



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magíster en Ciencias mención
Microbiología

**Entorno genético y localización del gen *bla*_{CTX-M} en cepas
de enterobacterias productoras de carbapenemasas
aisladas en hospitales chilenos.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en
Microbiología

SERGIO ALBERTO CARRASCO ANABALÓN
CONCEPCIÓN-CHILE
2017

Profesor Guía: Dra. Helia Bello Toledo
Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Investigación de Agentes Antimicrobianos (LIAA), Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dra. Helia Bello Toledo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dr. Gerardo González Rocha.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Gisela A. Riedel Molina.
Facultad de Medicina
Universidad de Concepción

Dra. Elena A. Uribe Pérez.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Víctor Campos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



A mi familia, pilar incondicional y fundamental en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada a través del proyecto FONDECYT 1130838 y Beca Magister Nacional CONICYT 2014-22141175.

Agradezco a cada uno de los académicos que conforman el Laboratorio de Investigación en Agentes Antimicrobianos (LIAA) por compartir sus conocimientos y ayudarme en mi formación científica. En especial, me gustaría agradecer a la Dra. Helia Bello y al Dr. Gerardo González-Rocha por su dedicación y buena voluntad en todo momento durante el desarrollo de esta tesis, y a su vez, sobre todo, por la confianza, interés y expectativas en mí desde el primer día que llegué a su laboratorio.

Quiero agradecer a cada uno de los integrantes que conforman la familia del LIAA, porque más de alguna vez fueron los artífices de sonrisas y momentos gratos en el día a día que compartí con ustedes. Quiero hacer especial mención a Alejandra, Fernanda, Julieta, Mario, y a las profesoras Celia y Mariana, puesto que en mayor o menor grado me ayudaron en el desarrollo de esta tesis.

También agradezco al personal del Dpto. de Microbiología, con mención especial a Evelyn, Sra. Angélica, Sra. Magda y Don Julio por su permanente disposición a ayudar en el desarrollo de diversas actividades. Quiero hacer especial mención a los alumnos de doctorado de la Facultad de Ciencias Biológicas Pamela Mendoza y Rodolfo Benítez, y también, a mis colegas del Laboratorio Central de Hospital Regional de Concepción, Néstor Herrera y Alejandro Montesinos, por su permanente disponibilidad de ayuda en el desarrollo de esta tesis.

Por último, agradezco a mi familia; padres y hermanas, por su confianza, paciencia, cariño e incondicionalidad, son el molde de lo que soy hoy como persona, por siempre, significaran todo en la vida para mí, a ustedes con mucho cariño les dedico esto.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xx
RESUMEN	xxi
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Resistencia antibiótica	1
1.2 Infecciones asociadas a la atención en salud y patógenos “ESCAPE”	3
1.3 Antibióticos β -lactámicos	6
1.4 Mecanismos de resistencia a β -lactámicos	9
1.4.1 Alteración del sitio blanco de acción	9
1.4.2 Trastornos de la permeabilidad y expulsión activa del antibiótico	9
1.4.3 Inactivación del antibiótico por hidrólisis.....	10
1.5 β -lactamasas del tipo CTX-M.....	16
1.5.1 Origen y clasificación de las enzimas CTX-M	17
1.5.2 Epidemiología de los genes <i>bla</i> _{CTX-M}	21
1.5.3 Movilización, plataformas genéticas de <i>bla</i> _{CTX-M} y co-selección de multirresistencia antibiótica	25
1.6 Resistencia a carbapenémicos en enterobacterias	31
1.6.1 Emergencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en Chile	32
1.7 Hipótesis	37
1.8 Objetivo general.....	38
1.9 Objetivos específicos	38
2. MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.1 Cepas bacterianas	39
2.2 Susceptibilidad de las cepas a los antibióticos	42

2.2.1	Antibiograma.....	42
2.2.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	42
2.3	Pruebas fenotípicas para la determinación de BLEE y carbapenemasas.....	43
2.3.1	Detección fenotípica de BLEE.....	43
2.3.2	Detección fenotípica de carbapenemasas.....	46
2.4	Técnicas moleculares	48
2.4.1	Extracción de ADN total	48
2.4.2	Pesquisa y determinación de variantes de genes <i>bla</i> _{CTX-M}	49
2.4.3	Pesquisa de genes productores de carbapenemasas	50
2.4.4	Determinación del entorno genético de <i>bla</i> _{CTX-M}	50
2.4.5	Extracción de ADN plasmídico y determinación de los perfiles plasmídicos....	52
2.4.6	Southern-Blot e Hibridación ADN-ADN	54
3.	RESULTADOS.....	57
3.1	Susceptibilidad de las cepas a los antibióticos.....	57
3.1.1	Antibiograma.....	57
3.1.2	Determinación de los niveles de resistencia a antibióticos β-lactámicos	63
3.2	Determinación fenotípica de producción de BLEE y carbapenemasas.....	65
3.3	Pesquisa de genes <i>bla</i> _{CTX-M}	70
3.4	Identificación de variantes de genes <i>bla</i> _{CTX-M}	70
3.5	Plataformas genéticas asociadas a <i>bla</i> _{CTX-M}	74
3.5.1	<i>Escherichia coli</i> UC327 (<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{KPC-2}).....	75
3.5.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> UC332 (<i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{KPC-2}).....	84
3.5.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> UC338 (<i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{KPC-2}).....	92
3.5.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> UC358 (<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{oxa-370}).....	94
3.5.5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> UC361 (<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{NDM-1}).....	96
3.5.6	<i>Klebsiella oxytoca</i> UC363 (<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{KPC-2}).....	99
3.6	Localización genética de genes <i>bla</i> _{CTX-M} y genes productores de carbapenemasas	100

3.6.1 Perfiles plasmidicos	100
3.6.2 Hibridación ADN-ADN	105
4. DISCUSIÓN	116
5. CONCLUSIONES	138
6. PROYECCIONES	139
7. REFERENCIAS	140
8. ANEXO	165



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Propiedades de los principales grupos de β -lactamasas de acuerdo a clasificación de Ambler y Bush/Jacoby.....	13
Tabla 1.2 Diferentes grupos y orígenes de las enzimas CTX-M	18
Tabla 2.1 Cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales de Chile entre los años 2012 y 2014 incluidas en el estudio	40
Tabla 3.1 Actividad antibacteriana de diferentes antibióticos sobre 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos. .	61
Tabla 3.2 Puntos de corte CLSI (2017) para interpretación de susceptibilidad (S), susceptibilidad intermedia (I) y resistencia (R) de diferentes antibióticos β -lactámicos mediante determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI).....	63
Tabla 3.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI: $\mu\text{g/ml}$) de antibióticos β -lactámicos en 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos.....	64
Tabla 3.4 Detección fenotípica de BLEE y carbapenemasas en 22 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasa KPC aisladas en hospitales chilenos	69
Tabla 3.5 Detección fenotípica de BLEE y carbapenemasas en cepas de <i>K. pneumoniae</i> UC358 (<i>bla</i> _{OXA-370}) y UC361 (<i>bla</i> _{NDM-1}) aisladas en hospitales chilenos....	69
Tabla 3.6 Detección fenotípica de BLEE y detección molecular mediante PCR de diferentes grupos de genes <i>bla</i> _{CTX-M} en 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en Chile.....	71
Tabla 3.7 Cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos portadoras de diferentes alelos de <i>bla</i> _{CTX-M}	72
Tabla 3.8 Cepas portadoras de <i>bla</i> _{CTX-M} seleccionadas para la determinación de su entorno genético.	75

Tabla 3.9 Tamaños estimativos de ADNpl obtenido de los diferentes perfiles plasmidicos resueltos mediante electroforesis convencional y PFGE de cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos.
..... 105

Tabla 3.10 Características de las sondas diseñadas para la hibridación ADN/ADN de genes *bla_{CTX-M}*. 106

Tabla 3.11 Tamaño (kb) de los plásmidos portadores de genes *bla_{CTX-M}* y genes productores de carbapenemasas en cepas de enterobacterias aisladas en hospitales chilenos..... 115



INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1** Estructura química de diferentes grupos de antibióticos β -lactámicos. 8
- Figura 1.2** Principales mecanismos de resistencia a β -lactámicos presentes en enterobacterias. El antibiótico A es capaz de atravesar la membrana externa bacteriana a través de una porina y ejerce su acción a nivel de PBP de membrana interna. El antibiótico B puede ingresar a la bacteria, sin embargo es expulsado desde el periplasma al exterior a través de una bomba de eflujo. El antibiótico C carece de proteína diana o porina de membrana para atravesar la membrana externa, por lo cual no puede ingresar a la célula bacteriana..... 11
- Figura 1.3** Diagrama de árbol que muestra los grupos de enzimas CTX-M y algunas de sus variantes genéticas más importantes. En naranja se encuentran las variantes más reportadas de cada grupo 19
- Figura 1.4** Distribución geográfica de las principales variantes enzimáticas de CTX-M en el mundo 20
- Figura 1.5** Variación de escenario de prevalencia de BLEE tipo CTX-M en el Mundo entre el año 2001 y 2012 22
- Figura 1.6** Estructura del Integrón complejo o inusual clase 1 InK283 de cepa de *K. pneumoniae* aislada en un hospital chileno..... 29
- Figura 1.7** Plataformas genéticas frecuentes asociadas a diferentes variantes de *bla*_{CTX-M}. A: *bla*_{CTX-M} asociado río arriba a secuencias de inserción *ISEcp1/ISEcp1-like* y río abajo a *IS903/IS903like*. B: *bla*_{CTX-M} asociado a *orf477/orf477-like*. C: *bla*_{CTX-M} asociado a integrones de clase 1 los cuales dentro de su estructura incluyen *ISEcp1*. D y E: *bla*_{CTX-M} asociado a integrones de clase 1 complejos-*ISCR1*. CS: segmentos conservados; *IntI*: gen de la integrasa, *qacE Δ 1*: gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario; *sul1*: gen de resistencia a sulfonamidas; 3'CS2: copia del extremo 3' conservado del integrón 30
- Figura 2.1** Test fenotípico para la determinación de BLEE. Placa 1: Disposición estratégica de los discos de C3G y AMC sobre el AMH. Placa 2: AMH suplementado con 250 μ g/mL de CLO. Flechas: Distorsión fenotípica o formación de “efecto huevo”,

resultado positivo para la producción de BLEE. Cepa *E. cloacae* UC186, productor de AmpC y CTX-M..... 45

Figura 2.2 Test de Hodge modificado (THM). Flecha: indica distorsión del halo de inhibición de la cepa reveladora, indicando positividad del test. Al centro, disco de MEM (10 µg). 1: *E. coli* UC327 (productora de KPC). 2: *E. coli* ATCC25922 (control negativo). 3: *K. pneumoniae* UC332 (productora de KPC). 4: *K.pneumoniae* BAA1005 (control positivo). 47

Figura 2.3 Test de disco de MEM (10 µg) combinado con EDTA/AFB para evidenciar y diferenciar la producción fenotípica de metalo-carbapenemasas y serin-carbapenemasas. EDTA 0.1 M, AFB 30 mg/mL. Cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA1005 (control positivo)..... 47

Figura 3.1 Porcentaje de susceptibilidad (verde), susceptibilidad intermedia (azul) y resistencia (rojo) antibiótica de 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos a diferentes antibióticos β-lactámicos determinado mediante antibiograma por método de difusión en agar. AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ac. clavulánico, TZP: piperacilina/tazobactam, ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CRO: ceftriaxona, CPD: cefpodoxima, CTX: cefotaxima, FEP: cefepime, IPM: imipenem, MEM: meropenem, ETP: ertapenem 58

Figura 3.2 Porcentajes de susceptibilidad (verde), susceptibilidad intermedia (azul) y resistencia (rojo) antibiótica de 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos a diferentes antibióticos determinado mediante antibiograma por método de difusión en agar. AMK: amikacina, GEN: gentamicina, NAL: ac. nalidíxico, CIP: ciprofloxacino, LEV: levofloxacino, SXT: trimetoprim/sulfametoxazol, TET: tetraciclina, CHL: cloranfenicol. 59

Figura 3.3 Test fenotípico de sinergia de doble disco para la detección de BLEE en cepas productora de KPC. Cepa de *K. pneumoniae* UC336 (*bla_{KPC}*). a) AMH, b) AMH más AFB (300 µg/mL). Discos de antibióticos: 1; CRO. 2; CTX, 3; CAZ. 4; CPD. 5; AMC. Flechas: Distorsión fenotípica o formación de “efecto huevo”, resultado positivo para la producción de BLEE.....65

Figura 3.4 Test fenotípico de sinergia de doble disco para la detección de BLEE en cepas productoras de. Cepa de *Klebsiella oxytoca* UC344 (*bla_{KPC}*). a) AMH, b) AMH más AFB (300 µg/mL). Discos de antibióticos: CRO, CTX, CAZ, CPD, AMC. Flechas: Distorsión fenotípica o formación de “efecto huevo”, resultado positivo para la producción de BLEE en ambas placas..... 66

Figura 3.5 A y B: Test fenotípico de sinergia de doble disco para la detección de BLEE en *K. pneumoniae* UC358 (*bla_{OXA-370}*). A) AMH, B) AMH más AFB (300 µg/mL). C: Test fenotípico de disco combinado para detección de carbapenemasas en *K. pneumoniae* UC358 (*bla_{OXA-370}*). MEM: meropenem, AFB: MEM + AFB, EDTA: MEM + EDTA, EDTA+AFB: MEM+EDTA+AFB..... 66

Figura 3.6 A y B: Test fenotípico de sinergia de doble disco para la detección de BLEE en *K. pneumoniae* UC361 (*bla_{NDM-1}*). A) AMH, B) AMH más AFB (300 µg/mL).

C: Test fenotípico de disco combinado para detección de carbapenemasas en *K. pneumoniae* UC361 (*bla_{NDM-1}*). MEM: meropenem, AFB: MEM + AFB, EDTA: MEM + EDTA, EDTA+AFB: MEM+EDTA+AFB 67

Figura 3.7 Test fenotípicos para la detección de carbapenemasas. A: Test de Hodge modificado, 1: Disco revelador de MEM, KPC: cepa control positivo *K. pneumoniae* ATCC BAA1005 (*bla_{KPC}*), UC361 y UC362: cepas de *K. pneumoniae* incluidas en el estudio, UC363: cepa de *K. oxytoca* incluida en el estudio. B: Test de disco de MEM combinado con EDTA-AFB, disco 1) MEM, 2) MEM+EDTA, 3) MEM+AFB, 4) MEM+EDTA+AFB, Cepa de *K. pneumoniae* UC338 (*bla_{KPC}*). 67

Figura 3.8 Alineamiento de secuencias nucleotídicas extraídas de Genbank. KU200455: *K. oxytoca* UC363 (*bla_{CTX-M-3}*) analizada en esta tesis. Y10278.1: *E. cloacae* (*bla_{CTX-M-3}*) y AY044436.1: *E. coli* (*bla_{CTX-M-15}*) secuencias de referencia de Lahey. En rojo sitios de diferencia. Posición 789 (subrayado y negrita) diferencia nucleotídica que genera diferencia aminoacídica entre *bla_{CTX-M-3}* y *bla_{CTX-M-15}*. 73

Figura 3.9 Alineamientos de secuencias aminoacídicas extraídas de Genbank. KU200455: *K. oxytoca* UC363 (*bla_{CTX-M-3}*) analizada en esta tesis. Y10278: *E. cloacae* (*bla_{CTX-M-3}*) y AY0444361: *E. coli* (*bla_{CTX-M-15}*) secuencias de referencia de Lahey. En rojo, subrayado y en negrita sitio de diferencia en posición 243; diferencia aminoacídica

que genera diferencia entre *bla*_{CTX-M-3} y *bla*_{CTX-M-15} (sustitución de ácido aspártico (D) por glicina (G)). 74

Figura 3.10 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-15} en cepas de *E. coli* UC327, *K. pneumoniae* UC358, UC361 y de *bla*_{CTX-M-3} en cepa de *K. oxytoca* UC363. A) Asociación de los genes *bla*_{CTX-M} e *ISEcp1* (1730 pb). B) Asociación de los genes *bla*_{CTX-M} y *orf477* (461 pb). UC231: Control negativo, ADN genómico cepa *E. coli* J53. 1 kb: Marcador de tamaño molecular OGeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). M: Marcador de tamaño molecular 100 pb DNA Ladder Ready-Ladder (Invitrogen)..... 76

Figura 3.11 Plataforma genética de *bla*_{CTX-M-15} en cepa de *E. coli* UC327 productora de carbapenemasa KPC-2 aislada en un hospital chileno. P₁: sitio promotor expresión de *tnpA* de *ISEcp1*, P₂: sitio promotor expresión de *bla*_{CTX-M-15}. 48 pb: Región espaciadora entre *ISEcp1* y *bla*_{CTX-M-15}. 46 pb: Región conservada de plataformas genéticas de genes *bla*_{KLUC} en cepas del género *Kluyvera*. RII y RID: secuencias repetidas invertidas izquierda y derecha respectivamente. Tamaños no escalados..... 77

Figura 3.12 Alineamientos de secuencias nucleotídicas de plataformas genéticas de *bla*_{CTX-M-15} extraídas de Genbank; KU748582: Cepa UC327 *E. coli* caracterizada en esta tesis. CP006662.2: *K. pneumoniae*. LN794248.1: *Salmonella enterica*. KJ406378: *Shigella sonnei*. JX423832.1: *Enterobacter cloacae*. Sombreado verde: Secuencia correspondiente a *ISEcp1*, rojo: *bla*_{CTX-M-15}, azul: *orf477*, sin sombreado: Secuencias intergénicas..... 78

Figura 3.13 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-2} en cepas de *K. pneumoniae* UC332 y UC338. A) Asociación de *bla*_{CTX-M} e *ISCR1* (1309 pb). B) Asociación de *ISCR1* y *sul1* (1974 pb). UC244: Cepa control positivo ambas asociaciones; ADN genómico de *Proteus mirabilis*. Negativo: Cepa control negativo, ADN genómico de *E. coli* J53. Blanco: Control de mezcla (sin ADN). 1 kb: Marcador de tamaño molecular OGeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific) 85

Figura 3.14 Determinación de tamaño molecular de las zonas variables del integrón clase 1 portado en cepas de *K. pneumoniae* UC332 y UC338. Obtención de productos

de PCR utilizando partidores HS458/HS459 y CASS1/CASS2. UC44: Control positivo, ADN genómico cepa *Proteus mirabilis*. 1 kb: Marcador de tamaño molecular OGeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific) 86

Figura 3.15 Integrón caracterizado de cepa *K. pneumoniae* UC332 productora de carbapenemasa KPC-2 aislada en un hospital chileno. 5' SC: segmento conservado 5' del integrón clase 1, 3' SC: segmento conservado 3' del integrón clase 1, Pi: promotor integrasa, Pc: promotor *cassettes*, P2: segundo promotor *cassettes* genéticos del integrón clase 1. ●: sitio *attI*. Tamaños no escalados. 87

Figura 3.16 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-2} de cepas de *K. pneumoniae* UC332 y UC338. Asociación de *orfF/ISCR1* (3259 pb). UC231: Cepa control negativo, *E. coli* J53. Blanco: Control de mezcla (sin ADN). 1kb: Marcador de tamaño molecular OGeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific) 88

Figura 3.17 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-2} de cepas de *K. pneumoniae* UC332 y UC338. A) Asociación de *bla*_{CTX-M}/*qacE*Δ1 con partidores SC1/SC2. B) Asociación de los genes *qacE*Δ1/*sul1* con partidores SC2/Sul1. UC231: Control negativo, ADN genómico cepa *E. coli* J53. UC44: Control positivo, ADN genómico cepa *Proteus mirabilis*. Blanco: Control de mezcla (sin ADN). 1kb: Marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 90

Figura 3.18 Plataforma genética de *bla*_{CTX-M-2} en cepa de *K. pneumoniae* UC332 productora de carbapenemasa KPC-2 aislada en un hospital chileno. 5' SC: segmento conservado 5' del integrón clase 1, 3' SC: segmento conservado 3' del integrón clase 1, 3' SC2: copia segmento conservado 3' del integrón clase 1, Pi: promotor integrasa del integrón clase 1, Pc: promotor *cassettes* genéticos del integrón, P2: segundo promotor *cassettes* genéticos del integrón clase 1, ●: sitio *attI*, 26 pb: región reconocimiento de *ISCR1* para el proceso de recombinación, Zona 1: segmento nucleotídico conservado similar al encontrado en *K. ascorbata*. Tamaños no escalados. 91

Figura 3.19 Plataforma genética de *bla*_{CTX-M-2} en la cepa de *K. pneumoniae* UC338 productora de carbapenemasa KPC-2 aislada en un hospital chileno. 5' SC: segmento conservado 5' del integrón clase 1, 3' SC: segmento conservado 3' del integrón clase

1, 3' SC2: copia segmento conservado 3' del integrón clase 1, Pi: promotor integrasa del integrón clase 1, Pc: promotor *cassettes* genéticos del integrón, P2: segundo promotor *cassettes* genéticos del integrón clase 1. Tamaños no escalados. 93

Figura 3.20 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-15} en cepas de *E. coli* UC327, *K. pneumoniae* UC358, UC361 y de *bla*_{CTX-M-3} en cepa de *K. oxytoca* UC363. Pesquisa de IS26 (558 pb). Blanco: control de mezcla, UC231: Cepa control negativo, *Escherichia coli* J53. Ø: Carriles vacíos. 100 pb: Marcador de tamaño molecular 100 bp DNA Ladder Ready (Invitrogen). 95

Figura 3.21 Plataforma genética de *bla*_{CTX-M-15} en cepa de *K. pneumoniae* UC358 productora de carbapenemasa OXA-370 aislada en un hospital chileno. Flechas (→) indican dirección de la transcripción de los diversos promotores; *tnpR*: promotor truncado de la resolvasa de *Tn3-like*, *tnpA*: promotor truncado de la transposasa de *Tn3-like*, P1: sitio promotor expresión de *tnpA* de *ISEcp1*, P2: sitio promotor expresión de *bla*_{CTX-M-15}. 46 pb: Región espaciadora entre *bla*_{CTX-M-15} y el elemento *orf477*. Tamaños no escalados. 96

Figura 3.22 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-15} en cepas de *E. coli* UC327, *K. pneumoniae*, UC358, UC361 y de *bla*_{CTX-M-3} en cepa de *K. oxytoca* UC363. Amplificación de *ISEcp1* con partidores *ISEcp1-F* *ISEcp1-R*. K-12: ADN genómico cepa control negativo *E. coli* J53. UC-332: *K. pneumoniae bla*_{CTX-M-2} utilizada como control negativo. 1 Kb: Marcador de tamaño molecular OGeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). 97

Figura 3.23 Plataforma genética de *bla*_{CTX-M-15} en cepa de *K. pneumoniae* UC361 productora de carbapenemasa NDM-1 aislada en un hospital chileno. Flechas (→) indican dirección de la transcripción de los diversos promotores. P2: sitio promotor expresión de *bla*_{CTX-M-15}. 48 y 46 pb corresponden a las regiones espaciadoras entre los elementos genéticos graficados. Tamaños no escalados. 98

Figura 3.24 Plataforma genética de *bla*_{CTX-M-3} en cepa de *K. pneumoniae* UC363 productora de carbapenemasa KPC-2 aislada en un hospital chileno. Flechas (→) indican dirección de la transcripción de los diversos promotores, P1: sitio promotor de la expresión de *tnpA* de *ISEcp1*. P2: sitio promotor expresión de *bla*_{CTX-M-3}. 48 y 46 pb

corresponden a las regiones espaciadoras entre los elementos genéticos graficados.
Tamaños no escalados. 99

Figura 3.25 Perfiles plasmidicos de cepas productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos obtenido mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). Cultivo A: cultivo convencional en caldo LB. Cultivo B: cultivo convencional en caldo LB suplementado con subsalicilato de bismuto. Extracciones realizadas con kit PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep. SB: Marcador de tamaño molecular, ADN digerido con *XbaI* de *Salmonella* serotipo Braenderup. UC167: Marcador de tamaño molecular, ADNpl de cepa *E. coli* V517. UC327: *E. coli* (*bla_{KPC-2}*, *bla_{CTX-M-15}*). UC332 y UC338: *K. pneumoniae* (*bla_{KPC-2}*, *bla_{CTX-M-2}*). 1kb: Marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). UC358: *K. pneumoniae* (*bla_{oxa-370}*, *bla_{CTX-M-15}*). UC361: *K. pneumoniae* (*bla_{NDM-1}*, *bla_{CTX-M-15}*). Cepa UC363: *K. oxytoca* (*bla_{KPC-2}*, *bla_{CTX-M-3}*).
..... 101

Figura 3.26 Perfiles plasmidicos de cepas productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos obtenidos mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). Extracciones realizadas con kit PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep. UC327: *E. coli* (*bla_{KPC-2}*, *bla_{CTX-M-15}*). UC338: *K. pneumoniae* (*bla_{KPC-2}*, *bla_{CTX-M-2}*). UC358: *K. pneumoniae* (*bla_{oxa-370}*, *bla_{CTX-M-15}*). UC167: Marcador de tamaño molecular correspondiente a ADNpl de cepa *E. coli* V517. SB: Marcador de tamaño molecular correspondiente a ADN digerido con *XbaI* de *Salmonella* serotipo Braenderup. UC361: *K. pneumoniae* (*bla_{NDM-1}*, *bla_{CTX-M-15}*). Cepa UC363: *K. oxytoca* (*bla_{KPC-2}*, *bla_{CTX-M-3}*). Cepa UC231; *E. coli* J53 utilizada como receptora en experimento de conjugación. Cepa TUC363; *E. coli* (*bla_{CTX-M-3}*) transconjugante de cepa UC363
..... 102

Figura 3.27 Perfiles plasmidicos de cepas productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos obtenidos mediante electroforesis convencional. Cultivo A: cultivo convencional en caldo LB. Cultivo B: cultivo convencional en caldo LB suplementado con subsalicilato de bismuto. Extracción mediante kit PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep. UC327: *E. coli* (*bla_{KPC-2}*, *bla_{CTX-M-15}*). UC332 y UC338: *K. pneumoniae* (*bla_{KPC-2}*, *bla_{CTX-M-2}*). UC358: *K. pneumoniae* (*bla_{oxa-370}*, *bla_{CTX-M-15}*).

UC361: *K. pneumoniae* (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}). UC363: *K. oxytoca* (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-3}).
 1kb: Marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). UC167:
 Marcador de tamaño molecular correspondiente a ADNpl de cepa *E. coli* V517. Blanco:
 carril vacío 103

Figura 3.28 Perfiles plasmidicos de cepas productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos obtenidos mediante electroforesis convencional. Cultivo: cultivo convencional en caldo LB. Cultivo B: cultivo convencional en caldo LB suplementado con subsalicilato de bismuto. Extracciones realizadas con kit PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep. UC327: *E. coli* (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-15}). UC332 y UC338: *K. pneumoniae* (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-2}). UC358: *K. pneumoniae* (*bla*_{oxa-370}, *bla*_{CTX-M-15}). UC361: *K. pneumoniae* (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}). UC363: *K. oxytoca* (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-3}). 1kb: Marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). UC167: Marcador de tamaño molecular correspondiente a ADNpl de cepa *E. coli* V517 104

Figura 3.29 Hibridación de ADNpl con sonda 1 (*bla*_{CTX-M-1}). Membrana correspondiente a perfil plasmídico obtenido en la Figura 3.25. Figuras A y B se muestran con diferente grado de contraste, editado con software UVI-1D. La Flecha (→) indica la altura de los pocillos de carga de las muestras. +: Control positivo de marcaje del kit comercial utilizado. D; Dot-blot con producto PCR de *bla*_{CTX-M-15}..... 108

Figura 3.30 Hibridación de ADNpl con sonda 2 (*bla*_{CTX-M-2}). Membrana correspondiente a perfil plasmídico obtenido en la Figura 3.25. Figuras A y B se muestran con diferente grado de contraste, editado con software UVI-1D. La Flecha (→) Indica la altura de los pocillos de carga de las muestras. +: Control positivo de marcaje del kit comercial utilizado. D; Dot-blot con producto PCR de *bla*_{CTX-M-2}..... 109

Figura 3.31 Perfiles plasmidicos y bandas de ADNpl hibridadas con sondas para la detección de genes *bla*_{CTX-M}. A: Perfil plasmídico cepa *E. coli* UC327 e hibridación [H] con sonda para *bla*_{CTX-M-1}. B: Perfil plasmídico cepa *K. oxytoca* UC-363 e hibridación [H] con sonda para *bla*_{CTX-M-1}. C: Perfil plasmídico cepa *K. pneumoniae* UC332 e

hibridación [H] con sonda para *bla*_{CTX-M-2}. D: Perfil plasmídico cepa *K. pneumoniae* UC338 e hibridación [H] con sonda para *bla*_{CTX-M-2}. SB: Marcador de tamaño molecular correspondiente a ADN digerido con *Xba*I de *Salmonella* serotipo Braenderup 110

Figura 3.32 Electroforesis en gel de agarosa de los producto de amplificación mediante PCR del gen *bla*_{CTX-M-1} utilizando como templado el ADNpl obtenido desde las bandas extraídas de los perfiles plasmidicos. UC168: ADN genómico cepa *K. pneumoniae* control positivo *bla*_{CTX-M-1}. UC327(A-D): Templado de ADNpl de cepa *E. coli* UC327; (A) banda de 331 kb y 322 kb; (B) banda de 254 kb; (C) banda de 184 kb; (D) banda de 4,2 kb. UC358: Templado de ADNpl de cepa *K. pneumoniae* UC358; (A) banda de 4,0 kb; (B) banda de 3,2 kb; (C) banda de 2,2 kb. UC363 (A) Templado de ADNpl extraído desde banda de 208 kb de cepa *K. oxytoca* UC363. Blanco: Mix de mezcla. 100 bp: Marcador de tamaño molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). 111

Figura 3.33 Electroforesis en gel de agarosa de los producto de amplificación mediante PCR del gen *bla*_{CTX-M-2} utilizando como templado el ADNpl obtenido desde las bandas extraídas de los perfiles plasmidicos. UC168: ADN genómico cepa *K. pneumoniae* control positivo gen *bla*_{CTX-M-2}. UC338: Cepa *K. pneumoniae* UC338; A: banda de 160 kb, B): banda de 80 kb. UC332: Templado de ADNpl extraído desde banda de 80 kb de cepa *K. pneumoniae* UC332. UC231: ADN genómico *E. coli* J53, utilizado como control negativo. Blanco: Mix de mezcla para el PCR sin ADN. 100 bp: Marcador de tamaño molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) Geles de electroforesis en agarosa al 1.5%. 112

Figura 3.34 Electroforesis en gel de agarosa de los producto de amplificación del gen *bla*_{KPC} utilizando como templado el ADNpl obtenido desde las bandas extraídas desde los perfiles plasmidicos. BA1005: Cepa *K. pneumoniae* control positivo *bla*_{KPC}. UC327: Templado de ADNpl de cepa *E. coli* UC327; (A) banda de 331 kb y 322 kb, (B) banda de 254 kb; (C) banda de 184 kb; (D) banda de 4,2 kb. UC338: Templado de ADNpl de cepa *K. pneumoniae* UC338; (A) banda de 160 kb; (B) banda de 80 kb. UC332 (A) Templado de ADNpl extraído desde banda de 80 kb de cepa *K. pneumoniae* UC332. UC363 (A) Templado de ADNpl extraído desde banda de 208 kb de cepa *K. oxytoca*

UC363. 1 kb: Marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) Geles de electroforesis en agarosa al 1%. 113

Figura 3.35 Electroforesis en gel de agarosa de los producto de amplificación mediante PCR del gen *bla_{OXA-370}* utilizando como templado el ADNpl obtenido desde las bandas extraídas del perfil plasmídico de la cepa *K. pneumoniae* UC358. Positivo: ADN genómico cepa UC358 (G). UC358: Templado de ADNpl de cepa *K. pneumoniae* UC358; (A) banda de 4,0 kb, (B) banda de 3,2 kb; (C) banda de 2,2 kb. Blanco: Mix de mezcla para el PCR sin ADN. 100 bp: Marcador de tamaño molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen)..... 114



ABREVIATURAS

ADNpl: ADN plasmídico

AFB: Ácido fenil borónico

AMH: Agar Müeller-Hinton

BGN: Bacilo Gram negativo

BLEE: β -lactamasa de espectro extendido

BrEt: Bromuro de etidio

C3G: Cefalosporinas de tercera generación

CBP: Carbapenemasa

CMI: Concentración mínima inhibitoria

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ERC: Enterobacteria resistente a carbapenémicos

EPC: Enterobacterias productoras de carbapenemasas

IAAS: Infecciones asociadas a la atención en salud

MDR: Multi-drogo resistente

MLST: Tipificación multilocus de secuencias

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDR: Pan-drogo-resistente

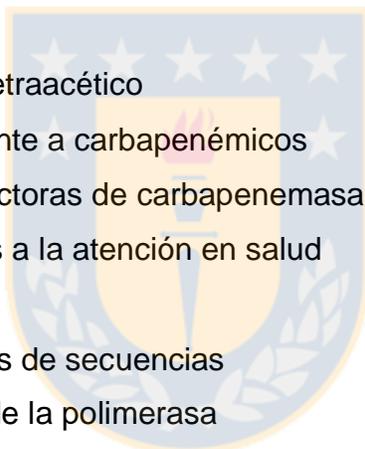
PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsado

SI: Secuencia de inserción.

ST: Secuencio-tipo

THM: Test de Hodge modificado.

XDR: Extremadamente resistente



RESUMEN

En Chile, las β -lactamasas de espectro extendido del tipo CTX-M corresponden al mecanismo más frecuente y relevante relacionado a resistencia a antibióticos β -lactámicos en cepas de enterobacterias. La exitosa diseminación de estas enzimas, está determinada por múltiples factores, siendo sus plataformas genéticas uno de los más importantes por promover su diseminación y por determinar fenotipos de multi-drogo resistencia. Por otra parte, la emergencia de carbapenemasas en enterobacterias a partir del 2012, se ha mantenido contenida a diferencia de otras zonas geográficas, sin embargo, los fenotipos asociados a la multi-drogo resistencia en estas cepas no se han dilucidado.

Con la finalidad de determinar si las plataformas genéticas de *bla*_{CTX-M} contribuyen a los fenotipos de multi-drogo resistencia que pueden presentar enterobacterias productoras de carbapenemasas, se estudiaron 24 cepas productoras de KPC, OXA-370 o NDM-1 aisladas en hospitales Chilenos entre 2012 y 2014. Fenotípicamente se determinó la susceptibilidad antimicrobiana y la producción de β -lactamasas, y molecularmente se determinó la prevalencia, variantes alélicas, plataformas y ubicación del gen *bla*_{CTX-M}

El 37,5% de las cepas presentó un perfil multi-drogo resistente y un 62,5% fue extremadamente resistente. De las 24 cepas, el 71 % es productora de β -lactamasas de espectro extendido, siendo el 54 % portadoras de *bla*_{CTX-M}, distinguiéndose las variantes *bla*_{CTX-M-2} (seis cepas), *bla*_{CTX-M-3} (una cepa) y *bla*_{CTX-M-15} (seis cepas). Las plataformas genéticas de *bla*_{CTX-M-3} y *bla*_{CTX-M-15} se asocian a la secuencias de inserción *ISEcp1* y no contribuyen a los fenotipos de multi-drogo resistencia, a diferencia de las plataformas genéticas de *bla*_{CTX-M-2}, asociadas a la secuencia de inserción *ISCR1*, formando parte de integrones clase 1 inusuales que si contribuyen a los fenotipos de multi-drogo resistencia. En tanto, *bla*_{CTX-M} no comparte ubicación con genes

productores de carbapenemasas, y se asocia a elementos genéticos móviles como plásmidos de diverso tamaño molecular.

Este trabajo constituye la primera descripción de prevalencia, ubicación y caracterización de plataformas genéticas de *bla*_{CTX-M} en cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo KPC, OXA-370 o NDM-1 en el mundo.



ABSTRACT

In Chile, extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M-type correspond to the most frequent and relevant mechanism of resistance to β -lactam antibiotics in strains of *Enterobacteriaceae*. The successful dissemination of these enzymes is due to multiple factors, their genetic platforms being one of the most important as well as for imposing multi-drug resistance phenotypes. On the other hand, the dissemination of carbapenemase-producing enterobacteria in Chile, after their emergence in 2012, has remained contained unlike what has happened in other geographical areas; the phenotypes associated with multi-drug resistance in these strains are not however have been elucidated.

In order to determine if the genetic platforms of *bla*_{CTX-M} contribute to the phenotypes of multi-drug-resistance present in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, 24 strains producing KPC, OXA-370 or NDM-1 isolated in Chilean hospitals between 2012 and 2014 were studied. Phenotypically, the antimicrobial susceptibility and the production of β -lactamases were determined; the prevalence, allele variants, platforms and location of the *bla*_{CTX-M} gene were elucidated employing molecular techniques.

The results showed that 37.5% of the strains had a multi-drug resistance profile and 62.5% were extremely resistant. Of the 24 strains, 71% are extended-spectrum- β -lactamase-producers, with 54% carrying *bla*_{CTX-M}, specifically *bla*_{CTX-M-2} variants (six strains), *bla*_{CTX-M-3} (one strain) and *bla*_{CTX-M-15} (six strains). The genetic platforms of *bla*_{CTX-M-3} and *bla*_{CTX-M-15} are associated with *ISEcp1* insertion sequences and don't contribute to a multi-drug resistance profile, unlike the *bla*_{CTX-M-2} genetic platforms, which are associated with *ISCR1* insertion sequence, forming part of an unusual class 1 integron that does contribute to a multi-drug resistance profile. Meanwhile, *bla*_{CTX-M} does not share a location with carbapenemase-producing genes, and is associated with mobile genetic elements such as plasmids of various molecular sizes. This work constitutes the first worldwide description of the prevalence, location and

characterization of the *bla*_{CTX-M} genetic platforms in KPC, OXA-370 and NDM-1 carbapenemase-producing enterobacteria strains.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Resistencia antibiótica

Los antibióticos o antibacterianos se definen como sustancias químicas sintetizadas de forma natural por organismos vivos, las cuales son capaces de matar directamente o inhibir el crecimiento y multiplicación de microorganismos (CDC, 2013). Desde la introducción de la Penicilina en 1943, hasta la fecha, han contribuido en la prevención y resolución de infecciones causadas por bacterias tanto en humanos como en animales (Suárez *et al.*, 2009). Al inicio, fueron considerados como las drogas “milagrosas” (APUA, 2014); sin embargo, al pasar los años apareció el concepto de resistencia antibiótica, siendo actualmente un grave problema en el ámbito extra e intrahospitalario por complicar el tratamiento de diversas infecciones comunes que hoy en día pueden resultar intratables y por consiguiente mortales cuando se asocian a bacterias resistentes (Cosgrove *et al.*, 2006; Tumbarello *et al.*, 2007; CDC, 2013).

La organización mundial de la salud (OMS) define la resistencia a los antibióticos como la resistencia de una bacteria a una droga antibiótica a la que originalmente era vulnerable, de tal forma, que los tratamientos convencionales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten, lo cual, incrementa el riesgo de propagación. En otras palabras, el antibiótico pierde la habilidad de frenar y controlar efectivamente el crecimiento bacteriano, por lo cual, la bacteria resistente continua multiplicándose en presencia de niveles terapéuticos del antibiótico suministrado (APUA, 2014).

La aparición de resistencia antibiótica, obedece un proceso natural y su origen se relaciona al concepto de exaptación (Martinez, 2012). Este concepto, señala que la mayoría de los genes de resistencia a antibióticos se encuentran localizados en el cromosoma de diferentes bacterias de manera estable y se relacionarían a procesos metabólicos, ya sea detoxificación celular, transporte de moléculas, entre otros, pero al movilizar dichos genes de su contexto original y al insertarse en un nuevo hospedador, este proceso tendría como objetivo asegurar la sobrevivencia

bacteriana, por consiguiente, en este caso, la adquisición de genes de resistencia desde otras bacterias tendría como objetivo la inhibición de la acción de un antibiótico (Blair *et al.*, 2015).

Por otro lado, el fenómeno de resistencia podría ocurrir cuando el ADN de los microorganismos se replica de “forma errónea” ocurriendo mutaciones genéticas, sin embargo, son cambios raros y espontáneos que ocurren a baja frecuencia (Martinez *et al.*, 2000). Algunas de estas mutaciones, así como la adquisición de genes foráneos por parte de una bacteria, pueden permitir producir potentes enzimas capaces de degradar antibióticos, desarrollar mecanismos de expulsión de antimicrobianos o modificaciones en la estructura blanco de estos, inhibiendo su acción sobre la célula bacteriana y haciéndose esta, resistente a determinados antibióticos (APUA, 2014; Blair *et al.*, 2015).

Si bien, el fenómeno de resistencia es un proceso natural, ha sido potenciado por el uso y abuso del consumo de antibióticos (Martinez *et al.*, 2000; Gelband *et al.*, 2015). En lo que respecta al tratamiento de infecciones humanas, entre el 20 % al 50 % de las prescripciones de antibióticos no son óptimas, ya sea porque no son necesarios, o bien porque se administran en dosis y duración incorrecta, lo que favorece el desarrollo y diseminación de bacterias resistentes, así como el aumento de la mortalidad de los pacientes que reciben un tratamiento empírico inadecuado (Tumbarello *et al.*, 2007; CDC., 2015; Gelband *et al.*, 2015). Otros factores altamente involucrados en el desarrollo de resistencia, son el uso excesivo de antibióticos en la industria alimentaria, la higiene y saneamiento deficiente (Laxminarayan *et al.*, 2013), el escaso desarrollo de nuevos antibióticos y también, en algunos países, la carencia de políticas relacionadas al control y vigilancia de las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), sobre todo aquellas relacionadas a patógenos que presentan algún grado de resistencia antimicrobiana como lo son el grupo ESCAPE (Boucher *et al.*, 2009).

