-M15008		ECL-M15428		ECL-M15736		Az ^R <i>E. coli</i> J53	
	CIM (µg/ml)	Int.	CIM (µg/ml)	Int.	CIM (µg/ml)	Int.	CIM (µg/ml)	Int.	CIM (µg/ml)	Int.	CIM (µg/ml)	Int.	CIM (µg/ml)	Int.	CIM (µg/ml)	Int.
<i>Piperacilina/Tazobactam</i>	≥128	R	≥128	R	32	I	16	S	≥128	R	≥128	R	≥128	R	ND	-
<i>Cefepime</i>	≤1	S*	8	S*	≤1	S*	≤1	S*	16	I*	≤1	S*	2	S*	0,015	S
<i>Ceftazidima</i>	16	R	≥64	R	16	R	≤1	I*	≥64	R	≥64	R	≥64	R	0,06	S
<i>Imipenem</i>	8	R	≤1	S	2	I	≤1	S	4	R	2	I	2	I	0,06	S
<i>Meropenem</i>	1	S*	1	S*	≤0,25	S	≤0,25	S	1	S*	0,5	S	1	S*	0,015	S
<i>Gentamicina</i>	4	S	≤1	S	2	S	≤1	S	≥16	R	≥16	R	≥16	R	1	S
<i>Amicacina</i>	≥64	R	≤2	S	≤2	S	≤2	S	≥64	R	16	S	≤2	S	1	S
<i>Ciprofloxacina</i>	≥4	R	≥4	R	≥4	R	≤0,25	S	≥4	R	≤0,25	S	≥4	R	0,015	S
<i>Trimetoprima/Sulfametoxazol</i>	≤1	S	≤1	S	≥16	R	≤1	S	≥16	R	≥16	R	≥16	R	ND	-
<i>Aztreonam</i> [§]	0,12	S	128	R	4	S	≤0,25	S	128	R	64	R	64	R	≤0,03	S

ECL: *E. cloacae*, TC-ECL-M13832: transconjugante de ECL-M13832, Int.: interpretación, CIM: concentración inhibitoria mínima, R: resistente, I: intermedio, S: sensible, ND: no determinado. * Categorizado como I por el *Advanced Expert System* de VITEK 2; § La CIM de aztreonam se determinó mediante el método de dilución en agar.

11.4 Pruebas fenotípicas de mecanismos de resistencia adicionales

11.4.1 β-lactamasa de espectro extendido (BLEE)

Cuatro aislamientos fueron resistentes al aztreonam y solo el aislamiento ECL-M15428 dio sinergia positiva entre el disco de aztreonam y el disco de amoxicilina/ácido clavulánico, sugiriendo la presencia de una BLEE (Ver Figura 24). Los tres aislamientos restantes mostraron una sinergia negativa entre las cefalosporinas de tercera generación y el ácido clavulánico, probablemente este perfil sea debido a la cefalosporinasa cromosómica de la especie *Enterobacter*.

11.4.2 Mecanismo de resistencia a quinolonas

Al total de los aislamientos se les evaluó la presencia de mecanismos de resistencia a quinolonas por el método de difusión en agar.

≈ **Mecanismo de resistencia a quinolonas asociada a plásmidos (PMQR):**

De los seis aislamientos estudiados, solo el ECL-M15428 presentó un halo de inhibición de ciprofloxacina menor a 30 mm y un halo de inhibición de ácido nalidíxico mayor a 6 mm (Tabla 11), por lo que se sospechó la presencia de *qnr*. Mientras que dos de aislamientos, ECL-M13532 y ECL-M15428, presentaron una diferencia mayor o igual a cinco entre los halos de inhibición de levofloxacina y ciprofloxacina (Tabla 11) sugiriendo la producción de una *aac(6')-Ib-cr*.

≈ **Mutaciones en la región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR):**

Cinco aislamientos fueron sospechosos de tener mutaciones en la región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR) por presentar halos de inhibición de ácido nalidíxico igual a seis milímetros (Tabla 11).

Tabla 11. Perfil de difusión en agar de los aislamientos sospechosos de presentar PMQR y QRDR.

N° Aislamiento	Sospecha de PMQR		Sospecha de QRDR
	<i>qnr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	
<i>ECL-M13532</i>	-	+	+
<i>ECL-M13768</i>	-	-	+
<i>ECL-M13832</i>	-	-	+
<i>ECL-M15008</i>	-	-	+
<i>ECL-M15428</i>	+	+	-
<i>ECL-M15736</i>	-	-	+

ECL: *E. cloacae*, PMQR: mecanismos de resistencia a quinolonas asociado a plásmidos, QRDR: mutaciones en la región determinante de la resistencia a las quinolonas. Las filas color gris indican los aislamientos sospechosos de contener modificaciones en el QRDR.

11.5 Resultados confirmatorios de mecanismos de resistencia mediante PCR

11.5.1 Determinación de mecanismos de resistencia a los carbapenemes

Todos los aislamientos fueron PCR positivos para genes de tipo *bla_{VIM}* y el análisis de la secuencias determinaron que cinco de los aislamientos portaban *bla_{VIM-2}* y uno *bla_{VIM-11}*.

La figura 36 se muestra la comparación de secuencias de aminoácidos de las tres variantes de VIM descritas en nuestro país y se puede observar la gran similitud entre ellas. VIM-16 presenta una leucina (L) en la posición 55 mientras que VIM-2 y VIM-11 tienen una serina (S) (Figura 36). La otra diferencia se observa en la posición 148, en la cual VIM-11 tiene una serina (S) mientras que VIM-2 y VIM-16 tienen una asparagina (N) (Figura 36).

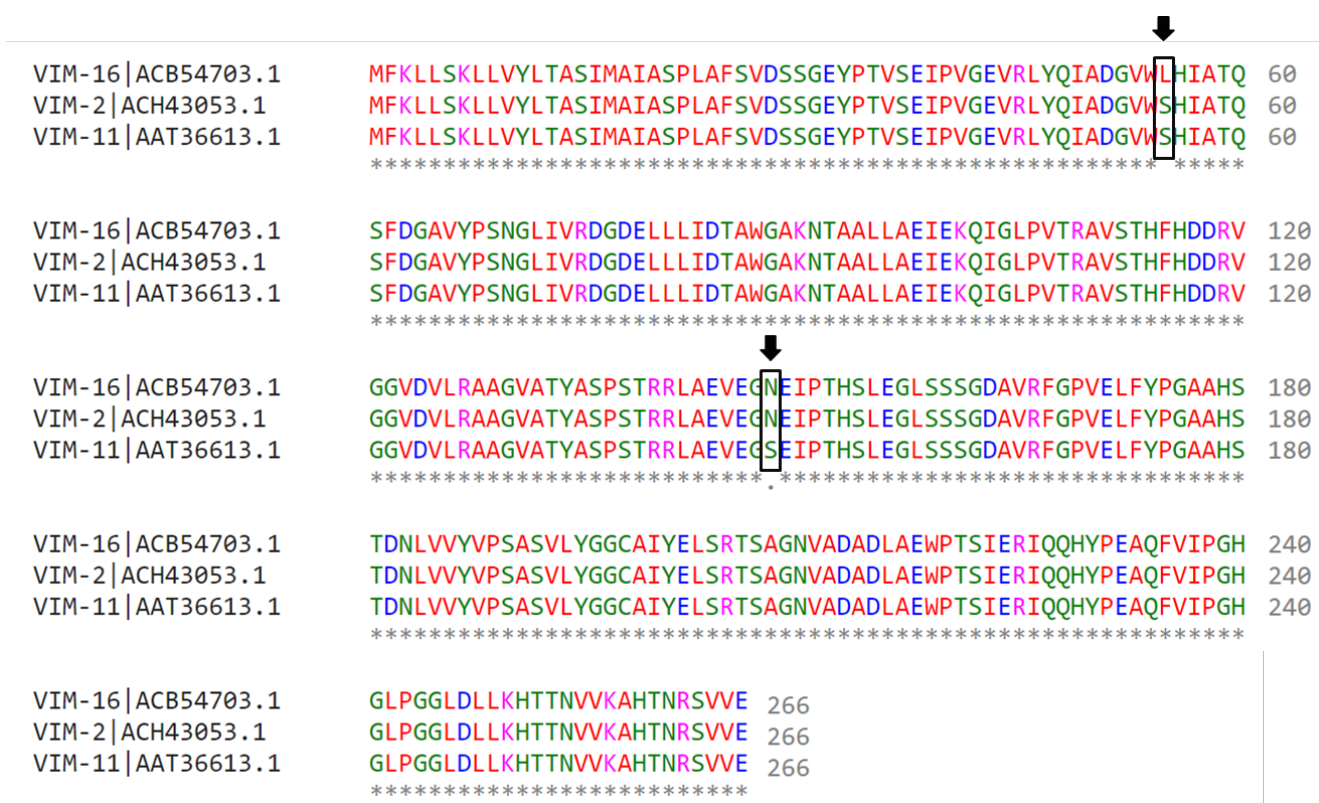


Figura 36. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de VIM-2, VIM-11 y VIM-16. Los colores de los residuos de aminoácidos indican sus propiedades fisicoquímicas. El color rojo indica residuos pequeños e hidrofóbicos, incluido el residuo aromático Tirosina = Y. El color azul indica los residuos ácidos y el magenta los básicos. Los residuos de color verde son los aminoácidos que integran los grupos: Hidroxilo, sulfhidrido, amina y la glicina (G). El asterisco (*) señala los residuos de aminoácidos conservados. El punto (.) debajo del residuo aminoacídico indica conservación entre grupos de propiedades débilmente similares aproximadamente equivalente a un scoring de ≤ 0.5 y > 0 en la matriz de Gonnet PAM 250 (PAM 250: distancia evolutiva en la que las proteínas comparten cerca del 20% de identidad. Es decir en la que el 80% de los aminoácidos se han cambiado). Las flechas y recuadros negros señalan las diferencias aminoacídicas entre las tres variantes.

11.5.2 Determinación de los mecanismos de resistencia adicionales

Cinco aislamientos, tres de ellos resistentes a aztreonam, no presentaron amplificación por PCR para la detección de genes de las β -lactamasas *bla*_{PER}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}. Solo el aislamiento ECL-M15428 fue positivo para *bla*_{PER-2}, así como para *qnrB* y *aac(6')Ib-cr*.

Por otro lado, se confirmó la presencia de mutaciones en el codón 83 del gen *gyrA* en los cinco aislamientos sospechosos de contener modificaciones en el QRDR. La mutación que presentaron estos aislamientos fue de Ser83Tyr.

11.6 Caracterización molecular de los elementos genéticos móviles que portan *bla*_{VIM}

El mapeo por PCR y el análisis de secuenciación mostraron que todos los aislamientos contenían *bla*_{VIM} como primer cassette de integrones de clase 1 (Figura 37). Se caracterizaron cinco integrones diferentes entre los seis aislamientos.

El aislamiento ECL-M13532 portaba *bla*_{VIM-2} en un integrón In883 que posee cinco cassettes, dos nuevos, *aacA38* y *gcuDD3* detectados en éste trabajo. El gen *aacA38* nunca se ha detectado en un cassette génico funcional porque el que se informó previamente (GenBank EF382672) tiene un sitio *attC* truncado (Figura 37 A). El aislamiento ECL-M13768 contenía *bla*_{VIM-11} en un In346 que posee como segundo cassette una *aacA35* (Figura 37 D). El aislamiento ECL-M13832 contenía el integrón In885 (Figura 37 B) el cual tiene tres cassettes, uno novedoso, *aadA5h*, que es un alelo de *aadA5* (GenBank AF170088). Mientras que como tercer cassette portaba una *aacA4'* (GenBank L25666) que tiene una variación de Leu102Ser en comparación con el gen de referencia *aacA4* (GenBank AF034958). Este cambio aminoacídico define los genes *aacA4'* y es el responsable de un cambio de los fenotipos AAC(6')-I a AAC(6')-II. Los aislamientos ECL-M15008 y ECL-M15428, contenían el

integrón In900, en el cual *bla_{VIM-2}* es seguido de *aadA7e* (Genbank DQ899757) (Figura 37 C). Finalmente, el aislamiento ECL-M15736 contenía el gen *bla_{VIM-2}* seguido del gen truncado *aacA53Δ* (Figura 37 E). Este gen presentó 95% de identidad con *aacA44* (GenBank JQ407409.1). Para poder determinar la estructura de éste integrón se implementaron diversas estrategias de mapeo por PCR con el fin de caracterizar el extremo 3'-CS, sin embargo esto no fue posible lo que sugiere la presencia de alteraciones en la secuencia 3' de este integrón del tipo de repeticiones invertidas.

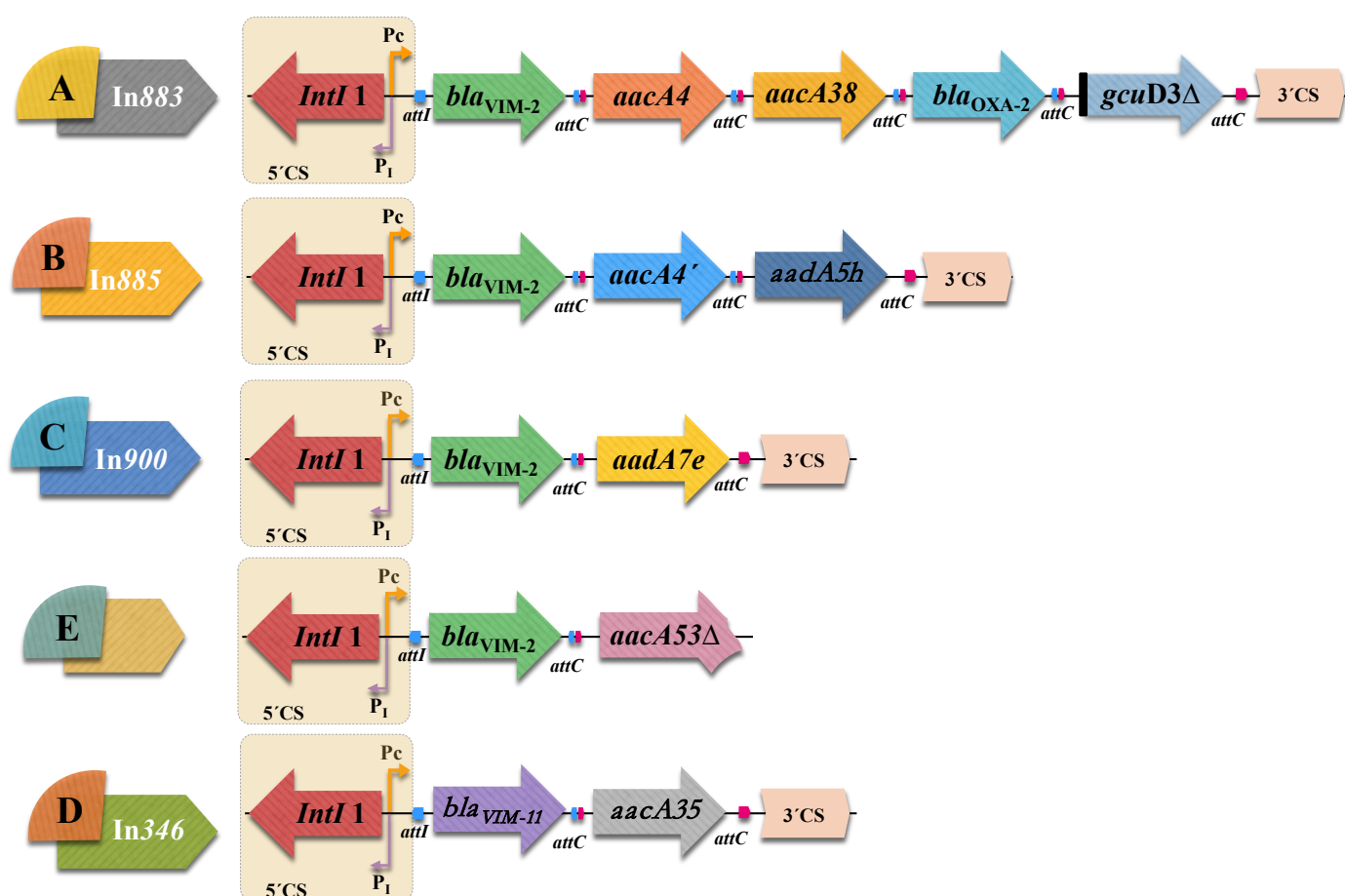


Figura 37. Estructuras de los arreglos de integrones de clase 1 hallados en los *E. cloacae*. *IntI1*: gen de la integrasa; 5'-CS: extremo 5' conservado; P_c : promotor asociado al integrón; P_i : promotor de la integrasa; *attI*: sitio de recombinación adyacente reconocido por la integrasa *IntI1*; *attC*: sitio de recombinación específica; 3'-CS: extremo 3' conservado.

11.7 Determinación de la relación genética entre los aislamientos de *E. cloacae* productores de *bla*_{VIM}

11.7.1 Evaluación de la relación genética de los aislamientos de *E. cloacae* mediante PFGE.

El estudio de la relación genética entre los *E. cloacae* demostró diversidad clonal entre los aislamientos. Como se puede observar en la Figura 38, los seis aislamientos presentaron patrones de banda distintos.

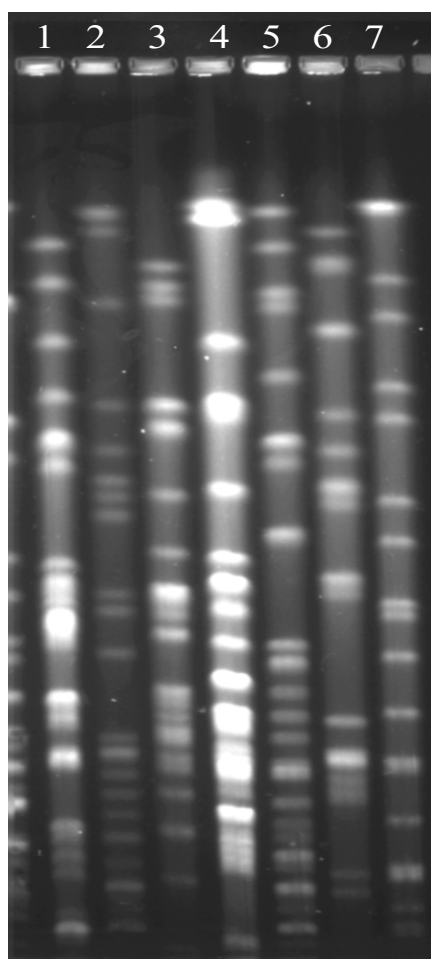


Figura 38. Perfil de restricción de XbaI determinado por electroforesis en gel en campo pulsado de *E. cloacae* portadores de *bla*_{VIM}. Calle 1: ECL-M13532, calle 2: ECL-M13768, calle 3: ECL-M13832, calle 4: ECL-M15008, calle 5: ECL-M15428, calle 6: ECL-M15736, calle 7: Ladder: *S. Braenderup*.

11.7.2 Caracterización molecular de los aislamientos por MLST

Se determinó los secuencia tipos (ST), según el esquema de MLST para *E. cloacae*, de los seis aislamientos. En base al análisis de eBURST se hallaron dos STs a los cuales no se les asignó ningún grupo: el ST88 en ECL-M13768, el cual fue previamente reportado en China [109], y el ST749 en ECL-M15428, cuyo secuencia tipo no fue reportado previamente. Los ST90 y ST91, en ECL-M13832 y ECL-M15736 respectivamente, son variantes en un solo locus entre ellos y forman parte de un grupo de 6 miembros centrado en el ST90 (Figura 39). El aislamiento ECL-M13532 presentó el ST182 que pertenece a un grupo de 5 miembros centrado en sí mismo. Por último, el ECL-M15008 presentó el ST184, el cual tiene cuatro SVL y en el ST fundador de un subgrupo.

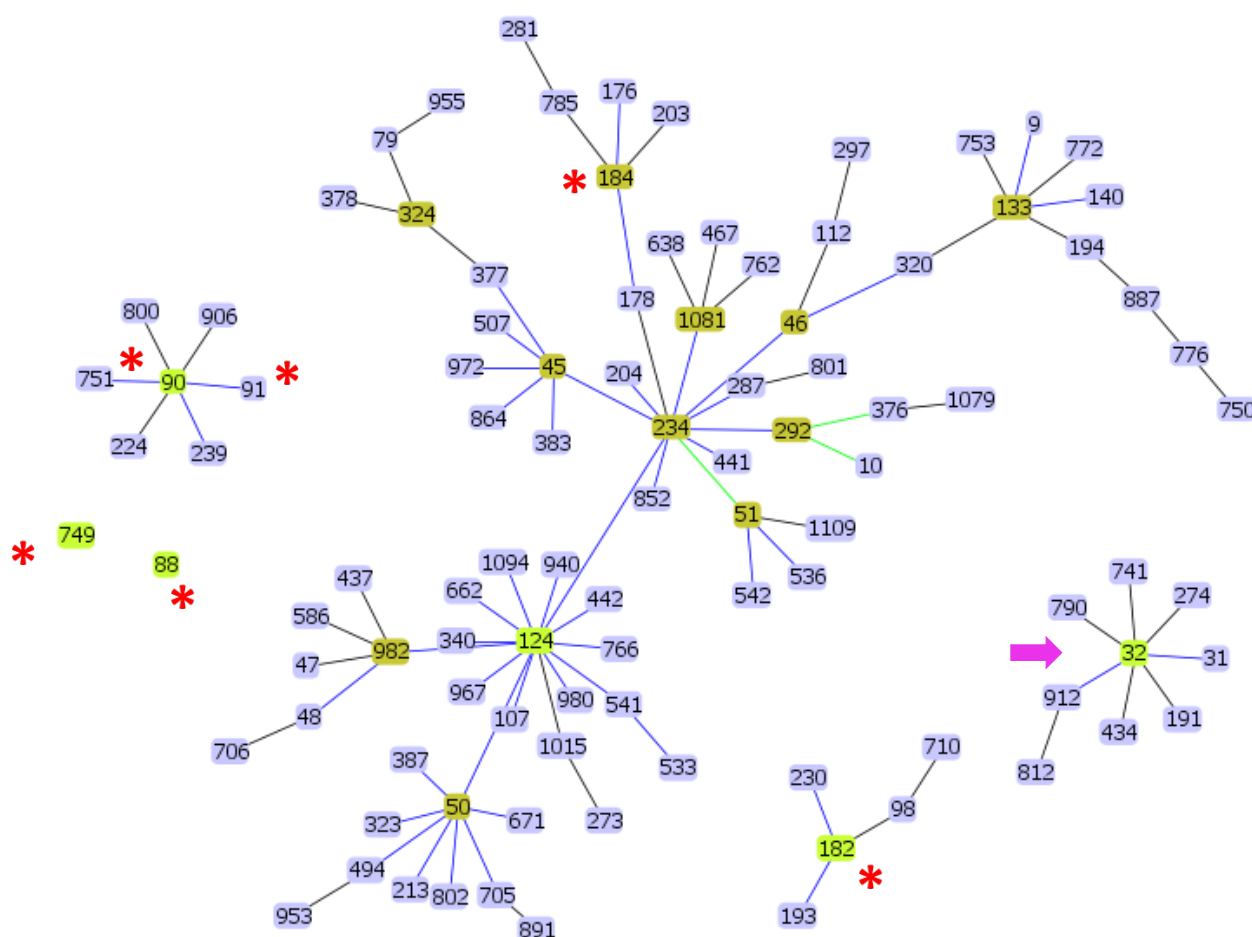


Figura 39. Estructura de la población de los seis aislamientos de *E. cloacae* productores de VIM, que se muestra en el contexto de los ST presentes en la base de datos de MLST (<http://pubmlst.org/ecloacae/>, desde el 21 de noviembre de 2018). El esquema se construyó usando el análisis eBURST como una vista cercana de todos los ST presentes en la base de datos que son parte del complejo clonal (CC) o variante de locus único

(SLV) de los ST encontrados en este estudio (marcados con asterisco) . SLV están vinculados por líneas continuas. El ST fundador del grupo se muestra en verde claro, los fundadores del subgrupo están representados en verde más oscuro y los nodos comunes en lila. Los asteriscos de color rojo señalan los ST correspondientes a los *E. cloacae* productores de *bla_{VIM}* hallados en éste estudio. La flecha fucsia señala el aislamiento de *E. cloacae* productor de *bla_{IMP-8}* mostrado en 10.9 del capítulo I.

11.8 Caracterización molecular de plásmidos

11.8.1 Diseminación horizontal de los elementos genéticos móviles que portan el gen *bla_{VIM}*.

La capacidad de transferencia horizontal del elemento genético portador de *bla_{VIM}* se confirmó solo en el aislamiento ECL-M13832, en el resto de los aislamientos no se obtuvieron transconjugantes para el gen *bla_{VIM}*. Estos resultados sugieren que los plásmidos presentes en esos aislamientos pueden no ser conjugativos o móviles, como informan otros autores [110], al menos en las condiciones experimentales ensayadas aquí.

11.8.2 Determinación de la cantidad y tamaño de los plásmidos portadores de *bla_{VIM}*

La digestión con nucleasa S1 mostró que todos los aislamientos contenían múltiples plásmidos de tamaños aproximadamente entre 50 y 370 kb (Figura 40, Tabla 12 sección 11.9, Figura B2 anexo B). La localización del gen *bla_{VIM-2}* se confirmó por Southern Blot con sonda *bla_{VIM-2}* en plásmidos de aproximadamente 53-82 Kb (Figura 40, Tabla 12 sección 11.9)

El aislamiento ECL-M15736 contenía cuatro plásmidos de los cuales hibridaron con la sonda *bla_{VIM-2}*, el de 130 y 270 kb (Figura 40, Tabla 12 sección 11.9). Esta doble hibridación se corroboró en posteriores ensayos en los que se obtuvo similar resultado (anexo B, figura B1). Los aislamientos ECL-M15008 y ECL-M15428 contenían tres plásmidos de los cuales hibridaron con *bla_{VIM-2}*, el de 61 kb y 50 kb, respectivamente (Figura 40, tabla 12 sección

11.9). Por otro lado, el aislamiento ECL-M13768 presentó dos plásmidos, 82 y 154 kb, siendo el de menor tamaño el portador de *bla*_{VIM} (Figura 40, Tabla 12 sección 11.9). El aislamiento ECL-M13532 presentó tres plásmidos de 160, 100 y un plásmido menor a 48 kb (Figura 40, Tabla 12 sección 11.9). La hibridación en éste aislamiento resulto negativa por lo que se sospecha que la localización del gen *bla*_{VIM-2} es cromosómica. Por último, el aislamiento ECL-M13832 contenía tres plásmidos de 53, 73 y 325 kb, siendo el más chico el portador de *bla*_{VIM-2} que a su vez fue transferible por conjugación (Figura 40, Tabla 12 sección 11.9).

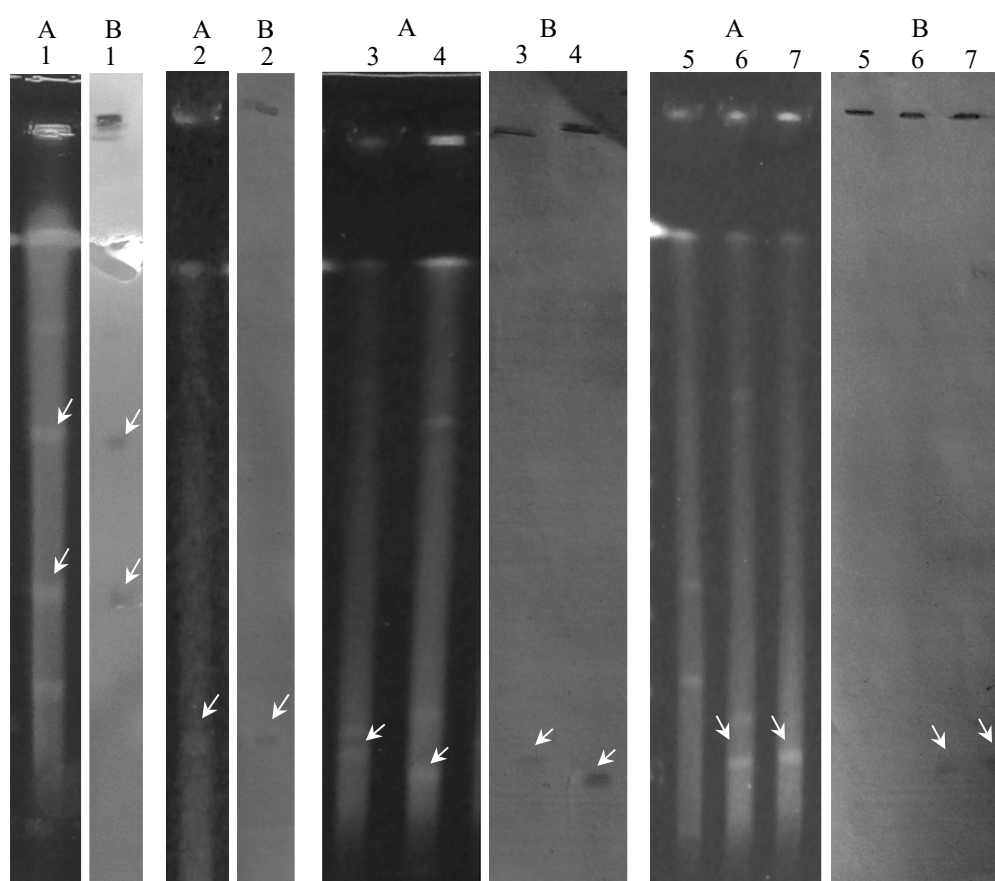


Figura 40. Restricción con nucleasa S1 y Southern Blot. (A) nucleasa S1-PFGE y (B) Southern Blot con sonda *bla*_{VIM}. Calle 1: ECL-M15736, calle 2: ECL-M13768, calle 3: ECL-M15008, calle 4: ECL-M15428, Calle 5: ECL-M13532; calle 6: ECL-M13832; calle 7: ECL-TC-M13832. Las flechas en los geles PFGE señalan la hibridaron con la sonda *bla*_{VIM} como se muestra en la figura B.

11.8.3 Determinación de la localización del gen *bla*_{VIM}

La investigación de la localización cromosómica del gen *bla*_{VIM} se realizó en los seis aislamientos. Se observó la hibridación de bandas con las dos sondas, *bla*_{VIM} (Figura 41 B) y

16S rDNA (Figura 41 C), en los aislamientos ECL-M13532 y ECL-M15428, de este modo se comprobó la localización cromosómica del gen *bla*_{VIM}.

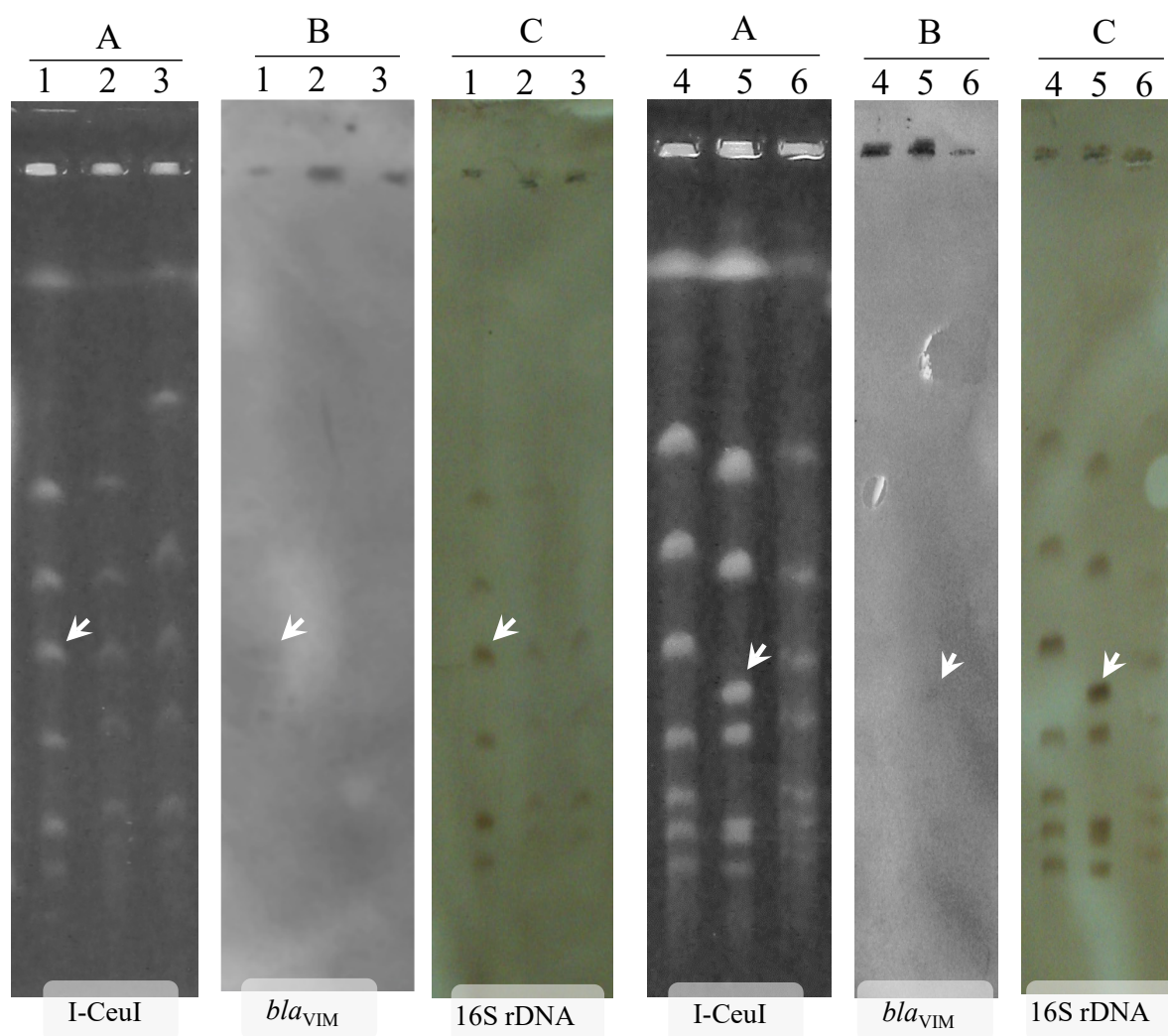


Figura 41. I-CeuI-PFGE y Southern Blot. (A) I-CeuI-PFGE, (B) Southern Blot con sonda *bla*_{VIM} y (C) Southern Blot con sonda 16S rDNA. Calle 1: ECL-M13532; calle 2: ECL-M13832; calle 3: ECL-M13768, Calle 4: ECL-M15008, calle 5: ECL-M15428; calle 6: ECL-M15736. Las flechas blancas en el gel I-CeuI-PFGE (A) se hibridaron con la sonda *bla*_{VIM} y con la sonda 16S rDNA como se muestra en (B) y (C), respectivamente.