1.2 Infecciones asociadas a la atención en salud y patógenos “ESCAPE”

La definición de infección intrahospitalaria, anteriormente definida como infección nosocomial, ha cambiado en la última década. Clásicamente se refiere a aquella infección que aparece después de 48-72 h de hospitalización y que no estaba presente, ni incubándose, en el momento del ingreso del paciente. También se incluyen infecciones que aparecen 72 h posterior al alta hospitalaria, inclusive extendiéndose hasta 30 días si se trata de infecciones asociadas a heridas quirúrgicas, o a un año, en el caso de implantes de material protésico (Zaragoza *et al.*, 2008). En la actualidad el concepto se ha ampliado, pasando a denominarse infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) y corresponde a infecciones productos de la atención en salud, que de manera no intencional, producen algún daño al paciente. Estas infecciones se asocian a varias causas incluyendo, pero no limitándose, al uso de dispositivos médicos, complicaciones postquirúrgicas, transmisión entre pacientes y trabajadores de la salud o como resultado del consumo frecuente de antibióticos (Potin *et al.*, 2016).

Entre los agentes causales de IAAS, si bien, se encuentran hongos, virus, parásitos y bacterias, estos últimos microorganismos son los agentes más frecuentemente aislados en diferentes cuadros infecciosos. La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas en enero del año 2009, publicó oficialmente un listado de patógenos asociados de forma frecuente a IAAS, pero que además, representan un grupo de microorganismos de difícil manejo, por estar asociado a resistencia a diversos antibióticos y quimioterapéuticos (Boucher *et al.*, 2009). Estos patógenos fueron agrupados dentro de la sigla ESKAPE; *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, *Klebsiella pneumoniae* productor de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y especies de *Enterobacter* spp., lo cual denota un grupo problemático de bacterias capaces de “escapar” a los efectos de los antimicrobianos de uso frecuente. En septiembre del

año 2009, se propuso el cambio de la sigla “ESKAPE” por “ESCAPE”, agrupando a *E. faecium*, *S. aureus*, *Clostridium difficile*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* (Peterson, 2009). Este cambio por un lado incluye a *C. difficile* como importante patógeno asociado a infecciones recurrentes en recintos hospitalarios y por otra parte incluye a la familia *Enterobacteriaceae*, no solamente abarcando *K. pneumoniae*, y especies de *Enterobacter* spp., sino también, a otros patógenos de importancia clínica que pueden expresar crecientes niveles de resistencia antibiótica, incluyendo la producción de BLEE, carbapenemasas (CBPs), resistencia a aminoglucósidos y niveles decrecientes de susceptibilidad frente a fluoroquinolonas (Boucher *et al.*, 2009; CDC, 2013; Ye *et al.*, 2014). En común, este grupo de patógenos están expuestos a ciertas condicionantes que favorecen el desarrollo y selección de cepas con multirresistencia antibiótica, por ejemplo; el incremento del uso de diferentes grupos de antibióticos es un factor que incide directamente en la selección de cepas multirresistentes, y por ende, al aumento de IAAS asociadas a patógenos que representan cierta dificultad en su erradicación, no solo de pacientes, si no que del ambiente nosocomial. Investigaciones han demostrado que bacterias resistentes tienen mayor letalidad y/o aumentan la estadía hospitalaria que sus contrapartes sensibles (Cosgrove, 2006; CDC, 2013), sumado que la gravedad de la infección puede depender si comienza con un agente resistente o si la resistencia es adquirida durante la evolución del cuadro infeccioso, existiendo asociación de peores resultados en esta última situación (Carmeli *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2014). En lo que respecta a la resistencia adquirida, vendría a estar condicionada por la existencia de elementos genéticos móviles que pueden ser adquiridos debido a la naturaleza “promiscua” de las bacterias y que portan genes de resistencia a diversos antimicrobianos. Este evento sobre todo se ha visto reflejado en el uso de terapias prolongadas con antibióticos, en específico lo que comprende cefalosporinas de tercera generación (C3G) (Paterson *et al.*, 2005, Tumbarello *et al.*, 2007), β -lactámicos ampliamente utilizados en el ámbito clínico por poseer una potente acción bactericida, amplio espectro de acción, características farmacocinéticas favorables, buena difusión tisular y escasos efectos adversos (Suárez *et al.*, 2009), sin embargo,

el uso excesivo a través del tiempo, sobre todo en el tratamiento de infecciones graves por bacilos Gram negativos (BGN), ha condicionado la selección de cepas resistentes, no sólo a β -lactámicos sino que también a otras familias o grupos de antibióticos.



1.3 Antibióticos β -lactámicos

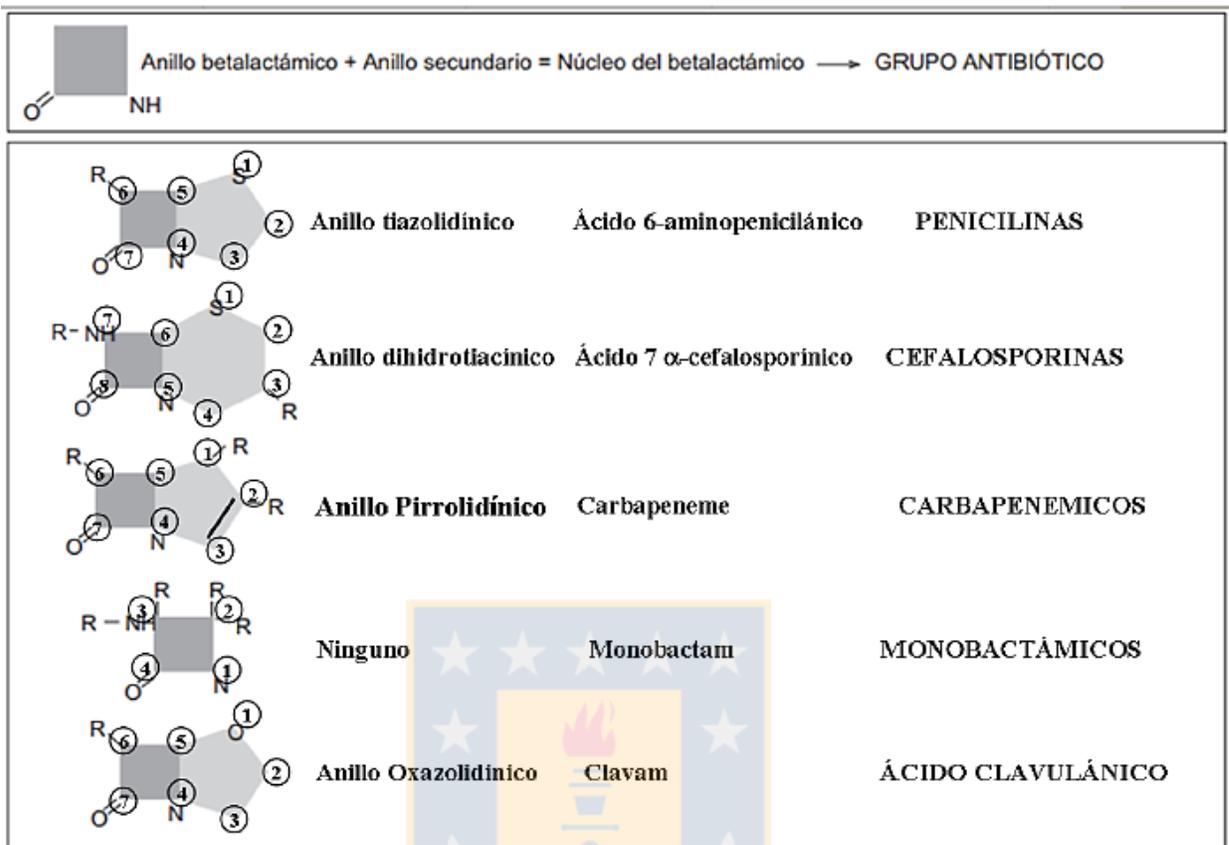
Los β -lactámicos son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la última etapa en la síntesis del peptidoglicán o mureína (Suárez *et al.*, 2009). Su mecanismo de acción está asociado a la similitud estereoquímica entre la D-alanil-D-alanina del UDP-NAcMur (intermediario en la producción de la malla de mureína) con la molécula de antibiótico. Esta similitud implica la inhibición de los dominios transpeptidasa y carboxi-peptidasa de las PBP (*penicillin binding protein*), provocando la detención de la síntesis de peptidoglicán, pero no la degradación de éste. El balance total es la pérdida de la continuidad de la malla de mureína, con el consiguiente estallido osmótico del microorganismo (Suárez *et al.*, 2009; Palzkill, 2013).

El primer antibiótico de esta clase es la penicilina, descubierta en 1928 por Alexander Fleming. Si bien se realizaron algunos ensayos preliminares, no fue hasta el año 1940 que se consigue purificar la molécula lo que permitió realizar los primeros trabajos en ratón y en humanos con el antibiótico purificado (Chain *et al.*, 1940). A partir de ese momento la familia de antibióticos β -lactámicos no ha parado de crecer como productos naturales, semi-sintéticos o en asociación a inhibidores, convirtiéndose en los antibióticos más prescritos tanto en atención primaria como en los hospitales (Suárez *et al.*, 2009).

De acuerdo a su estructura química se pueden describir cuatro clases de β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (Figura 1.1). Las penicilinas tienen como núcleo base al ácido 6-aminopenicilánico o grupo penam, el cual está compuesto por la fusión del anillo β -lactámico (común a toda la familia) y un anillo tiazolidínico. Las sustituciones en la cadena lateral del C6 permite modificar el espectro de acción y las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de estos compuestos (Palzkill, 2013).

El núcleo base de las cefalosporinas es el ácido 7 α -cefalosporánico o grupo cefem, el cual queda constituido por la fusión del anillo β -lactámico a un anillo dihidrotiacínico. Se generan así compuestos de 8 miembros pudiéndose introducir cadenas laterales en las posiciones 3 y 7 (Figura 1.1) que pueden cambiar las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de la molécula, espectro de acción y estabilidad ante determinadas enzimas inactivantes de β -lactámicos denominadas β -lactamasas (principalmente relacionado a C7) (Suárez *et al.*, 2009).

Los carbapenémicos fusionan el anillo β -lactámico a un anillo pirrolidínico, esto le otorga tres diferencias con los demás β -lactámicos: permite agregar cadenas laterales en C1 y C2; presenta un grupo metileno en lugar de sulfuro en la posición 1 y contiene un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 (Figura 1.1). Esto les otorga la mayor estabilidad dentro de los β -lactámicos frente a β -lactamasas sumado a un espectro mayor antimicrobiano. Finalmente, los monobactámicos consisten solamente en el anillo β -lactámico, y tienen como característica distintiva su alta estabilidad frente a las metalo- β -lactamasas, siendo su único representante disponible en clínica actualmente el aztreonam (Suárez *et al.*, 2009; Palzkill, 2013).



Fuente: Modificado de Suárez *et al.*, 2009. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **27**(2): Pag: 118.

Figura 1.1 Estructura química de diferentes grupos de antibióticos β-lactámicos.

1.4 Mecanismos de resistencia a β -lactámicos

Con la utilización desmedida de los antibióticos tanto en humanos como en animales y la eliminación al medio ambiente de enormes cantidades de restos de antibióticos derivados de dicho consumo, se ha ejercido una fuerte presión selectiva que ha permitido la evolución y agrupamiento de microorganismos con múltiples mecanismos de resistencia antimicrobiana (Laxminarayan *et al.*, 2013; Blair *et al.*, 2015; Gelband *et al.*, 2015). Entre los mecanismos de resistencia a compuestos β -lactámicos se reconocen tres principales:

1.4.1 Alteración del sitio blanco de acción

El blanco de acción de los antibióticos β -lactámicos radica en la inhibición de las PBPs, las cuales actúan en los diferentes procesos de formación del peptidoglicano y también en los procesos de división celular. A través de diferentes vías evolutivas, los microorganismos fueron capaces de ir produciendo variantes de PBPs que reemplazan las PBPs originales, o bien, modificando PBPs originales provocando que presenten una afinidad menor por el antibiótico y por consiguiente, generando cierto grado de resistencia frente a los β -lactámicos (Figura 1.2) (Adler *et al.*, 2016).

1.4.2 Trastornos de la permeabilidad y expulsión activa del antibiótico

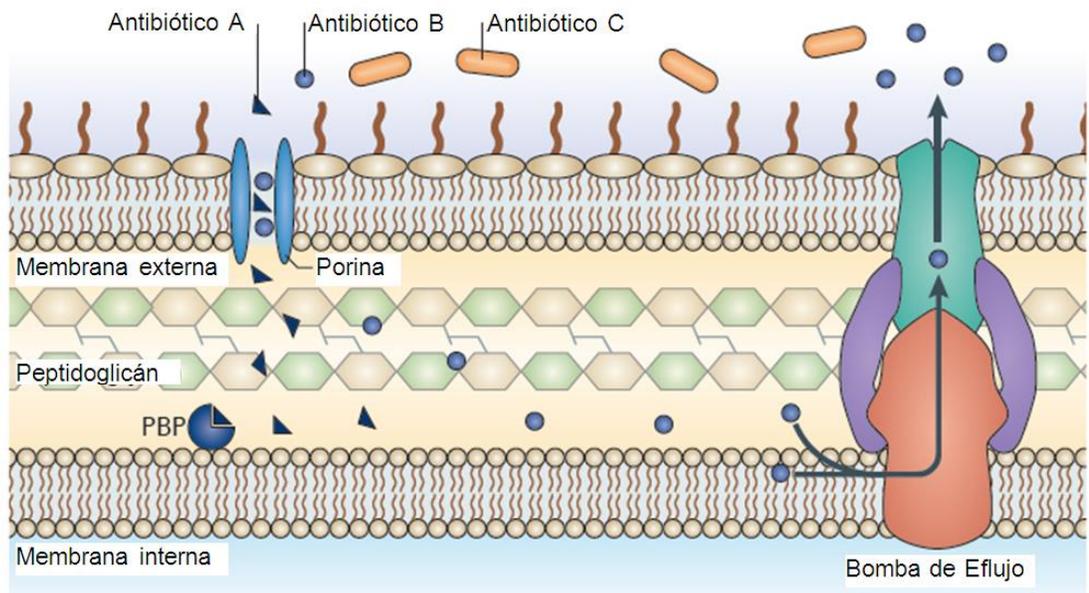
Constituye uno de los mecanismos más estudiados en BGN (Blair *et al.*, 2015). Su aparición es debido a la generación de cepas mutantes en una o más porinas de membrana externa. Dentro de este mecanismo se describe tanto las modificaciones parciales de las estructuras proteicas de las porinas, o bien la pérdida total de la proteína en cuestión (Figura 1.2); por ejemplo, se describe la pérdida total de OmpF y OmpC en *Escherichia coli* y *Serratia marcescens* (Blair *et al.*, 2015), o bien la

modificación o pérdida de OmpK35 y/o OmpK36 en *K. pneumoniae*, responsables de la disminución a la susceptibilidad frente antibióticos carbapenémicos (Wozniak *et al.*, 2012). La asociación de este mecanismo junto con la producción de BLEE y/o AmpC corresponde al mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos, inclusive carbapenémicos, más frecuente encontrado en enterobacterias (Wozniak *et al.*, 2012).

Las bombas de eflujo multidroga son otro de los mecanismos que participan en la resistencia antibiótica (Figura 1.2). Básicamente estas estructuras actúan de forma sinérgica con las mutaciones de porinas de membrana externa. Una vez que el antibiótico ingresa al espacio periplásmico, estas bombas expulsan el antibiótico nuevamente a través de la membrana externa hacia el exterior de la célula, provocando niveles basales de resistencia bacteriana (Figura 1.2). La sobreexpresión de bombas de eflujo capaces de expulsar diferentes sustratos, puede conducir a la resistencia a múltiples antimicrobianos potenciando el desarrollo de multirresistencia antibiótica (Blair *et al.*, 2015; Meletis, 2016).

1.4.3 Inactivación del antibiótico por hidrólisis

Corresponde a uno de los mayores y más relevantes mecanismos de resistencia antimicrobiana (Blair *et al.*, 2015). Se han descrito más de 1000 enzimas capaces de degradar los antibióticos β -lactámicos designadas en su conjunto como β -lactamasas, y constituyen el principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos (Pitout *et al.*, 2008; Laxminarayan *et al.*, 2013; Palzkill, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Estas enzimas están asociadas a codificación plasmídica o cromosomal y son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos e inclusive carbapenémicos (Ambler, 1980; Blair *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015).



Fuente: Modificado de Blair *et al.*, 2015. Nat Rev Microbiol. **13**(1): Pag: 43.

Figura 1.2 Principales mecanismos de resistencia a β -lactámicos presentes en enterobacterias. El antibiótico A es capaz de atravesar la membrana externa bacteriana a través de una porina y ejerce su acción a nivel de PBP de membrana interna. El antibiótico B puede ingresar a la bacteria, sin embargo es expulsado desde el periplasma al exterior a través de una bomba de eflujo. El antibiótico C carece de proteína diana o porina de membrana para atravesar la membrana externa, por lo cual no puede ingresar a la célula bacteriana.

Estructuralmente las β -lactamasas se clasifican en 4 grupos: A, B, C y D (Ambler, 1980) (Tabla 1.1); las enzimas pertenecientes a las clases A, C y D se caracterizan por presentar una serina en el sitio activo que media la reacción de hidrólisis del antibiótico β -lactámico, por lo cual, se catalogan como serin- β -lactamasas. Por otra parte, las enzimas de la clase B tienen uno o dos átomos de zinc asociados a su sitio activo, por lo que se les denomina metalo- β -lactamasas, y a diferencia de las serin- β -lactamasas estas enzimas no forman uniones covalentes entre la enzima y el

antibiótico, sino que son las moléculas de zinc quienes “atacan” directamente los grupos carbonilo y amida de todos los antibióticos β -lactámicos, salvo los monobactámicos (Palzkill, 2013). Dentro de los 4 grupos de Ambler se encuentran enzimas capaces de hidrolizar oximiinocefalosporinas, mientras que todas las de clase B y algunas pocas variantes de la clase A y D pueden hidrolizar carbapenémicos (Bush *et al.*, 2010). Sumada a esta clasificación estructural, se diseñó una clasificación funcional de las β -lactamasas que incluyen aspectos moleculares, puntos isoeléctricos, perfiles de sustrato y capacidad de ser inhibidas por sustancias como ácido clavulánico (CLA), tazobactam y/o EDTA (Tabla 1.1) (Bush *et al.*, 2010).

Las β -lactamasas de mayor relevancia por su frecuencia y asociación a cepas clínicas causantes de mortalidad en humanos son las de clase A. La aparición de la resistencia por estas enzimas tuvo un auge con la aparición de las cefalosporinas de tercera generación (C3G) como cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ), antibióticos utilizados masivamente desde 1980 para combatir infecciones graves producidas por BGN que presentaban resistencia a otros compuestos β -lactámicos. Se produjo un rápido surgimiento de resistencia mediado por enzimas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de estos antibióticos, las cuales recibieron el nombre de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Paterson *et al.*, 2005; Cantón *et al.*, 2006; Bush *et al.*, 2010; Cantón *et al.*, 2012).

Tabla 1.1 Propiedades de los principales grupos de β -lactamasas de acuerdo a clasificación de Ambler y Bush/Jacoby.

CA	CB	Principales sustratos	Inhibibles por		Característica enzimática	Principales enzimas
			CLA/TZEDTA	B		
	2a	Penicilinas	+	-	Hidrolizan mejor bencilpenicilinas que cefalosporinas	PC
	2b	Penicilinas y cefalosporinas de primera generación	+	-	Perfil de hidrólisis similar para bencilpenicilinas y C1G	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Oxiiminocefalosporinas, monobactámicos	+	-	Hidrólisis aumentada para oxiiminocefalosporinas y monobactámicos	CTX-M, PER 1/2, Derivadas de TEM 1/2 o SHV-1
A	2br	Penicilinas	-	-	Resistencia a CLA, TZB/SLB	TEM-30 a 40, 44-45. SHV-10, 26, 49
	2ber	Oxiiminocefalosporinas, monobactámicos	-	-	Hidrólisis aumentada para oxiiminocefalosporinas y resistencia a Resistencia a CLA, TZB/SLB	TEM-50,68, 89, 109, 121, 125, 151-52, 154, 158
	2c	Carbenicilina	+	-	Hidrólisis aumentada a carbenicilina	PSE, CARB
	2f	Carbapenémicos	+/-	-	Hidrólisis de carbapenémicos y oxiiminocefalosporinas	KPC, IMI, SME
B	3a	Carbapenémicos	-	+	Amplio espectro de hidrólisis incluyendo carbapenémicos pero no aztreonam	VIM, IMP, SPM, NDM
	1	Cefalosporinas	-	-	Mejor hidrólisis de cefalosporinas que penicilinas, hidrólisis de cefamicinas	AmpC, ACT, CMY-2, FOX-1, MIR1.
C	1e	Cefalosporinas	-	-	Hidrólisis aumentada a CAZ y a algunas oxiiminocefalosporinas	GC-1, CMY-37
	2d	Cloxacilina	+/-	-	Hidrólisis aumentada a cloxacilina u oxacilina	OXA-10
D	2de	Oxiiminocefalosporinas	+/-	-	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y oxiiminocefalosporinas	OXA-11, 14-19
	2df	Carbapenémicos	+/-	-	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y carbapenémicos	OXA-23-27, 33, 40, 48, 49, 51, 54, 55, 58, 370

CA: Clasificación de Ambler, CB: Clasificación de Bush/Jacoby. CLA: ácido clavulánico, TZB: Tazobactam

Fuente: Modificado de Bush *et al.*, 2010. Antimicrob Agents Chemother. **54**(3). Pag: 970.

Entre el 2004 y 2010, estudios internacionales como SMART (*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*) (Morrissey *et al.*, 2013), TEST (*Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial*) (Hoban *et al.*, 2015) y DISN (*Doripenem International Surveillance Network*) (Guzmán-Blanco *et al.*, 2014) detallan 28% de prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en Asia, 23% en Sudamérica, 8% en Europa y 7% en Norte América. Por otro lado, en cepas de *Klebsiella* spp. se aprecian del 44 % al 87 % de cepas productoras de BLEE en Sudamérica (Gelband *et al.*, 2015), 23% en Asia, 16% en Europa y 8% en Norte América. A su vez, el año 2013, el CDC estimó que anualmente se producen 26.000 casos de infecciones asociadas a enterobacterias, principalmente *E. coli* y *Klebsiella* spp., productoras de BLEE, de los cuales 1700 casos terminan en fallecimientos, y además señaló que existe 57 % más probabilidades de muerte cuando una infección está asociada a una enterobacteria productora de BLEE, siendo este mecanismo de resistencia el más importante dentro de los fenómenos de aparición de resistencia en enterobacterias a escala global (CDC, 2013) .

Desde el punto de vista evolutivo se reconocen dos alternativas para que una β -lactamasa de clase A tenga la capacidad de hidrolizar C3G y así catalogarse como BLEE:

a) Mutaciones puntuales a nivel del gen codificante de una β -lactamasa de amplio espectro: Mutaciones que provocan la expansión del perfil de sustrato debido a mutaciones puntuales del gen codificante de una β -lactamasa con capacidad de hidrólisis reducida a penicilinas y cefalosporinas de primera generación. Estas β -lactamasas generalmente se catalogan como las “ β -lactamasas clásicas” y por lo general otorgan resistencia a bencilpenicilinas, aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, pero no hidrolizan de forma significativa C3G. El uso de estos antibióticos, ha favorecido la selección de cepas que presentan entre 1 a 5 modificaciones aminoacídicas en enzimas denominadas TEM-1 y TEM-2 (Temoniera). La primera BLEE perteneciente a este grupo, denominada TEM-12, fue aislada en

1982 a partir de una cepa de *Klebsiella oxytoca* en Inglaterra (Paterson *et al.*, 2005). Estas enzimas constituyen uno de los grupos más extensos de β -lactamasas, incluyendo más de 220 variantes (<http://www.lahey.org/studies>). Por otra parte, otro grupo importante lo constituyen las enzimas pertenecientes al grupo SHV (sulfhidrilo-variable), de las cuales actualmente se describen más de 190 variantes (<http://www.lahey.org/studies>). La primera BLEE de este grupo, denominada SHV-2 se aisló en el año 1983, a partir de una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania (Paterson *et al.*, 2005).

b) Reordenamiento del entorno genético del gen: Las modificaciones pueden ocurrir no directamente en el gen codificante de la enzima, si no en el entorno genético de esta. Como se verá más adelante, algunos genes de β -lactamasas carecen de promotores propios de su expresión, y para poder expresar la enzima son necesarios elementos genéticos adyacentes que otorgan un promotor de expresión, tal como es el caso de las secuencias de inserción (SI) (Poirel *et al.*, 2003). En este caso las modificaciones pueden aumentar o disminuir la expresión del gen, pero no el perfil de hidrólisis de la enzima codificada, por consiguiente algunas cepas pueden portar genes de BLEE; sin embargo fenotípicamente pueden ser indetectable (Poirel *et al.*, 2003). Las β -lactamasas más importantes en el ámbito clínico afectadas por estas modificaciones, son las BLEE del tipo CTX-M.

1.5 β -lactamasas del tipo CTX-M

Posterior al surgimiento de las BLEE derivadas de TEM y SHV aparecieron nuevas enzimas las cuales molecularmente presentaban menos del 40 % de identidad nucleotídica con TEM y/o SHV, a las cuales se les denominó BLEE no TEM no SHV. Dentro de este grupo se encuentran las enzimas PER (*Pseudomonas extended resistance*), VEB (*Vietnamese extended spectrum β -lactamase*) y GES (*Guiana extended-spectrum β -lactamase*) con actividad ceftazidimasa y los tipos SFO-1 (*β -lactamase of *S. fonticola**), BES-1 (*extended-spectrum β -lactamase*) y CTX-M (Cefotaximasa M) con actividad cefotaximasa (Bonnet, 2004). De todos estos grupos de enzimas, destaca CTX-M, aislada por primera vez en Japón el año 1986 en una cepa de *E. coli* y que fue informada como BLEE no TEM no SHV a la cual designaron FEC-1 (*Faecal E.coli*) (Matsumoto *et al.*, 1988). Posteriormente, fue descrita como CTX-M en Alemania y Argentina en 1989 (Bauernfeind *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1992) por su potente actividad hidrolítica sobre cefotaxima y M por Múnich, ciudad de Alemania donde se aisló. Se clasifica dentro del grupo A de Ambler siendo susceptible a la acción de ciertos inhibidores como enzimáticos como ácido clavulánico (CLA), sulbactam y tazobactam, y pertenece al subgrupo 2be de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros (Tabla 1.1). Bioquímicamente presenta una alta tasa de hidrólisis frente a cefotaxima (CTX) y ceftriaxona (CRO) con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) dentro del rango resistente; sin embargo, frente a ceftazidima (CAZ) la tasa de hidrólisis es menor, y dependiendo de la variante enzimática de CTX-M, generalmente los microorganismos tienen un comportamiento susceptible (Bonnet, 2004; Cantón *et al.*, 2012).

1.5.1 Origen y clasificación de las enzimas CTX-M

Se plantea que el origen de las enzimas CTX-M puede estar asociado a bacterias del genero *Kluyvera* (Poirel *et al.*, 2003; Bonnet, 2004; Cantón *et al.*, 2012); enterobacterias de la microbiota intestinal humana consideradas como saprofiticas y patógenos oportunistas agente causal de infecciones del tracto urinario, piel y tejidos blandos (Sarria *et al.*, 2001). Se sabe que los genes cromosomales originarios de las enzimas CTX-M, denominados *bla_{KLUC}*, por carecer de promotores propios, son débilmente expresados en las cepas salvajes de *Kluyvera* spp. y necesitan un promotor fuerte para provocar un aumento de la CMI a varios antibióticos β -lactámicos y, en consecuencia, otorgar una resistencia fenotípica (Poirel *et al.*, 2003). Hipotéticamente se señala que a través del tiempo, mediado por la presión selectiva de antibióticos β -lactámicos, ocurrieron fenómenos de recombinación y expresión genética asociado a ciertas secuencias de inserción (SI) como *ISEcp1* o *ISCR1* que permitieron la captura de los genes cromosomales *bla_{KLUC}* y la transposición a plásmidos transferibles que fueron diseminados dentro del grupo de enterobacterias (Bonnet, 2004; Cantón *et al.*, 2012; D' Andrea *et al.*, 2013). Dichas SI, sirvieron de promotores de la expresión de los genes *bla_{KLUC}*, aumentando la CMI a los antibióticos β -lactámicos (Poirel *et al.*, 2003). En efecto, se han encontrado genes homólogos a *bla_{CTX-M}* en el cromosoma de *Kluyvera cryocrescens* (origen del grupo CTX-M-1) (Decousser *et al.*, 2001), *Kluyvera ascorbata* (origen del grupo CTX-M-2) (Rodriguez *et al.*, 2004) y *Kluyvera georgiana* (origen de los grupos CTX-M-8, 9 y 25) (D' Andrea *et al.*, 2013). Esto plantea que los diversos grupos de enzimas de CTX-M probablemente puedan derivar de una o más cepas diferentes del género *Kluyvera* (Tabla 1.2), y la existencia de diferentes genes *bla_{CTX-M}* en otros géneros bacterianos podría ser considerada como efecto de múltiples eventos de captura genética mediada posiblemente por presión selectiva dentro de ambientes clínicos y veterinarios.

Tabla 1.2 Diferentes grupos y orígenes de las enzimas CTX-M

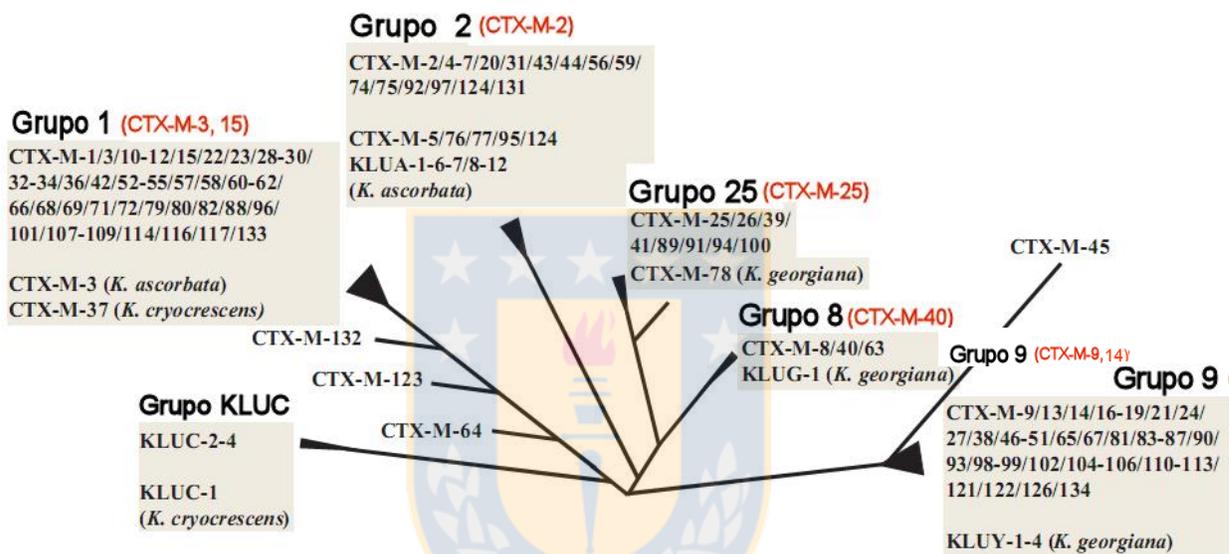
Grupos de CTX-M					
	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
Año*	1989	1988	1996	1994	2000
Enzima	CTX-M-1	FEC-1	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
País*	Alemania	Japón	Brasil	España	Canadá
Enzimas**	CTX-M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 29, 30, 32, 33, 28, 36, 54	CTX-M-2, 6, 7, 20, 31, 44	CTX-M-40	CTX-M-9, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 45, 46, 47, 48, 49, 50.	CTX-M-26, 25, 39, 41
Origen	<i>K. ascorbata</i>	<i>K. ascorbata</i>	<i>K. georgiana</i>	<i>K. georgiana</i>	ND

*: Año de reporte y país de aislamiento de la primera enzima del grupo. **: Enzimas más representativas del grupo. ND: no definido.

Fuente: Modificado de Cantón *et al.* 2006. Curr Opin Microbiol 9(5). Pag: 469.

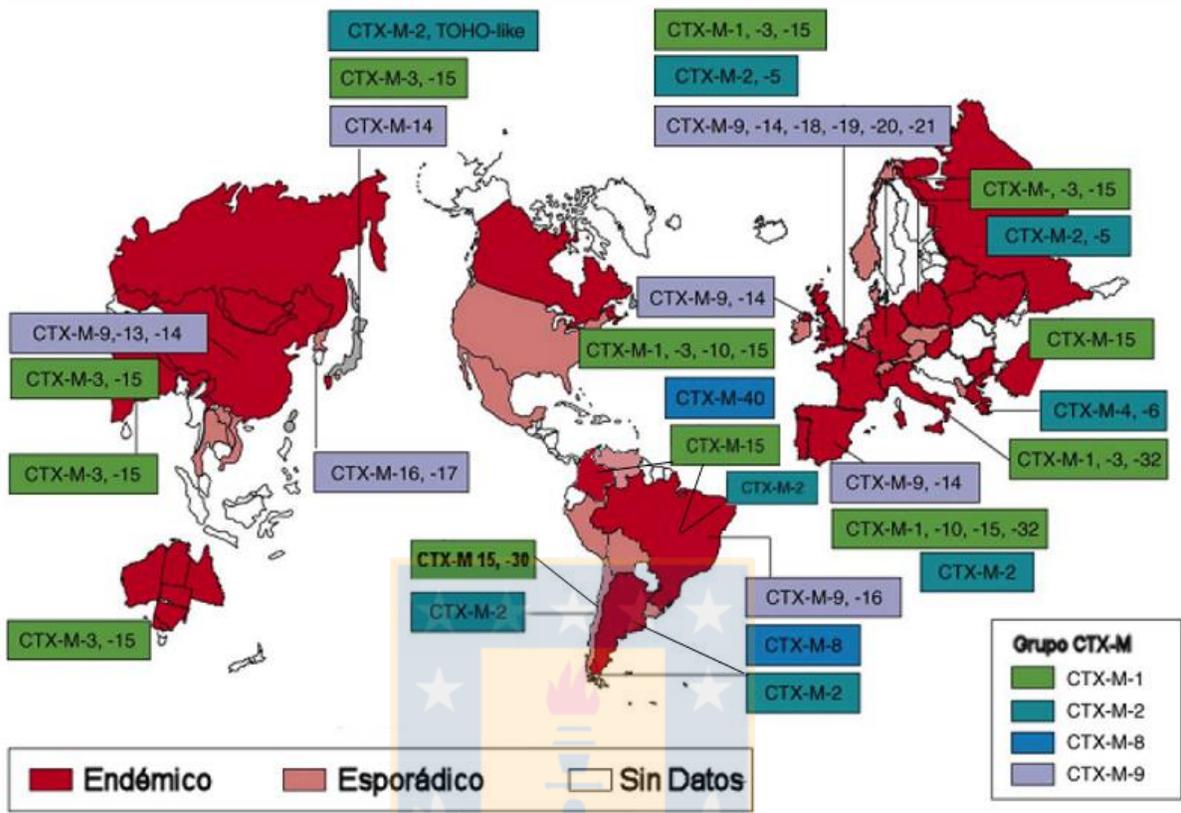
Si bien las β -lactamasas de tipo CTX-M se catalogan como un grupo heterogéneo de enzimas con propiedades de hidrólisis diferentes frente a β -lactámicos, esto está determinado por mutaciones puntuales que poseen las diferentes variantes de los genes *bla*_{CTX-M} (\approx 1000 pb) y que originan diversas sustituciones aminoacídicas en la estructura de la proteína. En este contexto actualmente se describen 6 grupos de enzimas CTX-M; CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 y KLUC (Figura 1.3), los cuales difieren entre sí por un porcentaje \geq 10 % de similitud en relación a sus residuos aminoacídicos (D'Andrea *et al.*, 2013). Cada grupo a su vez está compuesto de numerosas variantes enzimáticas de las cuales hoy se describen un total de 168 (<http://www.lahey.org/studies>) que difieren entre ellas por una o cinco sustituciones aminoacídicas. Por otra parte, existe un grupo particular de CTX-M compuesto de cuatro variantes de enzimas que poseen una estructura híbrida, por ejemplo; CTX-M-45 (anteriormente denominada como Toho-2), el cual es un híbrido de CTX-M-14 más una proteína de origen desconocido, y CTX-M-64, CTX-M-123 y CTX-M-132 que son híbridos de CTX-M-15 pero que poseen diferentes segmentos de CTX-M-14. Gran

parte de las variantes enzimáticas están incluidas dentro de los grupos de CTX-M-1 y 9, lo que sugiere que estos grupos tendrían una mayor plasticidad genética, lo cual podría reflejar una mayor prevalencia general de los miembros de estos grupos en lo que respecta a su distribución geográfica (Figura 1. 4) (Cantón *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013).



Fuente: Modificado de D' Andrea *et al.* 2013. Int J Med Microbiol 303. Pag: 306.

Figura 1.3 Diagrama de árbol que muestra los grupos de enzimas CTX-M y algunas de sus variantes genéticas más importantes. En naranja se encuentran las variantes más reportadas de cada grupo.

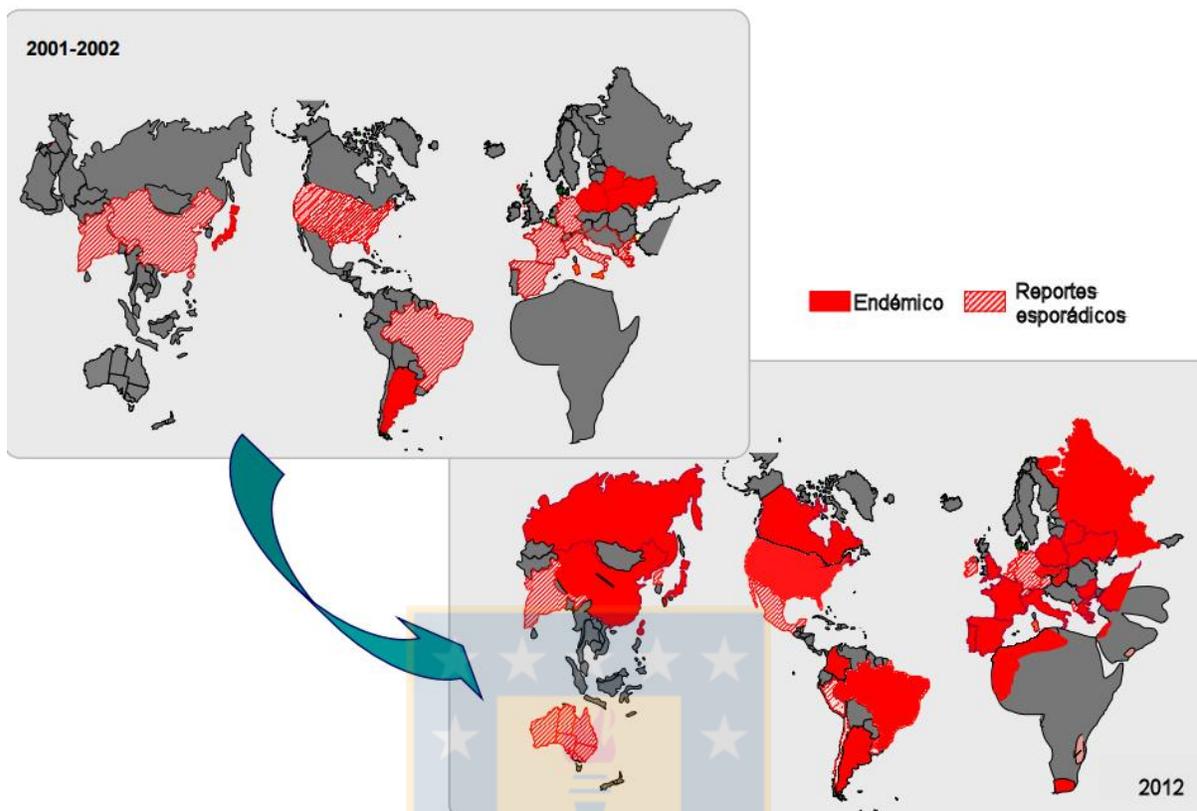


Fuente: Modificado de Cantón *et al.* 2006. *Curr Opin Microbiol* 9 (5). Pag: 469.

Figura 1.4 Distribución geográfica de las principales variantes enzimáticas de CTX-M en el mundo.