11.9 Determinación de los grupos de incompatibilidad de los plásmidos en los *E. cloacae*

El análisis del grupo de incompatibilidad de los plásmidos mostró que los aislamientos ECL-M13532, ECL-M13832, y ECL-M13768 fueron no tipables (Tabla 12); mientras que ECL-M15736 porta un plásmido con un replicón del tipo A/C y los aislamientos ECL-M15008 y ECL-M15428 el replicón HI2. Sin embargo, no fue posible determinar la asociación de estos plásmidos con el gen *bla*_{VIM}.

Tabla 12. Características moleculares de los *E. cloacae* portadores de *bla*_{VIM}.

	ECL-M13532	ECL-M13768	ECL-M13832	TC-ECL-M13832	ECL-M15008	ECL-M15428	ECL-M15736
ST	182	88	90	-	184	749	91
genes <i>bla</i>	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>bla</i> _{VIM-11}	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>bla</i> _{VIM-2}	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{PER-2}	<i>bla</i> _{VIM-2}
Ubicación de <i>bla</i> _{VIM}	<i>ch</i>	<i>pl</i>	<i>pl</i>	<i>pl</i>	<i>pl</i>	<i>ch</i> , <i>pl</i>	<i>pl</i>
Tamaño del plásmido(s) kb	<48; 100; 160	82 ; 154	53 ; 73; 325	53	61 ; 75; 367	50 ; 79; 325	65; 130 ; 270 ; 440
Integron	In883	In346	In885	-	In900	In900	ND
Contenido Rep por PCR	-	NT	NT	-	HI2	HI2	A/C

ECL: *Enterobacter cloacae*, TC-ECL-M13832: transconjugante de ECL-M13832, ST: secuencia tipo, *ch*: cromosoma, *pl*: plásmido, kb: kilobase, Rep: replicón, ND: no determinado. El tamaño del plásmido en negrita indica la hibridación con sonda *bla*_{VIM} por Southern blot.

11.10 Caracterización plasmídica por secuenciación masiva de plásmido.

Se realizó la secuenciación masiva del ADN plasmídico obtenido de la cepa transformante de TF-M15736 portador de *bla*_{VIM-2}. El ensamblado y posterior análisis de las secuencias determinó un fragmento de 52630 pb correspondiente al plásmido en estudio. Es importante aclarar que la brecha generada por la técnica de secuenciación utilizada no fueron cerradas

por PCR, por lo tanto la imagen que se muestra como resultado del ensamblado puede tener errores. Por este mismo motivo el tamaño de 52630 pb, es un tamaño estimado. La secuencia ensamblada fue comparada con la base de datos del NCBI y se observó que el plásmido presenta pocas regiones de similitud con lo ya descrito en la base de datos del GenBank (Figura 42).

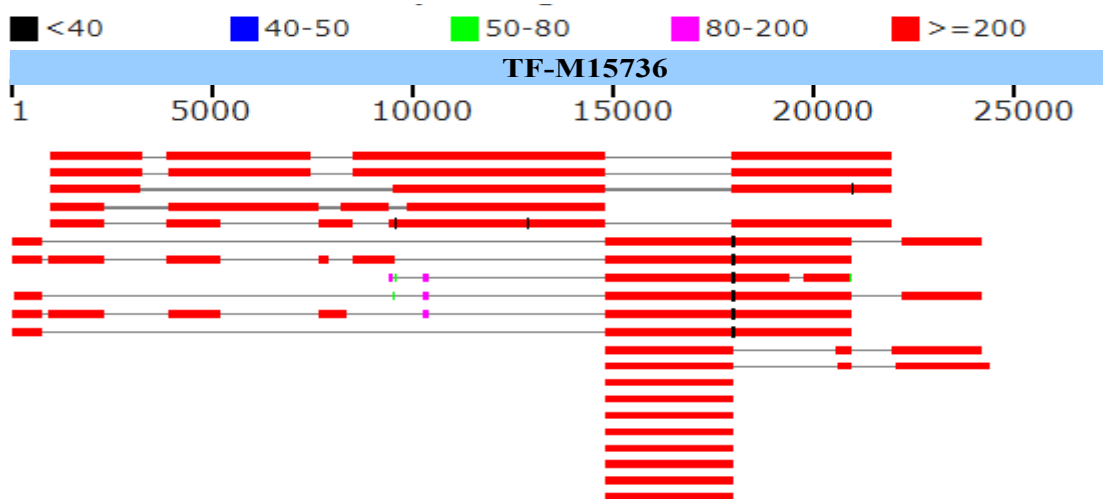


Figura 42. Análisis comparativo del plásmido TF-M15736 con GenBank. El gráfico representa el alineamiento de la secuencia de TF-M15736 respecto de las secuencias presentes en la base de datos de NCBI. Las barras horizontales representan el alineamiento codificadas por colores de acuerdo a una puntuación establecida que representa la identidad base a base de los fragmentos respecto de la secuencia TF-M15736 (mayor puntaje rojo, menor puntaje negro, fragmento son presentes o sin identidad línea fina gris).

La anotación de los marcos de lectura abierta (MLA) determinó 37 genes de los cuales cuatro eran de resistencia a los antimicrobianos. Asimismo, el análisis en RESfinder y CARD determinó que estos genes eran *bla_{VIM-2}*, *sull*, *aacA4* y *cmx*. Este último gen de resistencia codifica para una bomba de eflujo de la familia MFS y se encuentra como primer MLA en el transposón Tn5564. El segundo MLA de este transposón es una transposasa con un 91% de identidad con la secuencia depositada en el GenBank U85507. También se encontró la secuencia de inserción IS1071 que es un miembro de la familia Tn3 y que carece del gen de la resolvasa. A continuación se muestra un esquema representativo (Figura 42) del ensamblado del plásmido TF-M15736.

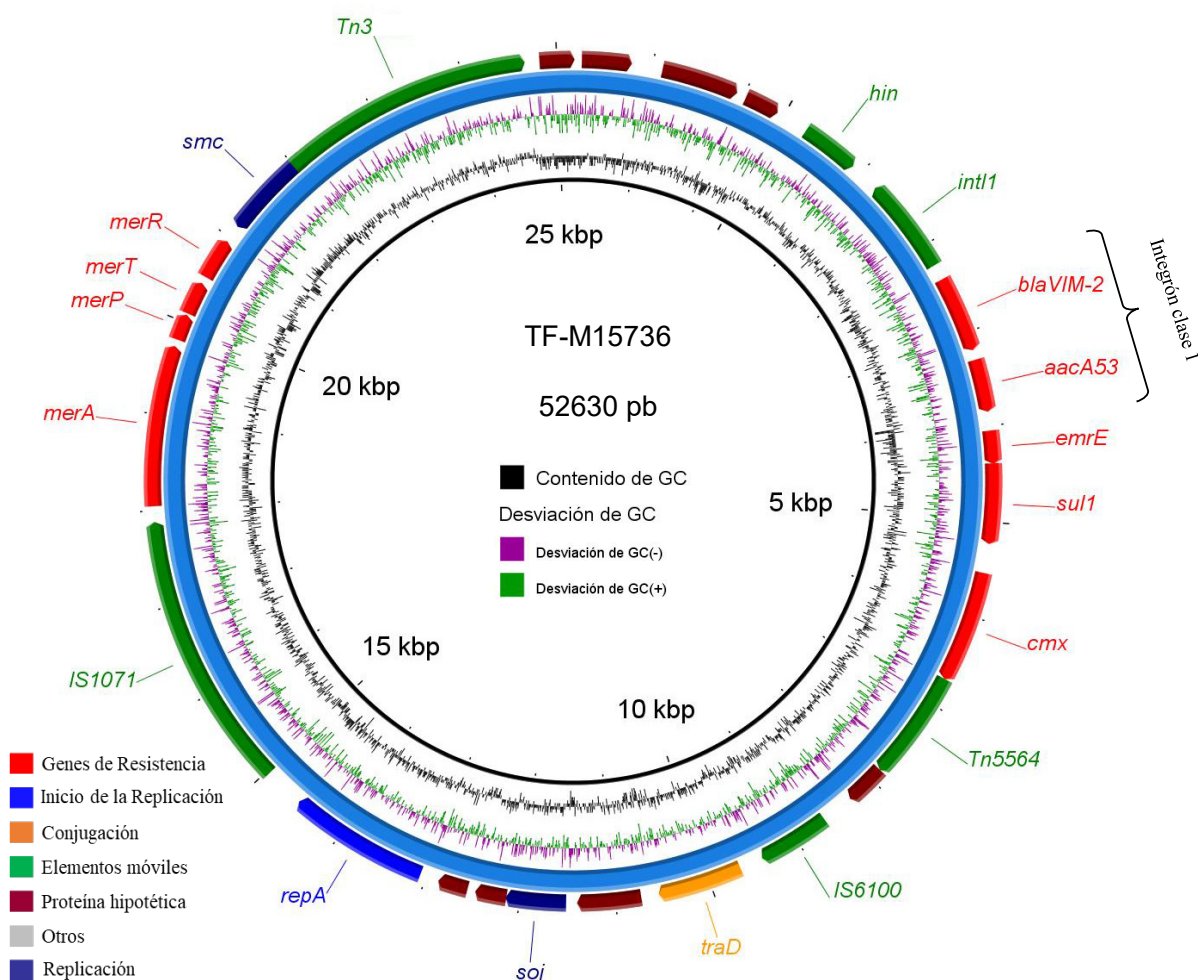


Figura 42. Esquema circular del draft del plásmido TF-M15736 portador de *blaVIM-2*. De adentro hacia fuera. El anillo negro y el tercer anillo verde y púrpura, corresponden al porcentaje y a la desviación de GC del plásmido TF-M15736, respectivamente. El anillo azul corresponde al plásmido TF-M15736. En el anillo más externo se indican los genes y/o regiones de mayor importancia, con un código de colores asociado a su función que se encuentra en el marco inferior izquierdo. La imagen se realizó con Blast Ring Image Generator (<http://sourceforge.net/projects/brig>).

11.11 Resumen resultados capítulo II

- En éste estudio describimos seis aislamientos clínicos de *E. cloacae* productores de *bla*_{VIM-2} o *bla*_{VIM-11} provenientes de 5 ciudades del país.
- Los aislamientos no estuvieron genéticamente relacionados y obtuvimos seis secuenciotipos de los cuales cinco fueron fundacionales de cada complejo clonal y uno fue un secuencio tipo nuevo (ST749)
 - *bla*_{VIM} se localizó como primer cassette de integrones de clase 1 nuevos: In883, In885, In346, In900.
- En un aislamiento se pudo demostrar que *bla*_{VIM} se localiza en un plásmido transferible.
- Demostramos la localización de *bla*_{VIM} en plásmidos y/o en el cromosoma, y determinamos el grupo de incompatibilidad al que pertenecen: HI2 (n=2), A/C (n=1) y no tipable (n=2).
- Tras la secuenciación completa del plásmido de ECL-M15736, se correlacionó con los resultados previos y además se hallaron otros genes de resistencia distintos a los detectados en el estudio inicial. Por otro lado, se observó baja similitud con plásmidos previamente descritos.

DISCUSIÓN GENERAL

12 Discusión general

En el presente trabajo se realizó un estudio de 46 aislamientos clínicos de enterobacteriales enviados al LNRRA en el periodo 2008-2016 por ser sospechosos de producir una carbapenemasa. Tras el estudio fenotípico y molecular se detectó la producción de metalo- β -lactamasa *bla*_{IMP-8} en 40 de ellos, mientras que en los 6 aislamientos restantes se detectó *bla*_{VIM-2} y *bla*_{VIM-11}. En ambos casos, dichos genes fueron localizados en plásmidos, algunos de ellos transferibles, y a su vez como primer cassette de integrones de clase 1. *bla*_{VIM} se halló en cinco provincias de Argentina, tres aislamientos del norte (Chaco, Salta y Jujuy), dos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y uno del sur (Neuquén); mientras que *bla*_{IMP-8} se detectó mayormente en el Área Metropolitana de Buenos Aires (24 de ellos de un único hospital) y la provincia de Santa Fe. Tras todos los estudios y ensayos realizados comprobamos la hipótesis de que tanto IMP como VIM se diseminan principalmente de manera horizontal intra e inter especie en plásmidos transferibles. En este estudio también pudimos detectar la ocurrencia de pequeños brotes de *K. pneumoniae* productora de IMP-8 (2 y 4 aislamientos) en un único hospital. También encontramos que todos los aislamientos de *E. cloacae* no tienen relación genética entre sí y éste hallazgo fue comprobado por la detección de diversos clones (STs). Por otra parte, el análisis de las plataformas genéticas reveló la presencia de distintos integrones de clase 1 con dos estructuras mayoritarias (*In1330* y otro no determinado) portadoras de *bla*_{IMP-8} halladas en distintos plásmidos y especies bacterianas.

Tanto VIM como IMP fueron de las enzimas más detectadas a nivel mundial, antes de la emergencia de Nueva Delhi metalo- β -lactamasa (NDM) [63]. Las bacterias productoras de IMP son mayormente detectadas en China, Japón y Australia y principalmente en

Acinetobacter baumannii mientras que las productoras de VIM son mayormente detectadas en *P. aeruginosa* pero también en enterobacteriales en algunos países de Europa como Grecia, Hungría, España e Italia donde se ha convertido en la metalo- β -lactamasa predominante y dónde también se ha documentado la “propagación interregional” [63] [67]. La ocurrencia de éste tipo de metalo- β -lactamasas en el continente americano es variable. Por ejemplo en Estados Unidos y Canadá, la resistencia por cualquier tipo de metalo- β -lactamasa es poco frecuente [67]. Mientras que en América Latina se reportó *bla*_{VIM} en Colombia [111], Chile [112], Venezuela [113], mientras que en Brasil se reportó *bla*_{IMP-1} [114] y *bla*_{IMP-16} [115]. En Argentina, se reportó *bla*_{IMP-1} en *Acinetobacter spp* [116], *bla*_{IMP-13}, *bla*_{IMP-16}, *bla*_{VIM-11} [117] [118] en *P. aeruginosa*. Mientras que el primer reporte de metalo- β -lactamasa en enterobacteriales en Argentina fue de *bla*_{IMP-8} y *bla*_{VIM-2} en *E. cloacae* y *Providencia rettgeri* [65].

Desde el punto de vista terapéutico, las cepas productoras de metalo- β -lactamasas dejan muy pocas opciones de tratamiento dado que, además de ser resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos, éstos genes están localizados en plásmidos que poseen otros genes de resistencia adicionales (Figura 26 y Figura 37) [56]. Los aislamientos de Argentina estudiados aquí poseen genes que codifican para β -lactamasas de espectro extendido (7 *bla*_{PER}, 1 *bla*_{SHV} y 2 *bla*_{CTX-M}), genes que confieren resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos (29 *qnrB* + *aac(6')Ib-cr*, 1 *qnrS* + *aac(6')Ib-cr* y 1 *qnrB*) y mutaciones QRDR sin considerar genes de resistencias adicionales de menor relevancia clínica. Por todo esto, son muchísimas las drogas que no pueden utilizarse para tratar a pacientes infectados con estos microorganismos limitando al extremo las opciones terapéuticas. Lamentablemente, el desarrollo de nuevas drogas se encuentra casi paralizado debido a que no es rentable para las empresas farmacéuticas ya que se requieren casi 10 años para el desarrollo y comercialización de una nueva droga y tal

vez un mes para la emergencia de un nuevo mecanismo de resistencia que lo hidrolice (ej. ceftazidima-avibactam) [119]. Hoy en día, el camino de la solución se encuentra en las acciones conjuntas de los países, sociedades científicas y hasta de grupos económicos preocupados por los gastos que ocasiona esta problemática en salud [fue tema del G20 en 2018 (https://www.paho.org/arg/index.php?option=com_content&view=article&id=10236:argentina-recibio-a-expertos-de-la-onu-en-resistencia-antimicrobiana-para-desarrollar-recomendaciones-a-nivel-mundial&Itemid=0)]. Estas acciones se basan en lo que se conoce como “*antimicrobial stewardship*” que refiere a las intervenciones coordinadas y conjuntas de los distintos actores (dentro del hospital y con el Estado) diseñadas para mejorar y medir el uso apropiado de los antibióticos promoviendo la selección del régimen óptimo de un antibiótico para cada paciente que incluye la dosificación, el tiempo de duración de la terapia y la ruta de administración [120]. Estas acciones no solo están dirigidas al microbiólogo y al médico sino que también apuntan a trabajar con los programas de control de infecciones. Por último, otro objetivo del *antimicrobial stewardship* es reducir los costos en salud causados por ésta problemática.

En este estudio, la especie mayoritaria detectada fue *K. pneumoniae* seguida por *E. cloacae*. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por el Programa Nacional de Vigilancia de Infecciones Hospitalarias de Argentina (VIHDA) [121] donde se encontró que *K. pneumoniae* fue la principal enterobacterial causante de infecciones sistémicas, neumonías y sepsis [121]. Este patógeno es altamente versátil dado que puede comportarse como oportunista, hipervirulento o multirresistente gracias a su diverso genoma accesorio [122]. La segunda especie predominante que encontramos fue *E. cloacae*, un microorganismo que desde hace una década ha emergido como un patógeno importante a nivel mundial [10] [123]. Algunos estudios de

vigilancia mundiales han revelado que microorganismos pertenecientes a especies de *Enterobacter* se han convertido en el segundo o tercer patógeno más común entre los enterobacteriales asociados a la producción de carbapenemasas [9] [124]. Por último, la prevalencia de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* como principales enterobacteriales resistentes a carbapenemes coincide también con lo que ocurre en nuestro país, donde resultados de la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos - Red WHONET-Argentina: 2010-2017 en Gram negativos resistentes a imipenem muestran que (sin considerar bacilos no fermentadores como *Acinetobacter* o *Pseudomonas*), *K. pneumoniae* es la enterobacterial más frecuente seguida por *E. cloacae* desde el año 2010 al 2017 (Figura 43). En ése mismo análisis (WHONET Argentina) se puede observar que el porcentaje de aislamientos resistentes a imipenem pasó de 9 y 5 en 2010 a 15,2 y 10 en el 2017 para *K. pneumoniae* y *E. cloacae* respectivamente, habiéndose duplicado el porcentaje de casos de *E. cloacae* resistentes a imipenem (ver Figura 43) [125].

Resistencia a Imipenem

E. coli, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*
Red WHONET Argentina 2010-2017

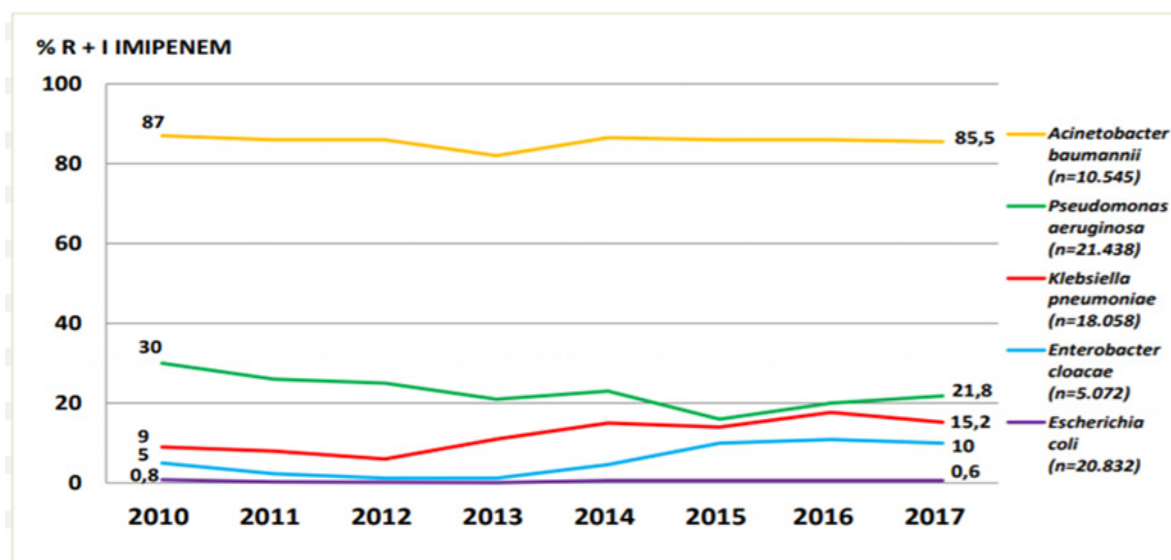


Figura 43 Se muestra el porcentaje de aislamientos no sensibles a imipenem detectados por la Red WHONET Argentina entre los años 2010-2017.

En ésta tesis, al analizar los sitios de aislamiento, encontramos que casi el 60% fueron recuperados del torrente sanguíneo siendo *K. pneumoniae* la especie mayoritaria, mientras que *E. cloacae* fue aislada de diversos sitios de infección como piel y partes blandas, infección del tracto urinario, abscesos abdominales, etc. tanto en productores de IMP como de VIM. Esta diferencia entre especies respecto del sitio de infección posiblemente se deba a aspectos propios de cada especie respecto de su patogenicidad, como la capacidad de *K. pneumoniae* de incorporar hierro del huésped (ej. torrente sanguíneo) o la capacidad de *E. cloacae* de formar biofilm (ej. sitios óseos, piel y partes blandas).

Considerando que recibimos aislamientos de dos especies mayoritarias, *K. pneumoniae* y *E. cloacae* y que además 24 aislamientos fueron derivados de la misma institución, realizamos un estudio de la relación genética entre aislamientos de la misma especie para confirmar o descartar la presencia de un brote intrahospitalario. El estudio demostró que tanto para *K. pneumoniae* como para *E. cloacae* existe una gran diversidad clonal descartando la existencia de un clon dominante, sobre todo en *E. cloacae*. Aquellos casos donde se observó relación genética (clon A, B y C de *K. pneumoniae* productoras de IMP, Figura 27), fueron casos aislados donde el clon no volvió a re aparecer en la institución o en el país demostrando que fueron apariciones esporádicas y limitadas.

Existen varios estudios previos que reportan tanto la aparición esporádica de algunos clones como la distribución local o regional o de algunas especies de enterobacteriales productores de IMP o VIM [126] [62] [67] [127]. Uno de ellos publicado en 2018, muestra la epidemiología de IMP y VIM a través del análisis de 119 aislamientos de enterobacteriales recuperados desde 2006 a 2012 en Polonia [126]. En ese estudio encuentran que a diferencia de nuestros resultados, la especie predominante productora

de IMP o VIM fue *E. cloacae*, que por PFGE mostraron numerosos pulsotipos, seguida por *K. oxytoca* y otras especies [126]. Cuando investigan el MLST de los aislamientos, encuentran diversos STs, la mayoría fundacionales de complejos clonales, como el ST90 (CC90) ya reportado como portador de VIM y otras β -lactamasas globalmente [126]. Por otra parte, estos autores encuentran 3 aislamientos que portaban *bla*_{IMP-19}, 101 aislamientos que portaban diversos alelos relacionados a VIM-1 (*bla*_{VIM-1}; *bla*_{VIM-4} *bla*_{VIM-28}; *bla*_{VIM-37}; *bla*_{VIM-40}) y 3 aislamientos que portaban *bla*_{VIM-2}, en ocho integrones de los cuales 6 fueron nuevos [126]. En el año 2017, el grupo liderado por J. D. D. Pitout, publicó dos estudios que involucran el análisis genómico de aislamientos productores de IMP [62] y VIM [67] recuperados de diversos países de todo el mundo. El primer trabajo muestra la caracterización de 38 aislamientos de enterobacteriales recuperados entre 2008 y 2014 de ocho países provenientes del Pacífico Sur, Asia, Brasil y España. Los aislamientos fueron de 7 especies donde hallaron 11 integrones distintos y donde identificaron siete variantes alélicas de IMP (*bla*_{IMP-1}; *bla*_{IMP-4}; *bla*_{IMP-6}; *bla*_{IMP-8}; *bla*_{IMP-13}; *bla*_{IMP-14}; *bla*_{IMP-26}) siendo IMP-26 la variante mayoritaria localmente distribuida en Filipinas principalmente en *K. pneumoniae* ST14 (9 STs en 22 aislamientos) seguida por el complejo *E. cloacae* CC78 (7 STs en 9 aislamientos) y luego otras especies [62]. En el segundo trabajo, analizan por WGS una colección de 89 aislamientos de enterobacteriales productores de VIM recuperados entre 2008 y 2014 [67]. En ese trabajo, encuentran a *K. pneumoniae* como especie mayoritaria (23 STs en 45 aislamientos) seguida por el complejo *E. cloacae* (11 CC y 24 STs en 33 aislamientos) y otras especies [67]. En ese trabajo detectan once variantes alélicas de VIM (*bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-4}, *bla*_{VIM-5}, *bla*_{VIM-19}, *bla*_{VIM-23}, *bla*_{VIM-26}, *bla*_{VIM-27}, *bla*_{VIM-29}, *bla*_{VIM-32} y *bla*_{VIM-33}), siendo VIM-1 la variante mayoritaria y detectada en varias especies bacterianas al igual que VIM-4 y VIM-5. Estas variantes se localizaron en 21

integrones distintos algunos de ellos específicos de un país hallado en distintas especies y complejos clonales mientras que otros integrones se diseminaron globalmente también en diversas enterobacteriales [67]. En resumen, en estos trabajos se reporta la detección de numerosos alelos de IMP y VIM, mientras que aquí demostramos que en nuestro país circulan alelos únicos de cada enzima como *bla*_{IMP-8} y *bla*_{VIM-2}. Por otra parte, éste es el primer aislamiento de VIM-11 detectado en enterobacteriales, ya que solo se ha detectado en *P. aeruginosa* sugiriendo la posible transferencia del plásmido o elemento genético móvil a enterobacteriales [128].

Coincidentemente con lo reportado aquí, en todos esos trabajos, *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM} fueron localizados en diversos integrones presentes en diversas especies y clones, algunos de ellos localmente diseminados de *K. pneumoniae* y de *E. cloacae* pero también en otras especies de enterobacteriales. Estos resultados sugieren la diseminación de los integrones a diversos plásmidos y diversas especies bacterianas. Esta observación es sustentada por el hecho de haber comprobado la existencia de un mismo integrón (In1330) en distintas especies bacterianas y en distintos tipos clonales. Más aún, aquí mostramos dos casos donde a cada paciente se le aislaron dos especies distintas, y en un caso ambas especies fueron portadoras de igual plásmido e igual integrón, mientras que en el segundo caso, cada especie bacteriana fue portadora de plásmidos distintos e integrones portadores de *bla*_{IMP-8} distintos (ver 10.8 y tabla 6).

En este trabajo, la relación genética entre aislamientos fue determinada principalmente por PFGE, pero también pudimos determinar el MLST de 6 aislamientos productores de VIM y un aislamiento productor de IMP, obteniendo como resultado 7 STs y 6 complejos clonales. Por otra parte, el ST749 detectado aquí resultó un nuevo secuencia tipo, mientras que el ST88 y el CC90 fueron reportados en el continente Asiático [126] [62] [67] [127]. En consecuencia, no observamos la prevalencia de un

clon dominante responsable de la diseminación de IMP o VIM, sino integrones que se diseminaron inter e intra especie (aislamientos de distintos ST o distintos patrones de bandas por PFGE que tuvieron el mismo integrón, tabla 6).

En este trabajo también comprobamos la localización plasmídica de IMP y VIM y la capacidad de éstos plásmidos para transferirse por conjugación biparental. Estos ensayos nos permitieron demostrar que en al menos siete aislamientos, *bla*_{IMP-8} se localizó en plásmidos conjugativos. En cuanto a las VIM, demostramos que 5 de los aislamientos se hallaron en plásmidos mientras que el sexto aislamiento se localizó en el cromosoma. Además, un aislamiento (ECL-M15428) se halló tanto en el cromosoma como en un plásmido. De acuerdo a lo descrito, la primer VIM-2 cromosómica fue reportada en España en un *C. freundii* [110]. De estos plásmidos, solo el que portaba ECL-M13832 fue conjugativo por lo menos en las condiciones que se ensayaron en éste trabajo. Asimismo, tres plásmidos fueron no tipables (ECL-M13532, ECL-M13832, y ECL-M13768) mientras que en ECL-M15008 y ECL-M15428 se halló el replicón HI2 y A/C en ECL-M15736 previamente reportados en aislamientos productores de otras variantes de VIM distintas de VIM-2 [126].

Por último, la secuenciación masiva de genoma nos permitió determinar de manera preliminar las características primordiales en términos epidemiológicos de los aislamientos de *K. pneumoniae* (ST12) y *E. cloacae* (ST37) productores de IMP-8. *E. cloacae* ECL-M9921, fue portadora de cuatro plásmidos y de varios genes de virulencia que participan en la biosíntesis de proteínas de adhesión, proteínas flagelares, o involucradas en la captación de hierro. En el genoma de *K. pneumoniae* KPN-M19434 se detectaron dos plásmidos observados en el gel de S1 y también se observó la presencia de genes responsables de la adhesión e invasión celular y siete genes

responsables de la captación de hierro. Cabe aclarar que tanto éste estudio como el estudio plasmídico son preliminares y se encuentran en su etapa inicial.

13 Conclusión

La aparición de resistencia a los carbapenemes es un importante problema de salud pública debido a que estos agentes son drogas de último recurso disponibles para tratar las infecciones causadas por enterobacteriales que presentan resistencia a múltiples drogas. En particular, el creciente uso de los antibióticos durante las últimas décadas ha conducido a la aparición y propagación de diversos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos entre estos patógenos.

En este trabajo se estudiaron aislamientos de origen hospitalario, mayormente causantes de infección y se determinó que los genes *bla_{VIM}* y *bla_{IMP-8}* se hallaban insertos principalmente en plásmidos, a excepción de un *E. cloacae* donde *bla_{VIM-2}* se localizó en el cromosoma. Se comprobó la transferencia horizontal de algunos de éstos plásmidos y también se observó diseminación vertical entre aislamientos de *K. pneumoniae* (entre 2 y 4 aislamientos) y dos aislamientos de *C. farmeri*. Además, se determinó que los genes *bla_{VIM}* y *bla_{IMP-8}* se localizaron como primer cassette en integrones de clase 1 con distintos arreglos génicos y seis de ellos nuevos. Por otro lado, se observó que los seis *E. cloacae* portadores de *bla_{VIM}* no estaban genéticamente relacionados, sin embargo pudimos detectar aislamientos pertenecientes a secuencias de diseminación internacional, y describimos un secuencia tipo nuevo.

Por todo esto, en este trabajo pudimos determinar que la emergencia y diseminación de las primeras metalo- β -lactamasas de tipo IMP y VIM en *Enterobacterales* durante el periodo 2008-2016 en Argentina fue principalmente debido a la diseminación de plásmidos asociados a diferentes integrones y a brotes esporádicos policlonales.

14 Perspectivas

✓ Completar la caracterización de los plásmidos portadores de *bla*_{IMP-8} y *bla*_{VIM-2} secuenciados para lograr obtener una única secuencia continua de los mismos:

≈ Cerrar brechas mediante PCR.

≈ Caracterizar extremos no determinados como los extremos 3'CS de algunos integrones estudiados aquí, diseñando nuevas estrategias.

✓ Secuenciar la totalidad de los plásmidos portadores de *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM} con el fin de realizar un relevamiento de éstos elementos genéticos responsables de la diseminación de la resistencia que circulan en la región.

✓ Secuenciar los genomas de los *E. cloacae* y *K. pneumoniae* portadores de *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM} de todo el país con el fin de realizar un estudio filogenético de éstos aislamientos en nuestro país.

15 REFERENCIAS

- [1] E. Kang *et al.*, «Enterobacteria and host resistance to infection», *Mamm. Genome*, vol. 29, n.º 7-8, pp. 558-576, 2018.
- [2] P. P. Guerrero, F. G. Sánchez, D. G. Saborido, y I. G. Lozano, «Infecciones por enterobacterias», *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, vol. 11, n.º 55, pp. 3276-3282, 2014.
- [3] C. Jenkins, R. J. Rentenaar, L. Landraud, y S. Brisse, «180 - Enterobacteriaceae», en *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, J. Cohen, W. G. Powderly, y S. M. Opal, Eds. Elsevier, 2017, pp. 1565-1578.e2.
- [4] J. T. Thaden, J. M. Pogue, y K. S. Kaye, «Role of newer and re-emerging older agents in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae», *Virulence*, vol. 8, n.º 4, pp. 403-416, jul. 2016.
- [5] B. Mehrad, N. M. Clark, G. G. Zhanel, y J. P. Lynch, «Antimicrobial Resistance in Hospital-Acquired Gram-Negative Bacterial Infections», *CHEST*, vol. 147, n.º 5, pp. 1413-1421, may 2015.
- [6] J. A. Karlowsky, D. J. Hoban, M. A. Hackel, S. H. Lob, y D. F. Sahn, «Resistance among Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Latin American countries: SMART 2013–2015», *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 21, n.º 3, pp. 343-348, may 2017.
- [7] A. Gomez-Simmonds y A.-C. Uhlemann, «Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*», *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 215, n.º suppl_1, pp. S18-S27, mar. 2017.
- [8] C.-R. Lee *et al.*, «Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms», *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 7, p. 483, 2017.
- [9] K. D. Chavda *et al.*, «Comprehensive Genome Analysis of Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp.: New Insights into Phylogeny, Population Structure, and Resistance Mechanisms», *MBio*, vol. 7, n.º 6, 13 2016.
- [10] A. Davin-Regli y J.-M. Pagès, «*Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment», *Front Microbiol*, vol. 6, p. 392, 2015.
- [11] K. Bush, «The coming of age of antibiotics: discovery and therapeutic value», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1213, pp. 1-4, dic. 2010.
- [12] R. I. Aminov, «A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future», *Front Microbiol*, vol. 1, p. 134, 2010.
- [13] F. Yousef, O. Mansour, y J. Herballi, «Sulfonamides: Historical Discovery Development (structure-activity Relationship Notes)», *IIIJ*, vol. 1, n.º 1, p. 1, may 2018.
- [14] F. Paredes y J. J. Roca, «Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana», *Offarm*, vol. 23, n.º 3, pp. 116-124, mar. 2004.
- [15] D. Vicente y E. Pérez-Trallero, «[Tetracyclines, sulfonamides, and metronidazole]», *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, vol. 28, n.º 2, pp. 122-130, feb. 2010.
- [16] F. Van Bambeke, Y. Glupczynski, M.-P. Mingeot-Leclercq, y P. M. Tulkens, «Chapter 130 - Mechanisms of action», en *Infectious Diseases (Third Edition)*, J. Cohen, S. M. Opal, y W. G. Powderly, Eds. London: Content Repository Only!, 2010, pp. 1288-1307.
- [17] M. S. Ramirez y M. E. Tolmasky, «Aminoglycoside modifying enzymes», *Drug Resist. Updat.*, vol. 13, n.º 6, pp. 151-171, dic. 2010.
- [18] S. Jana y J. K. Deb, «Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 70, n.º 2, pp. 140-150, mar. 2006.