1.5.2 Epidemiología de los genes *bla*_{CTX-M}.

La epidemiología de los genes *bla*_{CTX-M} a través de los años ha presentado importantes variaciones. Entre los años 1983 y 2001 correspondían principalmente a β -lactamasas plasmídicas que por efecto de mutaciones puntuales originaban BLEEs de diferente tipo y con perfiles de hidrólisis distintos frente a diversos antibióticos β -lactámicos, principalmente C3G (Cantón *et al.*, 2012). Estas enzimas, por su ubicación, presentaban una dispersión horizontal y una suerte de selección clonal de cepas resistentes. Sin embargo, hoy en día se plantea un nuevo escenario, bastante más complejo, donde la existencia de β -lactamasas de tipo CTX-M de ubicación cromosomal (Mahrouki *et al.*, 2012; Carvalho-Assef *et al.*, 2014), sumado a ciertas plataformas genéticas donde *bla*_{CTX-M} puede estar asociado a integrones de clase 1 complejos o inusuales, secuencias de inserción (SI) y transposones (Poirel *et al.*, 2003; Bonnet, 2004; Cantón *et al.*, 2012; Carvalho-Assef *et al.*, 2014) representan un esquema más complejo de dispersión y selección policlonal y clonal de cepas, provocando un nuevo escenario de epidemiología mundial de enterobacterias productoras de CTX-M (Figura 1.5). Esto hace ver el gran éxito en la diseminación de este tipo de BLEE, inclusive, ya no solo diseminación en lo que respecta dentro del ambiente hospitalario, sino que últimamente se han visto involucradas en infecciones asociadas a la comunidad, ganado, inclusive, animales de compañía, siendo estos últimos, un importante reservorio genético de clones multirresistentes a antibióticos (Moreno *et al.*, 2007; Ewers *et al.*, 2012; Ewers *et al.*, 2014).



Fuente: Modificado de Cantón R. 2008. www.sochinf.cl/Congreso2008/pdf/dr_cantonm.pdf

Figura 1.5 Variación de escenario de prevalencia de BLEE tipo CTX-M en el Mundo entre el año 2001 y 2012.

En lo que respecta a las especies bacterianas, *bla*_{CTX-M} se encuentra mayoritariamente asociada a aislados clínicos de enterobacterias, principalmente *E. coli* y *K. pneumoniae*, siendo la BLEE predominante en casos de bacteriemia e inclusive, infecciones del tracto urinario de origen comunitarias (Bonnet, 2004; Cantón *et al.*, 2006; Pitout *et al.*, 2008; Guzmán-Blanco *et al.*, 2014). De las especies mencionadas, se describen clones altamente exitosos en lo que respecta a la diseminación de esta enzima en el mundo, por ejemplo *E. coli* ST131 y *K. pneumoniae* ST15, ambos productores de CTX-M-15, la variante enzimática más frecuentemente reportada y

asociada, principalmente, a diseminación clonal de cepas en el ambiente comunitario, hospitalario y veterinario (Pitout *et al.*, 2008; Ewers *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2015; Alyamani *et al.*, 2016). Cabe destacar que este alelo presenta una mutación puntual con respecto a CTX-M-3 (Asp240Gly), lo cual le permite una fuerte hidrólisis de ceftazidima (CAZ) por sobre cefotaxima (CTX) (Bonnet, 2004; Stepanova *et al.*, 2008; Lahlaoui *et al.*, 2014). Otras variantes enzimáticas están ampliamente presentes en países específicos como España (CTX-M-9, CTX-M-10 y CTX-M-14) (Hernández *et al.*, 2005; Novais *et al.*, 2006), Italia, Francia y Alemania (CTX-M-1), Polonia (CTX-M-3), Brasil (CTX-M-8, CTX-M-16) (Bonnet, 2004) y países de América del Sur, Japón e Israel (CTX-M-2). En lo que respecta a Latinoamérica, el año 1989 se reportó la variante CTX-M-2 por primera vez en Argentina, y para los años 90's se informaba que hasta el 75% de las enterobacterias productoras de BLEE poseían algún gen codificante de enzimas del tipo CTX-M (Quinteros *et al.*, 2002), situación similar en Colombia, Brasil, Paraguay y Uruguay (Villegas *et al.*, 2008), desplazando la prevalencia de otras BLEE derivadas de los grupos TEM y SHV, catalogando a CTX-M como una enzima endémica en el continente. En lo que respecta a diversidad de variantes, principalmente, predominan las variantes CTX-M-2 asociada a *K.pneumoniae* y también CTX-M-15 asociada principalmente a cepas de *E. coli*. Sin embargo, no hay que despreciar los reportes esporádicos de otras variantes circulantes en el continente, tales como CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-12, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-24, CTX-M-31, CTX-M-32 y CTX-M-56 (Villegas *et al.*, 2008; Araque *et al.*, 2013; García-Fulgueiras *et al.*, 2013).

Con respecto a Chile, no se han realizado muchos estudios de epidemiología y detección de variantes enzimáticas de CTX-M. En el año 2005 se reportó que en 122 cepas clínicas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE había una prevalencia del 40,2 % de CTX-M (Grupos CTX-M-1 y CTX-M-2), por sobre variantes PER-2 y GES (Bello *et al.*, 2005). Posteriormente el 2011, se publicó un estudio sobre la prevalencia de BLEE en cepas de enterobacterias causantes de bacteriemia aisladas entre los años 2004 y 2007, donde se encontró que el 96 % de los genes asociados a la producción

de BLEE correspondían a CTX-M, específicamente de grupo 1, seguido de TEM (62 %) y GES (28 %) y además el 79 % de las cepas poseía más de un tipo de BLEE (García *et al.*, 2011). En lo que respecta a otras variantes enzimáticas, el año 2008 se describe la primera variante CTX-M-14 en Chile en una cepa de *E. coli* aislada desde materia fecal de perro que había sido tratado con enrofloxacino, haciendo alusión a los fenómenos de selección de cepas multirresistentes mediadas por la co-selección de genes de resistencia ubicados en los mismos elementos genéticos con *bla*_{CTX-M} (Moreno *et al.*, 2007). Esta variante junto con CTX-M-15, corresponden a las enzimas más frecuentemente encontradas en humanos, animales y en el ambiente en el mundo (Pitout *et al.*, 2008; Lahlaoui *et al.*, 2014; Blair *et al.*, 2015). A su vez, se ha determinado que las variantes prevalentes de CTX-M en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas en Chile entre el 2008 y 2011 corresponden a CTX-M-15 y CTX-M-2 respectivamente, y en menor grado además se ha reportado la variante CTX-M-30 (Guggiana, 2014). Más información en Chile respecto a CTX-M en cepas clínicas de la familia *Enterobacteriaceae* no han sido publicados.



1.5.3 Movilización, plataformas genéticas de *bla*_{CTX-M} y co-selección de multirresistencia antibiótica.

En los procesos de movilización de los genes *bla*_{CTX-M} se encuentran involucrados diferentes elementos que incluyen plásmidos, SI, transposones e integrones. En lo que respecta a los plásmidos, los tamaños son variables. Se han descrito desde 7 kb (Cao *et al.*, 2002) hasta 430 kb (Aires *et al.*, 2017). Lo mismo ocurre con los grupos de incompatibilidad plasmidicos asociado a los genes *bla*_{CTX-M}, en donde se describen frecuentemente los tipos IncF, IncN, IncI, IncL/M, IncH e IncK entre otros (Cantón *et al.*, 2012; D'Andrea *et al.*, 2013; Blair *et al.*, 2015; Kayama *et al.*, 2015; Zhong *et al.*, 2015). En los plásmidos que portan genes *bla*_{CTX-M}, se han pesquisado múltiples genes de resistencia a otros antibióticos, incluyendo aminoglucósidos, fenicoles, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas (Phan *et al.*, 2015; Aires *et al.*, 2017), sumado al reciente reporte de la coportación de *bla*_{CTX-M-55} y el gen de resistencia a colistin *mcr-1* en un mismo plásmido (Sun *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2016). Además, se han descrito plásmidos que portan genes *bla*_{CTX-M} y otros genes productores de β-lactamasas como variantes de *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV}, entre otros (Lunha *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2016; Aires *et al.*, 2017), y genes codificantes de CBPs como *bla*_{VIM-1} (Miró *et al.*, 2010), *bla*_{OXA-48} (Potron *et al.*, 2013; Potron *et al.*, 2013b), *bla*_{OXA-370} (Sampaio *et al.*, 2014), *bla*_{IMP-6} (Kayama *et al.*, 2015), *bla*_{KPC-2} (Xu *et al.*, 2015) y *bla*_{NDM.1} (Aires *et al.*, 2017), lo cual facilitaría la diseminación y mantención de genes *bla*_{CTX-M} y los genes mencionados en los procesos co-selección de resistencia antibiótica (Lahlaoui *et al.*, 2014).

Los elementos genéticos que se describen de forma frecuente asociados a las plataformas genéticas de *bla*_{CTX-M} han sido bastante estudiados puesto que no son exclusivos de estas plataformas, sino que también se asocian a otros genes de resistencia antibiótica y a otras plataformas genéticas diferentes a *bla*_{CTX-M}, por lo cual poseen una alta relevancia epidemiológica su pesquisa y caracterización ya que funcionalmente median fenómenos de captura, transposición y expresión de múltiples

genes de resistencia (Poirel *et al.*, 2003; Poirel *et al.*, 2005; Cantón *et al.*, 2012), y podrían ser los responsables en lo que respecta a la complejidad del panorama de diseminación observado en la actualidad de algunas BLEE y algunos genes productores de otras enzimas que participarían en la resistencia antimicrobiana de patógenos multi-drogo resistentes.

Una de las SI relacionadas al entorno genético de *bla*_{CTX-M} es *ISEcp1*, asociada principalmente a genes de codificantes de CTX-M de grupo 1, 2 y 9, y sus variantes enzimáticas CTX-M-1, 2, 3, 9, 13, 14, 15, 17, 19 y 21 (Poirel *et al.*, 2003; Eckert *et al.*, 2006; Wei-Hua *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Además se ha encontrado asociada a otros genes determinantes de resistencia antibiótica como *bla*_{CMY} (Phan *et al.*, 2015), *bla*_{KPC-2} (Martinez *et al.*, 2014), *qnrB* (Cattoir *et al.*, 2008) y *rmtC* (Wachino *et al.*, 2006). Estructuralmente se encuentra flanqueado por dos secuencias repetidas invertidas (IRL e IRR) y un marco de lectura que codifica una transposasa putativa de 420 aminoácidos. Se ha demostrado que *ISEcp1* participa en los fenómenos de captura, transposición y en la expresión no solo de genes *bla*_{CTX-M}, sino que hipotéticamente actuaría de igual forma cuando se asocia a otros genes codificantes de resistencia antibiótica (Martinez *et al.*, 2014; Kayama *et al.*, 2015). Se postula que esta SI sería una de las responsables en lo que respecta a la captura genética del gen *bla*_{KLUC} del cromosoma de *Kluyvera* spp. y la transposición de este gen a un plásmido transferible, hipótesis que se plantea como el origen de las enzimas CTX-M. Por su parte, existe otra SI, denominada IS26 que puede encontrarse insertada en las cercanías de *ISEcp1* transcribiéndose en el mismo sentido, o en sentido contrario y actuaría inactivando la transposasa de *ISEcp1* estabilizando el complejo *ISEcp1-bla*_{CTX-M}, favoreciendo la permanencia del gen en el plásmido y potenciando su transferencia horizontal (Lahlaoui *et al.*, 2014).

Otra de las SI asociadas de forma frecuente al entorno genético de *bla*_{CTX-M} son las secuencia de inserción CR o de “región común (*common region*)” (ISCRs) (Toleman *et al.*, 2006), denominada “CR” para distinguirla de las secuencias conservadas del

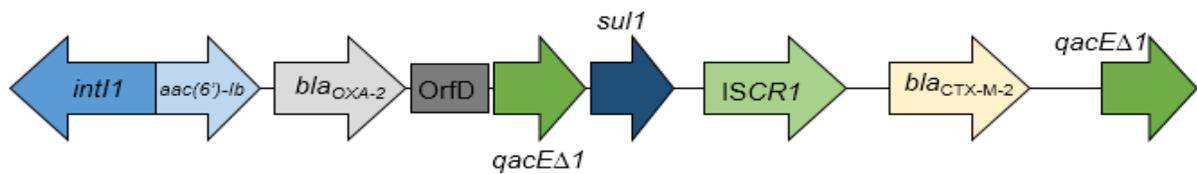
integrón (5'SC y 3'SC). Este tipo de SI pertenece a la familia de IS91 que se caracterizan por codificar una transposasa que permiten la movilización de genes de resistencia cercanos, mediante eventos de transposición y replicación en círculo rodante ("rolling-circle") (Cantón *et al.*, 2006). La primera ISCR descrita, actualmente denominada ISCR1, corresponde a una secuencia de ADN de 2.154 pb que al comienzo se le llamó *orf513* (un gen putativo de función desconocida) y se encontró abajo del gen *sul1* de los integrones de clase 1, In6 e In7 (Stokes *et al.*, 1993). Actualmente existen otras secuencias CR, distribuidas mundialmente en plásmidos y cromosomas de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Arduino *et al.*, 2003) que se pueden encontrar asociadas a múltiples genes que codifican resistencia a aminoglucósidos, trimetoprim, cloranfenicol y diversas β -lactamasas de clase A (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-20}, *bla*_{PER-1}, *bla*_{PER-3}, *bla*_{VEB-3}) y clase C (*bla*_{DHA-1}, *bla*_{CMY 1,8,9,10}), sumado a determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas como genes *qnr* (Mammeri *et al.*, 2005) e inclusive carbapenemasas (Zhao *et al.*, 2015).

El gen *bla*_{CTX-M} también se ha descrito asociado a otros elementos genéticos como lo son los integrones clase 1 inusuales o también denominados integrones complejos. Estos elementos se caracterizan por poseer un extremo 5' conservado (5'SC) y un extremo 3' conservado (3'SC), sumado a una duplicación parcial del extremo 3'SC entre los cuales se ubicaría el elemento ISCR1 y corriente abajo de esta SI, se encontraría el gen *bla*_{CTX-M}. Como se sabe, los integrones en su región variable pueden llevar múltiples genes de resistencia antibiótica, sumado a otros elementos que le otorgan diferentes características a las cepas que los portan. Esto contribuye a la selección de bacterias resistentes cuando la bacteria es sometida a presión selectiva con diversos grupos de antimicrobianos (Cantón *et al.*, 2012; Acosta-Pérez *et al.*, 2015). Un punto relevante es que los genes asociados a ISCR1 no presentan sitios de reconocimiento *attC*, por lo tanto, no pueden haber sido adquiridos en forma de *cassettes* genéticos, pero si poseen un elemento de 26 a 28 pb que serviría de sitio de reconocimiento para ISCR1, de forma tal, que esta SI permitiría eventos de transposición de estos genes, dentro de la estructura de los integrones de clase 1, pero

no en la zona de los *cassettes* genéticos (Power *et al.*, 2005). Los primeros integrones complejos descritos fueron In6 e In7, los cuales contenían genes *catA2* y *dfrA10*. Posteriormente, se describen los integrones In35 en *Proteus mirabilis*, InS21 en *Salmonella enterica* serovar Infantis, In116 en *Morganella morganii*, e InV117 en *Vibrio cholerae*. Todas las cepas aisladas presentaban una zona de *cassettes* genéticos donde estaban insertados los genes *bla_{OXA-2}*, *OrfD* y *aac(6')-Ib* y, posteriormente, en la cercanía de la segunda copia del extremo 3'SC parcial, se ubicaban los genes *bla_{CTX-M-2}* y *orf3*, estos últimos elementos genéticos, probablemente, originado de *K. ascorbata* (Arduino *et al.*, 2003).

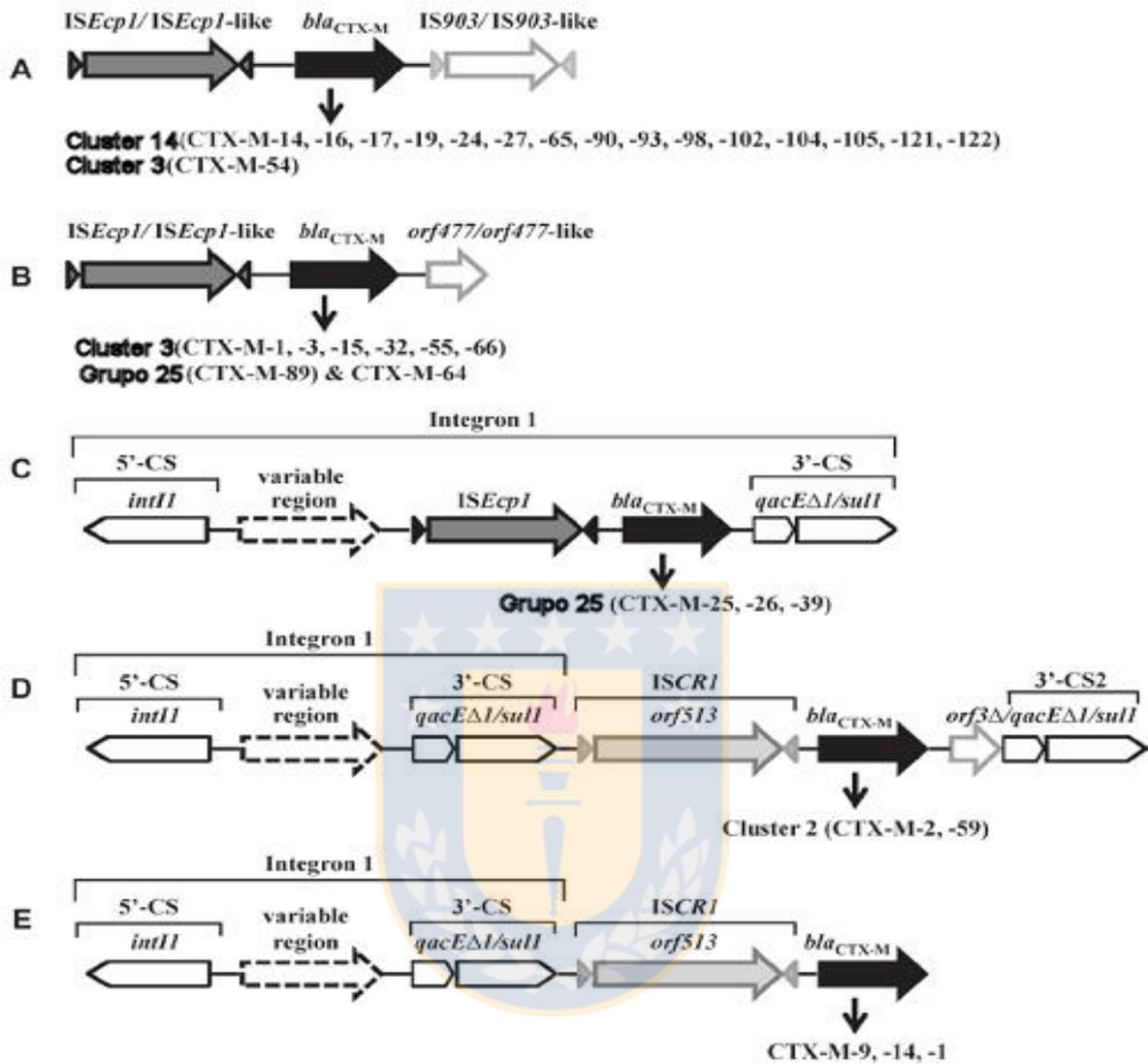
La descripción de estos elementos genéticos en diferentes regiones geográficas y en distintas especies bacterianas a lo largo del tiempo ha ido aumentando. En lo que respecta a Latinoamérica, el año 2006 se realizó la primera descripción del entorno genético de *bla_{CTX-M-2}* en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes hospitalizados de Uruguay (Vignoli *et al.*, 2006). Tras el análisis de las secuencias obtenidas de diferentes amplicones y su ensamblaje, se determinó que el gen codificante de la enzima CTX-M-2 se encontraba en un integrón de clase 1 inusual, el cual presentaba la misma estructura que integrones previamente descritos como In116 e InS21. A su vez, *bla_{CTX-M-2}* se encontró adyacente a *ISCR1*, y la única variación que poseía el integrón era en la zona de los *cassettes* genéticos, puesto que presentaba genes *dfrA12*, *orfF* y *aadA2*. En lo que respecta a Chile, el año 2007 se determinó la estructura de un integrón clase 1 inusual denominado InK283 (Figura 1.6) en una cepa de *K. pneumoniae* (Diaz, 2007), el cual presentaba igual arquitectura que los integrones descritos en Argentina In35, In116 e InS21 y aquel descrito en Uruguay InK13. Este trabajo correspondió a la primera descripción del ambiente genético de un gen productor de CTX-M en el país; sin embargo, descripciones correspondientes a genes pertenecientes a otros grupos de CTX-M u otras variantes enzimáticas no se han informado.

Si bien los integrones clase 1 inusuales y elementos *ISEcp1* e *ISCR* son los más descritos en relación al entorno genético de genes productores de CTX-M, también se describen otros elementos como *IS903*, *IS26*, variantes de *ISEcp1* como *ISEcp1B*, marcos de lectura abierta de función desconocida como *orf470*, entre otros, implicados en variados entornos genéticos de *bla*_{CTX-M} (Figura 1.7).



Fuente: Modificado de Diaz (2007) Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Microbiología. Universidad de Concepción.

Figura 1.6 Estructura del Integrón complejo o inusual clase 1 InK283 de cepa de *K. pneumoniae* aislada en un hospital chileno.



Fuente: Modificado de Zhao *et al.* 2013. Crit Rev Microbiol 39. Pag 92.

Figura 1.7 Plataformas genéticas frecuentes asociadas a diferentes variantes de *bla*_{CTX-M}. A: *bla*_{CTX-M} asociado arriba a secuencias de inserción ISEcp1/ISEcp1-like y río abajo a IS903/IS903like. B: *bla*_{CTX-M} asociado a *orf477/orf477-like*. C: *bla*_{CTX-M} asociado a integrones de clase 1 los cuales dentro de su estructura incluyen ISEcp1. D y E: *bla*_{CTX-M} asociado a integrones de clase 1 complejos-ISCR1. CS: segmentos conservados; *IntI*: gen de la integrasa, *qacEΔ1*: gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario; *sul1*: gen de resistencia a sulfonamidas; 3'CS2: copia del extremo 3' conservado del integrón.

1.6 Resistencia a carbapenémicos en enterobacterias

Los carbapenémicos corresponden a un grupo de antibióticos utilizados sobre todo en el tratamiento de enterobacterias multirresistentes, principalmente productoras de BLEE y/o AmpC. El aumento de la prevalencia de estos mecanismos enzimáticos ha provocado un aumento en el consumo de este tipo de antibiótico. Se estima que desde el año 2000 al 2010, el consumo mundial de antibióticos carbapenémicos aumentó en un 40 %, lo cual, paulatinamente ha generado la selección de cepas con reducida susceptibilidad a este grupo de antibióticos (Gelband *et al.*, 2015; Adler *et al.*, 2016). En el mundo, se estiman anualmente alrededor de 9300 casos de infecciones asociadas a enterobacterias resistentes a los carbapenémicos (ERC), de los cuales 610 casos terminan en muerte. Tal ha sido su aumento en frecuencia y nivel de diseminación, que en el año 2013 el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) clasificó a las ERC dentro de las amenazas más urgentes (CDC., 2013). Si bien los mecanismos implicados en la resistencia a carbapenémicos son similares a los de la mayoría de los demás antibióticos β -lactámicos, es de suma relevancia el seguimiento del aumento de la prevalencia de enzimas capaces de hidrolizar este grupo de antimicrobianos, denominadas carbapenemasas (CBPs), puesto que estos antimicrobianos constituyen la última terapia antibiótica disponible frente a numerosas infecciones comunes por microorganismos multiresistentes (WHO, 2014; Gelband *et al.*, 2015; Meletis, 2016).

La resistencia mediada por la producción de CBPs es la más importante clínicamente, principalmente porque estas enzimas son capaces de degradar todos o la mayoría de los antibióticos β -lactámicos y confieren por sí solas elevadas CMI a carbapenémicos (Adler *et al.*, 2016), sumado a que su codificación es principalmente por genes albergados en plásmidos transferibles o transposones frecuentemente asociados a otros genes o determinantes de resistencia antibiótica (Akpaka *et al.*, 2009; Meletis., 2016; Aires *et al.*, 2017). Las β -lactamasas con actividad CBP pertenecen a tres de las cuatro clases de Ambler. En la clase A se distingue la CBP del tipo KPC (*Klebsiella*

pneumoniae carbapenemasa), en la clase B se distingue la CBP de la clase VIM (Verona integron-*encoded* métalo- β -lactamasa), IMP (imipenemasa) y las recientemente descritas NDM (Nueva Delhi métalo- β -lactamasa) y aquellas dentro de la clase D detectadas fundamentalmente en *Acinetobacter* spp., las enzimas OXA (oxacilinasas). Cada una de estas CBP tiene propiedades fenotípicas y moleculares diferentes (Tabla 1.1), y hoy en día corresponden a uno de los mecanismos asociados a resistencia antibiótica de mayor preocupación mundial (Meletis, 2016).

1.6.1 Emergencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en Chile

Desde el punto de vista epidemiológico, en Chile no se habían reportado casos de infecciones por enterobacterias productoras de CBPs hasta marzo del año 2012, fecha en la que el Instituto de Salud Pública (ISP) confirmó el primer caso importado de infección por *K. pneumoniae* productora de CBP del tipo KPC en un paciente procedente de Italia (Cifuentes *et al.*, 2012). A la fecha se han descrito dos variantes más de CBPs (NDM-1 y OXA-370), previamente no reportadas en el país (ISP Chile, 2014; ISP Chile, 2014b), las cuales, además de KPC, constituyen a nivel mundial una preocupación creciente por su alta diseminación dentro del grupo de enterobacterias (CDC, 2013). Al año 2015, el ISP ha informado públicamente el hallazgo de 34 cepas de enterobacterias productoras de CBPs, de las cuales 32 son productoras de KPC, mientras las dos restantes son productoras de NDM-1 u OXA-370.

En lo que respecta a KPC, el estudio molecular a través de PFGE (electroforesis en campo pulsado, del inglés; *pulsed-field gel electrophoresis*) de 23 cepas correspondientes a *K. pneumoniae*, reveló la presencia de variados tipos de clones, y a su vez, a través de MLST (tipificación multilocus de secuencia, del inglés; *multilocus sequence typing*) se determinó la presencia del clon ST258, un tipo de secuencia (ST) reportado ampliamente en el mundo y, que además, se asocia a brotes epidémicos. A su vez, también se reportó un ST autóctono, denominado ST1161, el cual previamente

no había sido reportado en la base de datos internacional de MLST (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) (Barría-Loaiza *et al.*, 2016). Los 9 casos restantes de KPC, corresponden a otras especies bacterianas, dentro de las cuales se describe *Klebsiella oxytoca* (4 cepas), *Enterobacter cloacae* (2 cepas), *Citrobacter freundii* (1 cepa), *Serratia marcescens* (1 cepa) y *E. coli* (1 cepa) (ISP Chile, 2015).

La enzima KPC constituye la CBP más frecuentemente encontrada en cepas de enterobacterias a nivel mundial (Mathers, 2016). Fue descrita por primera vez en EE.UU. el año 1996 en un plásmido no conjugativo de una cepa de *K. pneumoniae*. A partir de esa fecha, KPC ha sido detectada en todos los continentes, principalmente asociado al complejo clonal 258 y principalmente al ST258 (Andrade *et al.*, 2011; Barría-Loaiza *et al.*, 2016). A la fecha se describen 22 variantes de KPC-2 que difieren en una o dos mutaciones puntuales (<https://www.lahey.org/studies>). Sin embargo, algunos autores solo reconocen 13 variantes legítimas encontradas en diferentes organismos Gram negativos en variadas regiones del mundo (Swathi *et al.*, 2016). La enzima KPC pertenece a la clasificación A de Ambler y al grupo 2f de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros (Tabla 1.1) y tiene potencial hidrolítico sobre todos los antibióticos β -lactámicos utilizados en clínica (Akpaka *et al.*, 2009). Es parcialmente inhibida por inhibidores clásicos de β -lactamasas (Naas *et al.*, 2008) como el ácido clavulánico, e *in vitro*, es potentemente inhibida por ácido fenilborónico (AFB). La distribución en Latinoamérica es amplia, abarcando Brasil, Argentina y Colombia principalmente, pero también existiendo reportes en Ecuador, Puerto Rico, Trinidad y Tobago entre otros países (Naas *et al.*, 2008; Akpaka *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2011; Cifuentes *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2014; Zurita *et al.*, 2015), y no sólo se ha encontrado en cepas de enterobacterias sino también en bacilos no fermentadores (BNF) como *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas aeruginosa* (Akpaka *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2011). Genéticamente, *bla*_{KPC}, se encuentra asociado a elementos genéticos móviles como el transposón Tn4401, el cual aproximadamente tiene un tamaño de 10 kb y está delimitado por dos secuencias repetidas e invertidas que

contienen genes para la transposasa (*tnpA*) y una resolvasa (*tnpR*) (Swathi *et al.*, 2016). También se han asociados otros elementos que han permitido la diseminación de *bla*_{KPC}, al igual que en el caso de *bla*_{CTX-M}, la secuencia de inserción *ISEcp1* aparece como un elemento asociado a eventos de transposición de este gen (Martinez *et al.*, 2014). En la mayoría de los casos el gen se ubica en plásmidos del tipo IncN e IncFII en los cuales se ha encontrado coexistencia de *bla*_{KPC-2} y *bla*_{CTX-M-15} (Andrade *et al.*, 2011), entre otros determinantes de resistencia antibiótica.

Posterior a la emergencia de KPC, el 13 de Mayo de 2014 el ISP de Chile reportó la primera cepa de *K. pneumoniae* portadora la CBP denominada Nueva Delhi métalo- β -lactamasa-1 o NDM-1 aislada a partir de un hisopado rectal de un paciente sin antecedentes de viajes al extranjero, e ingresado a un hospital público de Santiago (ISP Chile, 2014b). Esta enzima fue descrita el año 2008 a partir de un aislado obtenido de un paciente de origen Indio hospitalizado en Suecia que posterior a un viaje a Nueva Delhi el 2007, presentó una infección del tracto urinario causada por *K.pneumoniae* ST14 (Yong *et al.*, 2009; Palzkill, 2013). Posterior a este caso, han aparecido múltiples reportes de esta CBP, y ya para el año 2010, se reportó en casi 40 países, de los cuales, la mayoría tenía conexión con India, Pakistán, Bangladesh o la península de los Balcanes (Mathers, 2016; Meletis, 2016). A la fecha existen 16 variantes de NDM reportadas en varias regiones del mundo (<http://www.lahey.org/studies>). Esta enzima posee la característica de otorgar resistencia a todos los β -lactámicos, excepto aztreonam y al tratarse de una métalo- β -lactamasa, presenta inhibición solo por EDTA, por lo cual, otros métodos fenotípicos para la detección de esta CBP no son de utilidad. Genéticamente se encuentra codificada por el gen *bla*_{NDM-1}, en plataformas compuestas de secuencias de inserción *ISAb*₁₂₅, *IS26* e inclusive, se ha encontrado asociado a *ISCR1*, adyacente a integrones de clase 1 (Yong *et al.*, 2009, Dortet *et al.*, 2011; Carvalho-Assef *et al.*, 2014; Aires *et al.*, 2017). También ha sido reportado en muchas especies de enterobacterias, y también en *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter baumannii*, así como de muestras ambientales (Villa *et al.*, 2012). Si bien existen reportes de *bla*_{NDM-1} cromosomal (Zurita *et al.*, 2015, Zhong *et al.*, 2016),

en la mayoría de los casos se encuentra albergado en diferentes tipos y tamaños de plásmidos, principalmente en grupos IncN, IncA/C o IncL/M o, inclusive plásmidos conjugativo no tipificables desde 87 kb a 490 kb (Villa *et al.*, 2012; Palzkill, 2013; Carvalho-Assef *et al.*, 2014). Un punto relevante es que los plásmidos pueden portar diversos genes de resistencia a diversos grupos de antimicrobianos tales como aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas y sulfametoxazol, generando la aparición de cepas multirresistentes (Nordmann *et al.*, 2011; Carvalho-Assef *et al.*, 2014; Aires, 2017), las cuales sumado a mecanismos de resistencia no mediados por plásmidos, pueden volverse resistentes a todos los antibióticos, incluidos colistín y tigeciclina (Nordmann *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2016). Además, la co-transferencia de genes codificantes de BLEEs y cefalosporinas provoca que muchos aislados productores de NDM-1 presenten resistencia a aztreonam (Nordmann *et al.*, 2011), es así como se ha reportado la coexistencia de *bla*_{CTX-M} y *bla*_{NDM-1} en el mismo plásmido, sumado a otros genes asociados a la producción de β -lactamasas del tipo AmpC (Villa *et al.*, 2012; Carvalho-Assef *et al.*, 2014; Aires *et al.*, 2017). La primera descripción en Latinoamérica fue en el año 2011, en cepas de *K. pneumoniae* aisladas en Colombia y Guatemala, posteriormente existen reportes en Brasil el año 2013, en cepas de *Enterobacter hormaechei* y *Providencia rettgeri* y también, existen reportes dentro del género *Acinetobacter* spp (Carvalho-Assef *et al.*, 2014). Otros países implicados dentro de la región de las Américas figuran Paraguay, Ecuador, México, Honduras, Uruguay y Venezuela entre otros (Pasteran *et al.*, 2014; Zurita *et al.*, 2015; Delgado-Blas *et al.*, 2016).

De la mano con el reporte de NDM-1, el mismo año el ISP comunicó el hallazgo de la primera cepa de *K. pneumoniae* ST16 aislada a partir de una muestra de orina productora de la CBP del grupo OXA-48, específicamente la variante OXA-370 (ISP Chile, 2014). Dicha enzima codificada por el gen *bla*_{OXA-370} difiere en tres nucleótidos de *bla*_{OXA-48}. Pertenece a la clase D de Ambler y representa una CBP de difícil pesquisa en los laboratorios que solo poseen pruebas fenotípicas para su identificación (Pereira *et al.*, 2015). El grupo OXA-48 fue descrita por primera vez el año 2003, a partir de una

cepa de *K. pneumoniae* aislada en Turquía la cual era resistente a todos los β -lactámicos incluidos los carbapenémicos (Poirel *et al.*, 2004). A diferencia de otras oxacilinasas, esta variante no se encuentra relacionada a integrones clase 1, si no que se encuentra dentro de un transposón compuesto denominado Tn1999, donde el gen *bla*_{OXA-48} se encuentra flanqueado por dos secuencias de inserción denominadas IS1999 (Poirel *et al.*, 2004; Potron *et al.*, 2013). Su codificación es principalmente plasmídica y por si sola otorga altos niveles de resistencia a penicilinas e imipenem pero no a cefalosporinas de amplio espectro (Poirel *et al.*, 2010), sin embargo, se describe de forma frecuente la asociación de esta CBP con otros genes codificantes de BLEE, inclusive, se han descrito plásmidos que portan tanto genes *bla*_{OXA-48} como genes codificantes de *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{TEM-1}, provocando que dichas cepas presenten resistencia a todos los β -lactámicos, incluidos carbapenémicos (Potron *et al.*, 2013b). En lo que respecta a Latinoamérica y específicamente a la variante descrita en Chile, OXA-370, sólo ha sido descrita en Brasil el 2014, en una cepa de *Enterobacter hormaechei*, la cual constaba de un solo plásmido de 150 kb codificante de OXA-370, el cual además portaba genes codificantes para TEM-1 y CTX-M-8 (Sampaio *et al.*, 2014). Posteriormente, se describió un brote de OXA-370 en un hospital público de Rio de Janeiro (Pereira *et al.*, 2015), encontrándose en 24 aislados de enterobacterias (22 *K. pneumoniae*, 1 *E. cloacae*, 1 *E. aerogenes*) portadoras del gen *bla*_{OXA-370} en plásmidos de tamaño variable entre 25 kb y 150 kb. Además, el 91,6% de las cepas era portadora de *bla*_{CTX-M-15} y 21 de las 24 cepas totales pertenecen al ST16 de *K. pneumoniae*, mismo ST resuelto en la cepa pesquisada en Chile. A la fecha, no se han reportado nuevos casos de la presencia de alguna variante del grupo OXA-48 en el País.

1.7 Hipótesis

De acuerdo a la literatura, el entorno genético asociado a genes *bla*_{CTX-M} estaría implicado en la alta o exitosa diseminación de esta BLEE, puesto que se asocia a elementos genéticos como integrones, transposones o secuencias de inserción que potenciarían la dispersión de éstas y otras enzimas a través de fenómenos de captura, transposición y expresión genética. A su vez, las plataformas genéticas en las cuales se localizan los genes *bla*_{CTX-M}, pueden estar relacionadas con los fenómenos de multirresistencia antibiótica que presentan algunas cepas de enterobacterias, por encontrarse estructuradas por determinantes de resistencia a otras familias de antibióticos como aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, sulfonamidas y fenicoles, sumado a esto, dichos genes, junto con el gen *bla*_{CTX-M} pueden co-localizarse en elementos genéticos móviles como plásmidos que además portan genes de resistencia a carbapenémicos, características que se relacionarían con la multirresistencia antibiótica que presentan las cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas.

Considerando los antecedentes anteriores se plantean como hipótesis:

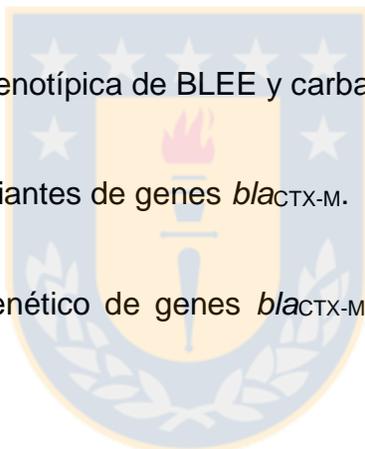
1. La plataforma genética de *bla*_{CTX-M} presente en cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales chilenos corresponde a secuencias de inserción, transposones y/o integrones, a los cuales, además, se asocian otros genes o determinantes de resistencia a antibióticos.
2. Los genes *bla*_{CTX-M} y genes codificantes de carbapenemasas portados por cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales chilenos, comparten localización en elementos genéticos extracromosomales como plásmidos.

1.8. Objetivo general

Determinar el entorno genético y localización del gen *bla*_{CTX-M} en cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos.

1.9 Objetivos específicos

1. Determinar los perfiles y niveles de resistencia a antibióticos β -lactámicos y antibióticos no β -lactámicos utilizados de forma frecuente en el tratamiento de infecciones por enterobacterias.
2. Determinar la presencia fenotípica de BLEE y carbapenemasas.
3. Detectar y determinar variantes de genes *bla*_{CTX-M}.
4. Determinar el entorno genético de genes *bla*_{CTX-M} y proponer su estructura más probable.
5. Determinar la localización genética del gen *bla*_{CTX-M} y si comparte ubicación con genes productores de carbapenemasas.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas

Se incluyeron 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas (Tabla 2.1), las que fueron proporcionadas por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Los aislados fueron obtenidos desde diferentes muestras clínicas, pacientes (excepto UC326 y UC327) y establecimientos de salud pública (HP) y privada (CP) de Chile entre los años 2012 y 2014. Los datos referente a secuencia tipo (ST), pulsotipo y complejo clonal (CC) fueron proporcionado por el ISP. Para la realización del antibiograma y CMI se utilizaron las cepas controles *Escherichia coli* ATCC25922, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC29213.



Tabla 2.1. Cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales de Chile entre los años 2012 y 2014 incluidas en el estudio.

Cepa	Especie	Muestra	Fecha	Hospital	Ciudad	ST	CC	Pulsotipo	CBP
UC318	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	13-03-2012	HP-1	Santiago	101	101	CL-Kpn-Spe-017	KPC-2
UC326	<i>K. pneumoniae</i>	Prótesis biliar	16-04-2012	CP-1	Santiago	11	258	CL-Kpn-Spe-026	KPC-2
UC327	<i>E. coli</i>	Prótesis biliar	16-04-2012	CP-1	Santiago	ND	ND	ND	KPC-2
UC328	<i>K. pneumoniae</i>	Aspirado traqueal	16-04-2012	CP-1	Santiago	11	258	CL-Kpn-Spe-026	KPC-2
UC329	<i>K. pneumoniae</i>	Expectoración	19-04-2012	HP-2	Santiago	258	258	CL-Kpn-Spe-027	KPC-2
UC330	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	19-04-2012	HP-2	Santiago	25	65	CL-Kpn-Spe-020	KPC-2
UC331	<i>K. pneumoniae</i>	Herida	17-05-2012	HP-3	Temuco	11	258	CL-Kpn-Spe-038	KPC-2
UC332	<i>K. pneumoniae</i>	Aspirado traqueal	21-02-2013	CP-2	Arauco	29	29	CL-Kpn-Spe-050	KPC-2
UC333	<i>K. pneumoniae</i>	Líquido peritoneal	28-02-2013	HP-1	Santiago	1161	29	CL-Kpn-Spe-051	KPC-2
UC334	<i>K. pneumoniae</i>	Herida	10-04-2013	CP-2	Arauco	1161	29	CL-Kpn-Spe-051	KPC-2
UC335	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	25-03-2013	CP-3	Santiago	258	258	CL-Kpn-Spe-052	KPC-2
UC336	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	25-03-2013	CP-3	Santiago	258	258	CL-Kpn-Spe-052	KPC-2
UC337	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	14-05-2013	CP-4	Santiago	258	258	CL-Kpn-Spe-054	KPC-2

Fuente: Elaboración propia.