- [19] S. Mella M. *et al.*, «Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia», *Revista chilena de infectología*, vol. 21, n.º 4, pp. 330-338, dic. 2004.
- [20] Y. Takahashi y M. Igarashi, «Destination of aminoglycoside antibiotics in the “post-antibiotic era”», *J. Antibiot.*, oct. 2017.
- [21] B. Yanat, J.-M. Rodríguez-Martínez, y A. Touati, «Plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae: a systematic review with a focus on Mediterranean countries», *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 36, n.º 3, pp. 421-435, mar. 2017.
- [22] D. T. King, S. Sobhanifar, y N. C. J. Strynadka, «One ring to rule them all: Current trends in combating bacterial resistance to the β -lactams», *Protein Sci.*, vol. 25, n.º 4, pp. 787-803, abr. 2016.
- [23] J.-I. Alós, «[Quinolones]», *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 27, n.º 5, pp. 290-297, may 2009.
- [24] D. C. Hooper y G. A. Jacoby, «Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance», *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 6, n.º 9, p. a025320, ene. 2016.
- [25] C. Suárez y F. Gudíol, «Antibióticos betalactámicos», *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 27, n.º 2, pp. 116-129, feb. 2009.
- [26] J. Gómez, E. García-Vázquez, y A. Hernández-Torres, «[Betalactams in clinical practice]», *Rev Esp Quimioter*, vol. 28, n.º 1, pp. 1-9, feb. 2015.
- [27] J. S. Bradley, C. R. Cannavino, D. E. Franzon, y S. Duthie, «Chapter 94 - Bacterial Infection, Antimicrobial Use, and Antibiotic-Resistant Organisms in the Pediatric Intensive Care Unit», en *Pediatric Critical Care (Fourth Edition)*, B. P. Fuhrman y J. J. Zimmerman, Eds. Saint Louis: Mosby, 2011, pp. 1315-1323.
- [28] R. A. Bonomo, « β -Lactamases: A Focus on Current Challenges», *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 7, n.º 1, ene. 2017.
- [29] R. R. Watkins y R. A. Bonomo, «140 - β -Lactam Antibiotics», en *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, J. Cohen, W. G. Powderly, y S. M. Opal, Eds. Elsevier, 2017, pp. 1203-1216.e2.
- [30] D. J. Biedenbach, K. Kazmierczak, S. K. Bouchillon, D. F. Sahm, y P. A. Bradford, «*In Vitro* Activity of Aztreonam-Avibactam against a Global Collection of Gram-Negative Pathogens from 2012 and 2013», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 59, n.º 7, pp. 4239-4248, jul. 2015.
- [31] J. N. Kattan, M. V. Villegas, y J. P. Quinn, «New developments in carbapenems», *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 14, n.º 12, pp. 1102-1111, dic. 2008.
- [32] K. M. Papp-Wallace, A. Endimiani, M. A. Taracila, y R. A. Bonomo, «Carbapenems: past, present, and future», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, n.º 11, pp. 4943-4960, nov. 2011.
- [33] S. R. Norrby, «Carbapenems.», *Med Clin North Am*, vol. 79, n.º 4, pp. 745-759, jul. 1995.
- [34] M. I. El-Gamal, I. Brahim, N. Hisham, R. Aladdin, H. Mohammed, y A. Bahaaeldin, «Recent updates of carbapenem antibiotics», *Eur J Med Chem*, vol. 131, pp. 185-195, may 2017.
- [35] G. G. Zhanel *et al.*, «Comparative Review of the Carbapenems», *Drugs*, vol. 67, n.º 7, pp. 1027-1052, may 2007.
- [36] D. S. Pontes *et al.*, «Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants», *Curr Top Med Chem*, vol. 18, n.º 1, pp. 42-74, 2018.
- [37] «WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014», *WHO*. [En línea]. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. [Accedido: 17-dic-2018].
- [38] R. J. Worthington y C. Melander, «Overcoming resistance to β -lactam antibiotics», *J. Org. Chem.*, vol. 78, n.º 9, pp. 4207-4213, may 2013.
- [39] M. O. A. Sommer, C. Munck, R. V. Toft-Kehler, y D. I. Andersson, «Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm?», *Nature Reviews Microbiology*, vol. 15, n.º 11, pp. 689-696, nov. 2017.

- [40] S. Basak, P. Singh, y M. Rajurkar, «Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study», *Journal of Pathogens*, 2016. [En línea]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jpath/2016/4065603/>. [Accedido: 02-dic-2018].
- [41] R. G. Melano, «Detección y notificación de patógenos multi-resistentes, con resistencia extrema o pan-resistentes», p. 26.
- [42] J. M. A. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, y L. J. V. Piddock, «Molecular mechanisms of antibiotic resistance», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, n.º 1, pp. 42-51, ene. 2015.
- [43] D. Du *et al.*, «Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation.», *Nat Rev Microbiol*, vol. 16, n.º 9, pp. 523-539, sep. 2018.
- [44] M. Gao, A. E. Glenn, A. A. Blacutt, y S. E. Gold, «Fungal Lactamases: Their Occurrence and Function», *Front Microbiol*, vol. 8, p. 1775, 2017.
- [45] R. Penchovsky y M. Traykovska, «Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do?», *Expert Opin Drug Discov*, vol. 10, n.º 6, pp. 631-650, jun. 2015.
- [46] K. Bush, «Past and Present Perspectives on β -Lactamases», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 62, n.º 10, oct. 2018.
- [47] K. Bush y G. A. Jacoby, «Updated functional classification of beta-lactamases», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, n.º 3, pp. 969-976, mar. 2010.
- [48] K. Bush, G. A. Jacoby, y A. A. Medeiros, «A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.», *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 39, n.º 6, pp. 1211-1233, jun. 1995.
- [49] M.-R. Meini, L. I. Llarrull, y A. J. Vila, «Overcoming differences: The catalytic mechanism of metallo- β -lactamases», *FEBS Lett.*, vol. 589, n.º 22, pp. 3419-3432, nov. 2015.
- [50] C. Bebrone, «Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily», *Biochem. Pharmacol.*, vol. 74, n.º 12, pp. 1686-1701, dic. 2007.
- [51] M. F. Mojica, R. A. Bonomo, y W. Fast, «B1-Metallo- β -Lactamases: Where Do We Stand?», *Curr Drug Targets*, vol. 17, n.º 9, pp. 1029-1050, 2016.
- [52] M. Hussain, A. Carlino, M. J. Madonna, y J. O. Lampen, «Cloning and sequencing of the metallothioprotein beta-lactamase II gene of *Bacillus cereus* 569/H in *Escherichia coli*», *J. Bacteriol.*, vol. 164, n.º 1, pp. 223-229, oct. 1985.
- [53] B. A. Rasmussen, Y. Gluzman, y F. P. Tally, «Cloning and sequencing of the class B beta-lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 34, n.º 8, pp. 1590-1592, ago. 1990.
- [54] G. M. Rossolini *et al.*, «Characterization and sequence of the *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* carbapenemase: a new molecular class B beta-lactamase showing a broad substrate profile», *Biochem. J.*, vol. 332 (Pt 1), pp. 145-152, may 1998.
- [55] S. Bellais, D. Girlich, A. Karim, y P. Nordmann, «EBR-1, a novel Ambler subclass B1 beta-lactamase from *Empedobacter brevis*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, n.º 10, pp. 3223-3227, oct. 2002.
- [56] G. Cornaglia, H. Giamarellou, y G. M. Rossolini, «Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams?», *Lancet Infect Dis*, vol. 11, n.º 5, pp. 381-393, may 2011.
- [57] A. M. Somboro, J. Osei Sekyere, D. G. Amoako, S. Y. Essack, y L. A. Bester, «Diversity and Proliferation of Metallo- β -Lactamases: a Clarion Call for Clinically Effective Metallo- β -Lactamase Inhibitors», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 84, n.º 18, sep. 2018.
- [58] O. Massidda, G. M. Rossolini, y G. Satta, «The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases», *J. Bacteriol.*, vol. 173, n.º 15, pp. 4611-4617, ago. 1991.
- [59] T. R. Walsh, M. A. Toleman, L. Poirel, y P. Nordmann, «Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 18, n.º 2, pp. 306-325, abr. 2005.

- [60] Lahey.org, « β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes». [En línea]. Disponible en: <https://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>. [Accedido: 18-dic-2018].
- [61] W.-H. Zhao y Z.-Q. Hu, «Acquired metallo- β -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria», *Future Microbiol*, vol. 10, n.º 5, pp. 873-887, 2015.
- [62] Y. Matsumura *et al.*, «Global Molecular Epidemiology of IMP-Producing Enterobacteriaceae», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 61, n.º 4, 2017.
- [63] R. A. Bonomo *et al.*, «Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge», *Clin. Infect. Dis.*, vol. 66, n.º 8, pp. 1290-1297, abr. 2018.
- [64] L. K. Logan y R. A. Weinstein, «The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace», *J. Infect. Dis.*, vol. 215, n.º suppl_1, pp. S28-S36, feb. 2017.
- [65] S. Gomez *et al.*, «Emergence of metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae from Argentina», *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 69, n.º 1, pp. 94-97, ene. 2011.
- [66] M.-R. Meini, L. I. Llarrull, y A. J. Vila, «Evolution of Metallo- β -lactamases: Trends Revealed by Natural Diversity and in vitro Evolution», *Antibiotics (Basel)*, vol. 3, n.º 3, pp. 285-316, jul. 2014.
- [67] Y. Matsumura *et al.*, «Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae», *J Antimicrob Chemother*, vol. 72, n.º 8, pp. 2249-2258, ago. 2017.
- [68] A. E. Sheppard *et al.*, «Nested Russian Doll-Like Genetic Mobility Drives Rapid Dissemination of the Carbapenem Resistance Gene blaKPC», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, n.º 6, pp. 3767-3778, 2016.
- [69] S. R. Partridge, S. M. Kwong, N. Firth, y S. O. Jensen, «Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 31, n.º 4, oct. 2018.
- [70] D. Mazel, «Integrons: agents of bacterial evolution», *Nature Reviews Microbiology*, vol. 4, p. 608, ago. 2006.
- [71] C. A. Alonso *et al.*, «Molecular diversity and conjugal transferability of class 2 integrons among Escherichia coli isolates from food, animal and human sources», *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 51, n.º 6, pp. 905-911, jun. 2018.
- [72] Y. Deng *et al.*, «Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons», *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 14, p. 45, oct. 2015.
- [73] O. Barraud y M.-C. Ploy, «Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure», *J. Bacteriol.*, vol. 197, n.º 13, pp. 2171-2178, jul. 2015.
- [74] T. Jové, S. D. Re, F. Denis, D. Mazel, y M.-C. Ploy, «Inverse Correlation between Promoter Strength and Excision Activity in Class 1 Integrons», *PLOS Genetics*, vol. 6, n.º 1, p. e1000793, ene. 2010.
- [75] A. Moura, M. Soares, C. Pereira, N. Leitão, I. Henriques, y A. Correia, «INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes», *Bioinformatics*, vol. 25, n.º 8, pp. 1096-1098, abr. 2009.
- [76] T. M. Ghaly, L. Chow, A. J. Asher, L. S. Waldron, y M. R. Gillings, «Evolution of class 1 integrons: Mobilization and dispersal via food-borne bacteria», *PLOS ONE*, vol. 12, n.º 6, p. e0179169, jun. 2017.
- [77] S. R. Partridge, «Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria», *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 35, n.º 5, pp. 820-855, sep. 2011.
- [78] S. R. Partridge, G. Tsafnat, E. Coiera, y J. R. Iredell, «Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons», *FEMS Microbiol Rev*, vol. 33, n.º 4, pp. 757-784, jul. 2009.
- [79] M. Gillings *et al.*, «The Evolution of Class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic Resistance», *Journal of Bacteriology*, vol. 190, n.º 14, pp. 5095-5100, jul. 2008.

- [80] S. Domingues, G. J. da Silva, y K. M. Nielsen, «Global dissemination patterns of common gene cassette arrays in class 1 integrons», *Microbiology (Reading, Engl.)*, vol. 161, n.º 7, pp. 1313-1337, jul. 2015.
- [81] Y. Lacotte, M.-C. Ploy, y S. Raheison, «Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*», *ISME J*, vol. 11, n.º 7, pp. 1535-1544, 2017.
- [82] M. R. Gillings, «Integrons: past, present, and future», *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 78, n.º 2, pp. 257-277, jun. 2014.
- [83] S. Babakhani y M. Oloomi, «Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria», *Journal of Basic Microbiology*, vol. 58, n.º 11, pp. 905-917, 2018.
- [84] *Mobile DNA II*. American Society of Microbiology, 2002.
- [85] D. Behnke, «DOUGLAS E. BERG and MARTHA M. HOWE (Editors), *Mobile DNA*. XIII + 972 S., 300 + 2 Abb., 36 Tab. Washington, D.C. 1989. American Society for Microbiology. \$ 95.00. ISBN: 1-55581-005-5.», *Journal of Basic Microbiology*, vol. 30, n.º 7, pp. 498-498, 1990.
- [86] Patricia Siguier (LMGM), Edith Goubeyre (LMGM), Mick Chandler (LMGM) and Jacques Mahillon (UCL), «ISfinder». [En línea]. Disponible en: https://www-is.biotoul.fr/IS_Infos/1_3.php. [Accedido: 29-ene-2019].
- [87] A. P. Roberts *et al.*, «Revised nomenclature for transposable genetic elements», *Plasmid*, vol. 60, n.º 3, pp. 167-173, nov. 2008.
- [88] I. Sultan, S. Rahman, A. T. Jan, M. T. Siddiqui, A. H. Mondal, y Q. M. R. Haq, «Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective», *Front. Microbiol.*, vol. 9, 2018.
- [89] A. Giedraitienė, A. Vitkauskienė, R. Naginienė, y A. Pavilionis, «Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria», *Medicina (Kaunas)*, vol. 47, n.º 3, pp. 137-146, 2011.
- [90] R. P. Novick, «Plasmid incompatibility.», *Microbiol Rev*, vol. 51, n.º 4, pp. 381-395, dic. 1987.
- [91] A. Carattoli *et al.*, «In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing», *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 58, n.º 7, pp. 3895-3903, jul. 2014.
- [92] X. Wang, I. K. Jordan, y L. W. Mayer, «A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology», en *Molecular Medical Microbiology*, Elsevier, 2015, pp. 517-536.
- [93] F. C. Tenover *et al.*, «Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 33, n.º 9, pp. 2233-2239, sep. 1995.
- [94] L. Chui y V. Li, «Chapter 8 - Technical and Software Advances in Bacterial Pathogen Typing», en *Methods in Microbiology*, vol. 42, A. Sails y Y.-W. Tang, Eds. Academic Press, 2015, pp. 289-327.
- [95] E. J. Feil, B. C. Li, D. M. Aanensen, W. P. Hanage, y B. G. Spratt, «eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data», *J Bacteriol*, vol. 186, n.º 5, pp. 1518-1530, mar. 2004.
- [96] M. Pérez-Losada, P. Cabezas, E. Castro-Nallar, y K. A. Crandall, «Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology.», *Infection, Genetics and Evolution*, pp. 38-53, jun. 2013.
- [97] B. Rodríguez-Santiago y L. Armengol, «Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal», *Diagn Prenat*, vol. 23, n.º 2, pp. 56-66, abr. 2012.
- [98] F. Pasteran, L. J. Gonzalez, E. Albornoz, G. Bahr, A. J. Vila, y A. Corso, «Triton Hodge Test: Improved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 54, n.º 3, pp. 640-649, mar. 2016.
- [99] Clinical & Laboratory Standards Institute, «M100Ed29 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition», *Clinical & Laboratory Standards Institute*.