Cepa: Corresponde al número asignado en cepario de Laboratorio de Investigación en Agentes Antimicrobianos (LIAA), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Fecha: corresponde a fecha del aislamiento. HP: Hospital público, CP: Clínica privada. ST: Secuencio-Tipo (MLST). CC: Complejo clonal. CBP: Carbapenemasa producida. ND: No determinado. Datos de Enero de 2014.

Continuación tabla 2.1

Cepa	Especie	Muestra	Año	Hospital	Ciudad	ST	CC	Pulsotipo	CBP
UC338	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	22-05-2013	HP-4	Santiago	1161	29	CL-Kpn-Spe-053	KPC-2
UC339	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	01-07-2013	HP-4	Santiago	1161	29	CL-Kpn-Spe-053	KPC-2
UC340	<i>K. pneumoniae</i>	Hisopado rectal	15-07-2013	HP-4	Santiago	1161	29	CL-Kpn-Spe-055	KPC-2
UC341	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	25-07-2013	CP-2	Arauco	1161	29	CL-Kpn-Spe-057	KPC-2
UC342	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	29-08-2013	HP-4	Santiago	1161	29	CL-Kpn-Spe-057	KPC-2
UC344	<i>K. oxytoca</i>	Secreción bronquial	07-11-2013	CP-1	Santiago	140	ND	CL-Kox-Spe-001	KPC-2
UC358	<i>K. pneumoniae</i>	Orina	18-03-2014	CP-5	Santiago	16	17	CL-Kpn-Spe-063	OXA-370
UC359	<i>K. pneumoniae</i>	Hisopado rectal	29-04-2017	CP-6	Santiago	454	347	CL-Kpn-Spe-064	KPC-2
UC361	<i>K. pneumoniae</i>	Hisopado rectal	29-04-2014	CP-6	Santiago	1588	1190	ND	NDM-1
UC362	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	20-05-2014	HP-5	S. Felipe	258	258	CL-Kpn-Spe-066	KPC-2
UC363	<i>K. oxytoca</i>	Sangre	04-06-2014	CP-7	Santiago	108	ND	CL-Kox-Spe-002	KPC-2

2.2 Susceptibilidad de las cepas a los antibióticos

2.2.1 Antibiograma

El comportamiento de las 24 cepas frente a diferentes antibióticos fue determinada mediante antibiograma por método de difusión en agar según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017) y los criterios establecidos en Magiorakos (2012) para la definición de los perfiles de multi-drogo resistencia (MDR), extrema resistencia (XDR) o pan-resistencia (PDR) a antibióticos. Se evaluaron los siguientes discos de antibióticos β -lactámicos (todos marca OXOID): ampicilina 10 μ g (AMP), amoxicilina/ácido clavulánico 110 μ g (AMC), piperacilina/tazobactam 110 μ g (TZP), aztreonam 30 μ g (ATM), cefpodoxima 10 μ g (CPD), ceftriaxona 10 μ g (CRO), ceftazidima 10 μ g (CAZ), cefotaxima 10 μ g (CTX), cefepime 30 μ g (FEP), imipenem 10 μ g (IPM), meropenem 10 μ g (MEM) y ertapenem 10 μ g (ETP). También se evaluaron discos de antibióticos no β -lactámicos (todos marca OXOID) correspondientes a: cloranfenicol 30 μ g (CLO), sulfametoxazol/trimetoprim 50 μ g (SXT), ciprofloxacino 5 μ g (CIP), levofloxacino 5 μ g (LEV), ácido nalidíxico 5 μ g (NAL), amikacina 30 μ g (AMK), gentamicina 10 μ g (GEN) y tetraciclina 30 μ g (TET). Las placas fueron incubadas por 18-24 h a 37 °C. Para definir susceptibilidad, susceptibilidad intermedia o resistencia se utilizaron los criterios y puntos de cortes descritos en el documento M100 del CLSI (CLSI, 2017).

2.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cefalosporinas de tercera y cuarta generación: CAZ, CRO, CTX y FEP, además de los carbapenémicos ETP, IPM y MEM mediante el método de dilución seriada en placa de agar siguiendo los criterios establecidos en el documento M100 de CLSI (CLSI, 2017). Se evaluó las concentraciones de antibióticos en el rango de 0,5 μ g/mL a 1024 μ g/mL. Para definir

susceptibilidad, susceptibilidad intermedia o resistencia se utilizaron los criterios y puntos de cortes descritos en el documento M100 del CLSI (CLSI, 2017).

2.3 Pruebas fenotípicas para la determinación de BLEE y carbapenemasas

2.3.1 Detección fenotípica de BLEE

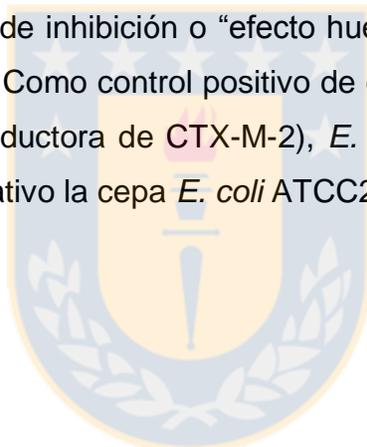
Se realizó la detección fenotípica de BLEE en las 24 cepas de enterobacterias incluidas en este estudio. Para el diseño experimental se utilizaron 3 placas de agar Müller-Hinton (AMH) basado en lo previamente descrito en la literatura para la detección de diferentes β -lactamasas en cepas productoras de CBPs (Famiglietti *et al.*, 2005; Birgy *et al.*, 2012; Georgios *et al.*, 2014). Todas las cepas fueron cultivadas previamente en placas de agar tripticasa por 18-24 h a 37 °C desde donde se obtuvieron colonias bacterianas aisladas para realizar los siguientes test:

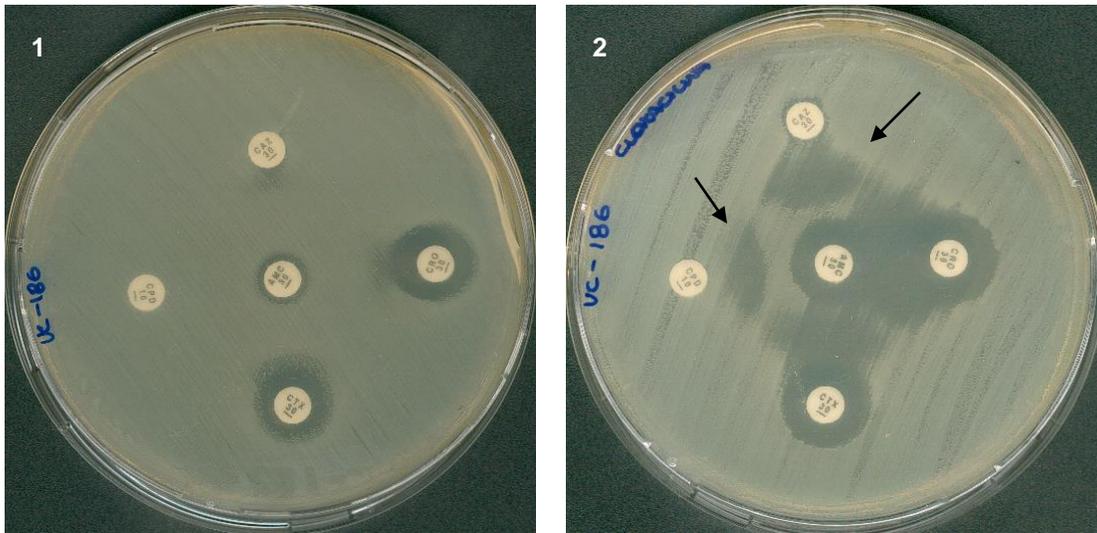
- a) Placa 1: A partir de las colonias bacterianas obtenidas anteriormente, se preparó una suspensión bacteriana a una concentración equivalente a un estándar McFarland 0,5. Posteriormente, se diseminó en placas con 25 mL de AMH. Al centro de la placa se colocó un disco de AMC, este último actuando como inhibidor de BLEE, y equidistantes de éste y entre ellos por 25 mm se dispusieron discos de C3G; CAZ, CPD, CRO y CTX (Famiglietti *et al.*, 2005).
- b) Placa 2: Se utilizó una placa similar a la placa 1, con la diferencia de que a la preparación del AMH se le adicionó ácido fenilborónico (AFB) a una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ con la finalidad de actuar como inhibidor de KPC y/o AmpC, según lo descrito previamente (Birgy *et al.*, 2012; Georgios *et al.*, 2014). Para la realización de esto, se añadieron 750 μl de AFB 10 mg/mL a una placa con 24,25 mL de AMH. Para la preparación del AFB 10 mg/mL se utilizó

un volumen equivalente de DMSO y agua estéril (3 mL). Previamente, la posible actividad antibacteriana del DMSO se testeó preparando una placa de AMH con una concentración similar a la alcanzada en la preparación del AFB y cultivando las cepas que se ensayaron mediante este test.

- c) Placa 3: Se utilizó una placa similar a la placa 1, con la diferencia de que a la preparación del AMH se le adicionó cloxacilina (CLO) a una concentración de 250 µg/mL con la finalidad de actuar como inhibidor de AmpC, según lo descrito previamente (Birgy *et al.*, 2012).

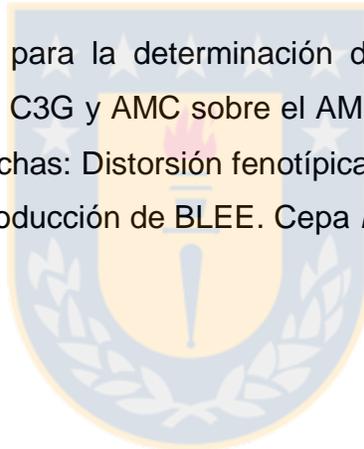
Un resultado positivo para el test de BLEE, en cualquiera de las tres placas, se traduce en la formación de un halo de inhibición o “efecto huevo” entre al menos una de las C3G y el AMC (Figura 2.1). Como control positivo de este test se utilizaron las cepas *K. pneumoniae* UC168 (productora de CTX-M-2), *E. cloacae* UC186 (productora de AmpC), y como control negativo la cepa *E. coli* ATCC25922.





Fuente: Elaboración propia.

Figura 2.1 Test fenotípico para la determinación de BLEE. Placa 1: Disposición estratégica de los discos de C3G y AMC sobre el AMH. Placa 2: AMH suplementado con 250 µg/mL de CLO. Flechas: Distorsión fenotípica o formación de “efecto huevo”, resultado positivo para la producción de BLEE. Cepa *E. cloacae* UC186, productor de AmpC y CTX-M.

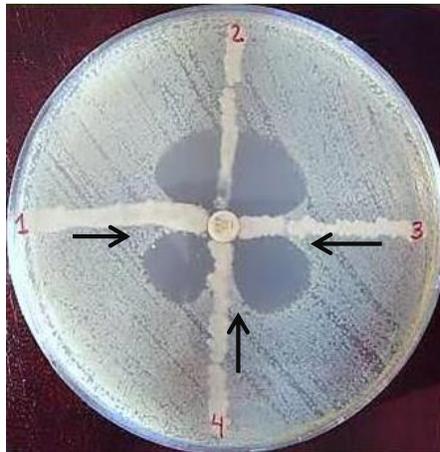


2.3.2 Detección fenotípica de carbapenemasas

La detección fenotípica de carbapenemasas (CBP) se realizó a las 24 cepas de enterobacterias incluidas en este estudio. Para el diseño experimental se utilizaron dos test fenotípicos, uno de ellos para evidenciar la producción, y el segundo para diferenciar si se trata de una serin-carbapenemasa o una métalo-carbapenemasa (Birgy *et al.*, 2012; Georgios *et al.*, 2014). Todas las cepas fueron cultivadas previamente en placas de agar tripticasa por 18-24 h a 37 °C desde donde se obtuvieron colonias aisladas para realizar los siguientes test:

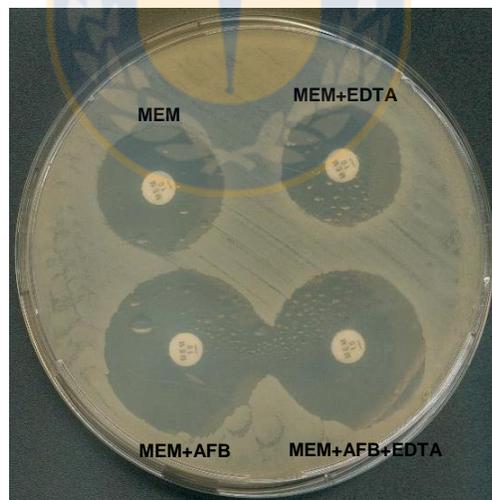
a) Test de Hodge modificado (THM): Se realizó e interpretó de acuerdo a los criterios establecidos por CLSI (CLSI, 2017). Se utilizó disco de MEM (10 µg) como antibiótico revelador. La cepa *K. pneumoniae* BAA1005 (productora de KPC) fue utilizada como control positivo y como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 25922. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 16-20 h. Un resultado positivo se puede apreciar tras el crecimiento de la cepa reveladora del test en la cercanía de la cepa testada sembrada en forma de estría (Figura 2.2).

b) Test de disco combinado con EDTA/AFB: Se realizó basándose en protocolo previamente descrito en Georgios (2014). Se utilizaron 4 discos de MEM (10 µg), uno impregnado con 10 µL de EDTA 0,1 M, el segundo impregnado con 10 µL de AFB 30 mg/mL, el tercero impregnado con EDTA y AFB y el cuarto disco sin ningún inhibidor (Figura 2.3). Los discos se dispusieron a una distancia de 20 mm alejados entre sí. Se consideró un test positivo cuando el halo de inhibición aumentó su tamaño en ≥ 4 mm con respecto al disco de MEM sin inhibidor (Figura 2.3). Se utilizaron las cepas *Acinetobacter baumannii* UC323 (productor de NDM-1) y *K. pneumoniae* ATCC BAA1005 (productora de KPC) como controles positivos.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 2.2 Test de Hodge modificado (THM). Flecha: indica distorsión del halo de inhibición de la cepa reveladora, indicando positividad del test. Al centro, disco de MEM (10 µg). 1: *E. coli* UC327 (productora de KPC). 2: *E. coli* ATCC25922 (control negativo). 3: *K. pneumoniae* UC332 (productora de KPC). 4: *K. pneumoniae* BAA1005 (control positivo).



Fuente: Elaboración propia.

Figura 2.3 Test de disco de MEM (10 µg) combinado con EDTA/AFB para evidenciar y diferenciar la producción fenotípica de metalo-carbapenemasas y serin-carbapenemasas. EDTA 0.1 M, AFB 30 mg/mL. Cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA1005 (control positivo).

2.4 Técnicas moleculares

2.4.1 Extracción de ADN total

Se realizó extracción de ADN total desde las cepas de *Klebsiella* spp. mediante el método de ebullición estándar con 4 ciclos de lavados previos con NaCl 0,8 %. Las cepas fueron sembradas previamente en agar tripticasa y cultivadas por 18-24 h a 37 °C bajo presión selectiva (disco de CTX 10 µg y ETP 10 µg). A partir de colonias aisladas, se tomó una asada y se depositó en un tubo eppendorf de 1,5 mL con 100 µL de agua de bidestilada, todo bajo condiciones de esterilidad. Posteriormente, se homogenizaron las muestras mediante vórtex y se sometieron a centrifugación por 2 min a 14.000 RPM (Microcentrífuga Eppendorf® modelo 5415). Se descartó el sobrenadante y al pellet se le adicionó 200 µL de NaCl 0,8 %, se homogenizó la mezcla mediante vórtex y posteriormente se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones anteriores. Este paso se repitió 3 veces más con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de exopolisacárido de las muestras. Posterior al último lavado con NaCl 0,8 %, se adicionó agua bidestilada libre de nucleasas y las muestras se sometieron a ebullición por 10 min. Las muestras fueron centrifugadas y se recuperó el sobrenadante para ser almacenado a 4 °C hasta su utilización. Para la extracción de ADN desde la cepa de *E. coli*, se utilizó matriz comercial InstaGene (Bio-Rad) y su respectivo protocolo.

Se cuantificó el ADN total y se determinó la pureza mediante la relación de absorbancia 260/280 nm en un espectrofotómetro Infinite 200 PRO NanoQuantc (Tecan, Suiza). Posteriormente, se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés *polymerase chain reaction*) la región del gen 16S ARNr con los partidores señalados en la Tabla 1 (material anexo) utilizando kit KAPA Taq ReadyMIX (KapaBiosystems, Wilmington, MA, Estados Unidos) y su respectivo protocolo. Se utilizó una mezcla de PCR de un volumen final de 10 µL: 3,8 µL de H₂O libre de nucleasas estéril, 5 µL de 2X KAPA Taq ReadyMix, 0,1 µL de cada partidore (25

pmoles/ μL) y 1 μL del templado de ADN. Los ciclos de temperatura para realizar la amplificación por PCR fueron: 1 ciclo de 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 3 min y para la extensión final 1 ciclo de 72 °C por 7 min; en un termociclador Axygen MaxyGen II (Corning, Tewksbury MA, Estados Unidos). Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80-100 V durante 30-45 min. Los gels fueron teñidos durante 10 min con bromuro de etidio (BrEt) (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) seguido de un lavado por 5-10 min con agua estéril libre de nucleasas, para posteriormente ser visualizados en un transiluminador Uvidoc HD5 (UVITEC, Cambridge). Se utilizó 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Waltham, MA, Estados Unidos) como marcador de tamaño molecular.

2.4.2 *Pesquisa y determinación de variantes de genes bla_{CTX-M}*

Se realizó pesquisa de genes *bla_{CTX-M}* de grupo 1, 2, 8, 9 y 25 mediante PCR múltiple de acuerdo a protocolo de Woodford (2006). Los partidores utilizados se describen en Tabla 1 (material anexo). El mix de PCR y las condiciones de electroforesis fueron similares a las descritas en la actividad anterior.

En aquellas cepas que amplificaron para alguno de los genes *bla_{CTX-M}* se procedió a amplificar el gen completo mediante PCR convencional con partidores extragenéticos descritos en Tabla 2 (material anexo), utilizando los programas de PCR de las referencias citadas para cada partidor utilizado. Dichos programas se llevaron a cabo en un termociclador Axygen MaxyGen II (Corning, Tewksbury MA, Estados Unidos). La mezcla de reacción utilizada fue de 25 μl como volumen final, consistente en: 0,25 μl dNTPs 25 mM; 0,75 μl MgCl_2 50 mM (Invitrogen; Waltham, MA, Estados Unidos); 2,5 μl tampón PCR 10X (Invitrogen; Waltham, MA, Estados Unidos); 0,2 μL Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 5 U/ μL (Invitrogen; Waltham, MA, Estados Unidos); 0,125 μl de cada partidor 25 pmol/ μl ; 19,05 μl de agua destilada estéril libre de nucleasas y 2 μl del templado de ADN. Los productos de PCR fueron visualizados

mediante las condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, los productos de PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen (República de Corea). Se analizaron las secuencias para la identificación de la variante de *bla*_{CTX-M} presente en cada una de las cepas utilizando las herramientas bioinformáticas BLAST; *Basic Local Alignment Search Tool* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) y ExPasy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate>).

2.4.3 *Pesquisa de genes productores de carbapenemasas*

A las 24 cepas se le realizó la confirmación de la portación de genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM-1} y *bla*_{OXA-370} utilizando los partidores y protocolos de las referencias citadas en la Tabla 1 (material anexo). Además, aquellas que presentaron test fenotípico positivo para la detección de métalo-carbapenemasas se les realizó pesquisa de genes *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SMP-1} mediante PCR convencional utilizando kit KAPA Taq ReadyMIX (KapaBiosystems, Wilmington, MA, Estados Unidos) y los partidores y protocolos señalados en las referencias de la Tabla 1 (material anexo). Los productos de PCR fueron visualizados mediante las condiciones descritas anteriormente.

2.4.4 *Determinación del entorno genético de bla*_{CTX-M}

Se seleccionaron 6 cepas para la determinación del entorno genético de *bla*_{CTX-M}. Los criterios de selección fueron los siguientes:

1. Cepas portadoras de diferentes variantes del gen *bla*_{CTX-M}.
2. Cepas portadoras de diferentes tipos de carbapenemasas.
3. Cepas de diferente género y/o especie bacteriana.

4. Si no existen diferencias para la selección de 6 cepas aplicando los criterios anteriores, se incluyó información de la procedencia del aislamiento, ST, pulsotipo y complejo clonal.

El entorno genético de *bla*_{CTX-M} de las cepas seleccionadas fue investigado mediante mapeo por PCR de elementos genéticos y regiones adyacentes río arriba y río abajo al gen. Se utilizó como base entornos genéticos frecuentemente asociados a diferentes variantes enzimáticas descritos previamente (Di Conza *et al.*, 2002; Arduino *et al.*, 2003; Bonnet, 2004; Gaze *et al.*, 2005; Power *et al.*, 2005; Eckert *et al.*, 2006; Vignoli *et al.*, 2006, Wei-Hua *et al.*, 2013). Los programas de PCR utilizados fueron de acuerdo a las referencias utilizadas para cada uno de los partidores que se señalan en la tabla 3 y 4 (material anexo). A su vez, se diseñaron programas de PCR para la asociación de diversos partidores, de acuerdo al protocolo del kit KAPA Taq ReadyMIX (KapaBiosystems, Wilmington, MA, Estados Unidos), modificando la temperatura de alineamiento de acuerdo a la *T_m* de cada par de partidores utilizado y los tiempos de la extensión final de acuerdo al tamaño del amplicón de PCR a obtener. Algunos fragmentos superiores a 1000 pb se amplificaron mediante PCR utilizando Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity. Cada fragmento obtenido fue enviado a secuenciar a Macrogen (República de Corea). Se compararon cada una de las secuencias, con secuencias incluidas en la base de datos del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*) mediante BLAST. Posteriormente cada una de las secuencias fue ensamblada utilizando el software CAP3 Sequence Assembly Program (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>). Una vez ensambladas cada una de las secuencias, se realizaron alineamientos múltiples utilizando Clustal Omega con secuencias similares descritas en la base de datos del NCBI obtenidas mediante BLAST. Para evidenciar la similitud proteica de algunas proteínas relacionadas al entorno genético de *bla*_{CTX-M}, se utilizó la herramienta ExPasy Translate Tool y posteriormente se alinearon las secuencias aminoacídicas con Clustal Omega.

2.4.5 Extracción de ADN plasmídico y determinación de los perfiles plasmídicos

Se realizó extracción de plásmidos y se determinó el perfil plasmídico de cada una de las cepas seleccionadas en el punto anterior. Para la realización de esto, la actividad se dividió en cultivo, extracción, electroforesis, tinción y visualización.

I. Cultivo: Las cepas fueron cultivadas en paralelo bajo tres condiciones diferentes; el primer cultivo se realizó en 5 mL de caldo LB (Oxoid Ltd.), el segundo cultivo se realizó en 5 mL de caldo Terrific Broth (Thermo Fisher) y el tercer cultivo se utilizaron 6 mL de caldo LB suplementado con concentraciones subinhibitorias de ETP y además se adicionó 0,5 mM de subsalicilato de bismuto con la finalidad de disminuir la producción de exopolisacárido capsular (Domenico *et al.*, 1991). Previamente, el subsalicilato de bismuto, fue disuelto en una solución de propilenglicol (propano-1,2-diol) alcalinizado con 400 mM de NaOH pH 12. Los tres tipos de cultivos fueron incubados entre 16 – 24 h con agitación constante (200 RPM). En el caso del cultivo suplementado con subsalicilato de bismuto, para detener la reacción se adicionó 25 µl de EDTA 0,25 M. Posteriormente, los tres cultivos se centrifugaron a 12.000 RMP (Microcentrífuga Eppendorf mod. 5415) durante 10 min, descartando el sobrenadante y el pellet bacteriano fue sometido a 4 lavados previos con NaCl 0,8 %, con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de exopolisacárido y contaminantes. El pellet resultante fue utilizado inmediatamente para la extracción de ADNpl.

II. Extracción: La extracción de ADNpl se llevó a cabo utilizando dos kits comerciales; PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep (Invitrogen, Waltham, MA USA) y Zippy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA USA) y, además, un protocolo de lisis alcalina (Ayre Lab, 2016). El ADNpl extraído se cuantificó en equipo Infinite 200 PRO NanoQuantc (Tecan, Suiza).

III. Electroforesis: Se realizaron dos tipos de electroforesis:

- a. Electroforesis convencional en gel de agarosa 0,8 % (Acosta-Pérez *et al.*, 2015) equilibrado con TBE 0.5X (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA pH 8,3). Para cargar la muestra en el gel, se utilizaron 15 μ L de templado de ADNpl y 5 μ L de DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific, Waltham, MA USA). La corrida electroforética fue a 25 – 50 V durante 8 h. Se utilizó 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Waltham, MA USA) y/o O'GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) como marcadores de tamaño molecular.
- b. Electroforesis en campo pulsado (PFGE; del inglés *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) en equipo CHEF-DR II® (Bio-Rad) en gel de agarosa SeaKem® Gold (Lonza, Basel, Suiza) al 1 % equilibrada con búfer TBE al 0.5X (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA pH 8,3) utilizando un voltaje de 6 V y un tiempo de corrida de 20 h, con las condiciones de pulso inicial 4 V y pulso final de 20 V a 14 °C. Para cargar la muestra en el gel se utilizaron 15 μ L de templado de ADNpl y 5 μ L de DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific, Waltham, MA USA).

Preparación de marcador de tamaño molecular: se utilizó ADN digerido con *Xba*I de *Salmonella* serotipo Braenderup (H9812) (Hunter *et al.*, 2005): Para la utilización de este marcador fue necesario la preparación de moldes de agarosa que se describirá brevemente: La cepa fue cultivada en agar tripticasa durante 18 - 24 h a 37 °C. Se resuspendieron células en búfer de suspensión (100 mM Tris; 100 mM EDTA; pH 8,0) ajustando la densidad celular por espectrofotometría a valores de absorbancia entre 0,9 y 1,1, medido a una longitud de onda de 610 nm. Luego, se realizó una pre-lisis adicionando a cada cepa 0,67 mg/mL de proteinasa K (20 mg/mL) e incubando a 54 °C por 10 minutos. Se agregó igual volumen de agarosa SeaKem Gold (Lonza, Basel, Suiza) al 1 % preparada con SDS al 1%. Posteriormente, se incubaron los moldes en búfer de lisis (50 mM Tris; 50 mM EDTA; 1% sarcosyl; pH 8,0) con 0,1 mg/mL de proteinasa K (20 mg/mL) por 3 horas a 54 °C. Luego se sometieron a un proceso de lavado que consistió en lavar 3 veces con agua Milli-Q estéril y 4 veces con búfer TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8), dejando 10 min a

54 °C entre cada lavado. Para finalizar se realizó la digestión de los moldes sumergiéndolos en una solución de 10 µl de búfer de enzima de restricción 1X, 1,5 µl de la enzima de restricción *Xba*I a 0,15 U/µL y 87,5 µl de agua libre de nucleasas. La mezcla fue incubada a 37 °C por 4 horas.

Cabe señalar que a la corrida electroforética, se integró ADNpl de la cepa *Escherichia coli* UC167 que corresponde a una cepa cuyos plásmidos se encuentran tipificados en lo que respecta a su tamaño molecular (Wang *et al.*, 2003), con la finalidad de utilizarlo como referencia para el cálculo de los tamaños moleculares de las diferentes bandas a visualizar.

Los geles fueron teñidos durante 10 min con BrEt (0,5 µg/mL) seguido por un lavado por 5-10 min con agua estéril libre de nucleasas para posteriormente ser visualizados en un transiluminador Uvidoc HD5 (UVITEC, Cambridge). El análisis, edición y estimación de los tamaños de las distintas bandas obtenidas en los perfiles plasmídicos fueron determinados con el software UVI-1D (UVITEC, Cambridge).

2.4.6 Southern-blot e Hibridación ADN-ADN

Con la finalidad de establecer la ubicación del gen *bla*_{CTX-M} y evidenciar si comparte ubicación con alguno de los genes de carbapenemasas presentes en las cepas de estudio, se diseñó un ensayo de hibridación de las 6 cepas a las cuales se les determinó el entorno genético de *bla*_{CTX-M}.

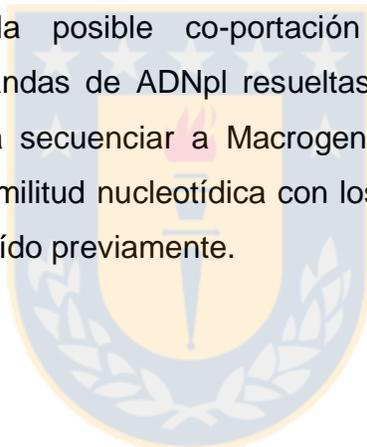
El ADNpl resuelto mediante electroforesis convencional y PFGE fue transferido mediante electrotransferencia (*electroblotting*) a una membrana de Nylon cargada positivamente (Amersham Hybond N+, GE Healthcare). Para realizar este procedimiento se utilizaron los instrumentos Apollo Semy-Dry Blotter (Ankersmid, Holanda), una fuente de poder Bio Rad (Model 1000/500) y como búfer de transferencia se utilizó TBE 1X. El protocolo utilizado se describirá brevemente:

- a. Con la finalidad de mejorar la conductividad de los geles de agarosa resueltos por electroforesis, estos se sumergieron en búfer de transferencia durante 10 min a temperatura ambiente y con agitación constante en contenedores adecuados.
- b. Se armaron dos pilas de papel filtro Whatman 3 MM de 2,5 mm de espesor previamente equilibradas en búfer de transferencia. Una de las pilas de papel va sobre la placa ánodo, y la otra por debajo de la placa cátodo del blotter. El tamaño de la torre de papel filtro, debe ser ligeramente mayor al tamaño del gel y de la membrana usada en la transferencia.
- c. Posterior a la torre de papel filtro ubicada por sobre la placa ánodo, se dispuso la membrana de Nylon N+, ligeramente de mayor tamaño al gel de agarosa.
- d. Posterior a la membrana de Nylon N+, se ubica el gel de agarosa previamente equilibrado en búfer de transferencia.
- e. Para finalizar se dispone sobre el gel de agarosa la segunda pila de papel filtro Whatman 3 MM. Todo el sistema debe quedar libre de burbujas, y al finalizar el armado se debe eliminar todo el búfer de transferencia residual que quede por sobre la placa ánodo. Luego se dispone la placa cátodo y se enciende la fuente de poder bajo las condiciones 25 V (400 mAhm) por 30-45 minutos.
- f. Una vez finalizada la transferencia, se comprueba sometiendo el gel de agarosa y la membrana a tinción durante 10 min con BrEt (0,5 µg/mL) seguido por un lavado por 5 - 10 min con agua estéril libre de nucleasas para posteriormente ser visualizados en un transiluminador Uvidoc HD5 (Uvitec Cambridge). Posteriormente, la membrana de nylon es secada y almacenada a 4 °C hasta su uso.

El ensayo de hibridación se llevó a cabo mediante protocolo previamente descrito (Sambrook *et al.*, 2001) con sondas para genes *bla*_{CTX-M} marcadas con digoxigenina (dUTP) utilizando kit comercial DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Diagnostics. Mannheim, Alemania) y su respectivo protocolo. Se diseñaron dos sondas y se determinó su eficiencia de marcaje de acuerdo a protocolo descrito en el Kit comercial utilizado.

Las membranas hibridadas fueron visualizadas tras exposición 10-30 minutos en un detector de quimioluminiscencia ChemiScope 3100 (CLINX, Shanghai, China) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Aquellas bandas de ADNpl hibridadas para las sondas ensayadas fueron extraídas y purificadas desde la agarosa utilizando el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA, Madison, USA), utilizando como referencia metodología previamente descrita (Lin *et al.*, 2009). La posible contaminación de ADN cromosomal fue chequeada utilizando partidores para la región 16s-ARNr. El ADNpl purificado se utilizó como templado, para la comprobación de la portación de los genes *bla*_{CTX-M}, y a su vez, se determinó la posible co-portación de genes productores de carbapenemasas en las bandas de ADNpl resueltas por electroforesis. Los genes amplificados se enviaron a secuenciar a MacroGen (República de Corea) con la finalidad de establecer la similitud nucleotídica con los genes pesquisados utilizando el ADN genómico total extraído previamente.



3. RESULTADOS

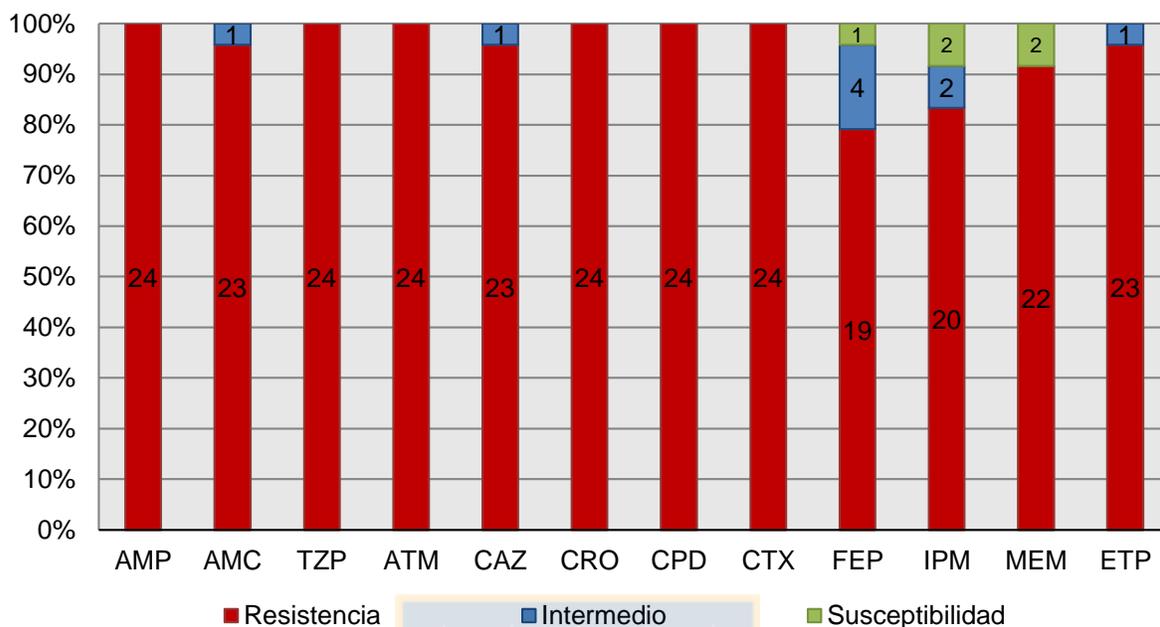
3.1 Susceptibilidad de las cepas a los antibióticos

3.1.1 Antibiograma

Los resultados de actividad antibacteriana de 20 antibióticos diferentes sobre las 24 cepas de enterobacterias estudiadas (21 *K. pneumoniae*, 2 *K. oxytoca* y 1 *E. coli*) se presentan como porcentajes de resistencia, susceptibilidad intermedia, o susceptibilidad para antibióticos β -lactámicos (Figura 3.1) y para otros grupos de antibióticos (Figura 3.2).

En la Tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las cepas y para cada uno de los antibióticos evaluados. De acuerdo a estos resultados las cepas fueron clasificadas en multi-drogo resistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR), según los criterios establecidos en Magiorakos (2012). Los antibióticos ensayados fueron clasificados en 11 categorías según las definiciones señaladas previamente.

Las 24 cepas fueron no susceptibles a AMP, AMC, TZP, ATM, CAZ, CRO, CPD y CTX, siendo 22 de ellas inclusive no susceptibles a los carbapenémicos ensayados (Figura 3.1). En lo que respecta a cefepime, se obtuvo un número mayor de cepas con susceptibilidad intermedia (4/24) y sólo la cepa UC344 presentó susceptibilidad a este antibiótico (Tabla 3.1). En lo que respecta a los carbapenémicos, dos cepas presentaron susceptibilidad a MER e IPM (UC344/UC359), y tres cepas presentaron susceptibilidad intermedia a al menos uno de los tres carbapenémicos (UC340/UC344/UC358), mientras que el 83,3 % de las cepas (20/24) fue resistente a los tres carbapenémicos ensayados (Tabla 3.1).

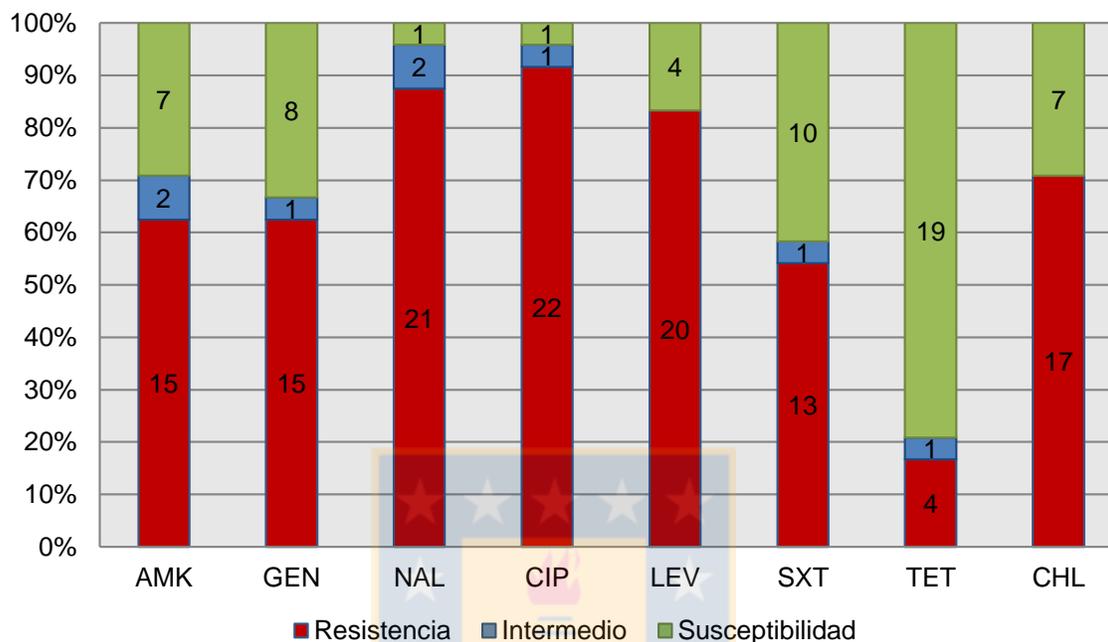


Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.1 Porcentaje de susceptibilidad (verde), susceptibilidad intermedia (azul) y resistencia (rojo) antibiótica de 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos a diferentes antibióticos β -lactámicos determinado mediante antibiograma por método de difusión en agar. AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ac. clavulánico, TZP: piperacilina/tazobactam, ATM: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CRO: ceftriaxona, CPD: cefpodoxima, CTX: cefotaxima, FEP: cefepime, IPM: imipenem, MEM: meropenem, ETP: ertapenem.

Con respecto a los antibióticos no β -lactámicos ensayados, 21 cepas presentaron susceptibilidad a al menos 1 de las 5 categorías de antibióticos ensayados (Tabla 3.1). Se puede apreciar que el porcentaje menor de susceptibilidad se obtuvo para las quinolonas (NAL, CIP, LEV) (Figura 3.2), existiendo sólo 4 cepas (UC344, UC359, UC361 y UC363) que presentaron susceptibilidad a 1 de los 3 antibióticos ensayados de esta familia (Tabla 3.1). En lo que respecta a los aminoglucósidos, AMK y GEN, aproximadamente el 60 % de las cepas fue resistente a uno de los dos antibióticos (Figura 3.2) y se observó susceptibilidad en 10/24 cepas, dentro de las cuales, 5 cepas

fueron susceptibles a ambos aminoglucósidos (Tabla 3.1). El antibiótico que presentó mayor susceptibilidad fue TET, donde 19/24 cepas fueron susceptibles (Figura 3.2).



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.2 Porcentajes de susceptibilidad (verde), susceptibilidad intermedia (azul) y resistencia (rojo) antibiótica de 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos a diferentes antibióticos determinado mediante antibiograma por método de difusión en agar. AMK: amikacina, GEN: gentamicina, NAL: ac. nalidíxico, CIP: ciprofloxacino, LEV: levofloxacino, SXT: trimetoprim/sulfametoxazol, TET: tetracilina, CHL: cloranfenicol.

De acuerdo a la Tabla 3.1, se obtuvo que 9 cepas (37,5 %) presentaron un perfil MDR, y que las 15 restantes (62,5 %), presentaron un perfil XDR. Se destaca que las cepas UC326 y UC328 no presentaron susceptibilidad a ninguno de los 20 antibióticos ensayados. Con el objetivo de determinar si estas cepas presentaban un perfil de resistencia del tipo PDR, se determinó mediante ensayo de microdilución en placa la CMI a colistin (EUCAST., 2017) resultando una concentración de 2 µg/mL, para ambas

cepas, valor dentro del rango de susceptibilidad, descartando de ese modo un perfil PDR, para ambas cepas.



Tabla 3.1 Actividad antibacteriana de diferentes antibióticos sobre 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos.

Cepas	ANTIBIOTICOS																					Perfil
	1	2	3	4	5					6			7		8			9	10	11		
	AMP	AMC	TZP	ATM	CAZ	CPD	CRO	CTX	FEP	IPM	MEM	ETP	AMK	GEN	NAL	CIP	LEV	SXT	TET	CHL		
UC318 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	XDR	
UC326 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
UC327 †	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
UC328 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
UC329 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	XDR
UC330 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	XDR
UC331 *	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	XDR
UC332 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	XDR
UC333 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	XDR
UC334 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	XDR
UC335 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	XDR
UC336 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	XDR
UC337 *	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	XDR
UC338 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	XDR
UC339 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	MDR
UC340 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	MDR

Números del 1 al 11 representan las 11 categorías de antibióticos para definir los perfiles XDR, MDR y PDR de acuerdo a Magiorakos (2012).

S: Susceptibilidad, I: Susceptibilidad intermedia, R: Resistencia. *: *K. pneumoniae*; †: *E. coli*; Ω: *K. oxytoca*.

Fuente: Elaboración propia.

Continuación Tabla 3.1

Cepas	ANTIBIÓTICOS																					Perfil
	1 [‡]	2	3	4	5					6			7		8			9	10	11		
	AMP	AMC	TZP	ATM	CAZ	CPD	CRO	CTX	FEP	IPM	MEM	ETP	AMK	GEN	NAL	CIP	LEV	SXT	TET	CHL		
UC341 *	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	MDR	
UC342 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	S	S	MDR	
UC344 Ω	R	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	S	S	R	I	S	R	S	R	MDR	
UC358 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	MDR	
UC359 *	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	I	R	S	S	S	S	MDR	
UC361 *	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	I	S	R	S	S	MDR	
UC362 *	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	XDR	
UC363 Ω	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	MDR	

3.1.2 Determinación de los niveles de resistencia a antibióticos β -lactámicos

Tras la determinación de los parámetros cualitativos de susceptibilidad de las 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas frente a antibióticos β -lactámicos se realizaron ensayos cuantitativos de determinación de CMI a C3G (CAZ, CRO, CTX), cuarta generación (FEP) y carbapenémicos (ETP, IPM, MER), mediante el método de dilución seriada en agar utilizando los criterios y puntos de corte del CLSI (CLSI. 2017) (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Puntos de corte CLSI (2017) para interpretación de susceptibilidad (S), susceptibilidad intermedia (I) y resistencia (R) de diferentes antibióticos β -lactámicos mediante determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI).

Antibiótico	Criterio interpretación CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
	S	I	R
Cefepime (FEP)	≤ 2	-	≥ 16
Cefotaxima (CTX)	≤ 1	2	≥ 4
Ceftazidima (CAZ)	≤ 4	8	≥ 16
Ceftriaxona (CRO)	≤ 1	2	≥ 4
Ertapenem (ETP)	$\leq 0,5$	1	≥ 2
Imipenem (IPM)	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem (MER)	≤ 1	2	≥ 4

Fuente: Elaboración propia.

La CMI más elevada se obtuvo para ETP, existiendo 4 cepas que alcanzaron 512 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 3.3). Las cepas *K. oxytoca* UC344, y *K. pneumoniae* UC359 fueron las únicas que presentaron susceptibilidad a carbapenémicos, específicamente IPM y MEM con una CMI de $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$, siendo la cepa UC344 la única que no presentó resistencia a carbapenémicos. Los datos de CMI y antibiograma, se relacionan en lo que respecta a la interpretación de susceptibilidad y resistencia.

Tabla 3.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI: µg/ml) de antibióticos β-lactámicos en 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos.

Cepas	Antibióticos													
	ETP		MEM		IPM		CAZ		CRO		CTX		FEP	
	µg/ml	Int	µg/ml	Int	µg/ml	Int	µg/ml	Int	µg/ml	Int	µg/ml	Int	µg/ml	Int
UC318*	512	R	64	R	64	R	128	R	≥1024	R	≥1024	R	256	R
UC326*	64	R	16	R	32	R	64	R	512	R	≥1024	R	128	R
UC327†	512	R	64	R	256	R	256	R	≥1024	R	512	R	512	R
UC328*	512	R	64	R	128	R	32	R	128	R	64	R	32	R
UC329*	32	R	4	R	8	R	128	R	256	R	64	R	128	R
UC330*	64	R	16	R	8	R	128	R	128	R	32	R	32	R
UC331*	32	R	4	R	4	R	64	R	128	R	64	R	8	I
UC332*	128	R	32	R	8	R	64	R	≥1024	R	≥1024	R	256	R
UC333*	512	R	32	R	16	R	256	R	≥1024	R	≥1024	R	512	R
UC334*	256	R	64	R	64	R	32	R	≥1024	R	≥1024	R	512	R
UC335*	32	R	4	R	4	R	512	R	512	R	512	R	128	R
UC336*	64	R	4	R	8	R	≥1024	R	1024	R	128	R	128	R
UC337*	32	R	4	R	8	R	128	R	128	R	64	R	8	I
UC338*	128	R	32	R	16	R	128	R	≥1024	R	≥1024	R	512	R
UC339*	256	R	32	R	8	R	32	R	128	R	64	R	32	R
UC340*	128	R	4	R	2	I	512	R	≥1024	R	≥1024	R	≥1024	R
UC341*	64	R	32	R	8	R	8	I	≥1024	R	≥1024	R	≥1024	R
UC342*	128	R	32	R	8	R	64	R	128	R	32	R	32	R
UC344 ^Ω	1	I	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	64	R	32	R	16	R	2	S
UC358*	8	R	4	R	2	I	≥1024	R	≥1024	R	≥1024	R	512	R
UC359*	2	R	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	32	R	16	R	8	R	4	I
UC361*	8	R	16	R	16	R	≥1024	R	≥1024	R	512	R	64	R
UC362*	64	R	64	R	16	R	256	R	256	R	256	R	4	I
UC363 ^Ω	2	R	4	R	8	R	128	R	128	R	64	R	16	R

Fuente: Elaboración propia.

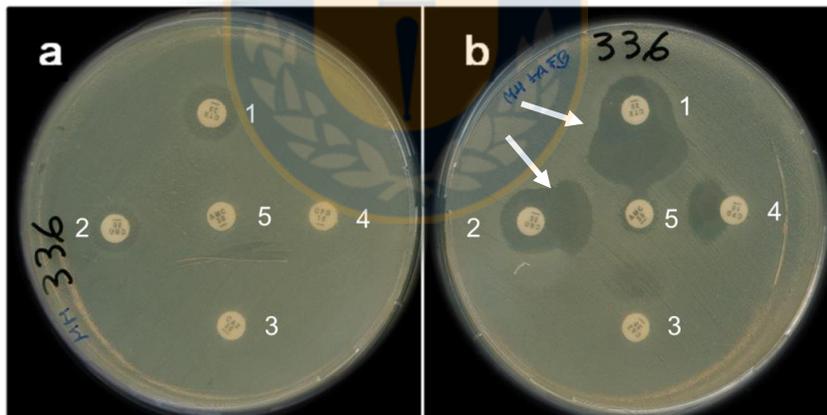
S: Susceptibilidad, I: Susceptibilidad intermedia, R: Resistencia. Int: Interpretación del valor de CMI según los criterios del CLSI (Tabla 3.2). *: *K. pneumoniae*; †: *E. coli*; Ω: *K. oxytoca*.

3.2 Determinación fenotípica de producción de BLEE y Carbapenemasas

Los resultados se analizaron separando las cepas en dos grupos en base al tipo de CBPs producidas. Así, en la Tabla 3.4 se presentan los resultados de detección fenotípica BLEE y CBPs en las 22 cepas productoras de KPC y en la Tabla 3.5, los resultados de las cepas UC358 productora de OXA-370 y UC361 productora NDM-1.

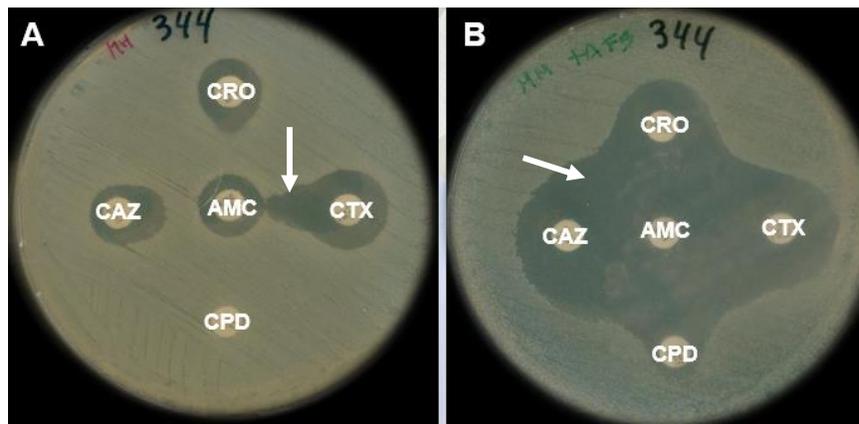
Dentro de las 22 de cepas productoras de KPC, 17 cepas producen fenotípicamente BLEE, de las cuales 15 presentaron un test fenotípico de BLEE negativo en ausencia de AFB, resultado que es revertido al adicionar 300 ug/mL de AFB. Por otro lado, las cepas productoras de OXA-370 (UC358) y NDM-1 (UC361), fenotípicamente resultaron BLEE negativas.

Cabe señalar que no hubo resultados positivos para la producción fenotípica de AmpC utilizando cloxacilina como inhibidor.



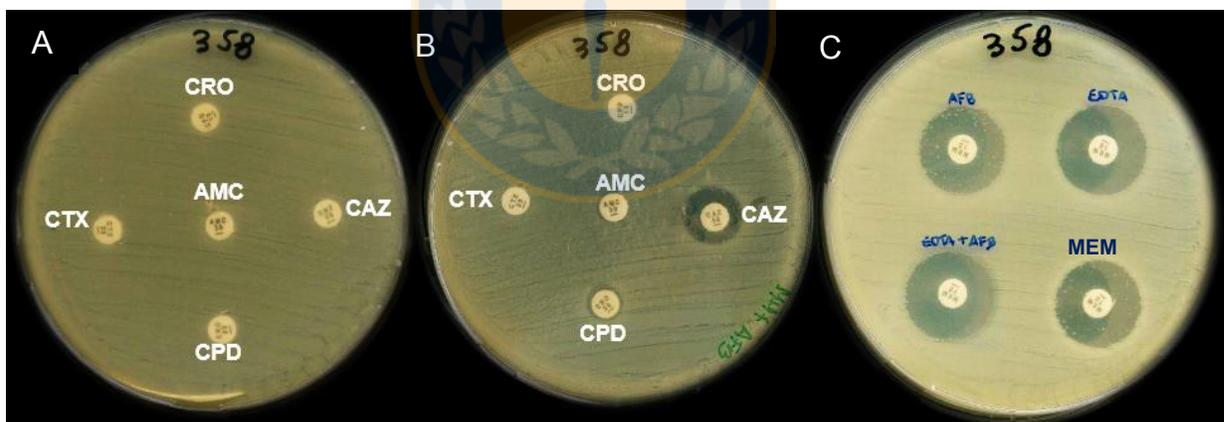
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.3 Test fenotípico de sinergia de doble disco para la detección de BLEE en cepas productora de KPC. Cepa de *K. pneumoniae* UC336 (bla_{KPC}). a) AMH, b) AMH más AFB (300 µg/mL). Discos de antibióticos: 1; CRO. 2; CTX, 3; CAZ. 4; CPD. 5; AMC. Flechas: Distorsión fenotípica o formación de “efecto huevo”, resultado positivo para la producción de BLEE.



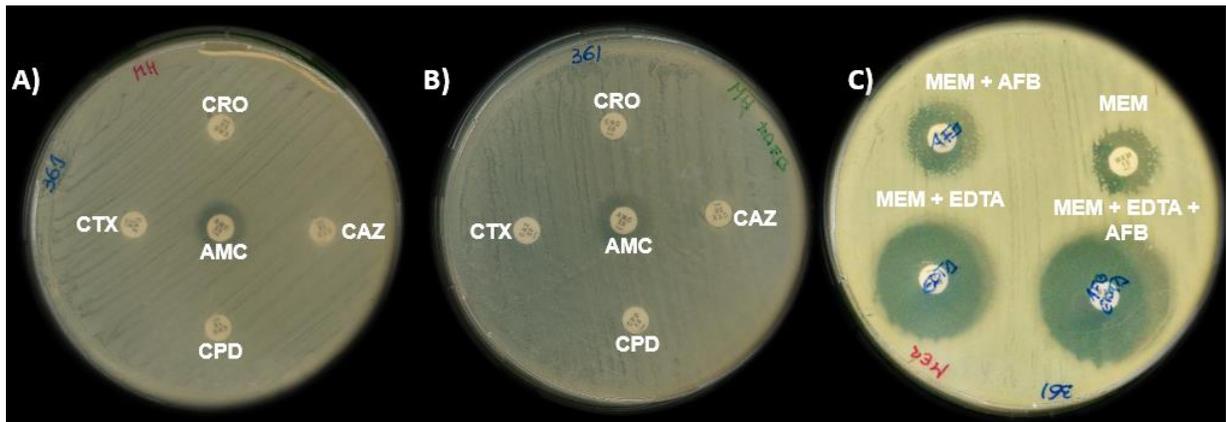
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.4 Test fenotípico de sinergia de doble disco para la detección de BLEE en cepas productoras de. Cepa de *Klebsiella oxytoca* UC344 (*bla_{KPC}*). a) AMH, b) AMH más AFB (300 µg/mL). Discos de antibióticos: CRO, CTX, CAZ, CPD, AMC. Flechas: Distorsión fenotípica o formación de “efecto huevo”, resultado positivo para la producción de BLEE en ambas placas.



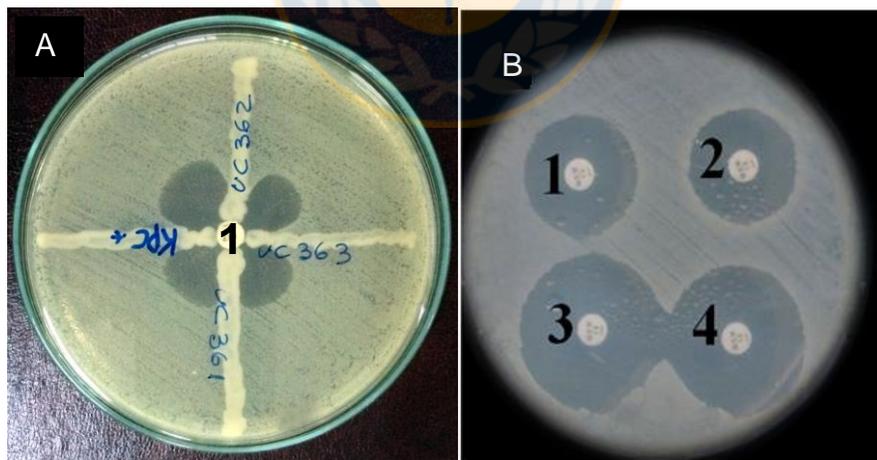
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.5 A y B: Test fenotípico de sinergia de doble disco para la detección de BLEE en *K. pneumoniae* UC358 (*bla_{OXA-370}*). A) AMH, B) AMH más AFB (300 µg/mL). C: Test fenotípico de disco combinado para detección de carbapenemasas en *K. pneumoniae* UC358 (*bla_{OXA-370}*). MEM: meropenem, AFB: MEM + AFB, EDTA: MEM + EDTA, EDTA+AFB: MEM+EDTA+AFB.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.6 A y B: Test fenotípico de sinergia de doble disco para la detección de BLEE en *K. pneumoniae* UC361 (bla_{NDM-1}). A) AMH, B) AMH más AFB (300 μ g/mL). C: Test fenotípico de disco combinado para detección de carbapenemasas en *K. pneumoniae* UC361 (bla_{NDM-1}). MEM: meropenem, AFB: MEM + AFB, EDTA: MEM + EDTA, EDTA+AFB: MEM+EDTA+AFB.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.7 Test fenotípicos para la detección de carbapenemasas. A: Test de Hodge modificado, 1: Disco revelador de MEM, KPC: cepa control positivo *K. pneumoniae* ATCC BAA1005 (bla_{KPC}), UC361 y UC362: cepas de *K. pneumoniae* incluidas en el

estudio, UC363: cepa de *K. oxytoca* incluida en el estudio. B: Test de disco de MEM combinado con EDTA-AFB, disco 1) MEM, 2) MEM+EDTA, 3) MEM+AFB, 4) MEM+EDTA+AFB, Cepa de *K. pneumoniae* UC338 (*bla_{KPC}*).

De acuerdo a los resultados de los test fenotípicos, las 24 cepas estudiadas expresan fenotípicamente CBPs, puesto que todas resultaron positivas al realizar el test de Hodge (Figura 3.7). En el ensayo de disco combinado con AFB, el 100% de las cepas portadoras de *bla_{KPC}* presentaron positividad al test mediante la visualización de aumento de tamaño de los halos de inhibición al agregar AFB al disco de MEM (Tabla 3.4). Por el contrario, en el ensayo con EDTA, sólo una cepa presentó positividad al test (UC361), evidenciando de esta forma la producción una metalo- β -lactamasa (Tabla 3.5).

En lo que respecta a la cepa productora de OXA-370, con el método de disco combinado con diferentes inhibidores, no fue posible determinar el tipo de carbapenemasa presente en la cepa, pero si presentó positividad para el test de Hodge.

Tabla 3.4 Detección fenotípica de BLEE y carbapenemasas en 22 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasa KPC aisladas en hospitales chilenos.

	Detección de BLEE		Test de Hodge	Detección de carbapenemasas		
	Test de sinergia de doble disco en placa			Test de disco* combinado con		
	Sin inhibidor	Con AFB		EDT A	AFB	EDTA y AFB
% Cepas positivas	9	77	100	4,6	100	100
Número de cepas positivas	2	17	22	1	22	22

AFB: Ácido fenilborónico, EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético. *Disco de meropenem 10 µg/mL

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.5 Detección fenotípica de BLEE y carbapenemasas en cepas de *K. pneumoniae* UC358 (*bla_{OXA-370}*) y UC361 (*bla_{NDM-1}*) aisladas en hospitales chilenos.

	Detección de BLEE		Test de Hodge	Detección de carbapenemasas		
	Test de sinergia de doble disco en placa			Test de disco* combinado con		
	Sin inhibidor	Con AFB		EDT A	AFB	EDTA y AFB
% Cepas positivas	0	0	100	50	0	50
Número de cepas positivas	0	0	2	1	0	1

AFB: Ácido Fenilborónico, EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético. *Disco de meropenem 10 µg/mL

Fuente: Elaboración propia.

3.3 Pesquisa de genes *bla*_{CTX-M}

Un total de 13 de las 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas portan genes *bla*_{CTX-M}, de los cuales 54 % corresponde al grupo CTX-M-1 y 46 % corresponde al grupo CTX-M-2. Por otra parte, 7 cepas (29 %) que presentaron un test fenotípico de BLEE positivo, resultaron negativas para la pesquisa de genes *bla*_{CTX-M}; en cambio, las cepas UC340, UC358 (*bla*_{oxa-370}⁺) y UC361 (*bla*_{NDM-1}) presentaron un test fenotípico de BLEE negativo, con detección molecular de *bla*_{CTX-M} (Tabla 3.6).

3.4 Identificación de variantes de genes *bla*_{CTX-M}

Al realizar el análisis de las secuencias nucleotídicas de los productos de amplificación de los genes *bla*_{CTX-M} obtenidos de las 13 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos, se encontró tres diferentes variantes alélicas correspondientes a CTX-M-2, CTX-M-3 y CTX-M-15 (Tabla 3.7).

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-15} presentaron 100 % de similitud con las secuencias de referencia para cada uno de las variantes de *bla*_{CTX-M} depositadas en el sitio web oficial de β-lactamasas (<http://www.lahey.org/studies>), las cuales fueron utilizadas como secuencias de referencia. En cambio, la secuencia nucleotídica de *bla*_{CTX-M-3} amplificada desde la cepa *K. oxytoca* UC363 presentó una variación en tres nucleótidos (G152T, G173A, T756C) (Figura 3.8); sin embargo, dichas variaciones no otorgan cambios aminoácidos a la proteína (Figura 3.9).

Tabla 3.6 Detección fenotípica de BLEE y detección molecular mediante PCR de diferentes grupos de genes *bla*_{CTX-M} en 24 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en Chile.

Muestra	Test fenotípico de sinergia con disco combinado		Detección molecular grupos de <i>bla</i> _{CTX-M}
	Test BLEE	BLEE+AFB	
UC318*	-	-	-
UC326*	-	+	-
UC327†	-	+	Grupo 1
UC328*	-	+	-
UC329*	-	-	-
UC330*	-	-	-
UC331*	-	-	-
UC332*	-	+	Grupo 2
UC333*	-	+	Grupo 2
UC334*	-	+	Grupo 2
UC335*	-	+	-
UC336*	-	+	-
UC337*	-	+	-
UC338*	-	+	Grupo 2
UC339*	-	+	Grupo 2
UC340*	-	-	Grupo 2
UC341*	-	+	Grupo 1
UC342*	-	+	Grupo 1
UC344 ^Ω	+	+	Grupo 1
UC358*	-	-	Grupo 1
UC359*	-	+	-
UC361*	-	-	Grupo 1
UC362*	-	+	-
UC363 ^Ω	+	+	Grupo 1

AFB: ácido fenilborónico. *: *K. pneumoniae*; †: *E. coli*; Ω: *K. oxytoca*.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.7 Cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos portadoras de diferentes alelos de *bla*_{CTX-M}

Cepa	Especie	CBP	Variante de <i>bla</i> _{CTX-M}	Referencia ¹	% SN	% SA
UC327	<i>E. coli</i>	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	AY044436	100	100
UC332	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	X92507	100	100
UC333	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	X92507	100	100
UC334	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	X92507	100	100
UC338	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	X92507	100	100
UC339	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	X92507	100	100
UC340	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	X92507	100	100
UC341	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	AY044436	100	100
UC342	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	AY044436	100	100
UC344	<i>K. oxytoca</i>	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	AY044436	100	100
UC358	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-370	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	AY044436	100	100
UC361	<i>K. pneumoniae</i>	NDM-1	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	AY044436	100	100
UC363	<i>K. oxytoca</i>	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	Y10278	99 (*)	100

CBP; Carbapenemasa. (1): Extraída desde <http://www.lahey.org/Studies> y Genbank. SN: similitud nucleotídica; SA: similitud aminoacídica. (*); Variación de 3 nucleótidos.

Fuente: Elaboración propia.

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment
KU200455      TGTGTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTTGCCG      120
Y10278.1     TGTGTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTTGCCG      115
AY044436.1   TGTGTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTTGCCG      115
*****
KU200455      AATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGGTGGCATTGATTAACACAGCGGATAATT      180
Y10278.1     AATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTCGATTGATTAACACAGCAGATAATT      175
AY044436.1   AATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTCGATTGATTAACACAGCAGATAATT      175
*****
KU200455      CGCAAATACTTTATCGTGTGATGAGCGCTTTCGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGG      240
Y10278.1     CGCAAATACTTTATCGTGTGATGAGCGCTTTCGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGG      235
AY044436.1   CGCAAATACTTTATCGTGTGATGAGCGCTTTCGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGG      235
*****
KU200455      CCGCGGCCCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTTG      300
Y10278.1     CCGCGGCCCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTTG      295
AY044436.1   CCGCGGCCCGGTGCTGAAGAAAAGTAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTTG      295
*****
KU200455      AGATCAAAAATCTGACCTTGTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCATGGGA      360
Y10278.1     AGATCAAAAATCTGACCTTGTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCATGGGA      355
AY044436.1   AGATCAAAAATCTGACCTTGTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCATGGGA      355
*****
KU200455      CGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCTACAGTACAGCGATAACCTGGCGATGA      420
Y10278.1     CGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCTACAGTACAGCGATAACCTGGCGATGA      415
AY044436.1   CGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCTACAGTACAGCGATAACCTGGCGATGA      415
*****
KU200455      ATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCGACAGCTGG      480
Y10278.1     ATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCGACAGCTGG      475
AY044436.1   ATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCGACAGCTGG      475
*****
KU200455      GAGACGAAACGTTCCGCTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGG      540
Y10278.1     GAGACGAAACGTTCCGCTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGG      535
AY044436.1   GAGACGAAACGTTCCGCTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGG      535
*****
KU200455      ATCCGCGTGATACCACTTCACTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTCGGGAATCTGACGCTGG      600
Y10278.1     ATCCGCGTGATACCACTTCACTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTCGGGAATCTGACGCTGG      595
AY044436.1   ATCCGCGTGATACCACTTCACTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTCGGGAATCTGACGCTGG      595
*****
KU200455      GTAAAGCATTTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCA      660
Y10278.1     GTAAAGCATTTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCA      655
AY044436.1   GTAAAGCATTTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCA      655
*****
KU200455      CCGGTGCAGCGAGCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTGTGGGGGATAAAACCG      720
Y10278.1     CCGGTGCAGCGAGCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTGTGGGGGATAAAACCG      715
AY044436.1   CCGGTGCAGCGAGCATTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTGTGGGGGATAAAACCG      715
*****
KU200455      GCAGCGGTGACTATGGCACCACCAATGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGC      780
Y10278.1     GCAGCGGTGACTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGC      775
AY044436.1   GCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGC      775
*****
KU200455      CGCTGATTCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATG      840
Y10278.1     CGCTGATTCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATG      835
AY044436.1   CGCTGATTCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATG      835
*****
KU200455      TATTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTG---      878
Y10278.1     TATTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTGTA      876
AY044436.1   TATTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTGTA      876
*****

```

Fuente: Elaboración propia en Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo).

Figura 3.8 Alineamiento de secuencias nucleotídicas extraídas de Genbank. KU200455: *K. oxytoca* UC363 (*bla_{CTX-M-3}*) analizada en esta tesis. Y10278.1: *E. cloacae* (*bla_{CTX-M-3}*) y AY044436.1: *E. coli* (*bla_{CTX-M-15}*) secuencias de referencia de Lahey. En rojo sitios de diferencia. Posición 789 (subrayado y negrita) diferencia nucleotídica que genera diferencia aminoacídica entre *bla_{CTX-M-3}* y *bla_{CTX-M-15}*.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

KU200455      PMVKKSLRQFTLMATATVTL LLG SVPL YAQ TADVQQKLAELERQSGGRLGVALINTADNS 60
Y10278        -MVKKSLRQFTLMATATVTL LLG SVPL YAQ TADVQQKLAELERQSGGRLGVALINTADNS 59
AY044436      -MVKKSLRQFTLMATATVTL LLG SVPL YAQ TADVQQKLAELERQSGGRLGVALINTADNS 59
                *****

KU200455      QILYRADERFAMCSTSKVMAAAVLKKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGT 120
Y10278        QILYRADERFAMCSTSKVMAAAVLKKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGT 119
AY044436      QILYRADERFAMCSTSKVMAAAVLKKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGT 119
                *****

KU200455      MSLAELSAALQYSDNVAMNKLI AHVGGPASVTAFARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGD 180
Y10278        MSLAELSAALQYSDNVAMNKLI AHVGGPASVTAFARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGD 179
AY044436      MSLAELSAALQYSDNVAMNKLI AHVGGPASVTAFARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGD 179
                *****

KU200455      PRD TTS PRAMAQTLRNLT LGKALGDSQRAQLVTW MKGNTTGAASI QAGLPASWVVGDKTG 240
Y10278        PRD TTS PRAMAQTLRNLT LGKALGDSQRAQLVTW MKGNTTGAASI QAGLPASWVVGDKTG 239
AY044436      PRD TTS PRAMAQTLRNLT LGKALGDSQRAQLVTW MKGNTTGAASI QAGLPASWVVGDKTG 239
                *****

KU200455      SGDYGTNDIAVIWPKDRAPLILV TYFTQPQPKAESRRDVLASA AKIVTDGL 292
Y10278        SGDYGTNDIAVIWPKDRAPLILV TYFTQPQPKAESRRDVLASA AKIVTDGL 291
AY044436      SGDYGTNDIAVIWPKDRAPLILV TYFTQPQPKAESRRDVLASA AKIVTDGL 291
                ** *****

```

Fuente: Elaboración propia en Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo)

Figura 3.9 Alineamientos de secuencias aminoacídicas extraídas de Genbank. KU200455: *K. oxytoca* UC363 (*bla*_{CTX-M-3}) analizada en esta tesis. Y10278: *E. cloacae* (*bla*_{CTX-M-3}) y AY0444361: *E. coli* (*bla*_{CTX-M-15}) secuencias de referencia de Lahey. En rojo, subrayado y en negrita sitio de diferencia en posición 243; diferencia aminoacídica que genera diferencia entre *bla*_{CTX-M-3} y *bla*_{CTX-M-15} (sustitución de ácido aspártico (D) por glicina (G)).

3.5 Plataformas genéticas asociadas a *bla*_{CTX-M}

Para realizar la determinación de las plataformas genéticas asociadas a *bla*_{CTX-M} se seleccionaron 6 cepas (Tabla 3.8), considerando los criterios mencionados en materiales y métodos (punto 2.2.4).

Tabla 3.8 Cepas portadoras de *bla*_{CTX-M} seleccionadas para la determinación de su entorno genético

Cepa	Especie	Ciudad	ST	CBP	Variante de <i>bla</i> _{CTX-M}
UC327	<i>E. coli</i>	Santiago	ND	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
UC332	<i>K. pneumoniae</i>	Arauco	ST29	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-2}
UC338	<i>K. pneumoniae</i>	Santiago	ST1161	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-2}
UC358	<i>K. pneumoniae</i>	Santiago	ST16	OXA-370	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
UC361	<i>K. pneumoniae</i>	Santiago	ST1588	NDM-1	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
UC363	<i>K. oxytoca</i>	Santiago	ST108	KPC-2	<i>bla</i> _{CTX-M-3}

ST: Secuencia tipo, CBP: Carbapenemasa, ND: No determinado.

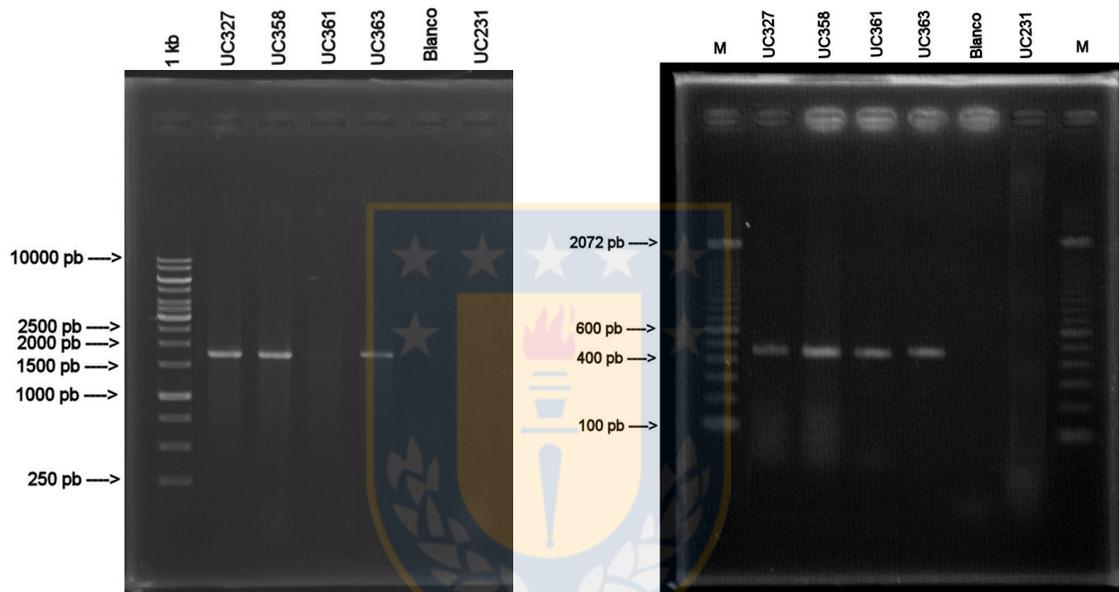
Fuente: Elaboración propia.

3.5.1 *Escherichia coli* UC327 (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC-2})

De acuerdo a la revisión bibliográfica (Poirel *et al.*, 2003; Eckert *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2013 Wei-Hua *et al.*, 2013), se pesquisó la asociación entre la SI denominada *ISEcp1* y el gen *bla*_{CTX-M-15} utilizando los partidores *ISEcp1_CTX_F/ISEcp1_CTX_R* (Tabla 4, material anexo). Se obtuvo un producto de PCR de 1730 pb (Figura 3.10A) cuyo análisis de su secuencia nucleotídica demostró que rio arriba al gen *bla*_{CTX-M}, separado por una secuencia de 48 pb se encuentra *ISEcp1*, flanqueada por dos secuencias repetidas e invertidas (RI); la derecha RID (5' –CCTAGATTCTACGTCAGT – 3') y la izquierda RII (5' – ACACACGTGGAATTTAGG – 3'). Dichas secuencias RI están formadas por 18 pb de las cuales 14 pb son complementarias entre sí. A su vez, se determinaron dos pares de zonas promotoras, P1: (35'-TTGAA y 10'-TACAAT) relacionada con la expresión del gen de la transposasa (*tnpA*) de *ISEcp1* y P2: (35'-TTGCAG y 10'-TACGAT) relacionada con la expresión del gen *bla*_{CTX-M-15}, el cual carece de promotor propio.

Posteriormente utilizando los partidores CTX-M-1_540/ORF477 (Tabla 4, material anexo) se obtuvieron 461 pb (Figura 3.10B). El análisis de la secuencia nucleotídica

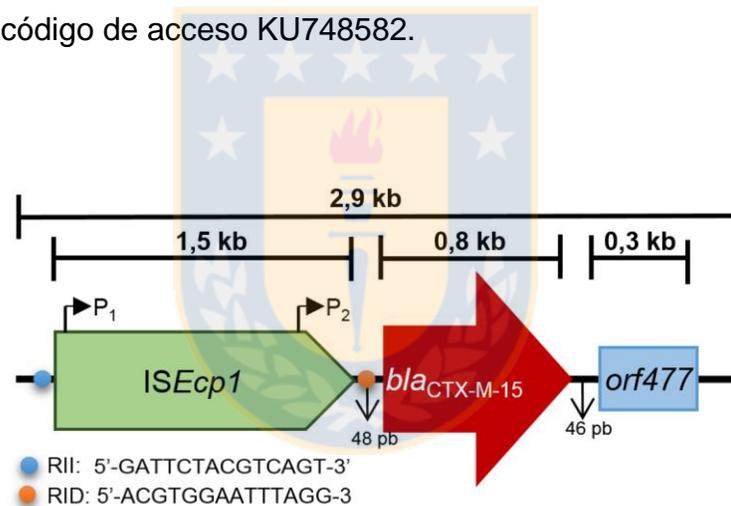
demostró que separado por 46 pb de *bla*_{CTX-M-15}, se encuentra un marco de lectura abierto codificante de una proteína de función desconocida, denominado *orf477* (Figura 3.11). Se buscaron otros elementos asociados con frecuencia a la plataforma genética de *bla*_{CTX-M-15} tales como, IS26 y *mucA*, pero no se obtuvieron amplicones con los partidores utilizados.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.10 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-15} en cepas de *E. coli* UC327, *K. pneumoniae* UC358, UC361 y de *bla*_{CTX-M-3} en cepa de *K. oxytoca* UC363. A) Asociación de los genes *bla*_{CTX-M} e *ISEcp1* (1730 pb). B) Asociación de los genes *bla*_{CTX-M} y *orf477* (461 pb). UC231: Control negativo, ADN genómico cepa *E. coli* J53. 1 kb: Marcador de tamaño molecular OGeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). M: Marcador de tamaño molecular 100 pb DNA Ladder Ready-Ladder (Invitrogen).

Se realizaron alineamientos múltiples de la secuencia nucleotídica de la plataforma completa caracterizada con secuencias nucleotídicas de plataformas de *bla*_{CTX-M-15} encontradas en diferentes especies bacterianas de importancia clínica ingresadas en la base de datos del Genbank; *K. pneumoniae* productora de NDM-1 aislada en Estados Unidos (Genbank ID: CP006662), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Thyphimurium* asociada a un brote aislada en Kenia (Genbank ID: LN794248), *Shigella sonnei* asociada a un brote aislada en Corea (Genbank ID: KJ406378), *Enterobacter cloacae* portadora de transposón *Tn1999* asociado a OXA-48 y CTX-M-15 en Italia (Genbank ID: JX423832), entre otras, encontrándose un 100% de similitud nucleotídica (Figura 3.12). Los 2896 pb caracterizados correspondientes a la plataforma genética de *bla*_{CTX-M-15} en la cepa *E. coli* UC327 fueron ingresados a la base de datos del Genbank con el código de acceso KU748582.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.11 Plataforma genética de *bla*_{CTX-M-15} en cepa de *E. coli* UC327 productora de carbapenemasa KPC-2 aislada en un hospital chileno. P₁: sitio promotor expresión de *tnpA* de *ISEcp1*, P₂: sitio promotor expresión de *bla*_{CTX-M-15}. 48 pb: Región espaciadora entre *ISEcp1* y *bla*_{CTX-M-15}. 46 pb: Región conservada de plataformas genéticas de genes *bla*_{KLUC} en cepas del género *Kluyvera*. RII y RID: secuencias repetidas invertidas izquierda y derecha respectivamente. Tamaños no escalados.

```

CLUSTAL O (1.2.1) multiple sequence alignment
KU748582      TCAGCTTTTATGACTCGATATATGGTAAAAATAATAGTAAGAAAAGTAGTAAAAAGGGGTT      180
CP006662.2    TCAGCTTTTATGACTCGATATATGGTAAAAATAATAGTAAGAAAAGTAGTAAAAAGGGGTT      180
LN794248.1    TCAGCTTTTATGACTCGATATATGGTAAAAATAATAGTAAGAAAAGTAGTAAAAAGGGGTT      180
KJ406378.1    TCAGCTTTTATGACTCGATATATGGTAAAAATAATAGTAAGAAAAGTAGTAAAAAGGGGTT      180
JX423832.1    TCAGCTTTTATGACTCGATATATGGTAAAAATAATAGTAAGAAAAGTAGTAAAAAGGGGTT      180
*****
KU748582      CTAATTATGATTAATAAAAATTGATTTCAAAGCTAAGAATCTAACATCAAATGCAGGTCTTT      240
CP006662.2    CTAATTATGATTAATAAAAATTGATTTCAAAGCTAAGAATCTAACATCAAATGCAGGTCTTT      240
LN794248.1    CTAATTATGATTAATAAAAATTGATTTCAAAGCTAAGAATCTAACATCAAATGCAGGTCTTT      240
KJ406378.1    CTAATTATGATTAATAAAAATTGATTTCAAAGCTAAGAATCTAACATCAAATGCAGGTCTTT      240
JX423832.1    CTAATTATGATTAATAAAAATTGATTTCAAAGCTAAGAATCTAACATCAAATGCAGGTCTTT      240
*****
KU748582      TTTCTGCTCCTTGAGAATGCAAAAAGCAATGGGATTTTGGATTTTATTGAAAATGACCTC      300
CP006662.2    TTTCTGCTCCTTGAGAATGCAAAAAGCAATGGGATTTTGGATTTTATTGAAAATGACCTC      300
LN794248.1    TTTCTGCTCCTTGAGAATGCAAAAAGCAATGGGATTTTGGATTTTATTGAAAATGACCTC      300
KJ406378.1    TTTCTGCTCCTTGAGAATGCAAAAAGCAATGGGATTTTGGATTTTATTGAAAATGACCTC      300
JX423832.1    TTTCTGCTCCTTGAGAATGCAAAAAGCAATGGGATTTTGGATTTTATTGAAAATGACCTC      300
*****
KU748582      GTATTTGATAATGACTCAACAAATAAAAATCAAGATGAATCATATAAAGACCATGCTCTGC      360
CP006662.2    GTATTTGATAATGACTCAACAAATAAAAATCAAGATGAATCATATAAAGACCATGCTCTGC      360
LN794248.1    GTATTTGATAATGACTCAACAAATAAAAATCAAGATGAATCATATAAAGACCATGCTCTGC      360
KJ406378.1    GTATTTGATAATGACTCAACAAATAAAAATCAAGATGAATCATATAAAGACCATGCTCTGC      360
JX423832.1    GTATTTGATAATGACTCAACAAATAAAAATCAAGATGAATCATATAAAGACCATGCTCTGC      360
*****
KU748582      GGTCACTTCATTTGGCATTGATAAGTTAGAAGCTCTAAAGCTACTTCAAATGATCCCCTC      420
CP006662.2    GGTCACTTCATTTGGCATTGATAAGTTAGAAGCTCTAAAGCTACTTCAAATGATCCCCTC      420
LN794248.1    GGTCACTTCATTTGGCATTGATAAGTTAGAAGCTCTAAAGCTACTTCAAATGATCCCCTC      420
KJ406378.1    GGTCACTTCATTTGGCATTGATAAGTTAGAAGCTCTAAAGCTACTTCAAATGATCCCCTC      420
JX423832.1    GGTCACTTCATTTGGCATTGATAAGTTAGAAGCTCTAAAGCTACTTCAAATGATCCCCTC      420
*****
KU748582      GTCAACGAGTTTGATATTTCCGTAAAAGAACCCTGAAACAGTGTACGGTTTCTAGGAAAC      480
CP006662.2    GTCAACGAGTTTGATATTTCCGTAAAAGAACCCTGAAACAGTGTACGGTTTCTAGGAAAC      480
LN794248.1    GTCAACGAGTTTGATATTTCCGTAAAAGAACCCTGAAACAGTGTACGGTTTCTAGGAAAC      480
KJ406378.1    GTCAACGAGTTTGATATTTCCGTAAAAGAACCCTGAAACAGTGTACGGTTTCTAGGAAAC      480
JX423832.1    GTCAACGAGTTTGATATTTCCGTAAAAGAACCCTGAAACAGTGTACGGTTTCTAGGAAAC      480
*****
KU748582      TTCAACTTCAAGACAACCCAAATGTTTAGAGACATTAATTTTAAAGTCTTTAAAAAACTG      540
CP006662.2    TTCAACTTCAAGACAACCCAAATGTTTAGAGACATTAATTTTAAAGTCTTTAAAAAACTG      540
LN794248.1    TTCAACTTCAAGACAACCCAAATGTTTAGAGACATTAATTTTAAAGTCTTTAAAAAACTG      540
KJ406378.1    TTCAACTTCAAGACAACCCAAATGTTTAGAGACATTAATTTTAAAGTCTTTAAAAAACTG      540
JX423832.1    TTCAACTTCAAGACAACCCAAATGTTTAGAGACATTAATTTTAAAGTCTTTAAAAAACTG      540
*****
KU748582      CTCACTAAAAGTAAATTGACATCCATTACGATTGATATTGATAGTAGTGTAAATTAACGTA      600
CP006662.2    CTCACTAAAAGTAAATTGACATCCATTACGATTGATATTGATAGTAGTGTAAATTAACGTA      600
LN794248.1    CTCACTAAAAGTAAATTGACATCCATTACGATTGATATTGATAGTAGTGTAAATTAACGTA      600
KJ406378.1    CTCACTAAAAGTAAATTGACATCCATTACGATTGATATTGATAGTAGTGTAAATTAACGTA      600
JX423832.1    CTCACTAAAAGTAAATTGACATCCATTACGATTGATATTGATAGTAGTGTAAATTAACGTA      600
*****

```

Fuente: Elaboración propia en Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)

Figura 3.12 Alineamientos de secuencias nucleotídicas de plataformas genéticas de *bla*_{CTX-M-15} extraídas de Genbank; KU748582: Cepa UC327 *E. coli* caracterizada en esta tesis. CP006662.2: *K. pneumoniae*. LN794248.1: *Salmonella enterica*. KJ406378: *Shigella sonnei*. JX423832.1: *Enterobacter cloacae*. Sombreado verde: Secuencia correspondiente a *ISEcp1*, rojo: *bla*_{CTX-M-15}, azul: *orf477*, sin sombreado: Secuencias intergénicas.