- [En línea]. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100-3/>. [Accedido: 11-ene-2019].
- [100] F. Pasteran *et al.*, «Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, n.º 6, pp. 1996-1998, jun. 2015.
- [101] F. Pasteran, N. Tijet, R. G. Melano, y A. Corso, «Simplified Protocol for Carba NP Test for Enhanced Detection of Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, n.º 12, pp. 3908-3911, dic. 2015.
- [102] F. Pasteran *et al.*, «Tigecycline and intravenous fosfomicin zone breakpoints equivalent to the EUCAST MIC criteria for Enterobacteriaceae», *J Infect Dev Ctries*, vol. 6, n.º 5, pp. 452-456, may 2012.
- [103] F. Pasteran *et al.*, «Emergence of genetically related NDM-1-producing *Providencia rettgeri* strains in Argentina», *J Glob Antimicrob Resist*, vol. 2, n.º 4, pp. 344-345, dic. 2014.
- [104] A. Carattoli, A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins, y E. J. Threlfall, «Identification of plasmids by PCR-based replicon typing», *J. Microbiol. Methods*, vol. 63, n.º 3, pp. 219-228, dic. 2005.
- [105] S. B. Hunter *et al.*, «Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, n.º 3, pp. 1045-1050, mar. 2005.
- [106] E. Zankari *et al.*, «Identification of acquired antimicrobial resistance genes», *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 67, n.º 11, pp. 2640-2644, nov. 2012.
- [107] R. Overbeek *et al.*, «The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST)», *Nucleic acids research*, vol. 42, n.º Database issue, pp. D206-D214, ene. 2014.
- [108] Nabil-Fareed Alikhan, «BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons | BMC Genomics | Full Text». [En línea]. Disponible en: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-402>. [Accedido: 16-abr-2019].
- [109] Liu C, Qin S, Xu H, «New Delhi Metallo- β -Lactamase 1 (NDM-1), the Dominant Carbapenemase Detected in Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* from Henan Province, China. - PubMed - NCBI». [En línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=10.1371%2Fjournal.pone.0135044>. [Accedido: 24-ene-2019].
- [110] N. Porres-Osante *et al.*, «First description of a blaVIM-2-carrying *Citrobacter freundii* isolate in Spain», *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 58, n.º 10, pp. 6331-6332, oct. 2014.
- [111] D. van Duin y Y. Doi, «The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae», *Virulence*, vol. 8, n.º 4, pp. 460-469, 19 2017.
- [112] A. Pérez I *et al.*, «[Presence of metallo beta-lactamases in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*]», *Rev Med Chil*, vol. 136, n.º 4, pp. 423-432, abr. 2008.
- [113] D. Martínez *et al.*, «KPC and VIM producing *Enterobacter cloacae* strain from a Hospital in Northeastern Venezuela», *Investigación Clínica*, vol. 56, n.º 2, pp. 182-187, jun. 2015.
- [114] H. S. Sader, M. Castanheira, R. E. Mendes, M. Toleman, T. R. Walsh, y R. N. Jones, «Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program», *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 25, n.º 1, pp. 57-61, ene. 2005.
- [115] R. E. Mendes, M. A. Toleman, J. Ribeiro, H. S. Sader, R. N. Jones, y T. R. Walsh, «Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac(6')-30/aac(6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, n.º 12, pp. 4693-4702, dic. 2004.
- [116] G. Fiorilli *et al.*, «Emergence of metallo-beta-lactamases in *Acinetobacter* spp clinical isolates from Argentina», *Rev Esp Quimioter*, vol. 23, n.º 2, pp. 100-102, jun. 2010.

- [117] F. Pasteran *et al.*, «Novel Variant (*bla*_{VIM-11}) of the Metallo-β-Lactamase *bla*_{VIM} Family in a GES-1 Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in Argentina», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, n.º 1, p. 474, ene. 2005.
- [118] Pagniez G Gutkind G., «[Prevalence of metallo-beta-lactamase in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* at a university hospital of Buenos Aires City]. - PubMed - NCBI». [En línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16784133>. [Accedido: 31-ene-2019].
- [119] N. Sherry y B. Howden, «Emerging Gram negative resistance to last-line antimicrobial agents fosfomicin, colistin and ceftazidime-avibactam – epidemiology, laboratory detection and treatment implications», *Expert Review of Anti-infective Therapy*, vol. 16, n.º 4, pp. 289-306, 2018.
- [120] T. F. Barlam *et al.*, «Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America», *Clinical Infectious Diseases*, vol. 62, n.º 10, pp. e51-e77, abr. 2016.
- [121] «VIHDA». [En línea]. Disponible en: <http://www.vihda.gov.ar/sitio%20vihdaii/vihda/estudiosprevalencia.asp>. [Accedido: 22-dic-2018].
- [122] R. M. Martin y M. A. Bachman, «Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*», *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 8, p. 4, 2018.
- [123] M. Dalben *et al.*, «Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature», *J. Hosp. Infect.*, vol. 70, n.º 1, pp. 7-14, sep. 2008.
- [124] Peirano, Matsumura, y Pitout, «Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp., 2008–2014 - Volume 24, Number 6—June 2018 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC». [En línea]. Disponible en: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/6/17-1648_article. [Accedido: 13-feb-2019].
- [125] «Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos 2010-2017.pdf». .
- [126] A. Baraniak *et al.*, «VIM/IMP carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Poland: epidemic *Enterobacter hormaechei* and *Klebsiella oxytoca* lineages», *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 73, n.º 10, pp. 2675-2681, jul. 2018.
- [127] R. DeVinney, Y. Matsumura, J. D. D. Pitout, G. Peirano, P. A. Bradford, y M. R. Motyl, «Genomic characterization of IMP and VIM carbapenemase-encoding transferable plasmids of Enterobacteriaceae», *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 73, n.º 11, pp. 3034-3038, ago. 2018.
- [128] D. De Belder *et al.*, «Novel class 1 Integrons and sequence types in VIM-2 and VIM-11-producing clinical strains of *Enterobacter cloacae*», *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 54, pp. 374-378, oct. 2017.

16 ANEXO

A1- Criterios de sospecha y detección de carbapenemasa en *Enterobacterales*

En Argentina la búsqueda de carbapenemasas se realiza de rutina a todos los aislamientos de bacilos Gram negativos con señales de alerta para estos mecanismos (por ej.: halos de inhibición de imipenem ≤ 22 mm, ERT I/R, etc). En las siguientes imágenes se muestra el algoritmo para búsqueda de carbapenemasas en *Enterobacterales*.

Criterios para sospecha de carbapenemasas en enterobacterias 2017



ETB: *Enterobacterales*. IMP: imipenem, MER: meropenem, FOX: cefoxitina, ETP: ertapenem, CZA: ceftazidima/avibactam, PTZ: piperacilina/tazobactam, FEP: cefepime. KES: grupo de microorganismos compuesto por *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp* y *Serratia spp*. Proteeae: grupo de microorganismos compuesto por los géneros *Proteus*, *Providencia* y *Morganella*.

Algoritmo para la detección de carbapenemasas en *Enterobacterales* 2017

Si prevalencia CPEs > 10%: buscar CPEs en placa 1aria.

Detección de CPEs

	KPC SME/IMI	MBL	NDM PROTEAE	OXA 48	OXA 163	CTXM (NON-CPE)	AmpC (NON-CPE)
BCT CNPd in house/TM	++	++	++/-	++/-	--	--	--
THT	++	++	++ <small>Proteus spp.: CLDE, Levine, etc</small>	++	++	--/+	--/+ <small>Falsos positivos en Kpn, Ent, Sma > Eco</small>
mCIM	++	++	+/-	++/I	--	--/+	--/+
DCM & inhibidores	BOR	EDTA	EDTA ó DIP	sin inhib. TEMO: R	sin inhib. TEMO: R, L, S	TAZ	CLOXA
K-SeT	KPC +	NDM + <small>Si negat. derivar para PCR IMP/VIM</small>		OXA 48+	OXA 163+		



CPEs: *Enterobacterales* productores de carbapenemasa, BCT: BlueCarba Test, CNPd: CarbaNP direct, THT: Triton Hodge Test, BOR: ácido fenil borónico, TAZ: tazobactam, CLOXA: cloxacilina, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, DIP: Ácido dipicolínico, mCIM: método de inactivación de carbapenemes modificado, DCM: discos combinados de meropenem – kit comercial.

A2 - Materiales y métodos

1. Preparación de la solución A del BlueCarba Test

Preparación y almacenamiento de Solución A (csp 100 ml):

(i) Disolver 40 miligramos de azul de bromotimol en 100 ml H₂O (concentración final 0.04%). Se encuentra disponible comercialmente solución de esta concentración.

(ii) Disolver en la solución anterior 1,6 miligramos de SO₄Zn (concentración final 0.1 mmol/L).

Nota 1: algunas sales de SO₄Zn son penta o hepta hidratadas, por lo que deberá realizar los ajustes de cálculos correspondientes para lograr la concentración 0.1 mM)

(iii) Medir pH de la solución y ajustar a pH a 7.0. CRITICO!!!

(iv) Filtrar con Millipore (opcional)

Conservar en heladera (extemporánea). Vigile que no se produzca decoloración espontánea hacia el verde/amarillo durante conservación.

Nota 2: Se puede utilizar la formulación farmacéutica de imipenem (frasco ampolla Tienam-MSD y/o genéricos). La Solución A + imipenem (3 mg/ml) tiene que ser preparado en el momento del ensayo. Sin embargo, pueden ser preparados de antemano los lotes de polvos de imipenem (pesadas) y mantenerse a 4°C durante 2 semanas o > de 2 meses en freezer, si no se añade la solución A.

Nota 3: recuerde incluir una cepa control positivo (cuyo genotipo de productor de carbapenemasa sea conocido, por ejemplo alguna perteneciente a la colección de cepas enviadas en el Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología) y un control negativo (cuyo genotipo de NO productor de carbapenemasa sea conocido, por ejemplo alguna perteneciente a la colección de cepas ATCC).

2. Preparación de las soluciones del CarbaNP Direct

A. Preparación y almacenamiento de Solución A (csp 100 ml):

(i) Disolver 50 miligramos de rojo fenol en 100 ml H₂O (concentración final 0,05%).

(ii) Disolver en la SN anterior 1,6 miligramos de SO₄Zn (concentración final 0.1 mmol/L).

Nota: si utiliza SO₄Zn·7H₂O (hepta hidratado) se requerirán 2,87 mg cada 100 ml para lograr la concentración 0,1 mM

(iii) Agregar en la SN anterior, 100 µl de Triton X-100 (concentración final 0,1% vol/vol).

Nota: la formación de espuma no afecta a la solución ni el desempeño posterior del test.

(iv) Medir pH de la SN y ajustar a pH a 7,8 – **CRITICO!**

Conservar en heladera (extemporánea) y al abrigo de la luz. Vigile que no se produzca decoloración espontánea hacia el naranja/amarillo durante conservación. Si ello ocurre, lleve a pH 7,8 con SN de álcali concentrada.

B. Preparación y almacenamiento de Solución B (csp 1 ml, equivalente a 10 reacciones o cepas): agregue a 1 ml de Solución A, unos 6 mg de imipenem puro (potencia 100%) o 12 mg de la formulación farmacéutica de imipenem/cilastatin (frasco ampolla Tienam-MSD y/o genéricos de potencia aprox. Del 50%) (concentración final 6 mg/ml de imipenem).

Nota: la Solución B tiene que ser preparada en el momento del ensayo. Podrá ser conservada en heladera a 4°C hasta 3-5 días. Se deberá verificar la integridad del imipenem de la solución B más allá de las 24 horas de su preparación con respectivos controles positivo y negativo. No se

recomienda preparar menos de 1 ml de Solución B ya que la pesada equivalente podría estar asociada con errores de magnitud considerable.

Tabla A1. Cebadores utilizados para la amplificación de genes de resistencia y entorno genético.

Gen amplificado	Secuencia 5' a 3'	Referencia	TA
5'-CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	Levesque C y col.	53
3'-CS	TCA GGT CAA GTC TGC TT	AACH 39: 185-91, 1995	55
<i>sul 1</i>	GTG CTG TCG AAC CTT CA	Levesque C y col. AACH 39: 185-91, 1995	50
<i>int11-F</i>	ATC ATC GTC GTA GAG ACG TCG G	Reyes et al. JAC	55
<i>int11-R</i>	GTC AAG GTT CTG GAC CAG TTG C	51:317-321 (2003)	
<i>tniC</i>	GCA TCT CTG CGA AGA ACT CG	Toleman, AAC, 51:2636-8.2007	55
16S-Plus	AGG AGG TGA TCC AAC CGC A	Greisen y col. JCM	55
16S-Minus	AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT	32:335-351, 1994	
IMP-R	CCG CCT TGT TAG AAA TTA G	Servicio Antimicrobianos	50
IMP-F	TCG TTT GAA GAA GTT AAC G		
VIM-F	AGT GGT GAG TAT CCG ACA G	Servicio Antimicrobianos	57
VIM-R	GTC TCC ACG CAC TTT CAT		
NDM-F	AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC	Servicio Antimicrobianos	50
NDM-R	GGC GTA GTG CTC AGT GTC		
CTX-Mu F	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT	Pagani, et al, JCM 41(9):4264-4269, 2003	52
CTX-Mu R	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA		
CTX-M-2 F	CGG AAT TCA TGA TGA CTC AGA GCA TTC G	Servicio Antimicrobianos	59
CTX-M-2 R	GCT CTA GAT TAT TGC ATC AGA AAC CGT G		
PER-2-plus	GTA GTA TCA GCC CAA TCC CC	Servicio Antimicrobianos	55
PER-2-minus	CCA ATA AAG GCC GTC CAT CA		
PER 6 F	GCC CTG ATG ATC TGG AGC CTT	Alejandro Petroni (Noviembre 2014)	
PER 1-578F	GGC CTG ACG ATC TGG AAC CTT		
PER U1-8 R	TAA CCG CTs TGG TCC TGT GGT		
TEM F	TTG GGT GCA CGA GTG GGT TA	Arlet and Philippon, FEMS Microbiol Lett 19:19-26, 1991	
TEM R	TAA TTG TTG CCG GGA AGC TA		
SHV F	TCG GGC CGC GTA GGC ATG AT	Arlet and Philippon, FEMS Microbiol Lett 19:19-26, 1991	59
SHV R	AGC AGG GCG ACA ATC CCG CG		

qnrB F	CCG ACC TGA GCG GCA CTG A	Alejandro Petroni	55
qnrB R	CGC TCC ATG AGC AAC GAT GCC T	(Agosto 2006)	
qnrS F	ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA	Gay et al. CID	43 297-304, 2006
qnrS R	TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC		
aac-cr-F	GCT CTT GGA AGC GGG GAC GAA A	Servicio Antimicrobianos	55
aac-cr-R	GAA CCA TGT ACA CGG CTG GAC CGT A		
aac(6')-Ib F	GCT CTT GGA AGC GGG GAC GAA T	Alejandro Petroni	55
aac(6')-Ib R	GAA CCA TGT ACA CGG CTG GAC CGT C	(Agosto 2006)	
aacA53 F	GCG TCA GTG ACA AAG ATC CA	Servicio Antimicrobianos	

TA: Temperatura de *annealing*

Tabla A2: Cebadores para la clasificación de plásmidos según el grupo de Incompatibilidad (Inc).

	Primer	Secuencia 5' a 3'	Sitio objetivo	Tamaño del Amplicon (bp)
MPX-1	HI1 FW	GGA GCG ATG GAT TAC TTC AGT AC	parA-parB	471
	HI1 RV	TGC CGT TTC ACC TCG TGA GTA		
	HI2 FW	TTT CTC CTG AGT CAC CTG TTA ACA C	iterons	644
	HI2 RV	GGC TCA CTA CCG TTG TCA TCC T		
	I1 FW	CGA AAG CCG GAC GGC AGA A	RNAI	139
	I1 RV	TCG TCG TTC CGC CAA GTT CGT		
MPX-2	X FW	AAC CTT AGA GGC TAT TTA AGT TGC TGA T	ori y	376
	X RV	TGA GAG TCA ATT TTT ATC TCA TGT TTT AGC		
	L/M FW	GGA TGA AAA CTA TCA GCA TCT GAA G	repA,B,C	785
	L/M RV	CTG CAG GGG CGA TTC TTT AGG		
	N FW	GTC TAA CGA GCT TAC CGA AG	repA	559
	N RV	GTT TCA ACT CTG CCA AGT TC		
MPX-3	FIA FW	CCA TGC TGG TTC TAG AGA AGG TG	iterons	462
	FIA RV	GTA TAT CCT TAC TGG CTT CCG CAG		
	FIB FW	GGA GTT CTG ACA CAC GAT TTT CTG	repA	702
	FIB RV	CTC CCG TCG CTT CAG GGC ATT		
	W FW	CCT AAG AAC AAC AAA GCC CCC G	repA	242
	W RV	GGT GCG CGG CAT AGA ACC GT		
MPX-4	Y FW	AAT TCA AAC AAC ACT GTG CAG CCT G	repA	765
	Y RV	GCG AGA ATG GAC GAT TAC AAA ACT TT		
	P FW	CTA TGG CCC TGC AAA CGC GCC AGA AA	iterons	534
	P RV	TCA CGC GCC AGG GCG CAG CC		
	FIC FW	GTG AAC TGG CAG ATG AGG AAG G	repA2	262
	FIC RV	TTC TCC TCG TCG CCA AAC TAG AT		
MPX-5	A/C FW	GAG AAC CAA AGA CAA AGA CCT GGA	repA	465
	A/C RV	ACG ACA AAC CTG AAT TGC CTC CTT		
	T FW	TTG GCC TGT TTG TGC CTA AAC CAT	repA	750
	T RV	CGT TGA TTA CAC TTA GCT TTG GAC		
	FIIS FW	CTG TCG TAA GCT GAT GGC	repA	270
	FIIS RV	CTC TGC CAC AAA CTT CAG C		

Simples	FrepB FW	TGA TCG TTT AAG GAA TTT TG	RNAI/repA	270
	FrepB RV	GAA GAT CAG TCA CAC CAT CC		
Simples	K/B FW	GCG GTC CGG AAA GCC AGA AAA C	RNAI	160
	K RV	TCT TTC ACG AGC CCG CCA AA		
Simples	B/O RV	TCT GCG TTC CGC CAA GTT CGA	RNAI	159

Carattoli, A. 2005; García-Fernández, A. 2008.