Continuación figura 3.12

KU748582	GAAGGTCATCAAGAAGGTGCGTCAAAGGATATAATCCTAAGAACTGGGAAACCGATGC	660
CP006662.2	GAAGGTCATCAAGAAGGTGCGTCAAAGGATATAATCCTAAGAACTGGGAAACCGATGC	660
LN794248.1	GAAGGTCATCAAGAAGGTGCGTCAAAGGATATAATCCTAAGAACTGGGAAACCGATGC	660
KJ406378.1	GAAGGTCATCAAGAAGGTGCGTCAAAGGATATAATCCTAAGAACTGGGAAACCGATGC	660
JX423832.1	GAAGGTCATCAAGAAGGTGCGTCAAAGGATATAATCCTAAGAACTGGGAAACCGATGC	660

KU748582	TACAATATCCAATTTGCATTTTGCACGAATAAAAGCATATGTTACCGATTTGTAAGA	720
CP006662.2	TACAATATCCAATTTGCATTTTGCACGAATAAAAGCATATGTTACCGATTTGTAAGA	720
LN794248.1	TACAATATCCAATTTGCATTTTGCACGAATAAAAGCATATGTTACCGATTTGTAAGA	720
KJ406378.1	TACAATATCCAATTTGCATTTTGCACGAATAAAAGCATATGTTACCGATTTGTAAGA	720
JX423832.1	TACAATATCCAATTTGCATTTTGCACGAATAAAAGCATATGTTACCGATTTGTAAGA	720

KU748582	AGTGGCAATACTTACTGCAAACGGTGTGCGGAAATGATCAAAGAAATGTTGCTAAC	780
CP006662.2	AGTGGCAATACTTACTGCAAACGGTGTGCGGAAATGATCAAAGAAATGTTGCTAAC	780
LN794248.1	AGTGGCAATACTTACTGCAAACGGTGTGCGGAAATGATCAAAGAAATGTTGCTAAC	780
KJ406378.1	AGTGGCAATACTTACTGCAAACGGTGTGCGGAAATGATCAAAGAAATGTTGCTAAC	780
JX423832.1	AGTGGCAATACTTACTGCAAACGGTGTGCGGAAATGATCAAAGAAATGTTGCTAAC	780

KU748582	ATCAAATCAGACGATTTAGAAATTTTATTTTCGAATGGATAGTGGCTACTTTGATGAAAA	840
CP006662.2	ATCAAATCAGACGATTTAGAAATTTTATTTTCGAATGGATAGTGGCTACTTTGATGAAAA	840
LN794248.1	ATCAAATCAGACGATTTAGAAATTTTATTTTCGAATGGATAGTGGCTACTTTGATGAAAA	840
KJ406378.1	ATCAAATCAGACGATTTAGAAATTTTATTTTCGAATGGATAGTGGCTACTTTGATGAAAA	840
JX423832.1	ATCAAATCAGACGATTTAGAAATTTTATTTTCGAATGGATAGTGGCTACTTTGATGAAAA	840

KU748582	ATTATCGAAACGATAGAATCTCTTGGATGCAAATATTTAATTAAGCCAAAAGTTATTCT	900
CP006662.2	ATTATCGAAACGATAGAATCTCTTGGATGCAAATATTTAATTAAGCCAAAAGTTATTCT	900
LN794248.1	ATTATCGAAACGATAGAATCTCTTGGATGCAAATATTTAATTAAGCCAAAAGTTATTCT	900
KJ406378.1	ATTATCGAAACGATAGAATCTCTTGGATGCAAATATTTAATTAAGCCAAAAGTTATTCT	900
JX423832.1	ATTATCGAAACGATAGAATCTCTTGGATGCAAATATTTAATTAAGCCAAAAGTTATTCT	900

KU748582	ACACTCACCTCACAAGCAACGAATTCATCAATTGTATTTCGTTAAAGGAGAAGAAGGTAGA	960
CP006662.2	ACACTCACCTCACAAGCAACGAATTCATCAATTGTATTTCGTTAAAGGAGAAGAAGGTAGA	960
LN794248.1	ACACTCACCTCACAAGCAACGAATTCATCAATTGTATTTCGTTAAAGGAGAAGAAGGTAGA	960
KJ406378.1	ACACTCACCTCACAAGCAACGAATTCATCAATTGTATTTCGTTAAAGGAGAAGAAGGTAGA	960
JX423832.1	ACACTCACCTCACAAGCAACGAATTCATCAATTGTATTTCGTTAAAGGAGAAGAAGGTAGA	960

KU748582	GAAACTACAGAACTGTATACAAAATTAGTTAAATGGGAAAAAGACAGAAGATTTGTCGTA	1020
CP006662.2	GAAACTACAGAACTGTATACAAAATTAGTTAAATGGGAAAAAGACAGAAGATTTGTCGTA	1020
LN794248.1	GAAACTACAGAACTGTATACAAAATTAGTTAAATGGGAAAAAGACAGAAGATTTGTCGTA	1020
KJ406378.1	GAAACTACAGAACTGTATACAAAATTAGTTAAATGGGAAAAAGACAGAAGATTTGTCGTA	1020
JX423832.1	GAAACTACAGAACTGTATACAAAATTAGTTAAATGGGAAAAAGACAGAAGATTTGTCGTA	1020

KU748582	TCTCGCGTACTGAAACCAGAAAAAGAAAGAGCACAATTATCACTTTTAGAAGGTTCCGAA	1080
CP006662.2	TCTCGCGTACTGAAACCAGAAAAAGAAAGAGCACAATTATCACTTTTAGAAGGTTCCGAA	1080
LN794248.1	TCTCGCGTACTGAAACCAGAAAAAGAAAGAGCACAATTATCACTTTTAGAAGGTTCCGAA	1080
KJ406378.1	TCTCGCGTACTGAAACCAGAAAAAGAAAGAGCACAATTATCACTTTTAGAAGGTTCCGAA	1080
JX423832.1	TCTCGCGTACTGAAACCAGAAAAAGAAAGAGCACAATTATCACTTTTAGAAGGTTCCGAA	1080

Continuación figura 3.12

KU748582	TACGACTACTTTTTCTTTGTAACAAATACTACCTTGCTTTCTGAAAAAGTAGTTATATAC	1140
CP006662.2	TACGACTACTTTTTCTTTGTAACAAATACTACCTTGCTTTCTGAAAAAGTAGTTATATAC	1140
LN794248.1	TACGACTACTTTTTCTTTGTAACAAATACTACCTTGCTTTCTGAAAAAGTAGTTATATAC	1140
KJ406378.1	TACGACTACTTTTTCTTTGTAACAAATACTACCTTGCTTTCTGAAAAAGTAGTTATATAC	1140
JX423832.1	TACGACTACTTTTTCTTTGTAACAAATACTACCTTGCTTTCTGAAAAAGTAGTTATATAC *****	1140
KU748582	TATGAAAAGCGTGGTAATGCTGAAAACATATATCAAAGAAGCCAAATACGCATGGCGGTG	1200
CP006662.2	TATGAAAAGCGTGGTAATGCTGAAAACATATATCAAAGAAGCCAAATACGCATGGCGGTG	1200
LN794248.1	TATGAAAAGCGTGGTAATGCTGAAAACATATATCAAAGAAGCCAAATACGCATGGCGGTG	1200
KJ406378.1	TATGAAAAGCGTGGTAATGCTGAAAACATATATCAAAGAAGCCAAATACGCATGGCGGTG	1200
JX423832.1	TATGAAAAGCGTGGTAATGCTGAAAACATATATCAAAGAAGCCAAATACGCATGGCGGTG *****	1200
KU748582	GGTCATCTCTTGCTAAAGTCATTTTGGGCGAATGAAGCCGTGTTTCAAATGATGATGCTT	1260
CP006662.2	GGTCATCTCTTGCTAAAGTCATTTTGGGCGAATGAAGCCGTGTTTCAAATGATGATGCTT	1260
LN794248.1	GGTCATCTCTTGCTAAAGTCATTTTGGGCGAATGAAGCCGTGTTTCAAATGATGATGCTT	1260
KJ406378.1	GGTCATCTCTTGCTAAAGTCATTTTGGGCGAATGAAGCCGTGTTTCAAATGATGATGCTT	1260
JX423832.1	GGTCATCTCTTGCTAAAGTCATTTTGGGCGAATGAAGCCGTGTTTCAAATGATGATGCTT *****	1260
KU748582	TCATATAACCTATTTTGTGTTCAAGTTTGATTCCCTGGACTCTTCAGAATACAGACAG	1320
CP006662.2	TCATATAACCTATTTTGTGTTCAAGTTTGATTCCCTGGACTCTTCAGAATACAGACAG	1320
LN794248.1	TCATATAACCTATTTTGTGTTCAAGTTTGATTCCCTGGACTCTTCAGAATACAGACAG	1320
KJ406378.1	TCATATAACCTATTTTGTGTTCAAGTTTGATTCCCTGGACTCTTCAGAATACAGACAG	1320
JX423832.1	TCATATAACCTATTTTGTGTTCAAGTTTGATTCCCTGGACTCTTCAGAATACAGACAG *****	1320
KU748582	CAAATAAAGACCTTTCGTTTGAAGTATGTATTTCTGCAGCAAAAATAATCAAAACCGCA	1380
CP006662.2	CAAATAAAGACCTTTCGTTTGAAGTATGTATTTCTGCAGCAAAAATAATCAAAACCGCA	1380
LN794248.1	CAAATAAAGACCTTTCGTTTGAAGTATGTATTTCTGCAGCAAAAATAATCAAAACCGCA	1380
KJ406378.1	CAAATAAAGACCTTTCGTTTGAAGTATGTATTTCTGCAGCAAAAATAATCAAAACCGCA	1380
JX423832.1	CAAATAAAGACCTTTCGTTTGAAGTATGTATTTCTGCAGCAAAAATAATCAAAACCGCA *****	1380
KU748582	AGATATGTAATCATGAAGTTGTCGGAAAACATCCGTACAAGGGAGTGTATGAAAAATGT	1440
CP006662.2	AGATATGTAATCATGAAGTTGTCGGAAAACATCCGTACAAGGGAGTGTATGAAAAATGT	1440
LN794248.1	AGATATGTAATCATGAAGTTGTCGGAAAACATCCGTACAAGGGAGTGTATGAAAAATGT	1440
KJ406378.1	AGATATGTAATCATGAAGTTGTCGGAAAACATCCGTACAAGGGAGTGTATGAAAAATGT	1440
JX423832.1	AGATATGTAATCATGAAGTTGTCGGAAAACATCCGTACAAGGGAGTGTATGAAAAATGT *****	1440
KU748582	CTGGTATAATAAGAATATCATCAATAAAATGAGTGTGCTCTGTGGATAACTTGCAGAG	1500
CP006662.2	CTGGTATAATAAGAATATCATCAATAAAATGAGTGTGCTCTGTGGATAACTTGCAGAG	1500
LN794248.1	CTGGTATAATAAGAATATCATCAATAAAATGAGTGTGCTCTGTGGATAACTTGCAGAG	1500
KJ406378.1	CTGGTATAATAAGAATATCATCAATAAAATGAGTGTGCTCTGTGGATAACTTGCAGAG	1500
JX423832.1	CTGGTATAATAAGAATATCATCAATAAAATGAGTGTGCTCTGTGGATAACTTGCAGAG *****	1500
KU748582	TTTATTAAGTATCATTGCAGCAAAGATGAAATCAATGATTTATCAAAAATGATTGAAAGG	1560
CP006662.2	TTTATTAAGTATCATTGCAGCAAAGATGAAATCAATGATTTATCAAAAATGATTGAAAGG	1560
LN794248.1	TTTATTAAGTATCATTGCAGCAAAGATGAAATCAATGATTTATCAAAAATGATTGAAAGG	1560
KJ406378.1	TTTATTAAGTATCATTGCAGCAAAGATGAAATCAATGATTTATCAAAAATGATTGAAAGG	1560
JX423832.1	TTTATTAAGTATCATTGCAGCAAAGATGAAATCAATGATTTATCAAAAATGATTGAAAGG *****	1560
KU748582	TGGTTGTAATAAATGTTACAATGTGTGAGAAGCAGTCTAAATTCCTCGTCAAATAGTGAT	1620
CP006662.2	TGGTTGTAATAAATGTTACAATGTGTGAGAAGCAGTCTAAATTCCTCGTCAAATAGTGAT	1620
LN794248.1	TGGTTGTAATAAATGTTACAATGTGTGAGAAGCAGTCTAAATTCCTCGTCAAATAGTGAT	1620
KJ406378.1	TGGTTGTAATAAATGTTACAATGTGTGAGAAGCAGTCTAAATTCCTCGTCAAATAGTGAT	1620
JX423832.1	TGGTTGTAATAAATGTTACAATGTGTGAGAAGCAGTCTAAATTCCTCGTCAAATAGTGAT *****	1620

Continuación figura 3.12

KU748582	TTTTGAAGCTAATAAAAAACACACGTGGAATTTAGGGACTATTTCATGTTGTTGTTATTTTC	1680
CP006662.2	TTTTGAAGCTAATAAAAAACACACGTGGAATTTAGGGACTATTTCATGTTGTTGTTATTTTC	1680
LN794248.1	TTTTGAAGCTAATAAAAAACACACGTGGAATTTAGGGACTATTTCATGTTGTTGTTATTTTC	1680
KJ406378.1	TTTTGAAGCTAATAAAAAACACACGTGGAATTTAGGGACTATTTCATGTTGTTGTTATTTTC	1680
JX423832.1	TTTTGAAGCTAATAAAAAACACACGTGGAATTTAGGGACTATTTCATGTTGTTGTTATTTTC	1680

KU748582	GTATCTTCCAGAATAAGGAATCCCATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTCACGCTGATG	1740
CP006662.2	GTATCTTCCAGAATAAGGAATCCCATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTCACGCTGATG	1740
LN794248.1	GTATCTTCCAGAATAAGGAATCCCATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTCACGCTGATG	1740
KJ406378.1	GTATCTTCCAGAATAAGGAATCCCATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTCACGCTGATG	1740
JX423832.1	GTATCTTCCAGAATAAGGAATCCCATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAGTTCACGCTGATG	1740

KU748582	GCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGCGCGAC	1800
CP006662.2	GCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGCGCGAC	1800
LN794248.1	GCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGCGCGAC	1800
KJ406378.1	GCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGCGCGAC	1800
JX423832.1	GCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGCGCGAC	1800

KU748582	GTACAGCAAAAACCTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTG	1860
CP006662.2	GTACAGCAAAAACCTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTG	1860
LN794248.1	GTACAGCAAAAACCTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTG	1860
KJ406378.1	GTACAGCAAAAACCTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTG	1860
JX423832.1	GTACAGCAAAAACCTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTG	1860

KU748582	ATTAACACAGCAGATAAATTCGCAAAATCTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTCGATGTGC	1920
CP006662.2	ATTAACACAGCAGATAAATTCGCAAAATCTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTCGATGTGC	1920
LN794248.1	ATTAACACAGCAGATAAATTCGCAAAATCTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTCGATGTGC	1920
KJ406378.1	ATTAACACAGCAGATAAATTCGCAAAATCTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTCGATGTGC	1920
JX423832.1	ATTAACACAGCAGATAAATTCGCAAAATCTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTCGATGTGC	1920

KU748582	AGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAAT	1980
CP006662.2	AGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAAT	1980
LN794248.1	AGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAAT	1980
KJ406378.1	AGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAAT	1980
JX423832.1	AGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAAT	1980

KU748582	CTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTAACTATAATCCGATTGCG	2040
CP006662.2	CTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTAACTATAATCCGATTGCG	2040
LN794248.1	CTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTAACTATAATCCGATTGCG	2040
KJ406378.1	CTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTAACTATAATCCGATTGCG	2040
JX423832.1	CTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTAACTATAATCCGATTGCG	2040

KU748582	GAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACCTGGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTACAGTAC	2100
CP006662.2	GAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACCTGGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTACAGTAC	2100
LN794248.1	GAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACCTGGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTACAGTAC	2100
KJ406378.1	GAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACCTGGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTACAGTAC	2100
JX423832.1	GAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACCTGGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTACAGTAC	2100

KU748582	AGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACC	2160
CP006662.2	AGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACC	2160
LN794248.1	AGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACC	2160
KJ406378.1	AGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACC	2160
JX423832.1	AGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACC	2160

Continuación figura 3.12

KU748582	GCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTA	2220
CP006662.2	GCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTA	2220
LN794248.1	GCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTA	2220
KJ406378.1	GCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTA	2220
JX423832.1	GCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTA	2220

KU748582	AACACCGCCATTCGGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAAC	2280
CP006662.2	AACACCGCCATTCGGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAAC	2280
LN794248.1	AACACCGCCATTCGGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAAC	2280
KJ406378.1	AACACCGCCATTCGGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAAC	2280
JX423832.1	AACACCGCCATTCGGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAAC	2280

KU748582	CTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACA	2340
CP006662.2	CTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACA	2340
LN794248.1	CTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACA	2340
KJ406378.1	CTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACA	2340
JX423832.1	CTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACA	2340

KU748582	TGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGG	2400
CP006662.2	TGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGG	2400
LN794248.1	TGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGG	2400
KJ406378.1	TGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGG	2400
JX423832.1	TGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTTCAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGG	2400

KU748582	GTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATC	2460
CP006662.2	GTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATC	2460
LN794248.1	GTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATC	2460
KJ406378.1	GTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATC	2460
JX423832.1	GTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATC	2460

KU748582	TGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAG	2520
CP006662.2	TGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAG	2520
LN794248.1	TGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAG	2520
KJ406378.1	TGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAG	2520
JX423832.1	TGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAG	2520

KU748582	GCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTGTA	2580
CP006662.2	GCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTGTA	2580
LN794248.1	GCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTGTA	2580
KJ406378.1	GCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTGTA	2580
JX423832.1	GCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTGTA	2580

KU748582	TAGCGGAAACGGAATGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATTATCGCCTTAGACGGCAAAG	2640
CP006662.2	TAGCGGAAACGGAATGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATTATCGCCTTAGACGGCAAAG	2640
LN794248.1	TAGCGGAAACGGAATGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATTATCGCCTTAGACGGCAAAG	2640
KJ406378.1	TAGCGGAAACGGAATGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATTATCGCCTTAGACGGCAAAG	2640
JX423832.1	TAGCGGAAACGGAATGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATTATCGCCTTAGACGGCAAAG	2640

KU748582	TGCTGTGCGCCACCTGCGCTTGCGCATACCAGGCCATAAGCTCCGTGGTTCCCTGGTTCTC	2700
CP006662.2	TGCTGTGCGCCACCTGCGCTTGCGCATACCAGGCCATAAGCTCCGTGGTTCCCTGGTTCTC	2700
LN794248.1	TGCTGTGCGCCACCTGCGCTTGCGCATACCAGGCCATAAGCTCCGTGGTTCCCTGGTTCTC	2700
KJ406378.1	TGCTGTGCGCCACCTGCGCTTGCGCATACCAGGCCATAAGCTCCGTGGTTCCCTGGTTCTC	2700
JX423832.1	TGCTGTGCGCCACCTGCGCTTGCGCATACCAGGCCATAAGCTCCGTGGTTCCCTGGTTCTC	2700

Continuación figura 3.12

KU748582	CTTCCGCTGGAGCCCAGTGCGCATAGTCATCGGCAGCCACGGGTTGATAGCCACCGTGT	2760
CP006662.2	CTTCCGCTGGAGCCCAGTGCGCATAGTCATCGGCAGCCACGGGTTGATAGCCACCGTGT	2760
LN794248.1	CTTCCGCTGGAGCCCAGTGCGCATAGTCATCGGCAGCCACGGGTTGATAGCCACCGTGT	2760
KJ406378.1	CTTCCGCTGGAGCCCAGTGCGCATAGTCATCGGCAGCCACGGGTTGATAGCCACCGTGT	2760
JX423832.1	CTTCCGCTGGAGCCCAGTGCGCATAGTCATCGGCAGCCACGGGTTGATAGCCACCGTGT	2760

KU748582	TTACTTCAAAAATTATGCCACCGGTATCCAGCGACAGCACGGCATGCCAGGTTCCCTGCGG	2820
CP006662.2	TTACTTCAAAAATTATGCCACCGGTATCCAGCGACAGCACGGCATGCCAGGTTCCCTGCGG	2820
LN794248.1	TTACTTCAAAAATTATGCCACCGGTATCCAGCGACAGCACGGCATGCCAGGTTCCCTGCGG	2820
KJ406378.1	TTACTTCAAAAATTATGCCACCGGTATCCAGCGACAGCACGGCATGCCAGGTTCCCTGCGG	2820
JX423832.1	TTACTTCAAAAATTATGCCACCGGTATCCAGCGACAGCACGGCATGCCAGGTTCCCTGCGG	2820

KU748582	CCATCTCCAGCACCGTACAGGTTTCCCCCAATATCGCCCGATGGGTGACGGTACCCCGAT	2880
CP006662.2	CCATCTCCAGCACCGTACAGGTTTCCCCCAATATCGCCCGATGGGTGACGGTACCCCGAT	2880
LN794248.1	CCATCTCCAGCACCGTACAGGTTTCCCCCAATATCGCCCGATGGGTGACGGTACCCCGAT	2880
KJ406378.1	CCATCTCCAGCACCGTACAGGTTTCCCCCAATATCGCCCGATGGGTGACGGTACCCCGAT	2880
JX423832.1	CCATCTCCAGCACCGTACAGGTTTCCCCCAATATCGCCCGATGGGTGACGGTACCCCGAT	2880

KU748582	CGTCAAAAATTCAGCAC	2896
CP006662.2	CGTCAAAAATTCAGCAC	2896
LN794248.1	CGTCAAAAATTCAGCAC	2896
KJ406378.1	CGTCAAAAATTCAGCAC	2896
JX423832.1	CGTCAAAAATTCAGCAC	2896



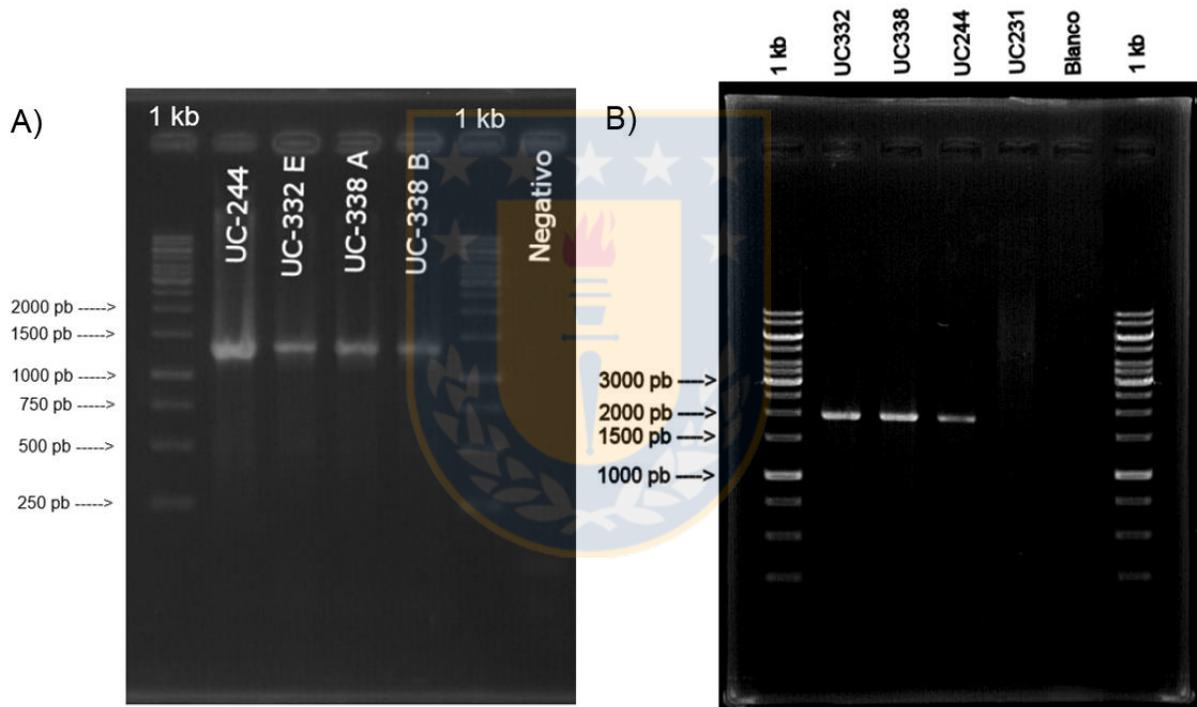
3.5.2 *Klebsiella pneumoniae* UC332 (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{KPC-2})

De acuerdo a la revisión bibliográfica (Di Conza *et al.*, 2002; Arduino *et al.*, 2003; Bonnet, 2004; Gaze *et al.*, 2005; Power *et al.*, 2005; Eckert *et al.*, 2006; Vignoli *et al.*, 2006; Díaz, 2007) se buscó la asociación de *bla*_{CTX-M-2} con la secuencia de inserción *ISCR1*, y posteriormente se dilucidó si estos elementos estaban formando parte de la estructura de un integrón complejo o inusual de clase 1.

Utilizando los partidores Orf513InK13/blaup (Tabla 3, material anexo) se determinó la asociación entre *ISCR1* y *bla*_{CTX-M-2}, generándose un amplicón de 1309 pb (Figura 3.13A). El análisis de la secuencia nucleotídica de este amplicón, reflejó que río abajo a *ISCR1* se encuentra una zona de 26 pb (5'- AAAGGTGGTTTATACTTCCTATACCC -3'), descrita como el sitio de reconocimiento de *ISCR1* que participa en el proceso de recombinación homóloga mediada por la transposasa (*tnpA*) producida por este gen (Power *et al.*, 2005). Posterior a esta secuencia se encontró una zona de 266 pb con 99 % de identidad con una región homóloga río arriba del gen cromosomal *bla*_{KLUA-9} de *K. ascorbata* (Genbank ID: AM086668) y un 97 % de identidad con una región homóloga río arriba del gen cromosomal de *bla*_{KLUA-1} de *K. ascorbata* (Genbank ID: AJ272538), la cual contiene la secuencia promotora del gen *bla*_{CTX-M-2} (regiones -35 [ACTTTT] y -10 [TTGAAG]) (Toleman *et al.*, 2006).

Posteriormente, utilizando los partidores F12.F/F12.R (Tabla 3, material anexo) se generó un amplicón de 1974 pb que corresponde a la asociación entre *ISCR1* y *sul1*, este último elemento, correspondiente al extremo 3'SC del integrón clase 1 complejo o inusual (Figura 3.13B), por lo cual se realizó la amplificación del gen de la integrasa de clase 1 (*Int1*) con los partidores IntA/IntB (Tabla 3, material anexo). El análisis de la secuencia de 893 pb generada, permitió la identificación de tres zonas promotoras; una asociada a la expresión de la integrasa (Pi) la cual contiene una zona de 10 pb (5' - TGCCTCGGGC – 3') entre 10-[AGTCTA] y 35-[ATCCAA], y la otras dos zonas asociadas a la expresión de los *cassettes* genéticos (Pc) que contiene una secuencia

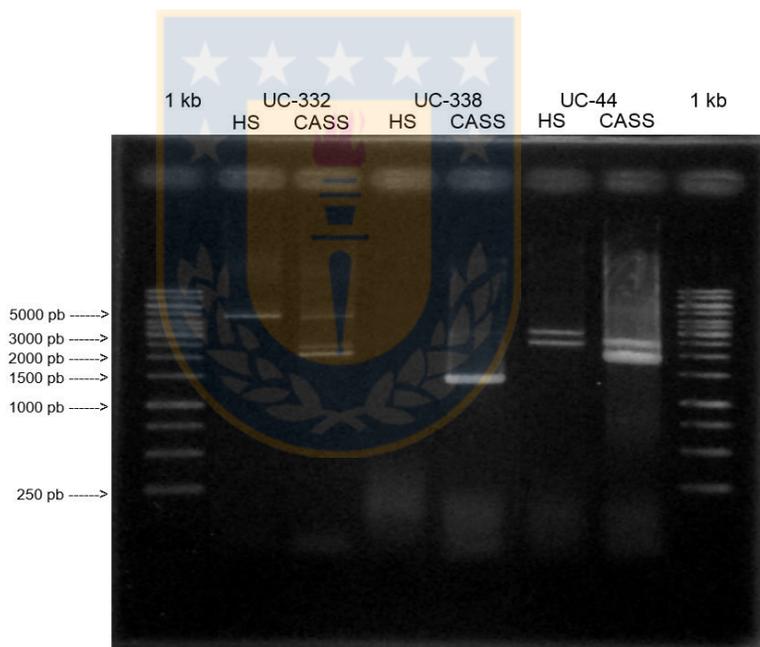
de 17 pb (5'- TAAGCCTGTTCGGTTCG – 3') entre 35- [TGGACA] y 10- [TAAGCT] que correspondería a un promotor débil, y P2 que contiene una secuencia de 14 pb (5' - TGACTGTTTTTTT - 3') entre -35 [TTGTTA] y -10 [TACAGT] que correspondería a un promotor sin actividad según lo descrito en Di Conza (2010). En tanto el sitio *attI* de 62 pb (5'- TGATGTTATGG AGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCCCTAAAACAAAGTTATGT-3'), fue caracterizado 32 pb río arriba de la secuencia promotora de la integrasa.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.13 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-2} en cepas de *K. pneumoniae* UC332 y UC338. A) Asociación de *bla*_{CTX-M} e *ISCR1* (1309 pb). B) Asociación de *ISCR1* y *sul1* (1974 pb). UC244: Cepa control positivo ambas asociaciones; ADN genómico de *Proteus mirabilis*. Negativo: Cepa control negativo, ADN genómico de *E. coli* J53. Blanco: Control de mezcla (sin ADN). 1 kb: Marcador de tamaño molecular OGeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

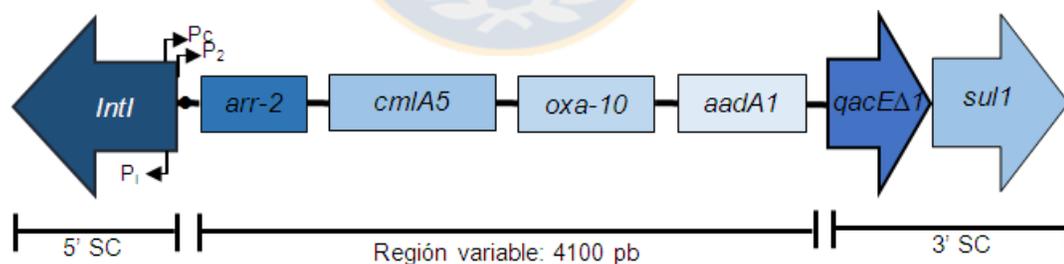
A su vez, se realizó la amplificación de la zona variable del integrón con dos pares de partidores, HS458/HS459 y CASS1/CASS2. Con los partidores CASS1/CASS2 se obtuvieron tres productos de PCR; dos entre 2000-2500 pb de tamaño molecular, y un tercer producto de entre 4000-5000 pb, en tanto con los partidores HS458/HS459 se obtuvo sólo un producto entre 4000 y 5000 pb (Figura 3.14). Al secuenciar este último producto, el análisis de la secuencia nucleotídica dio como resultado el *cassette* genético *arr-2* asociado al extremo 5'SC y el *cassette* genético *aadA1* asociado al extremo 3'SC del integrón clase 1. Dado el tamaño del producto de PCR a amplificar y la metodología empleada, no fue posible obtener la secuencia completa del producto entre ambos *cassettes* genéticos mencionados.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.14 Determinación de tamaño molecular de las zonas variables del integrón clase 1 portado en cepas de *K. pneumoniae* UC332 y UC338. Obtención de productos de PCR utilizando partidores HS458/HS459 y CASS1/CASS2. UC44: Control positivo, ADN genómico cepa *Proteus mirabilis*. 1 kb: Marcador de tamaño molecular OGeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

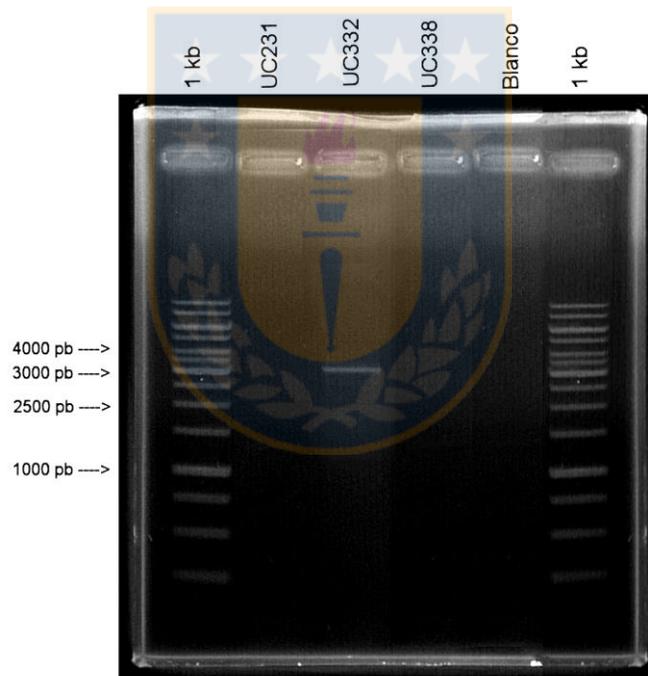
Con la finalidad de determinar la zona variable del integrón complejo inusual al cual está asociado *bla*_{CTX-M-2}, a partir del gel de electroforesis se extrajeron y purificaron las bandas electroforéticas obtenidas tras la PCR realizada con los partidores CASS1/CASS2, utilizando el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA, Madison, USA) y la metodología previamente descrita por Lin (2009). El análisis de la secuencia de ADN obtenido a partir de la banda electroforética de ≈ 5000 pb arrojó como resultado los mismos *cassettes* genéticos pesquisados con la amplificación de los partidores HS458/HS459, es decir *arr-2* asociado al extremo 5' SC y el *cassette* genético *aadA1* asociado al extremo 3' SC. Se diseñaron diversos partidores (*cmlA5*-F, *ISCR1*-R, *arr2*-F, *aadA1*-R) (Tabla 3, material anexo) con la finalidad de dilucidar los *cassettes* genéticos entre *arr-2* y *aadA1*. Finalmente, se determinó que la zona variable del integrón caracterizado, de 4100 pb, está estructurado por lo *cassettes* genéticos de resistencia antibiótica *arr-2*, *cmlA5*, *oxa-10* y *aadA1* (Figura 3.15). Se buscó mediante PCR la asociación de alguno de estos cuatro *cassettes* genéticos pesquisados con el elemento *ISCR1* pero no se obtuvieron amplicones.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.15 Integrón caracterizado de cepa *K. pneumoniae* UC332 productora de carbapenemasa KPC-2 aislada en un hospital chileno. 5' SC: segmento conservado 5' del integrón clase 1, 3' SC: segmento conservado 3' del integrón clase 1, Pi: promotor integrasa, Pc: promotor *cassettes*, P2: segundo promotor *cassettes* genéticos del integrón clase 1. ●: sitio *attI*. Tamaños no escalados.

En tanto, el análisis de la secuencia de ADN a partir de la banda electroforética de menor tamaño molecular (≈ 2000 pb) indicó que dicha zona variable está constituida de los cassettes genéticos, *dfrA12*, *orfF* y *aadA2*. A su vez, se buscó la asociación de alguno de estos *cassettes* con el elemento *ISCR1*, encontrándose la asociación entre *orfF* e *ISCR1* obteniéndose un producto de PCR de 3259 pb que fue enviado a secuenciar (Figura 3.16). El análisis de la secuencia permitió establecer que la plataforma genética de *bla*_{CTX-M-2} se encuentra asociada a un integrón complejo o inusual portador de una zona variable de 1913 pb el cual coexiste en la misma cepa con otro integrón de clase 1 portador de una zona variable de 4100 pb.

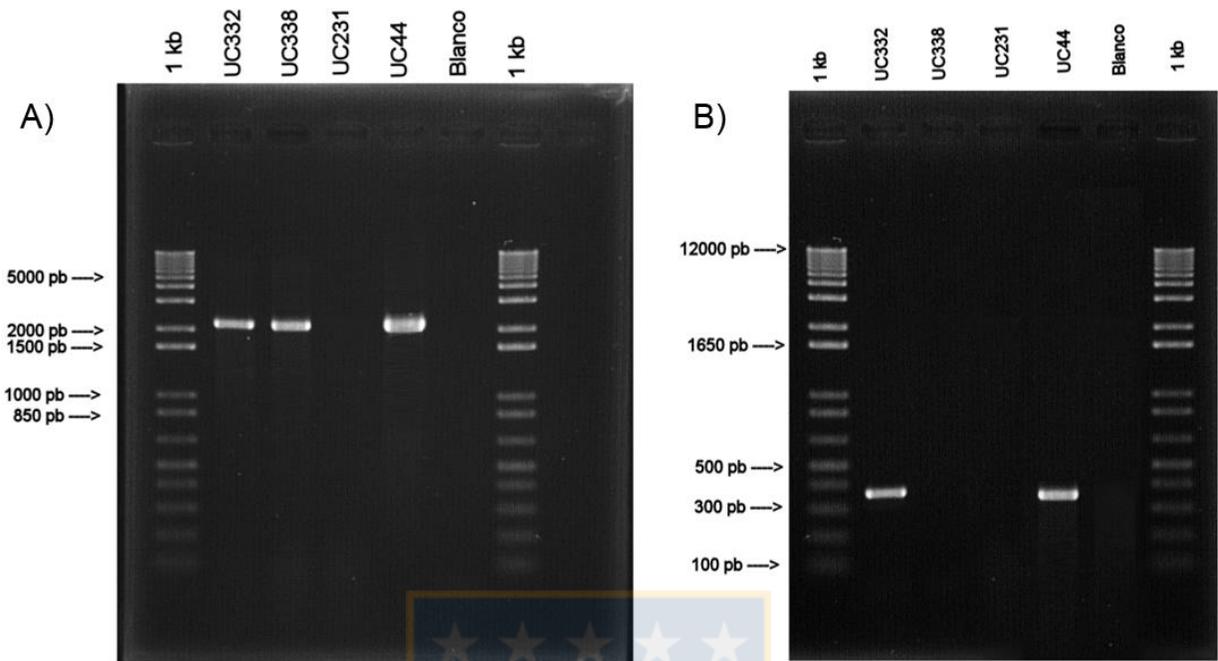


Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.16 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-2} de cepas de *K. pneumoniae* UC332 y UC338. Asociación de *orfF*/*ISCR1* (3259 pb). UC231: Cepa control negativo, *E. coli* J53. Blanco: Control de mezcla (sin ADN). 1kb: Marcador de tamaño molecular OGeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

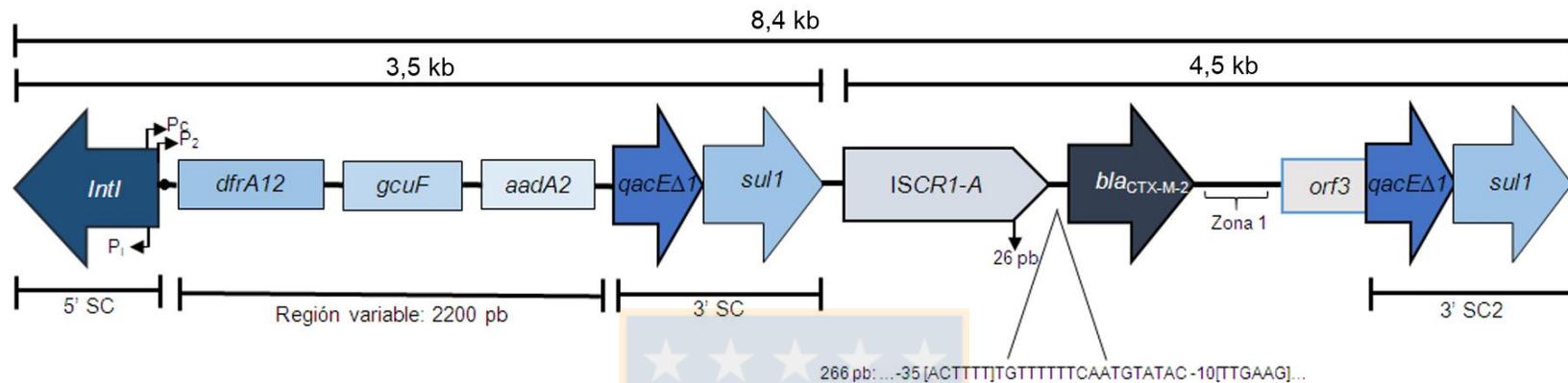
Para la caracterización río arriba al gen *bla*_{CTX-M-2}, se utilizaron los partidores SC1/SC2 (Tabla 3, material anexo) obteniéndose un producto de 2209 pb (Figura 3.17A) que corresponde a la asociación de los genes *bla*_{CTX-M} y *qacE* Δ 1. La secuenciación de este producto y el posterior análisis señaló que río abajo de *bla*_{CTX-M-2} se encuentra *orf3*, y posteriormente, le sigue *qacE* Δ 1, que correspondería a la duplicación parcial del segmento 3' SC2 del integrón clase 1. A su vez se asociaron los partidores SC2/sul1 obteniéndose un producto de 321 pb (Figura 3.17B) correspondiente a la asociación entre *qacE* Δ 1 y *sul1* de la duplicación parcial del extremo 3' SC2. Por lo tanto, la plataforma genética asociada a *bla*_{CTX-M-2} correspondería a un integrón complejo o inusual de clase 1 portador de los *cassettes* genéticos de resistencia *dfrA12*, *orfF* y *aadA2* (Figura 3.18). La secuencia completa caracterizada de 8471 pb se ingresó al Genbank bajo código de acceso KY315992.

La secuencia nucleotídica fue comparada mediante BLAST con secuencias nucleotídicas ingresadas a la base de datos del Genbank. Se encontraron 3 secuencias nucleotídicas con un 99 % de similitud: EU780013 (8469/8471 nucleótidos), correspondiente a una porción del transposón Tn5036-like de *K. pneumoniae* aislada a partir de un urocultivo en Montevideo, Uruguay el año 2005 (Márquez *et al.*, 2008); KU254578 (8465/8471 nucleótidos), correspondiente a una porción del plásmido pYD786-1 de *E. coli* aislada desde orina Estados Unidos el año 2012 (sin publicar, Genbank: KU254578) y EF592571 (8460/8471 nucleótidos), correspondiente a una porción de un plásmido pesquisado en *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium obtenida desde un paciente con gastroenteritis en Guayana Francesa el año 2004 (García Fernández *et al.*, 2007).



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.17 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-2} de cepas de *K. pneumoniae* UC332 y UC338. A) Asociación de *bla*_{CTX-M}/*qacE*Δ1 con partidores SC1/SC2. B) Asociación de los genes *qacE*Δ1/*sul1* con partidores SC2/Sul1. UC231: Control negativo, ADN genómico cepa *E. coli* J53. UC44: Control positivo, ADN genómico cepa *Proteus mirabilis*. Blanco: Control de mezcla (sin ADN). 1kb: Marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.18 Plataforma genética de *bla*_{CTX-M-2} en cepa de *K. pneumoniae* UC332 productora de carbapenemasa KPC-2 aislada en un hospital chileno. 5' SC: segmento conservado 5' del integrón clase 1, 3' SC: segmento conservado 3' del integrón clase 1, 3' SC2: copia segmento conservado 3' del integrón clase 1, Pi: promotor integrasa del integrón clase 1, Pc: promotor *cassettes* genéticos del integrón, P2: segundo promotor *cassettes* genéticos del integrón clase 1, ●: sitio *attI*, 26 pb: región reconocimiento de *ISCR1* para el proceso de recombinación, Zona 1: segmento nucleotídico conservado similar al encontrado en *K. ascorbata*. Tamaños no escalados.

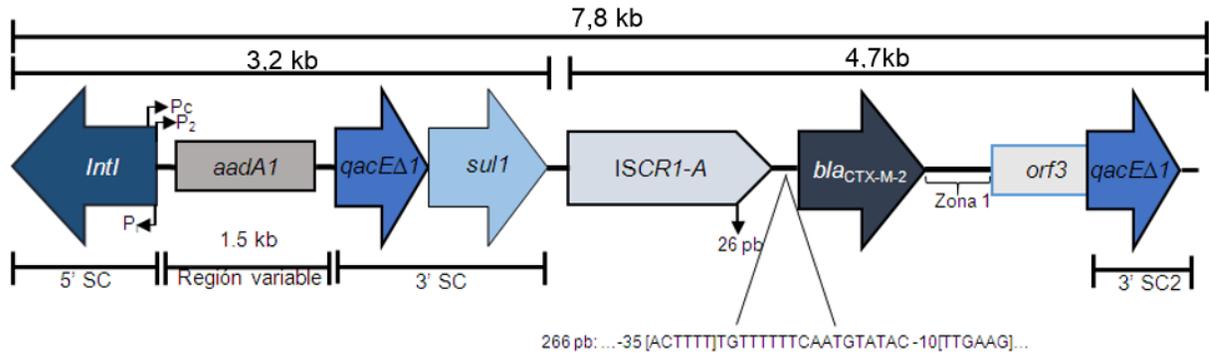
3.5.3 *Klebsiella pneumoniae* UC338 (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{KPC-2})

Al igual que en la cepa UC332; mediante mapeo por PCR río arriba y abajo del gen mencionado se determinó que se encuentra inserto en un integrón complejo o inusual de clase 1. Se utilizaron las mismas asociaciones de partidores utilizadas en la cepa UC332 (Figura 3.13, 3.14, 3.16, 3.17).

En el extremo 5' se identificó el gen *intl1* codificante de la integrasa de tipo 1, tras el análisis de la secuencia correspondiente a este gen, se pudo identificar que está compuesto de tres regiones promotoras; una asociada a la expresión de la integrasa (Pi) la cual contiene una zona de 10 pb (5' - TGCCTCGGGC – 3') entre 10-[AGTCTA] y 35-[ATCCAA], y la otras dos zonas asociadas a la expresión de los *cassettes* genéticos; Pc que contiene una secuencia de 17 pb (5'- TAAGCCTGTTTCGGTTCG – 3') entre 35- [TTGACA] y 10- [TAAACT] constituyendo así un promotor fuerte a diferencia de lo obtenido en la cepa UC332 y P2 que contiene una secuencia de 14 pb (5' -TGACTGTTTTTTTG - 3') entre -35 [TTGTTA] y -10 [TACAGT] que correspondería a un promotor sin actividad idéntico a la cepa UC332. En tanto el sitio *attI* de 62 pb (5'- TGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCG CCCTAAAACAAAGTTATGT -3') fue caracterizado 32 pb río arriba de la secuencia promotora de la integrasa.

Posteriormente, se realizó la amplificación de la zona variable del integrón con dos pares de partidores, HS458/HS459 y CASS1/CASS2 obteniéndose un producto de 1500 pb sólo con los partidores CASS1/CASS2 (Figura 3.14). El análisis de las secuencias dio como resultado la presencia del *cassette* genético *aadA1*. Cabe señalar que al utilizar la combinación de partidores SC2/Sul1 (Figura 3.17B) en busca de la asociación de los elementos *qacEΔ1* y *sul1* de la duplicación parcial del extremo 3' SC2 no se obtuvieron productos PCR a diferencia de lo mencionado en la cepa UC332. Se caracterizaron 7824 pb ingresados a Genbank bajo el código de acceso KY286109 correspondiente a un integrón complejo o inusual de clase 1 (Figura 3.19). Al utilizar la

herramienta BLAST, no se encontró secuencias idénticas a la plataforma completa caracterizada.



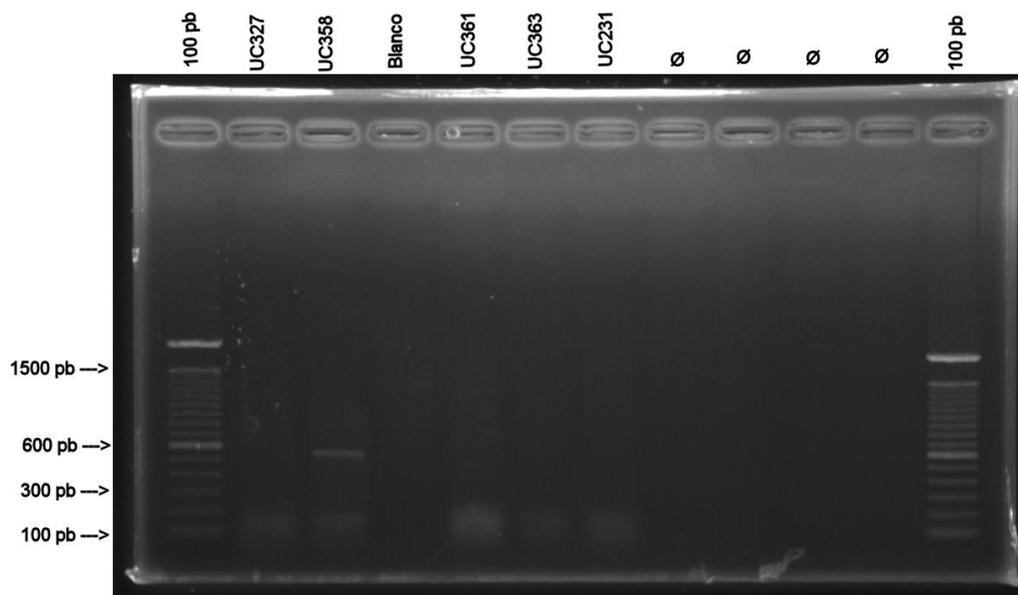
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.19 Plataforma genética de *bla*_{CTX-M-2} en la cepa de *K. pneumoniae* UC338 productora de carbapenemasa KPC-2 aislada en un hospital chileno. 5' SC: segmento conservado 5' del integrón clase 1, 3' SC: segmento conservado 3' del integrón clase 1, 3' SC2: copia segmento conservado 3' del integrón clase 1, Pi: promotor integrasa del integrón clase 1, Pc: promotor *cassettes* genéticos del integrón, P2: segundo promotor *cassettes* genéticos del integrón clase 1. Tamaños no escalados.

3.5.4 *Klebsiella pneumoniae* UC358 (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{oxa-370})

Al igual que en la cepa *E. coli* UC327, utilizando los partidores ISEcp1_CTX_F/ ISEcp1_CTX_R (Tabla 4, material anexo) se obtuvo un producto de PCR de un tamaño de 1730 pb (Figura 3.10A). El análisis de la secuencia de este producto indicó que rio arriba del gen *bla*_{CTX-M}, separado por una secuencia de 48 pb se encuentra la secuencia de inserción ISEcp1. Posteriormente utilizando los partidores IS26.R/ISECP1.5' (Tabla 4, material anexo) se obtuvo un producto PCR de 836 pb. A través de la herramienta ExPASy (<http://web.expasy.org/tools/translate>) se tradujo la secuencia nucleotídica a la secuencia proteica correspondiente. El alineamiento de dicha secuencia a través de BLAST, determinó que rio arriba de la secuencia ISEcp1 se encuentra un elemento similar al encontrado en la familia del transposón *Tn3*, denominado previamente *Tn3-like* (Genbank: AB976579) (Matsumura *et al.*, 2015). Dicho elemento conserva las regiones codificantes en sentido 3 - 5' de la resolvasa (*tnpR*) y la porción codificante en sentido 5' - 3' de la transposasa (*tnpA*) encontradas en la familia de Tn3, sin embargo, ambas zonas se encuentran truncadas, *tnpR* por IS26 y *tnpA* por ISEcp1.

Utilizando los partidores IS26.F/IS26R, se identificó una secuencia nucleotídica de 558 pb correspondiente al gen de la transposasa (*tnpA*) de la secuencia de inserción IS26 (Figura 3.20). A su vez, utilizando los partidores CTX-M-1_540/ORF477 (Figura 3.10B) se obtuvieron 461 pb correspondientes a la asociación de los elementos genéticos *bla*_{CTX-M-15} y el marco de lectura abierto *orf477*, constituyendo similar asociación a lo encontrado previamente en la cepa *E. coli* UC327.

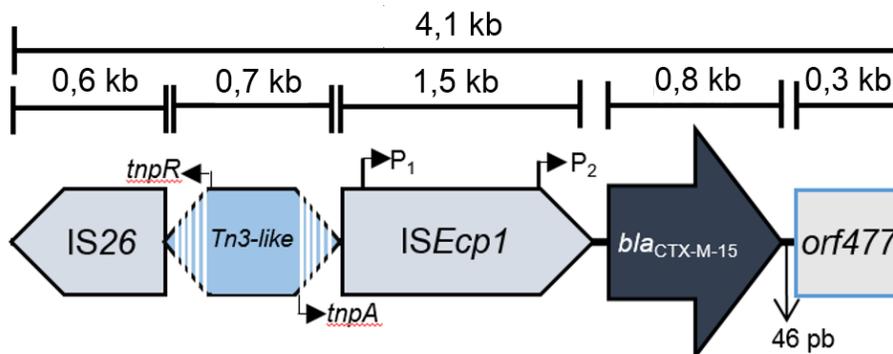


Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.20 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-15} en cepas de *E. coli* UC327, *K. pneumoniae* UC358, UC361 y de *bla*_{CTX-M-3} en cepa de *K. oxytoca* UC363. Pesquisa de IS26 (558 pb). Blanco: control de mezcla, UC231: Cepa control negativo, *Escherichia coli* J53. Ø: Carriles vacíos. 100 pb: Marcador de tamaño molecular 100 pb DNA Ladder Ready (Invitrogen).

Se realizaron alineamientos múltiples de la secuencia nucleotídica de 4114 pb utilizando la herramienta BLAST y no se encontraron plataformas similares para cepas de *Klebsiella* spp. Sin embargo, se encontró 100 % de similitud nucleotídica con la secuencia AB976579, asociada a una cepa de *E. coli* ST131 aislada en Japón el año 2011 (Matsumura *et al.*, 2015) y con la secuencia CP015086 asociada a un plásmido pesquisado en una cepa de *E. coli* ST131 aislada en Arabia Saudita el año 2014 (Alyamani *et al.*, 2016).

La secuencia completa de la plataforma de *bla*_{CTX-M-15} (Figura 3.21) asociada a la cepa *K. pneumoniae* UC358 productora de OXA-370 fue ingresada a la base de datos de Genbank bajo el código de acceso KY551566.



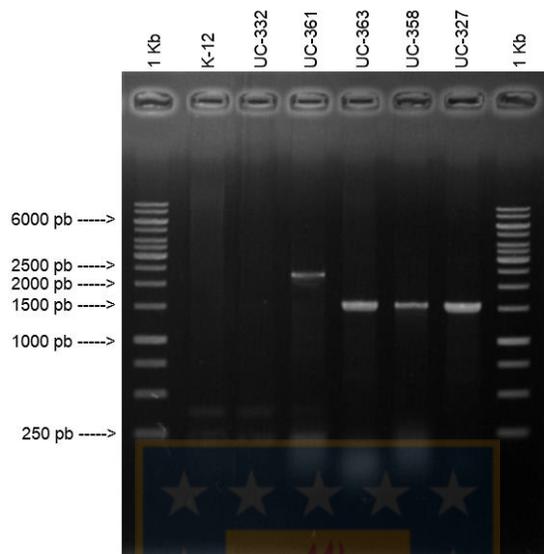
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.21 Plataforma genética de *bla*_{CTX-M-15} en cepa de *K. pneumoniae* UC358 productora de carbapenemasa OXA-370 aislada en un hospital chileno. Flechas (→) indican dirección de la transcripción de los diversos promotores; *tnpR*: promotor truncado de la resolvasa de *Tn3-like*, *tnpA*: promotor truncado de la transposasa de *Tn3-like*, P1: sitio promotor expresión de *tnpA* de *ISEcp1*, P2: sitio promotor expresión de *bla*_{CTX-M-15}. 46 pb: Región espaciadora entre *bla*_{CTX-M-15} y el elemento *orf477*. Tamaños no escalados.

3.5.5 *Klebsiella pneumoniae* UC361 (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{NDM-1})

Para la determinación de la plataforma genética de *bla*_{CTX-M-15} en la cepa *K. pneumoniae* UC361, se utilizaron las mismas asociaciones de partidores utilizados en las cepas UC327 y UC358 (Figura 3.10 A y B, 3.20). Corriente abajo del gen, separado por 46 pb al igual que en la cepa UC327 y UC358 se encuentra el marco de lectura *orf477*. Por el lado opuesto, corriente arriba al gen *bla*_{CTX-M-15}, separado por 48 pb se encuentra una porción de la secuencia de inserción *ISEcp1*. La característica más relevante de esta plataforma, es que al amplificar mediante PCR convencional el elemento *ISEcp1* con los partidores *ISEcp1*-R/*ISEcp1*-F (Tabla 4, material anexo) y

posterior electroforesis, se obtuvo un producto de mayor tamaño molecular en comparación a las cepas UC327, UC358 y UC363 (Figura 3.22).



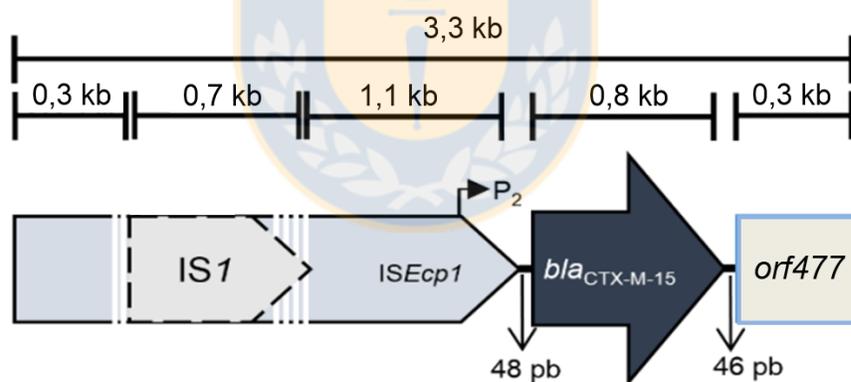
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.22 Caracterización del entorno genético de *bla*_{CTX-M-15} en cepas de *E. coli* UC327, *K. pneumoniae*, UC358, UC361 y de *bla*_{CTX-M-3} en cepa de *K. oxytoca* UC363. Amplificación de *ISEcp1* con partidores *ISEcp1-F* *ISEcp1-R*. K-12: ADN genómico cepa control negativo *E. coli* J53. UC-332: *K. pneumoniae bla*_{CTX-M-2} utilizada como control negativo. 1 Kb: Marcador de tamaño molecular OGeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Posterior a la secuenciación del producto amplificado, se obtuvo que *ISEcp1* se encuentra truncada a nivel del nucleótido 1095 (dirección 5'→3') por la secuencia de inserción IS 1. Dicha secuencia de inserción, posee dos marcos de lectura, *InsA* e *InsB*, los cuales participan en el fenómeno de transposición de este elemento genético y se encuentra flanqueada por dos secuencias RI: (RII: 5'-GGTAATGACTCCA ACTTACTGAT-3' e RID: 5'-ATCAGTAAGTTGGCACCATTACC-

3'). El efecto de la inserción de la IS1, según el análisis de la secuencia nucleotídica obtenida revela que *ISEcp1* conserva la zona promotora de la expresión de *bla_{CTX-M-15}*, sin embargo, en lo que respecta a la zona promotora de *tnpA* de *ISEcp1* se encuentra solo una de las secuencias promotoras, (10' TACAAT). Rio arriba de la secuencia IS1 se encuentra una porción de *ISEcp1*, por tanto, la inserción de IS1 no generó la pérdida de un fragmento de *ISEcp1*, sino que solo modificó los marcos de lectura de la secuencia desplazando la secuencia nucleotídica restante hacia el extremo 5' de la plataforma de *bla_{CTX-M-15}*. Se realizaron alineamientos múltiples de la secuencia nucleotídica de la plataforma completa caracterizada de *bla_{CTX-M-15}* utilizando la herramienta BLAST y no se encontró ninguna secuencia nucleotídica similar.

Se determinaron 3,3 kb correspondientes a la plataforma genética de *bla_{CTX-M-15}* (Figura 3.23), cuya secuencia genética fue ingresada al Genbank bajo el código de acceso: MF797950.

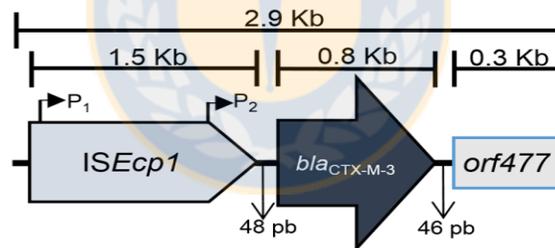


Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.23 Plataforma genética de *bla_{CTX-M-15}* en cepa de *K. pneumoniae* UC361 productora de carbapenemasa NDM-1 aislada en un hospital chileno. Flechas (→) indican dirección de la transcripción de los diversos promotores. P2: sitio promotor expresión de *bla_{CTX-M-15}*. 48 y 46 pb corresponden a las regiones espaciadoras entre los elementos genéticos graficados. Tamaños no escalados.

3.5.6 *Klebsiella oxytoca* UC363 ($bla_{CTX-M-3}$, bla_{KPC-2})

Al igual que en las cepas UC327, UC358 y UC361, se utilizaron las mismas combinaciones de partidores (Figura 3.10 A y B, 3.20, 3.22). La plataforma de $bla_{CTX-M-3}$ está estructurada río arriba al gen por la secuencia de inserción $ISEcp1$ y río abajo del gen se encuentra $orf477$ (Figura 3.24). La variación más significativa en esta plataforma se encuentra en la secuencia espaciadora entre la secuencia RI derecha de $ISEcp1$ (RID: 5'-TAAAAACACACGTGGAATTTAGG-3') y el inicio del gen $bla_{CTX-M-3}$ que consta de 48 pb, lo cual generalmente se describe para las plataformas similares pero asociadas a $bla_{CTX-M-15}$. Mediante la herramienta BLAST, se buscaron secuencias nucleotídicas similares en la base de datos del Genbank asociadas a cepas de *K. oxytoca*, pero no se encontraron resultados. La secuencia nucleotídica caracterizada fue ingresada a la base de datos del Genbank bajo el código de acceso KU200455.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.24 Plataforma genética de $bla_{CTX-M-3}$ en cepa de *K. pneumoniae* UC363 productora de carbapenemasa KPC-2 aislada en un hospital chileno. Flechas (→) indican dirección de la transcripción de los diversos promotores, P1: sitio promotor de la expresión de *tnpA* de $ISEcp1$. P2: sitio promotor expresión de $bla_{CTX-M-3}$. 48 y 46 pb corresponden a las regiones espaciadoras entre los elementos genéticos graficados. Tamaños no escalados.

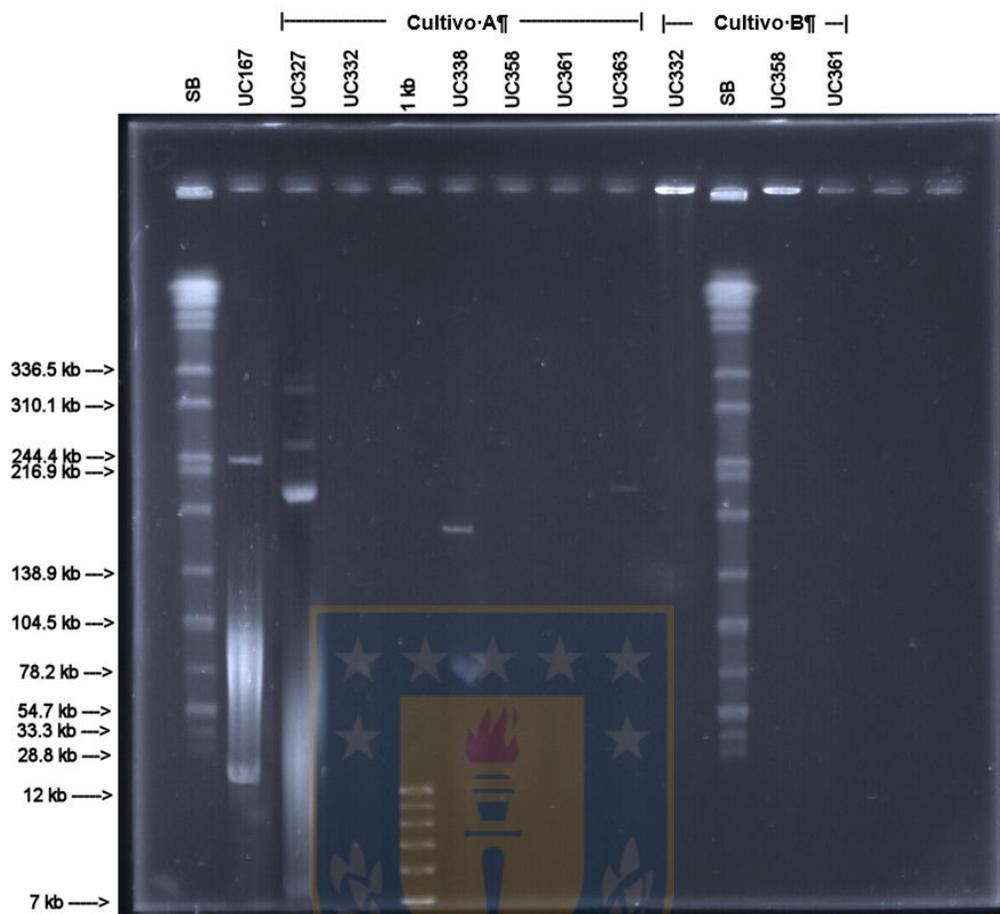
3.6 Localización genética de genes *bla*_{CTX-M} y genes productores de carbapenemasas

Los resultados de este objetivo se dividirán en dos secciones; en primer lugar, se analizarán los perfiles de los plásmidos portados por las cepas a las cuales se les determinó el entorno genético de *bla*_{CTX-M} (UC327, UC332, UC338, UC358, UC361 y UC363), obtenidos mediante electroforesis convencional y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y, en segundo lugar, los ensayos de hibridación ADN-ADN con las sondas diseñadas para la detección de los genes *bla*_{CTX-M} de grupo 1 y 2.

3.6.1 Perfiles plasmídicos

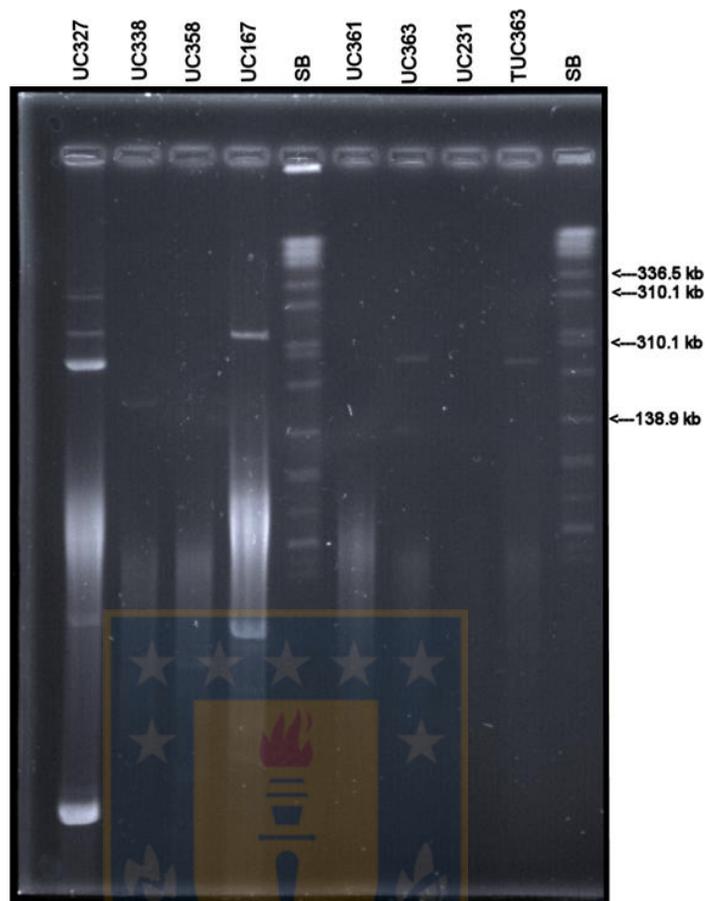
Tal como se señaló en la metodología, se utilizaron diversos protocolos para la extracción de ADN plasmídico (ADNpl), no existiendo diferencias entre ellos con las variaciones de las condiciones de cultivo, ni la metodología de extracción de ADNpl. Sin embargo, las diferencias se observaron a la hora de realizar las electroforesis correspondientes y visualizar las bandas de ADNpl en los geles de agarosa.

Al utilizar PFGE se obtiene una buena discriminación de los patrones de bandeo de ADNpl de entre 20 kb y 300 kb (Figuras 3.25 y 3.26), sin embargo, las bandas de ADNpl inferiores a esos tamaños no se visualizaron. A diferencia de esto, en la electroforesis convencional (Figuras 3.27 y 3.28) no se obtuvieron buenos resultados a la hora de discriminar bandas de ADNpl cuyo tamaño sea superior a 20 kb, inclusive variando el % de agarosa utilizado, sin embargo, pueden conservarse en la corrida electroforética bandas de ADNpl inferior al tamaño mencionado



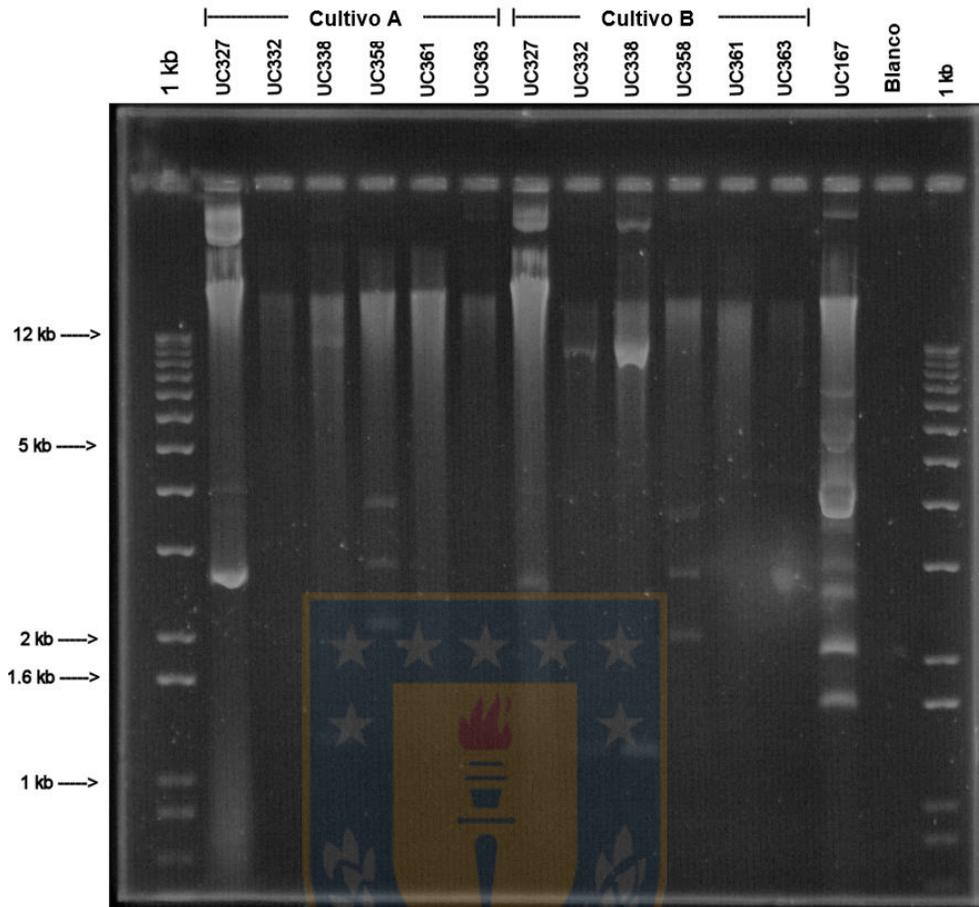
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.25 Perfiles plasmídicos de cepas productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos obtenido mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). Cultivo A: cultivo convencional en caldo LB. Cultivo B: cultivo convencional en caldo LB suplementado con subsalicilato de bismuto. Extracciones realizadas con kit PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep. SB: Marcador de tamaño molecular, ADN digerido con *Xba*I de *Salmonella* serotipo Braenderup. UC167: Marcador de tamaño molecular, ADNpl de cepa *E. coli* V517. UC327: *E. coli* (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-15}). UC332 y UC338: *K. pneumoniae* (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-2}). 1kb: Marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). UC358: *K. pneumoniae* (*bla*_{oxa-370}, *bla*_{CTX-M-15}). UC361: *K. pneumoniae* (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}). Cepa UC363: *K. oxytoca* (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-3}).



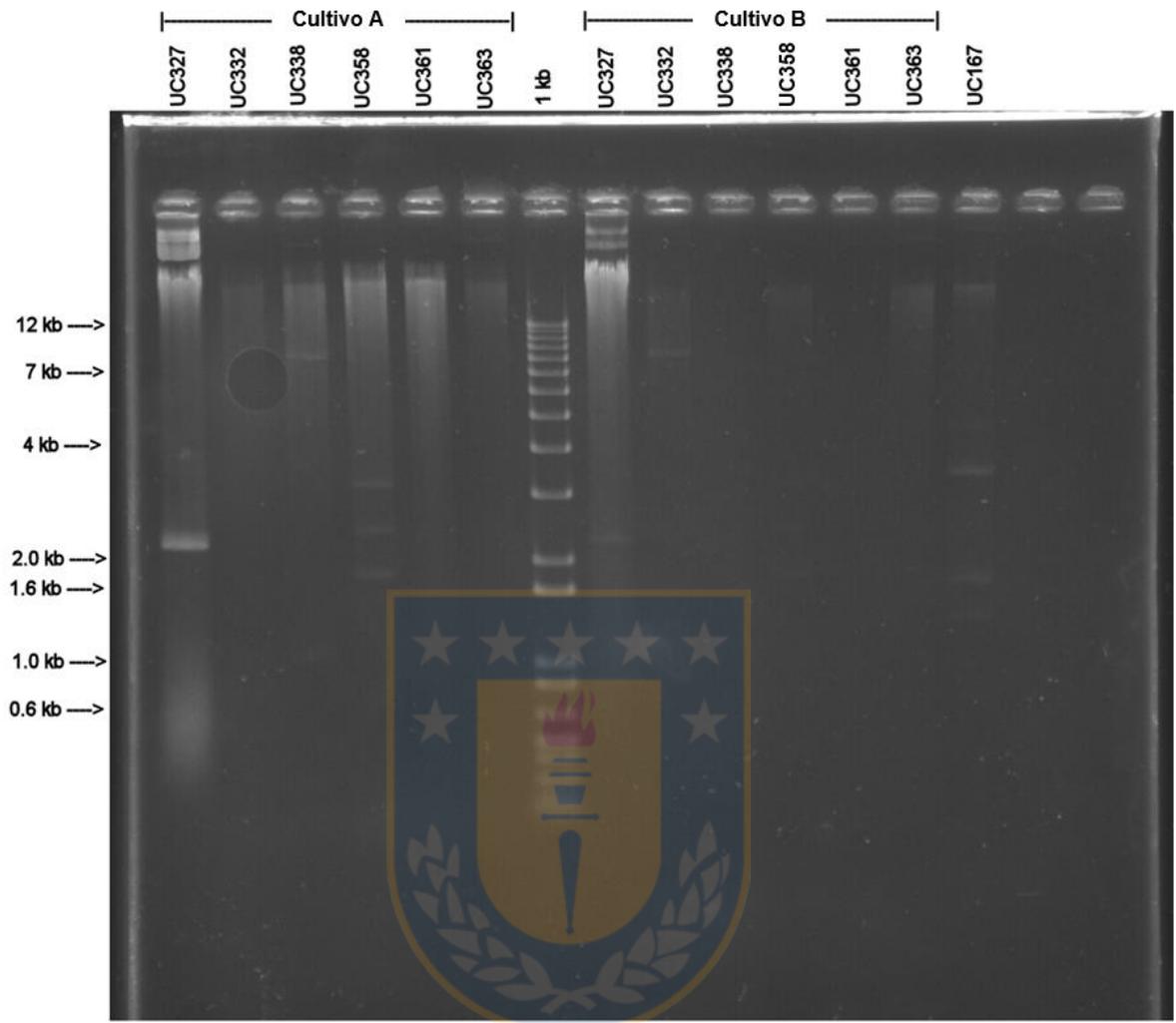
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.26 Perfiles plasmídicos de cepas productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos obtenidos mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). Extracciones realizadas con kit PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep. UC327: *E. coli* (bla_{KPC-2} , $bla_{CTX-M-15}$). UC338: *K. pneumoniae* (bla_{KPC-2} , $bla_{CTX-M-2}$). UC358: *K. pneumoniae* ($bla_{oxa-370}$, $bla_{CTX-M-15}$). UC167: Marcador de tamaño molecular correspondiente a ADN_{pI} de cepa *E. coli* V517. SB: Marcador de tamaño molecular correspondiente a ADN digerido con *Xba*I de *Salmonella* serotipo Braenderup. UC361: *K. pneumoniae* (bla_{NDM-1} , $bla_{CTX-M-15}$). Cepa UC363: *K. oxytoca* (bla_{KPC-2} , $bla_{CTX-M-3}$). Cepa UC231; *E. coli* J53 utilizada como receptora en experimento de conjugación. Cepa TUC363; *E. coli* ($bla_{CTX-M-3}$) transconjugante de cepa UC363.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.27 Perfiles plasmídicos de cepas productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos obtenidos mediante electroforesis convencional. Cultivo A: cultivo convencional en caldo LB. Cultivo B: cultivo convencional en caldo LB suplementado con subsalicilato de bismuto. Extracción mediante kit PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep. UC327: *E. coli* (bla_{KPC-2} , $bla_{CTX-M-15}$). UC332 y UC338: *K. pneumoniae* (bla_{KPC-2} , $bla_{CTX-M-2}$). UC358: *K. pneumoniae* ($bla_{oxa-370}$, $bla_{CTX-M-15}$). UC361: *K. pneumoniae* (bla_{NDM-1} , $bla_{CTX-M-15}$). UC363: *K. oxytoca* (bla_{KPC-2} , $bla_{CTX-M-3}$). 1kb: Marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). UC167: Marcador de tamaño molecular correspondiente a ADNpl de cepa *E. coli* V517. Blanco: carril vacío.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.28 Perfiles plasmídicos de cepas productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos obtenidos mediante electroforesis convencional. Cultivo: cultivo convencional en caldo LB. Cultivo B: cultivo convencional en caldo LB suplementado con subsalicilato de bismuto. Extracciones realizadas con kit PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep. UC327: *E. coli* (bla_{KPC-2} , $bla_{CTX-M-15}$). UC332 y UC338: *K. pneumoniae* (bla_{KPC-2} , $bla_{CTX-M-2}$). UC358: *K. pneumoniae* ($bla_{Oxa-370}$, $bla_{CTX-M-15}$). UC361: *K. pneumoniae* (bla_{NDM-1} , $bla_{CTX-M-15}$). UC363: *K. oxytoca* (bla_{KPC-2} , $bla_{CTX-M-3}$). 1kb: Marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). UC167: Marcador de tamaño molecular correspondiente a ADNpl de cepa *E. coli* V517.

Posteriormente, se analizaron cada uno de los geles de electroforesis (PFGE y convencional) para cada una de las cepas a través del software UVI-1D, obteniendo de esa forma un estimativo del tamaño de cada una de las bandas de ADNpl visualizadas. Los datos son mostrados en la tabla 3.9.

Cabe señalar que en la cepa UC361 no se obtuvieron bandas de ADNpl con las metodologías de cultivo y de extracción utilizadas.

Tabla 3.9 Tamaños estimativos de ADNpl obtenido de los diferentes perfiles plasmídicos resueltos mediante electroforesis convencional y PFGE de cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos.