Tabla A3. Cebadores utilizados en el esquema MLST de *E. cloacae*

Gen amplificado	Secuencia 5' a 3'
dnaA F2	AYA ACC CGC TGT TCC TBT ATG GCG GCA C
dnaA R	KGC CAG CGC CAT CGC CAT CTG ACG CGG
fusA F2	TCG CGT TCG TTA ACA AAA TGG ACC GTA T
fusA R2	TCG CCA GAC GGC CCA GAG CCA GAC CCA T
gyrB F	TCG ACG AAG CGC TCG CGG GTC ACT GTA A
gyrB R	GCA GAA CCG CCC GCG GAG TCC CCT TCC A
leuS F2	GAT CAR CTS CCG GTK ATC CTG CCG GAA G
leuS R	ATA GCC GCA ATT GCG GTA TTG AAG GTC T
pyrG F	AYC CBG AYG TBA TTG CRC AYM AGG CGA T
pyrG R	GCR CGR ATY TCV CCC TSH TCG TCC CAG C
rplB F	GTA AAC CGA CAT CTC CGG GTC GTC GCC A
rplB R	ACC TTT GGT CTG AAC GCC CCA CGG AGT T
rpoB F	AAA AAC GTA TTC GTA AGG ATT TTG GTA A
rpoB R2	CCA GCA GAT CCA GGC TCA GCT CCA TGT T

Miyoshi-Akiyama *et al.* PLoS ONE 8(6): e66358

B - Resultados Capítulo I y II

Tabla B1. Sensibilidad a los antimicrobianos de los enterobacteriales portadores de *bla*_{IMP-8} por difusión en agar y dilución en agar.

Nº Aislamiento	AMK (mm.)	Int.	AMK (µg/ml)	Int.	ATM (mm.)	Int.	ATM (µg/ml)	Int.	CIP (mm.)	Int.	CIP (µg/ml)	Int.	COL (µg/ml)	Int.	FOS (mm.)	Int.	FOS (µg/ml)	Int.	GEN (mm.)	Int.	GEN (µg/ml)	Int.	MNO (mm.)	Int.	MNO (µg/ml)	Int.	NAL (mm.)	Int.	NAL (µg/ml)	Int.	TGC (mm.)	Int.	TGC (µg/ml)	Int.
CFA-M19020	22	S	4	S	30	S	2	S	19	R	1	R	0,5	S	30	S	0,5	S	10	R	16	R	23	S	0,5	S	19	S	8	S	28	S	0,12	S
CFA-M19031	21	S	4	S	23	S	4	S	17	R	1	R	0,5	S	31	S	0,5	S	12	R	16	R	22	S	0,5	S	16	I	8	S	24	S	0,12	S
CFR-M19571	18	S	4	S	36	S	0,25	S	6	R	128	R	0,5	S	32	S	≤0,25	S	6	R	128	R	6	R	≥64	R	6	R	≥64	R	16	R	2	I
CFR-M19802	22	S	2	S	21	S	32	R	12	R	16	R	0,5	S	32	S	≤0,25	S	6	R	0,25	S	14	I	4	S	6	R	8	S	26	S	0,25	S
CFR-M13281	7	R	128	R	7	R	256	R	14	R	2	R	0,5	S	32	S	0,5	S	7	R	64	R	23	S	0,5	S	6	R	≥64	R	23	S	0,12	S
ECO-M15732	18	S	8	S	30	S	0,12	S	16	R	2	R	0,5	S	30	S	0,25	S	20	S	0,5	S	20	S	1	S	16	I	16	S	24	S	0,12	S
ECO-M17431	23	S	2	S	28	S	≤0,06	S	30	S	0,016	S	1	S	28	S	1	S	22	S	0,5	S	22	S	0,5	S	25	S	2	S	25	S	0,12	S
KOX-M13063	16	I	32	I	8	R	256	R	10	R	8	R	0,5	S	22	S	8	S	11	R	16	R	16	S	8	I	6	R	≥64	R	21	S	1	S
SMA-M15888	24	S	2	S	36	S	0,12	S	33	S	0,12	S	≥128	R	30	S	4	S	24	S	0,5	S	20	S	4	S	33	S	2	S	24	S	1	S
EAE-M17109	19	S	16	S	25	S	32	R	7	R	16	R	≥128	R	21	S	16	S	6	R	≥128	R	19	S	2	S	6	R	≥64	R	21	S	0,5	S
ROR-M17614	20	S	4	S	11	R	128	R	25	I	0,25	S	0,5	S	22	S	32	S	13	I	8	I	22	S	0,5	S	21	S	4	S	26	S	0,25	S
ECL-M9921	16	I	16	S	12	R	64	R	18	R	1	R	≥128	R	18	S	64	R	14	I	16	R	20	S	1	S	19	S	8	S	23	S	0,25	S
ECL-M13280	16	I	32	I	13	R	128	R	17	R	2	R	0,5	S	22	S	8	S	9	R	8	I	21	S	1	S	17	I	16	S	21	S	0,5	S
ECL-M13624	18	S	16	S	10	R	256	R	18	R	1	R	0,5	S	36	S	≤0,25	S	6	R	128	R	14	I	4	S	16	I	16	S	22	S	0,5	S
ECL-M13795	15	I	32	I	34	S	0,12	S	20	R	1	R	0,5	S	8	R	256	R	17	S	4	S	19	S	2	S	6	R	≥64	R	23	S	0,5	S
ECL-M17212	24	S	1	S	33	S	≤0,06	S	35	S	0,016	S	1	S	24	S	8	S	20	S	0,25	S	18	S	1	S	26	S	2	S	22	S	0,25	S
ECL-M17324	22	S	2	S	34	S	≤0,06	S	18	R	2	R	1	S	35	S	≤0,25	S	21	S	0,25	S	18	S	2	S	12	R	32	R	21	S	0,5	S
ECL-M19340	23	S	4	S	16	R	32	R	22	I	1	R	0,5	S	28	S	8	S	22	S	16	R	13	I	8	I	16	I	16	S	26	S	0,12	S
ECL-M19671	21	S	8	S	32	S	0,25	S	6	R	128	R	0,5	S	18	S	32	S	23	S	0,25	S	21	S	2	S	6	R	≥64	R	23	S	0,5	S
ECL-M19783	23	S	2	S	31	S	≤0,06	S	23	I	1	R	0,5	S	32	S	≤0,25	S	8	R	32	R	22	S	1	S	20	S	4	S	22	S	0,25	S
ECL-M19846	20	S	2	S	19	I	≤0,06	S	6	R	1	R	0,5	S	22	S	8	S	11	R	32	R	16	S	1	S	6	R	8	S	22	S	0,25	S
ECL-M21030	17	S	4	S	11	R	128	R	17	R	2	R	0,5	S	28	S	4	S	6	R	64	R	19	S	1	S	14	I	16	S	23	S	0,25	S
ECL-M21059	17	S	8	S	33	S	0,12	S	24	I	0,5	I	0,5	S	36	S	≤0,25	S	6	R	128	R	18	S	1	S	15	I	16	S	22	S	0,25	S

KPN-M15885	23	S	2	S	33	S	≤0,06	S	30	S	0,03	S	0,5	S	18	S	8	S	22	S	0,5	S	10	R	8	I	24	S	4	S	23	S	0,25	S
KPN-M17343	24	S	4	S	35	S	8	I	31	S	≥128	R	1	S	22	S	32	S	22	S	0,25	S	24	S	2	S	25	S	≥64	R	25	S	0,5	S
KPN-M19368	22	S	4	S	22	S	4	S	16	R	2	R	1	S	24	S	2	S	7	R	64	R	18	S	2	S	17	I	16	S	20	I	0,5	S
KPN-M19434	19	S	2	S	36	S	≤0,06	S	21	R	1	R	0,5	S	24	S	8	S	10	R	32	R	21	S	1	S	17	I	16	S	24	S	0,25	S
KPN-M19708	26	S	2	S	36	S	≤0,06	S	23	I	1	R	0,5	S	22	S	8	S	15	S	32	R	23	S	1	S	20	S	16	S	24	S	0,25	S
KPN-M19709	19	S	8	S	12	R	64	R	17	R	2	R	0,5	S	28	S	≤0,25	S	6	R	128	R	20	S	2	S	18	I	16	S	22	S	0,5	S
KPN-M19711	23	S	2	S	35	S	≤0,06	S	21	R	1	R	0,5	S	20	S	8	S	10	R	32	R	22	S	1	S	19	S	8	S	22	S	0,25	S
KPN-M19723	23	S	2	S	30	S	0,25	S	18	R	8	R	0,5	S	22	S	8	S	9	R	32	R	15	I	16	R	12	R	32	R	19	I	2	I
KPN-M19732	23	S	16	S	22	S	≤0,06	S	20	R	0,016	S	0,5	S	20	S	32	S	19	S	2	S	13	I	16	R	14	I	4	S	26	S	0,25	S
KPN-M19805	24	S	2	S	35	S	≤0,06	S	21	R	1	R	0,5	S	20	S	16	S	6	R	32	R	19	S	1	S	15	I	≥64	R	21	S	0,25	S
KPN-M19810	22	S	2	S	35	S	≤0,06	S	21	R	1	R	1	S	22	S	8	S	10	R	32	R	19	S	1	S	16	I	16	S	22	S	0,25	S
KPN-M19917	22	S	2	S	34	S	≤0,06	S	19	R	2	R	0,5	S	15	R	128	R	10	R	64	R	17	S	2	S	15	I	16	S	21	S	0,5	S
KPN-M19918	24	S	2	S	35	S	≤0,06	S	22	I	1	R	1	S	22	S	8	S	14	I	64	R	20	S	1	S	18	I	8	S	24	S	0,25	S
KPN-M19931	23	S	8	S	32	S	≤0,06	S	20	R	2	R	0,5	S	14	R	256	R	9	R	32	R	20	S	2	S	15	I	16	S	22	S	0,5	S
KPN-M21002	18	S	4	S	39	S	≤0,06	S	18	R	2	R	0,5	S	6	R	128	R	7	R	32	R	18	S	2	S	17	I	16	S	22	S	0,5	S
KPN-M21064	23	S	2	S	12	R	32	R	11	R	8	R	128	R	16	I	64	R	22	S	0,5	S	16	S	2	S	6	R	≥64	R	23	S	0,5	S
KPN-M21105	18	S	8	S	13	R	128	R	21	R	1	R	0,5	S	26	S	≤0,25	S	6	R	128	R	20	S	1	S	18	I	16	S	24	S	0,25	S

AMK: amicacina, ATM: aztreonam, CIP: ciprofloxacina, COL: colistin, FOS: fosfomicina, GEN: gentamicina, MNO: minociclina, NAL: ácido nalidíxico, TGC: tigeciclina. mm.: milímetros, Int.: interpretación, R: resistente, I: intermedio, S: sensibles. KPN: *K. pneumoniae*, ECL: *E. cloacae*, CFR: *C. freundii*, CFA: *C. farmeri*, ECO: *E. coli*, EAE: *E. aerogenes*, KOX: *K. oxytoca*, ROR: *R. ornithinolytica*, SMA: *S. marcescens*.

Tabla B2. Sensibilidad a los carbapenemes de los enterobacteriales portadores de *bla*_{IMP-8} por difusión en agar y microdilución.

Nº Aislamiento	IMI (mm.)	Int.	IMI (µg/ml)	Int.	MER (mm.)	Int.	MER (µg/ml)	Int.
CFA-M19020	19	R	4	R	22	I	2	I
CFA-M19031	19	R	8	R	22	I	4	R
CFR-M19571	15	R	4	R	18	R	2	I
CFR-M19802	22	I	2	I	23	S	2	I
CFR-M13281	21	I	4	R	21	I	1	S
ECO-M15732	17	R	4	R	21	I	4	R
ECO-M17431	21	I	1	S	21	I	1	S
KOX-M13063	21	I	8	R	22	I	8	R
SMA-M15888	19	R	32	R	20	I	4	R
EAE-M17109	16	R	2	I	16	R	2	I
ROR-M17614	19	R	8	R	18	R	4	R
ECL-M9921	17	R	2	I	15	R	1	S
ECL-M13280	19	R	8	R	20	I	4	R
ECL-M13624	17	R	8	R	19	R	4	R
ECL-M13795	20	I	4	R	21	I	2	I
ECL-M17212	17	R	4	R	18	R	2	I
ECL-M17324	20	I	4	R	22	I	8	R
ECL-M19340	20	I	4	R	22	I	2	I
ECL-M19671	15	R	16	R	20	I	4	R
ECL-M19783	17	R	16	R	20	I	8	R
ECL-M19846	20	I	4	R	20	I	4	R
ECL-M21030	17	R	8	R	20	I	8	R
ECL-M21059	18	R	4	R	21	I	2	I
KPN-M15885	21	I	4	R	20	I	8	R
KPN-M17343	20	I	8	R	20	I	8	R
KPN-M19368	10	R	16	R	13	R	≥32	R
KPN-M19434	20	I	8	R	20	I	4	R
KPN-M19708	21	I	8	R	22	I	8	R
KPN-M19709	20	I	4	R	19	R	1	S
KPN-M19711	19	R	4	R	22	I	4	R
KPN-M19723	19	R	8	R	20	I	8	R
KPN-M19732	20	I	8	R	25	S	4	R
KPN-M19805	20	I	4	R	22	I	8	R
KPN-M19810	19	R	16	R	20	I	8	R
KPN-M19917	19	R	8	R	20	I	8	R
KPN-M19918	19	R	1	S	19	R	1	S
KPN-M19931	20	I	4	R	20	I	4	R
KPN-M21002	20	I	4	R	19	R	4	R
KPN-M21064	16	R	8	R	15	R	8	R
KPN-M21105	21	I	8	R	22	I	8	R

IMI: imipenem, MER: meropenem, mm.: milímetros, Int.: interpretación, R: resistente, I: intermedio, S: sensibles. KPN: *K. pneumoniae*, ECL: *E. cloacae*, CFR: *C. freundii*, CFA: *C. farmeri*, ECO: *E. coli*, EAE: *E. aerogenes*, KOX: *K. oxytoca*, ROR: *R. ornithinolytica*, SMA: *S. marcescens*.

Tabla B3. Enterobacteriales portadores de *bla*_{IMP-8} sospechosos de producir β -lactamasa de espectro extendido.

<u>Aislamiento</u>	<u>Sinergia AMC-ATM</u>	<u>BLEE +</u>
ECL-M9921	+	PER-2
KOX-M13063	+	PER-2
ECL-M13280	+	PER-2
CFR-M13281	+	PER-2
ECL-M13624	+	PER-2
ROR-M17614	+	-
CFA-M19020	+	-
CFA-M19031	+	-
ECL-M19340	+	SHV-12
KPN-M19709	+	PER-2
KPN-M19732	+	CTX-M
ECL-M19846	+	CTX-M
ECL-M21030	+	-
KPN-M21105	+	PER-2

AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, ATM: aztreonam, BLEE: β -lactamasa de espectro extendido, ECL: *E. cloacae*, KOX: *K. oxytoca*, CFR: *C. freundii*, ROR: *R. ornithinolytica*, CFA: *C. farmeri*, KPN: *K. pneumoniae*.

B4. Nomenclatura de aminoglucósidos

Para referirnos a los determinantes de resistentes a los aminoglucósidos se utilizó la nomenclatura propuesta por Novick *et al.* (1976), la misma que sugiere INTEGRALL. Los números arábigos deben usarse para designar diferentes subdivisiones.

Familia	Gen	Sinónimo	Enzima
Aminoglucósido Acetiltransferasas	<i>aacA</i>	<i>aac(6')</i>	6'-N-acetiltransferasa
	<i>aacB</i>	<i>aac(2')</i>	2'-N-acetiltransferasa
	<i>aacC</i>	<i>aac(3)</i>	3'-N-acetiltransferasa
Aminoglucósido Adeniltransferasas	<i>aadA</i>	<i>ant(3'')</i>	aminoglucósido-3''- adeniltransferasa
	<i>aadB</i>	<i>ant(2'')</i>	aminoglucósido-2''- adeniltransferasa
Aminoglucósido Fosforiltransferasas	<i>aphA</i>	<i>aph(3')</i>	aminoglucósido-3'- fosforiltransferasa

B5. Genes de resistencia hallados por secuenciación masiva de ADN genómico

B5.1 Aislamiento KPN-M19434

Gen	Producto	Clasificación
acrA	Sistema de expulsión de múltiples fármacos AcrAB-ToIC, componente de fusión de membrana AcrA	
mdtK	Transportador no caracterizado YeeO	
YojI	Sistema de exportación sideróforo de tipo ABC	
marA	proteína MarA, Resistencia a múltiples antibióticos	
acrB	Sistema de expulsión de múltiples fármacos AcrAB-ToIC (tipo RND)	
emrB	Sistema de expulsión de múltiples fármacos EmrAB-OMF (tipo MFS)	
mdtB	Sistema de expulsión de múltiples fármacos MdtABC-ToIC (tipo RND)	
mdtA	Sistema de expulsión de múltiples fármacos MdtABC-ToIC, componente de fusión de membrana	
emrA	Sistema de expulsión de múltiples fármacos EmrAB-OMF, componente de fusión de membrana	
patA	Putincina aminotransferasa	Bomba de eflujo que confiere resistencia a los antibióticos.
mdtH	Proteína de resistencia a múltiples fármacos MdtH	
mdtC	Sistema de expulsión de múltiples fármacos MdtABC-ToIC (RND type)	
mdtG	Proteína de resistencia a múltiples fármacos MdtG	
emrD	Bomba de eflujo multidroga EmrD (de tipo MFS)	
msbA	Lípido A exportación permeasa / ATP que se une a la proteína MsbA	
vgaC	Proteína VapB (antitoxina a VapC)	
mdtD	Transportador no caracterizado MdtD de la superfamilia de facilitadores principales (MFS)	
mdtL	MdtL de la bomba de salida de múltiples fármacos (de tipo MFS)	
oqxA	Sistema de flujo RND, proteína de fusión de membrana.	
oqxB	Sistema de expulsión RND, transportador interno de membrana.	
mdfA	Bomba de eflujo multidroga MdfA/Cmr (de tipo MFS), amplio espectro	
CRP	Proteína del receptor de AMPc	
emrR	Regulador de resistencia multidrogas EmrR (MprA)	
robA	regulador transcripcional dual de unión a ADN Rob	
H-NS	Proteína de unión a ADN	
soxR	Activador transcripcional sensible a redox SoxR	
cpxA	Histidina quinasa sensor de cobre	Genes involucrados en la modulación de bombas de eflujo de antibióticos
cpxR	Regulador de respuesta del sistema de dos componentes de sensor de cobre CpxR	
baeR	Regulador de respuesta BaeR	
marR	Proteína de resistencia a antibióticos múltiples	
acrR	Regulador transcripcional del operón acrAB, AcrR	
ramR	Regulador transcripcional, familia AcrR	
ramA	Activador transcripcional RamA	Modulación de genes permeabilidad a los antibióticos
soxS	regulador transcripcional dual de unión a ADN	
QnrB10	Proteína de resistencia a la quinolona QnrB10	
AAC(6')-Ib-cr	aminoglucósido 6'-N-acetil transferasa tipo Ib-cr	
parE	subunidad B de ADN topoisomerasa IV	Gen de resistencia a fluoroquinolona
parC	subunidad A de ADN topoisomerasa IV	
gyrA	Subunidad A de DNA girasa	
gyrB	Subunidad B de DNA girasa	

AAC(6')-Ib	Aminoglucósido N(6')-acetiltransferasa => AAC(6')-Ib/AAC(6')-II	Gen de resistencia a aminoglucósidos
aadA	Aminoglucósido 3"-nucleotidiltransferasa => ANT(3")-Ia (familia AadA)	Gen de resistencia a aminoglucósidos, enzima inactivadora de antibióticos
AAC(3)-IIa	Aminoglucósido N(3)-acetiltransferasa => AAC(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X	Gen de resistencia a aminoglucósidos, enzima inactivadora de antibióticos
IMP-47	β -lactamasa Subclase B1 => Familia IMP	
OXA-1	β -lactamasa clase D => Familia OXA	Enzima de inactivación de antibióticos β -lactámicos
TEM-1	β -lactamasa clase A => Familia TEM	
SHV-11	β -lactamasa clase A => familia SHV	
dfrA8	Dihidrofolato reductasa	Gen de resistencia a trimetoprim
mphA	Macrólido 2'-fosfotransferasa => familia Mph (A)	Enzima de inactivación antibiótica, gen de resistencia a macrólidos
EreA2	Eritromicina esterasa => Familia EreA	Enzima de inactivación antibiótica, gen de resistencia a macrólidos
FosA5	proteína de resistencia a Fosfomicina	Enzima de inactivación antibiótica, gen de resistencia a la fosfomicina
GlpT	Transportador de glicerol-3-fosfato	Gen de resistencia a la fosfomicina
UhpT	transportador de hexosa fosfato	Variante o mutante. Gen de resistencia a la fosfomicina
murA	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa	Variante o mutante. Gen de resistencia a la fosfomicina
arr-3	rifampicina ADP-ribosil transferasa	Enzima inactivadora de antibióticos, gen de resistencia a rifampicina
rpoB	Subunidad beta de la ARN polimerasa	Variante o mutante. Gen de resistencia a rifampicina.
sul1	Dihidropteroato sintasa tipo 2 proteína de resistencia a la sulfonamida	Gen de resistencia a sulfonamida
folP	Dihidropteroato sintasa	Variante o mutante. Gen de resistencia a sulfonamida
leuO	LysR family transcriptional activator LeuO	Gen modulación de flujo de salida de antibiótico. Gen de resistencia a sulfonamida
bacA	Undecaprenil-difosfatasa	Gen que confiere resistencia a los antibióticos mediante bypass molecular, gen de resistencia a los antibióticos peptídicos
nfsA	NADPH nitroreductasa insensible al oxígeno	Variante o mutante. Gen de resistencia a la nitrofuratoína.
catB3	Cloranfenicol O-acetiltransferasa => familia CatB	Enzima de inactivación antibiótica, gen de resistencia al cloranfenicol
alaS	Alanil-ARNt sintetasa	Gen de resistencia a aminocumarina
cysB	Regulador transcripcional	Gen de resistencia a aminocumarina
OmpK35	porina de membrana externa OmpF	
OmpK36	porina de membrana externa OmpC	
OmpK36	porina de membrana externa OmpS	Gen que modula la permeabilidad al antibiótico

B5.2 Aislamiento ECL-M9921

Gen	Producto	Clasificación
acrA	Sistema de expulsión de múltiples fármacos AcrAB-ToIC, componente de fusión de membrana AcrA	
mdtK	Transportador no caracterizado YeeO	
YojI	Sistema de exportación sideróforo de tipo ABC	
marA	proteína MarA, Resistencia a múltiples antibióticos	
acrB	Sistema de expulsión de múltiples fármacos AcrAB-ToIC (tipo RND)	
emrB	Sistema de expulsión de múltiples fármacos EmrAB-OMF (tipo MFS)	
mdtB	Sistema de expulsión de múltiples fármacos MdtABC-ToIC (tipo RND)	
acrF	Sistema de expulsión de múltiples fármacos AcrAB-ToIC (tipo RND)	

acrF	Sistema de expulsión de múltiples fármacos AcrAB-ToIC (tipo RND)	
mdtA	Sistema de expulsión de múltiples fármacos MdtABC-ToIC, componente de fusión de membrana	
emrA	Sistema de expulsión de múltiples fármacos EmrAB-OMF, componente de fusión de membrana	
patA	Putincina aminotransferasa	
mdtH	Proteína de resistencia a múltiples fármacos MdtH	Bomba de eflujo que confiere resistencia a los antibióticos.
mdtC	Sistema de expulsión de múltiples fármacos MdtABC-ToIC (RND type)	
mdtG	Proteína de resistencia a múltiples fármacos MdtG	
emrD	Bomba de eflujo multidroga EmrD (de tipo MFS)	
msbA	Lípido A exportación permeasa / ATP que se une a la proteína MsbA	
acrD	Sistema de expulsión de aminoglucósidos AcrAD-ToIC (tipo RND)	
mdfA	Bomba de eflujo multidroga MdfA / Cmr (de tipo MFS), amplio espectro	
CRP	Proteína del receptor de AMPc	
baeS	Histidina quinasa proteína sensora	
robA	regulador transcripcional dual de unión a ADN Rob	
H-NS	Proteína de unión a ADN	
soxR	Activador transcripcional sensible a redox SoxR	Genes involucrados en la modulación de bombas de eflujo de antibióticos
cpxA	Histidina quinasa sensor de cobre	
cpxR	Regulador de respuesta del sistema de dos componentes de sensor de cobre CpxR	
baeR	Regulador de respuesta BaeR	
marR	Proteína de resistencia a antibióticos múltiples	
acrR	Regulador transcripcional del operón acrAB, AcrR	
ramA	Activador transcripcional RamA	Involucrado en la modulación de genes permeabilidad a los
soxS	regulador transcripcional dual de unión a ADN	
QnrB10	Proteína de resistencia a la quinolona QnrB10	
AAC(6')-Ib-cr	aminoglucósido 6'-N-acetil transferasa tipo Ib-cr	
parE	subunidad B de ADN topoisomerasa IV	Gen de resistencia a fluoroquinolona
parC	subunidad A de ADN topoisomerasa IV	
gyrA	Subunidad A de DNA girasa	
gyrB	Subunidad B de DNA girasa	
AAC(6')-Ib	Aminoglucósido N (6') - acetiltransferasa => AAC (6') - Ib / AAC (6') - II	Gen de resistencia a aminoglucósidos
aadA	Aminoglucósido 3"-nucleotidiltransferasa => ANT (3") - Ia (familia AadA)	Gen de resistencia a aminoglucósidos, enzima inactivadora de antibióticos
IMP-47	β -lactamasa Subclase B1 => Familia IMP	
OXA-9	β -lactamasa clase D	Enzima de inactivación de antibióticos β -lactámicos
PER-2	β -lactamasa de espectro extendido (clase A) => Familia PER	
TEM-1	β -lactamasa clase A => Familia TEM	
sul1	Dihidropteroato sintasa tipo 2 proteína de resistencia a la sulfonamida	Gen de resistencia a sulfonamida
dfrA8	Dihidrofolato reductasa	Gen de resistencia a trimetoprim
mphA	Macrólido 2'-fosfotransferasa => familia Mph (A)	Enzima de inactivación antibiótica, gen de resistencia a macrólidos
EreA2	Eritromicina esterasa => Familia EreA	Enzima de inactivación antibiótica, gen de resistencia a macrólidos
FosA2	proteína de resistencia a Fosfomicina	Enzima de inactivación antibiótica, gen de resistencia a la fosfomicina
GlpT	Transportador de glicerol-3-fosfato	Gen de resistencia a la fosfomicina
murA	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa	Variante o mutante. Gen de resistencia a la fosfomicina
rpoB	Subunidad beta de la ARN polimerasa	Variante o mutante. Gen de resistencia a rifampicina.
catI	Cloranfenicol O-acetiltransferasa => Familia CatA1 / CatA4	Enzima de inactivación antibiótica, gen de resistencia al cloranfenicol
ACT-28	β -lactamasa de clase C => Familia ACT/MIR	Enzima de inactivación antibiótica
folP	Dihidropteroato sintasa	Variante o mutante. Gen de resistencia a sulfonamida
leuO	LysR family transcriptional activator LeuO	Gen modulación de flujo de salida de antibiótico. Gen de resistencia a sulfonamida
bacA	Undecaprenil-difosfatasa	Gen que confiere resistencia a los antibióticos mediante bypass molecular, gen de resistencia a los antibióticos peptídicos
nfsA	NADPH nitroreductasa insensible al oxígeno	Variante o mutante. Gen de resistencia a la nitrofuratoína.
UhpT	transportador de hexosa fosfato	Variante o mutante. Gen de resistencia a la fosfomicina
alaS	Alanil-ARNt sintetasa	Gen de resistencia a aminocumarina
cysB	Regulador transcripcional	Gen de resistencia a aminocumarina

Tabla B6. Sensibilidad a los antimicrobianos de los *E. cloacae* portadores de *bla_{VIM}* por difusión en agar.

Nº Aislamiento	AMK (mm.)	Int.	ATM (mm.)	Int.	CIP (mm.)	Int.	FOS 50 (mm.)	Int.	GEN (mm.)	Int.	MNO (mm.)	Int.	NAL (mm.)	Int.	TGC (mm.)	Int.	IMI (mm.)	Int.	MER (mm.)	Int.
ECL-M13532	14	R	35	S	6	R	19	S	18	S	20	S	6	R	21	S	18	R	18	R
ECL-M13768	24	S	8	R	6	R	26	S	22	S	17	S	6	R	21	S	22	I	23	S
ECL-M13832	24	S	26	S	15	R	21	S	21	S	14	I	6	R	20	I	21	I	22	I
TC-ECL-M13832	27	S	40	S	38	S	32	S	22	S	18	S	23	S	28	S	24	S	28	S
ECL-M15008	6	R	8	R	6	R	11	R	6	R	10	R	6	R	18	I	20	I	18	R
ECL-M15428	16	I	10	R	24	I	16	S	12	R	19	S	21	S	23	S	24	S	26	S
ECL-M15736	23	S	13	R	6	R	16	S	6	R	21	S	6	R	22	S	19	R	17	R

AMK: amicacina, ATM: aztreonam, CIP: ciprofloxacina, FOS50: fosfomicina, GEN: gentamicina, MNO: minociclina, NAL: ácido nalidíxico, TGC: tigeciclina, IMI: imipenem, MER: meropenem. mm.: milímetros, Int.: interpretación, R: resistente, I: intermedio, S: sensibles. ECL: *E. cloacae*, TC-ECL-M13832: transconjugante de ECL-M13832.

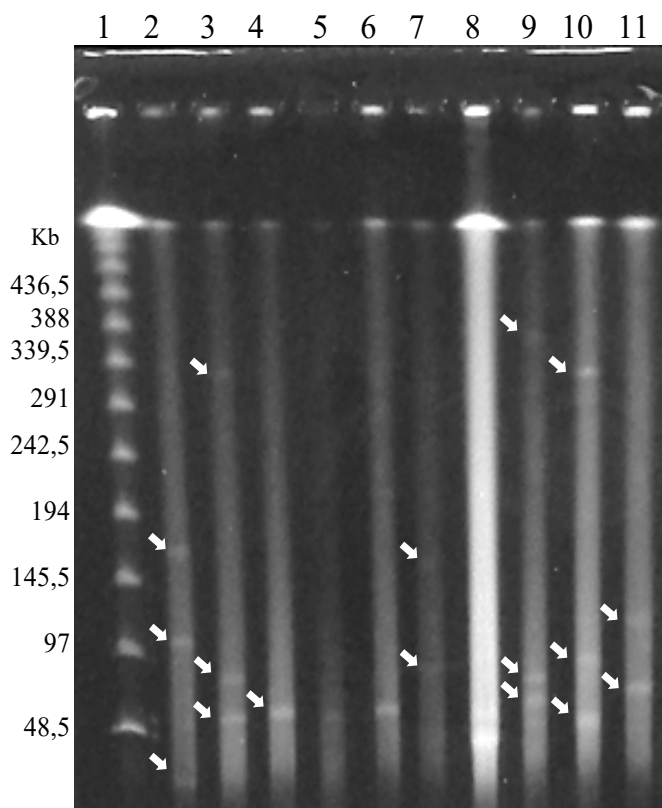


Figura B1. Nucleasa S1-PFGE de los *E. cloacae* portadores de *bla_{VIM}*. Calle 1: λ Ladder, calle 2: ECL-M13532, calle 3: ECL-M13832, calle 4: TC-ECL-M13832, calle 5: aislamiento no estudiado, calle 6: aislamiento no estudiado, calle 7: ECL-M13768, calle 8: aislamiento no estudiado, calle 9: ECL-M15008, calle 10: ECL-M15428, calle 11: ECL-M15736. Las flechas blancas en el gel de PFGE señalan los plásmidos hallados en cada aislamiento.

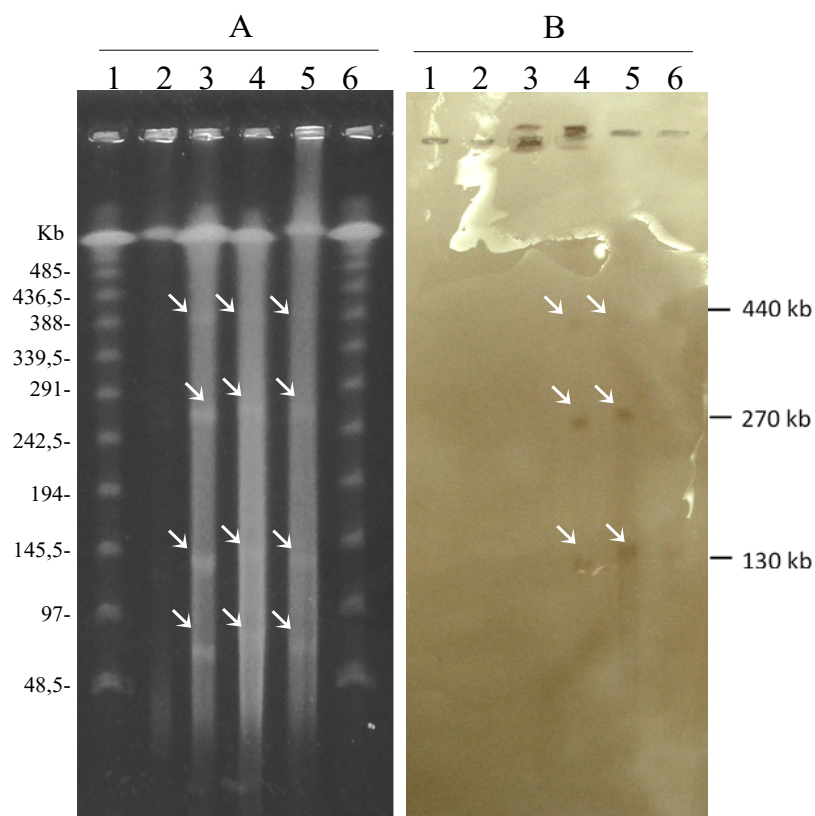


Figura B2. Restricción con nucleasa S1 y Southern Blot. (A) Nucleasa S1-PFGE y (B) Southern Blot con sonda *bla_{VIM}*. Calle 1: λ Ladder, calle 2: ECL-M15736 sin digerir, calle 3: ECL-M15736 digerido con 0,5 U S1, calle 4: ECL-M15736 digerido con 1 U S1, calle 5: ECL-M15736 digerido con 2 U S1, calle 6: λ Ladder. Las flechas blancas en el gel de PFGE indican los plásmidos de diferente tamaño mientras que en la membrana del Southern Blot señalan la hibridación con la sonda *bla_{VIM}*.