Número de bandas de ADNpl	Cepas					
	UC327	UC332	UC338	UC358	UC361	UC363
	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>
1	331 kb	80 kb	160 kb	4,0 kb	*	208 kb
2	322 kb	11 kb	80 kb	3,2 kb		
3	254 kb	1,2 kb	11 kb	2,2 kb		
4	184 kb		1,2 kb			
5	4,2 kb					
6	2,8 kb					

ADNpl: Bandas de ADN plasmídico, kb: Kilobases, *: No dilucidado.

Fuente: Elaboración propia.

3.6.2 Hibridación ADN-ADN

Se diseñaron dos sondas de ADN de acuerdo al protocolo establecido en el kit comercial DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Para el diseño se utilizaron dos pares de partidores, previamente utilizados en la amplificación de PCR múltiple, para los genes *bla*_{CTX-M} de los grupos 1 y 2 (Tabla 1, material anexo). La eficiencia de marcaje de las sondas se llevó a cabo de acuerdo al protocolo del kit comercial utilizado.

Tabla 3.10 Características de las sondas diseñadas para la hibridación ADN/ADN de genes *bla*_{CTX-M}.

N°	Partidores	Secuencia 5' - 3'	% G+C	T _m	T _{opt}	$\bar{x}T_{opt}$	Tamaño (pb)	Gen blanco
1	mCTX-MG1R	AGCTTATTCATCGCCACGTT	45	66,8	46,8	46,8	415	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
	mCTX-MG1F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	45	66,8	46,8			
2	mCTX-MG2R	CCAGCGTCAGATTTTTCAGG	50	69,2	49,2	51,4	552	<i>bla</i> _{CTX-M-2}
	mCTX-MG2F	CGACGCTACCCCTGCTAT	61	73,7	53,7			

T_m: Temperatura de melting (°C). %G+C: Porcentaje de guanina y citosina de la sonda. T_{opt}: Temperatura óptima (°C) de hibridación calculada en base a formula extraída de protocolo de kit DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Diagnostics. Mannheim, Alemania). $\bar{x}T_{opt}$: Promedio de temperaturas (°C) óptima para la hibridación.

Fuente: Elaboración propia.

Después de la electrotransferencia del ADNpl a la membrana de Nylon⁺ y la hibridación de ADN-ADN y su posterior detección mediante quimioluminiscencia, se obtuvieron diferentes señales quimioluminiscente para las cepas UC327, UC332, UC338 y UC363 (Figura 3.29, 3.30, 3.31) que por comparativa y análisis de los geles electroforéticos corresponderían a diversas bandas de ADNpl resueltas en los perfiles plasmídicos obtenidos previamente.

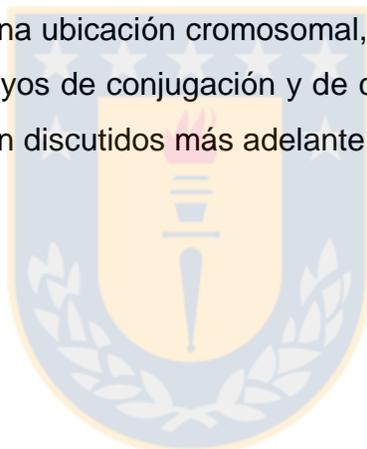
Según los análisis establecidos, *bla*_{CTX-M-15} en la cepa *E. coli* UC327 se encontraría en un plásmido de un tamaño aproximado de 254 kb. Por otro lado, si bien en el perfil plasmídico de la cepa UC332 no se logra visualizar con nitidez la banda de ADNpl de 80 kb, en el ensayo de hibridación de *bla*_{CTX-M-2} se logra visualizar la señal quimioluminiscente en dicha banda, a su vez, *bla*_{CTX-M-2} en la cepa *K. pneumoniae* UC338 se encontraría en un plásmido de 80 kb, similar a lo obtenido en la cepa UC332.

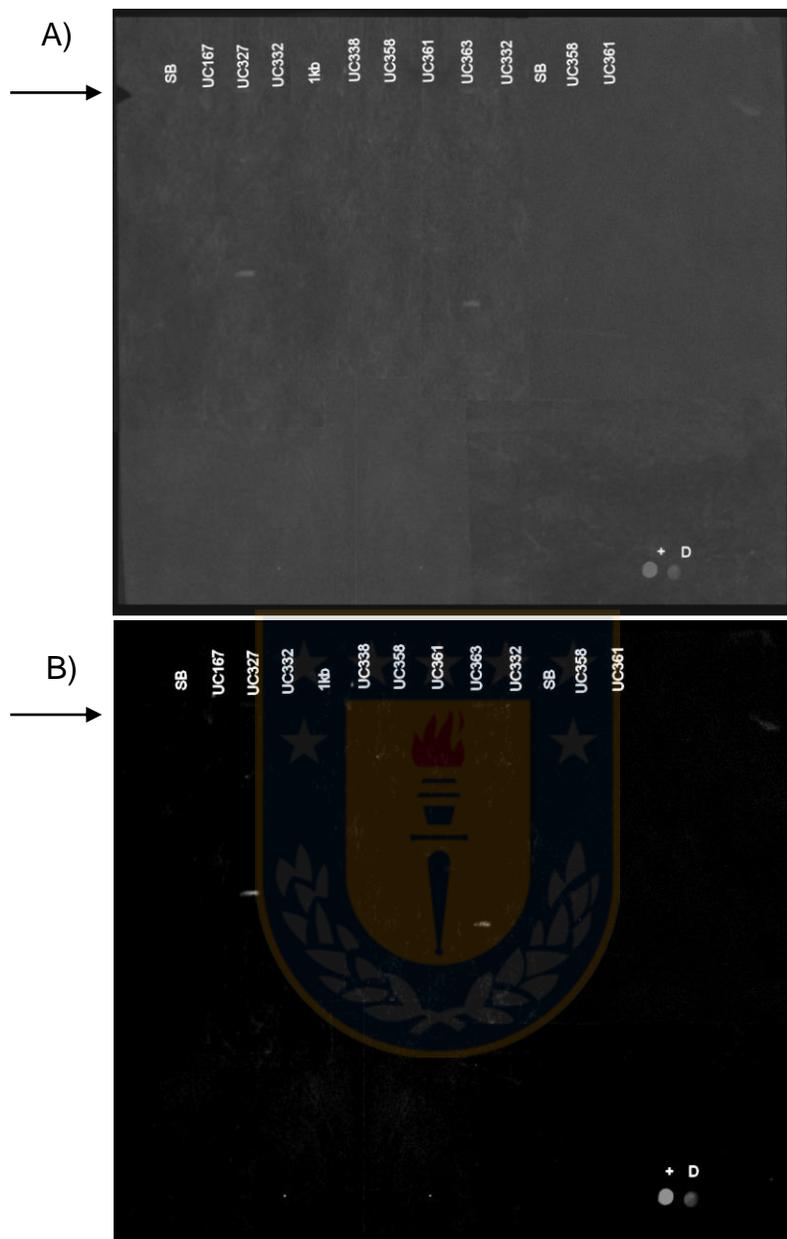
En tanto, *bla*_{CTX-M-15} en la cepa *K. oxytoca* UC363, de la cual se obtuvo solo una banda de ADNpl, estaría ubicado en dicha banda de aproximadamente 208 kb.

En la cepa *K. pneumoniae* UC358, en cuyo perfil plasmídico se visualizaron 3 bandas inferiores a 10 kb no se observó señal quimioluminiscente, y tal como era esperable, la corrida electroforética de la cepa UC361 en la cual no se observó ninguna banda de ADNpl, tampoco mostró esbozos de señal quimioluminiscente.

Cabe señalar que el ensayo de hibridación se realizó por triplicado y para las cepas UC358 y UC361, se modificaron las condiciones de electrotransferencia, hibridación (temperatura y lavados de astringencia) y tiempos de incubación no habiendo diferencias significativas a la hora de visualizar las membranas hibridadas.

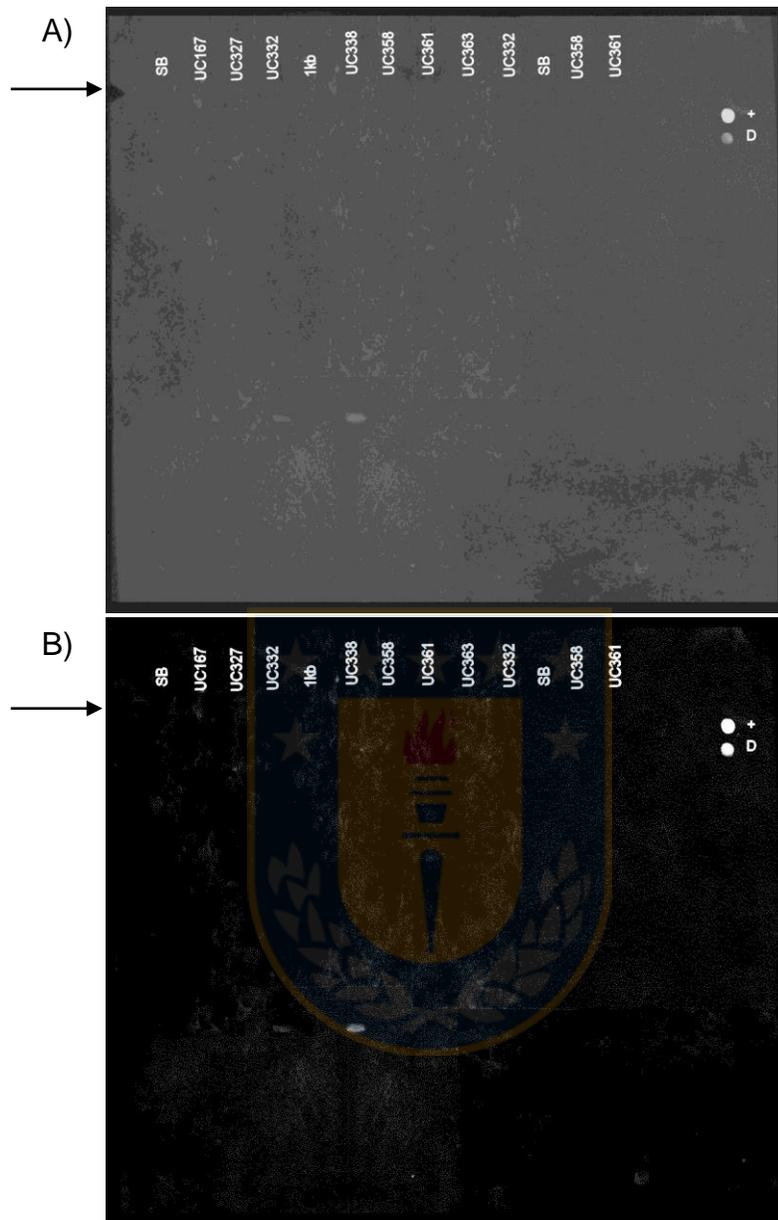
Con la finalidad de descartar que *bla_{CTX-M}* y/o los genes productores de carbapenemasas tuvieran una ubicación cromosomal, para las cepas UC358, UC361 y UC363 se realizaron ensayos de conjugación y de curación de plásmidos (material anexo), resultados que serán discutidos más adelante.





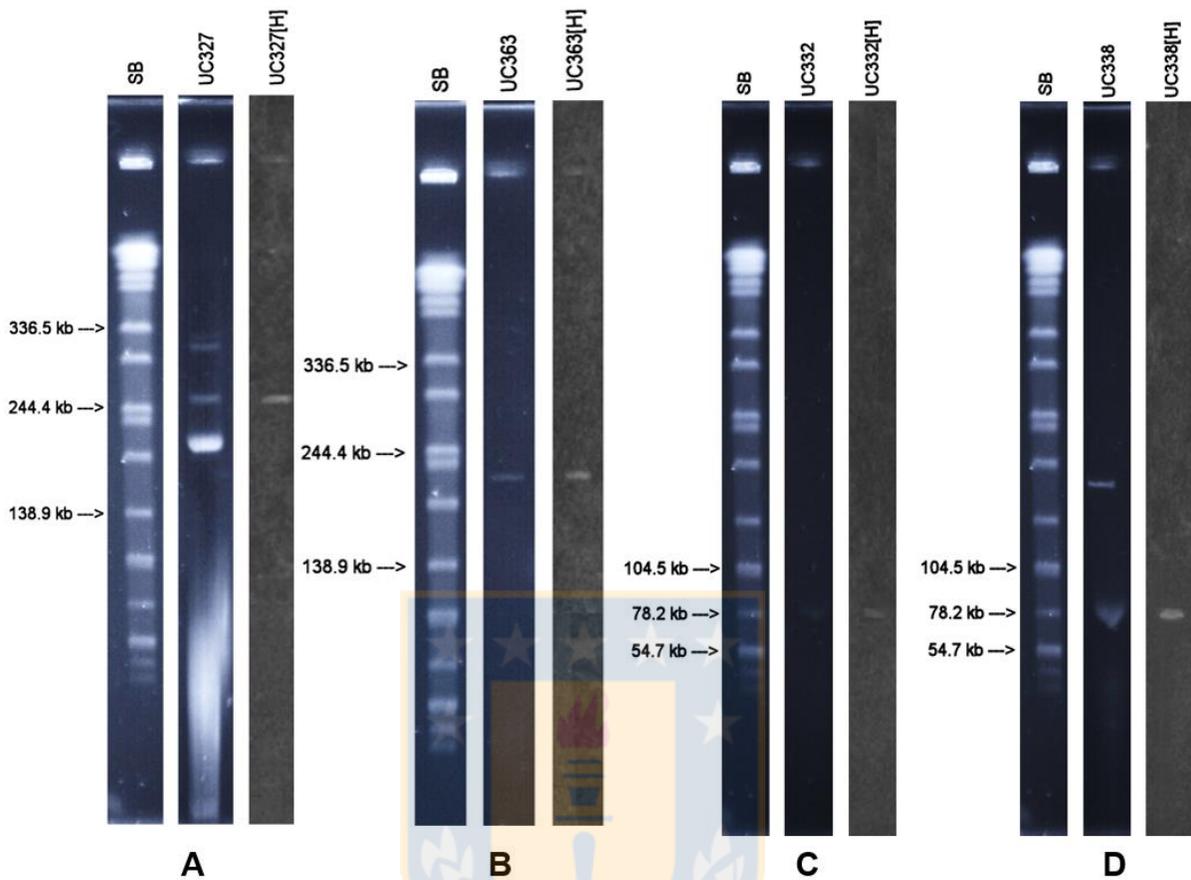
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.29 Hibridación de ADNpl con sonda 1 (*bla_{CTX-M-1}*). Membrana correspondiente a perfil plasmídico obtenido en la Figura 3.25. Figuras A y B se muestran con diferente grado de contraste, editado con software UVI-1D. La Flecha (→) indica la altura de los pocillos de carga de las muestras. +: Control positivo de marcaje del kit comercial utilizado. D; Dot-blot con producto PCR de *bla_{CTX-M-15}*.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.30 Hibridación de ADNpl con sonda 2 (*bla*_{CTX-M-2}). Membrana correspondiente a perfil plasmídico obtenido en la Figura 3.25. Figuras A y B se muestran con diferente grado de contraste, editado con software UVI-1D. La Flecha (→) Indica la altura de los pocillos de carga de las muestras. +: Control positivo de marcaje del kit comercial utilizado. D; Dot-blot con producto PCR de *bla*_{CTX-M-2}.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.31 Perfiles plasmídicos y bandas de ADNpl hibridadas con sondas para la detección de genes *bla*_{CTX-M}. A: Perfil plasmídico cepa *E. coli* UC327 e hibridación [H] con sonda para *bla*_{CTX-M-1}. B: Perfil plasmídico cepa *K. oxytoca* UC-363 e hibridación [H] con sonda para *bla*_{CTX-M-1}. C: Perfil plasmídico cepa *K. pneumoniae* UC332 e hibridación [H] con sonda para *bla*_{CTX-M-2}. D: Perfil plasmídico cepa *K. pneumoniae* UC338 e hibridación [H] con sonda para *bla*_{CTX-M-2}. SB: Marcador de tamaño molecular correspondiente a ADN digerido con *Xba*I de *Salmonella* serotipo Braenderup.

Con la finalidad de corroborar lo obtenido mediante el ensayo de hibridación, se extrajeron desde la agarosa las diferentes bandas de ADNpl. Tras doble-purificación

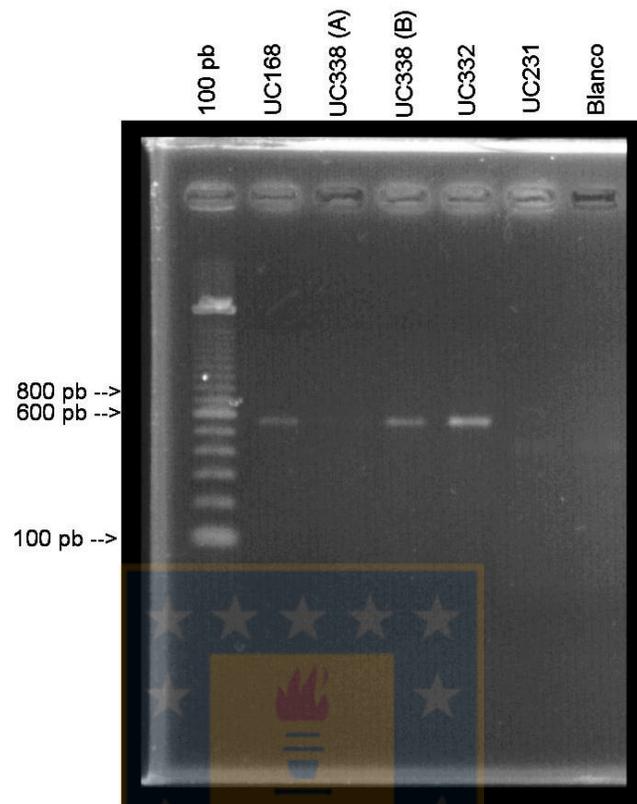
del ADNpl, este se utilizó como templado para la realización de PCR en busca del gen *bla_{CTX-M}* y los genes productores de carbapenemasas (*bla_{KPC-2}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-370}*) asociados a cada una de las cepas con los partidores y programas previamente utilizados (Figura 3.32-35).

Cabe señalar que las bandas de 331 kb y 322 kb de la cepa *E. coli* UC327 no se pudieron separar para la extracción desde el gel de agarosa, por lo cual se procesó como un solo templado. Los resultados obtenidos de las bandas de ADNpl portadoras de genes *bla_{CTX-M}* como genes de carbapenemasas se muestran en la Tabla 3.11.



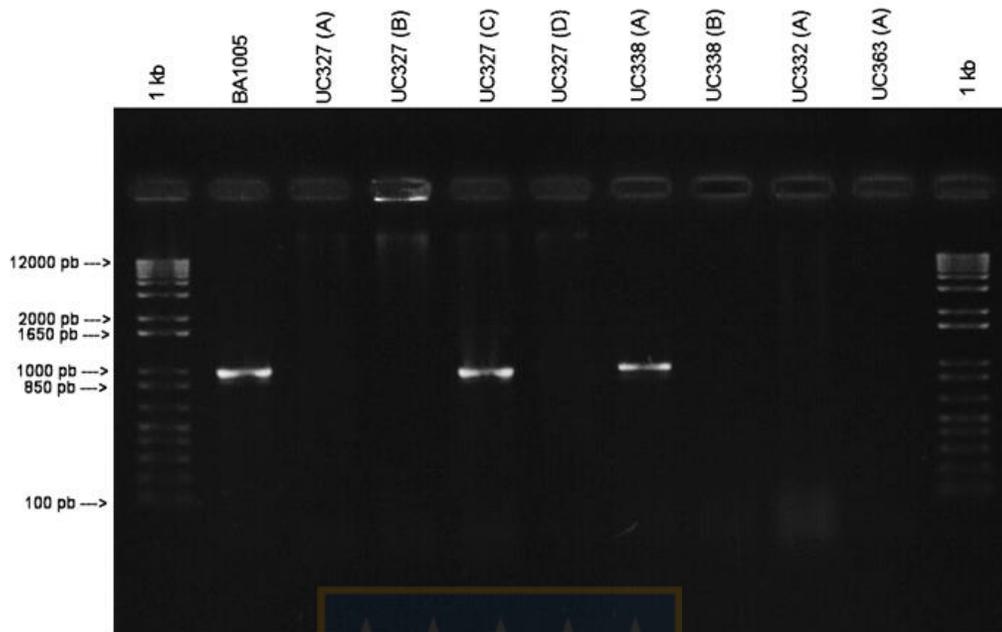
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.32 Electroforesis en gel de agarosa de los producto de amplificación mediante PCR del gen *bla_{CTX-M-1}* utilizando como templado el ADNpl obtenido desde las bandas extraídas de los perfiles plasmídicos. UC168: ADN genómico cepa *K. pneumoniae* control positivo *bla_{CTX-M-1}*. UC327(A-D): Templado de ADNpl de cepa *E. coli* UC327; (A) banda de 331 kb y 322 kb; (B) banda de 254 kb; (C) banda de 184 kb; (D) banda de 4,2 kb. UC358: Templado de ADNpl de cepa *K. pneumoniae* UC358; (A) banda de 4,0 kb; (B) banda de 3,2 kb; (C) banda de 2,2 kb. UC363 (A) Templado de ADNpl extraído desde banda de 208 kb de cepa *K. oxytoca* UC363. Blanco: Mix de mezcla. 100 bp: Marcador de tamaño molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).



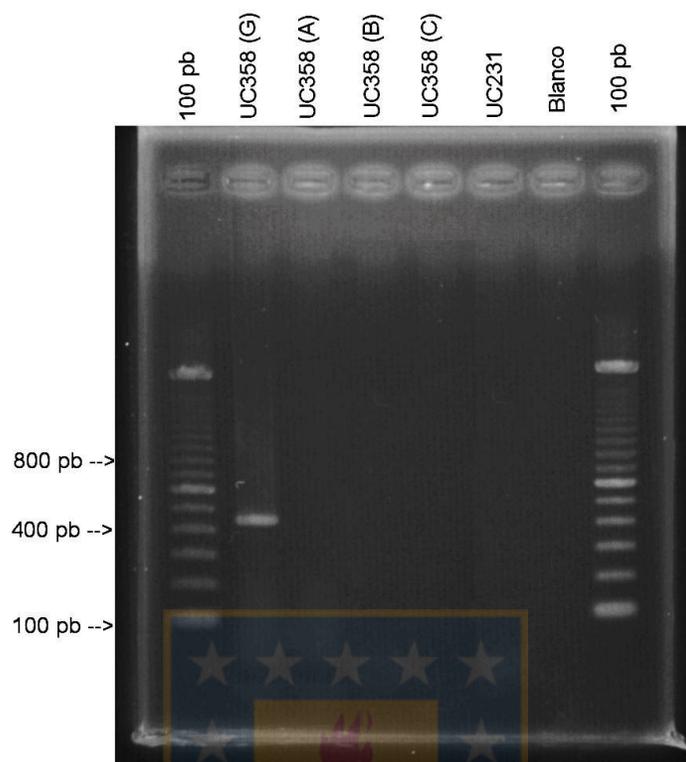
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.33 Electroforesis en gel de agarosa de los producto de amplificación mediante PCR del gen *bla*_{CTX-M-2} utilizando como templado el ADNpl obtenido desde las bandas extraídas de los perfiles plasmídicos. UC168: ADN genómico cepa *K. pneumoniae* control positivo gen *bla*_{CTX-M-2}. UC338: Cepa *K. pneumoniae* UC338; A: banda de 160 kb, B): banda de 80 kb. UC332: Templado de ADNpl extraído desde banda de 80 kb de cepa *K. pneumoniae* UC332. UC231: ADN genómico *E. coli* J53, utilizado como control negativo. Blanco: Mix de mezcla para el PCR sin ADN. 100 pb: Marcador de tamaño molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) Geles de electroforesis en agarosa al 1.5%.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.34 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del gen *bla_{KPC}* utilizando como plantilla el ADN_{Npl} obtenido desde las bandas extraídas desde los perfiles plasmídicos. BA1005: Cepa *K. pneumoniae* control positivo *bla_{KPC}*. UC327: Templado de ADN_{Npl} de cepa *E. coli* UC327; (A) banda de 331 kb y 322 kb, (B) banda de 254 kb; (C) banda de 184 kb; (D) banda de 4,2 kb. UC338: Templado de ADN_{Npl} de cepa *K. pneumoniae* UC338; (A) banda de 160 kb; (B) banda de 80 kb. UC332 (A) Templado de ADN_{Npl} extraído desde banda de 80 kb de cepa *K. pneumoniae* UC332. UC363 (A) Templado de ADN_{Npl} extraído desde banda de 208 kb de cepa *K. oxytoca* UC363. 1 kb: Marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) Geles de electroforesis en agarosa al 1%.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 3.35 Electroforesis en gel de agarosa de los producto de amplificación mediante PCR del gen *bla*_{OXA-370} utilizando como templado el ADNpl obtenido desde las bandas extraídas del perfil plasmídico de la cepa *K. pneumoniae* UC358. Positivo: ADN genómico cepa UC358 (G). UC358: Templado de ADNpl de cepa *K. pneumoniae* UC358; (A) banda de 4,0 kb, (B) banda de 3,2 kb; (C) banda de 2,2 kb. Blanco: Mix de mezcla para el PCR sin ADN. 100 bp: Marcador de tamaño molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

Tabla 3.11 Tamaño (kb) de los plásmidos portadores de genes *bla*_{CTX-M} y genes productores de carbapenemasas en cepas de enterobacterias aisladas en hospitales chilenos.

Genes de resistencia y tamaño de los plásmidos asociados.				
Especie (cepa)	<i>bla</i>_{CTX-M}	<i>bla</i>_{KPC-2}	<i>bla</i>_{NDM-1}	<i>bla</i>_{OXA-370}
<i>E. coli</i> (UC327)	254 kb	184 kb	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (UC332)	80 kb	ND	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (UC338)	80 kb	160 kb	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (UC358)	ND	-	-	ND
<i>K. pneumoniae</i> (UC361)	ND	-	ND	-
<i>K. oxytoca</i> (UC363)	208 kb	ND	-	-

ND: No determinado. -: No portadora.

Fuente: Elaboración propia.



4. DISCUSIÓN

En la actualidad la resistencia antibiótica es una de las mayores amenazas para la salud mundial, pudiendo afectar a cualquier persona, de cualquier edad y en cualquier país, y si bien, es un proceso que ocurre de forma natural, el uso excesivo e inadecuado de antibióticos en humanos, animales y en el ambiente ha acelerado la problemática (WHO, 2014; Gelband *et al.*, 2015; Totsika, 2016). Un punto crítico en este tema, es la emergencia de carbapenemasas en cepas de enterobacterias que presentaban resistencia a C3G con fenotipos multi-drogo resistentes (MDR), lo cual dejó ineficaz el tratamiento de elección con carbapenémicos, y por consiguiente contribuyó a aumentar los costos hospitalarios (Mathers *et al.*, 2016; Meletis, 2016; Totsika, 2016), la morbilidad y la mortalidad de los pacientes que padecen infecciones por este tipo de bacterias, sumergiendo al mundo en una complicación a la hora del tratamiento y constituyendo un factor clave en el desarrollo de la era post-antibiótica (Cosgrove, 2006; Birgy *et al.*, 2012; Potin *et al.*, 2016). Es así que en Febrero del 2017, la OMS categorizó las enterobacterias resistentes a carbapenémicos y/o resistentes a C3G como primera prioridad para guiar la investigación, descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos frente a ellas (OMS, 2017).

En la presente tesis se caracterizaron 24 cepas de enterobacterias productoras de alguna de las siguientes carbapenemasas: KPC, OXA-370 o NDM-1, siendo KPC la más frecuente, lo que concuerda con lo informado en el resto del mundo (Nordmann *et al.*, 2014; Mathers, 2016). Además, fenotípica y molecularmente se determinó la portación del gen codificante de la BLEE más relevante a nivel mundial, denominada CTX-M (Cantón *et al.*, 2012; D'Andrea *et al.*, 2013). Posteriormente, se seleccionaron 6 cepas para determinar la plataforma genética de *bla*_{CTX-M}, y a su vez, dilucidar si este gen tiene ubicación en algún elemento genético móvil junto a los genes codificantes de las diferentes carbapenemasas portadas por las cepas analizadas en este estudio. Los aislados incluidos pertenecen a 11 ST diferentes (Tabla 2.1), incluyendo aquellos relacionados a la diseminación de *bla*_{KPC}, como el ST1161, autóctono en Chile, (Barria-

Loiza *et al.*, 2016) y el ST258 asociado a un clon epidémico de distribución mundial, reportados en mayor prevalencia en esta tesis (Andrade *et al.*, 2011; Nordmann *et al.*, 2014; Mathers, 2016). Esta diversidad de ST, pertenecientes a 7 complejos clónales distintos, refiere una discreta diseminación multiclonal en el país de cepas de EPC. Por otra parte, la emergencia de NDM-1 y OXA-370 en dos aislados diferentes, epidemiológicamente, es muy atractivo, ya que ambas enzimas recientemente fueron descritas en cepas de *K. pneumoniae* en Brasil (Pereira *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2017), las cuales comparten la característica de pertenecer a los mismos ST descritos en Chile (ST1588 y ST16 respectivamente), sumado a que OXA-370 sólo ha sido descrita en el país mencionado (Pereira *et al.*, 2015), lo cual, su ocurrencia podría indicar de que se traten de casos de importación de cepas de EPC, al igual que lo ocurrido con la primera descripción de *bla*_{KPC} en Chile (Cifuentes *et al.*, 2012).

De acuerdo a los resultados obtenidos del antibiograma el 62,5 % de las cepas de EPC poseen el perfil XDR y el 37,5 % corresponde a MDR (Magiorakos *et al.*, 2012), lo cual concuerda con lo descrito en la literatura para cepas productoras de CBPs (Paterson *et al.*, 2007; Labrador *et al.*, 2014; Cifuentes *et al.*, 2015). Este perfil estaría mediado por la acumulación de genes de resistencia en bacterias constantemente sometidas a presión selectiva por el uso de diversos antibióticos, lo cual a su vez genera resistencia cruzada, es decir entre diversas familias de antimicrobianos, y por consiguiente, la aparición de cepas MDR y/o XDR puesto que obligaría a la bacteria a conservar y/o acumular elementos genéticos de resistencia a los diversos antimicrobianos a los cuales ha sido expuesta (Tugce *et al.*, 2014).

En relación a los β -lactámicos, la mayoría de las cepas presentaron resistencia a todos los antibióticos ensayados, incluidos los carbapenémicos. Este resultado tiene directa relación con la portación de carbapenemasas del tipo KPC, OXA-370 y NDM-1; sin embargo, no puede descartarse la presencia de otros mecanismos de resistencia, o β -lactamasas, que pudieran contribuir a la resistencia a esta familia de antimicrobianos (Pournaras *et al.*, 2010; Blair *et al.*, 2015; Meletis, 2016). Sólo dos aislados, *K. oxytoca*

UC344 y *K. pneumoniae* UC359, ambas portadoras de *bla*_{KPC-2}, tuvieron un comportamiento distinto. Estas cepas, presentaron susceptibilidad a MEM e IPM (Tabla 3.1), lo cual puede ser atribuido a un bajo nivel de expresión de la carbapenemasa KPC-2, sumado a la ausencia de otros mecanismos de resistencia que participen en el aumento de las CMI a dichos antibióticos (Pournaras *et al.*, 2010). El hallazgo de cepas con niveles de susceptibilidad o susceptibilidad intermedia a carbapenémicos, portadoras de genes productores de carbapenemasas ha sido descrito y puede dificultar su pesquisa y contribuir a la mantención de dichos genes en el ambiente (Mathers, 2016).

Cabe señalar que tal como lo descrito en el mundo, en Chile, la prevalencia de cepas productoras de carbapenemasas es mayor para la especie *K. pneumoniae* por sobre *K. oxytoca*, presentando esta última un perfil de susceptibilidad mayor (Hoenig *et al.*, 2012; Validi *et al.*, 2016). Esto puede tener directa relación en que la frecuencia de aislamientos de *K. oxytoca* puede ser hasta 10 veces inferior a los aislamientos de *K. pneumoniae* y la producción de β -lactamasas en este último género puede ser hasta 4 veces más frecuente (Labrador *et al.*, 2014). Similar situación se tiene en otras regiones del mundo como Colombia, Venezuela, Austria e Irán, donde existen reportes esporádicos de aislamiento de cepas de *K. oxytoca* productoras de carbapenemasas, principalmente del tipo KPC-2, y generalmente se describen asociadas a brotes hospitalarios (Garzón *et al.*, 2004; Hoenigl *et al.*, 2012; Labrador *et al.*, 2014; Validi *et al.*, 2016;).

En relación a los otros grupos o familias de antibióticos, se pudo evidenciar una alta resistencia a quinolonas (>80 %), fenicoles (>70 %) y en menor porcentaje a aminoglucósidos (>60 %). Estos resultados se relacionan con lo reportado en Chile el año 2015 en cepas de *K. pneumoniae* (ISP Chile, 2015), describiéndose tasas de resistencia a gentamicina que varían desde 45 % a 66 % y a ciprofloxacino de 60 %. A su vez, de acuerdo a la literatura internacional, generalmente enterobacterias portadoras de *bla*_{CTX-M} y/o genes productores de carbapenemasas, portan plásmidos

que acarrean múltiples genes de resistencia a otros antimicrobianos, otorgándoles a las cepas fenotipos del tipo MDR y/o XDR (Mammeri *et al.*, 2005; Seiffert *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015; Aires *et al.*, 2017).

En relación a la detección fenotípica de BLEE, al no adicionar ningún inhibidor de β -lactamasas al test fenotípico, se obtuvo un bajo porcentaje positividad (8,3 %), lo cual, puede ser consecuencia de la presencia de las diferentes carbapenemasas portadas en los aislados estudiados (Birgy *et al.*, 2012). Por ejemplo, para el caso de las cepas productoras de KPC, la literatura indica que en cepas productoras de BLEE derivadas de las familias TEM, SHV e incluso CTX-M, la presencia de KPC puede conllevar a resultados falsos negativos en los test fenotípicos de BLEE, debido a que el ácido clavulánico (CLA) y otros inhibidores de β -lactamasas usados son pobres inhibidores de la enzima KPC, lo cual es similar a lo que ocurre en la presencia de carbapenemasas del tipo NDM-1 y del grupo OXA (Giske *et al.*, 2010; Birgy *et al.*, 2012; Georgios *et al.*, 2014). De forma contraria, al adicionar ácido fenilborónico (AFB), inhibidor competitivo reversible de KPC, a las placas donde se realizó la detección fenotípica de BLEE, el porcentaje de cepas positivas aumentó al 70,8 %, lo que demuestra lo descrito anteriormente (Tabla 3.4-5). En las cepas que presentaron un test positivo para BLEE y no son portadoras de *bla*_{CTX-M}, es probable que pudieran ser portadoras de otra variedad de BLEE, como variantes de TEM, SHV, PER o GES, frecuentemente pesquisadas en aislados de *K. pneumoniae* (Bello *et al.*, 2005; Villegas *et al.*, 2008; Guzmán-Blanco *et al.*, 2014). Un resultado relevante, es que la cepa *K. pneumoniae* UC340, presentó un test negativo de BLEE, sin embargo, molecularmente se pesquisó la variante *bla*_{CTX-M-2}. Es posible que este enmascaramiento sea por algún otro tipo de mecanismo y/o β -lactamasa no pesquisado en este aislado, por ejemplo, se describen fenómenos asociados a hiperproducción de variantes de enzimas OXA que pueden enmascarar el test, o bien, un bajo nivel de producción constitutiva de BLEE (Poirel *et al.*, 2003). A través de estos resultados fenotípicos se reafirma lo postulado por otros autores, que frente a diferentes carbapenemasas, o patrones de resistencia desconocidos, los test fenotípicos para la demostración de mecanismos

enzimáticos de resistencia deben ser evaluados en conjunto y utilizando diversos inhibidores de las enzimas predominantes en cada una de las regiones de acuerdo a su epidemiología (Giske *et al.*, 2010; Birgy *et al.*, 2012; Georgios *et al.*, 2014).

La determinación fenotípica de carbapenemasas mediante el test de Hodge modificado (THM) reveló un 100% de aislados positivos, lo cual se corroboró con la detección genética de al menos un gen productor de carbapenemasa en todos los aislados estudiados. Estos resultados permiten concluir que el THM sigue siendo una herramienta útil, de alta sensibilidad para la detección fenotípica de cepas productoras de carbapenemasas (Birgy *et al.*, 2012; Cifuentes *et al.*, 2015; CLSI, 2017). En cuanto a la diferenciación fenotípica del tipo de carbapenemasa portado en cada una de las cepas, utilizando diversos inhibidores específicos, se observó que con EDTA se obtuvo un aparente resultado falso positivo, puesto que no se obtuvo positividad para la pesquisa molecular de los genes más frecuentemente asociados a la producción de metalo- β -lactamasas (*bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SMP} y *bla*_{NDM}) (Poirel *et al.*, 2011). Este fenómeno ha sido descrito previamente por Giske (2010), en cuyo estudio analizó 34 cepas productoras de KPC, entre las cuales, cuatro, presentaron un resultado falso positivo para la producción de metalo- β -lactamasas mediante el uso de EDTA. La acción del EDTA frente a las cepas, o bien, sobre KPC, no ha sido dilucidado, pero si es posible establecer que el test de sinergia con EDTA para la determinación de metalo- β -lactamasas puede tener una especificidad cuestionable frente a diversas carbapenemasas, principalmente del tipo KPC y OXA (Giske *et al.*, 2010). Esto último se debe tener en consideración al tener fenómeno de co-portación de diferentes tipos de carbapenemasas (Seiffert *et al.*, 2014), puesto que no todas las enzimas presentan los mismos inhibidores, pudiendo generar enmascaramientos de los test fenotípicos. A diferencia de los resultados obtenidos con EDTA, el test fenotípico con AFB indicó que el 100 % de las cepas portadoras de *bla*_{KPC}, presentaron un test positivo, corroborándose el resultado mediante la amplificación del gen *bla*_{KPC}, y ninguna de las cepas portadoras de *bla*_{NDM-1} o *bla*_{OXA-370} presentaron positividad al test, mostrando una sensibilidad del 100%, lo cual se relaciona a lo descrito previamente (Birgy *et al.*, 2011).

En Chile la prevalencia y diversidad de enzimas CTX-M en los últimos años es incierta, posterior a los estudios publicados el 2005, 2007 y 2011 (Bello *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2007; García *et al.*, 2011), no han habido más reportes epidemiológicos referente a estas BLEEs en cepas clínicas de enterobacterias, lo cual, puede deberse a que los estudios se han enfocado en la emergencia de la aparición de diferentes carbapenemasas en enterobacterias en el país, principalmente KPC. Sin embargo, es de considerar que desde la aparición de KPC en Chile el año 2012, al año 2015 solo fueron reportados públicamente 34 casos incluyendo las cepas productoras de NDM-1 y OXA-370 (ISP Chile., 2014; ISP Chile., 2014b), sin embargo, de acuerdo a información no publicada (comunicación personal, Juan Carlos Hormazábal, curso de resistencia antimicrobiana, Clínica Alemana, Septiembre 2017, Santiago de Chile) a Julio del año 2017 habrían 306 aislamientos de enterobacterias productoras de carbapenemasa, en su mayoría KPC, lo cual en un periodo de 5 años desde su primera descripción en el país, refiere una prevalencia mucho más discreta en comparación a otros países de la región como Colombia, Argentina y Brasil (Naas *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2011; Cifuentes *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2014; Zurita *et al.*, 2015). Esto hace suponer, que el mecanismo prevalente de resistencia a compuestos β -lactámicos en enterobacterias en el país sigue siendo la producción de BLEE, principalmente del tipo CTX-M, y que la resistencia a los antibióticos carbapenémicos, tal y como se señala en Cifuentes (2015), principalmente estaría mediada por la producción de esta enzima y su asociación con pérdida de porinas de membrana de la bacteria, o este último mecanismo y su asociación con la hiper-producción de AmpC.

En esta tesis el 54 % de las cepas productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos, son portadoras de genes *bla*_{CTX-M}. Este resultado puede relacionarse con la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de infecciones producidas por BGN, en especial C3G, quinolonas y aminoglicósidos (Cantón *et al.*, 2012; Guzmán-Blanco *et al.*, 2014), lo que presiona a las bacterias a conservar las plataformas genéticas en los cuales se localizan genes

codificantes de distintos elementos genéticos de resistencia antibiótica (Moreno *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2012). Los resultados de prevalencia y de diversidad de grupos de *bla*_{CTX-M} pesquisados, son similares a los reportados en el año 2005 y 2011 en Chile (Bello *et al.*, 2005, García *et al.*, 2011). En cuanto a la diversidad de variantes, dentro del grupo 2, el 25 % de los aislados son productores de CTX-M-2, la enzima, dentro de la familia CTX-M, descrita como predominante y endémica en Sudamérica (Quinteros *et al.*, 2002; Vignoli *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2012; D' Andrea *et al.*, 2013), seguido por un 25 % de aislados productores de la variante CTX-M-15, perteneciente al grupo 1 de la familia CTX-M, denominada “CTX-M pandémica” por ser reportada en casi todo el mundo (Cantón *et al.*, 2012; D' Andrea *et al.*, 2013; Matsumura *et al.*, 2015). Si bien, estudios previos a nivel de Sudamérica, relataban principalmente los hallazgos de CTX-M-2, la similitud en los porcentajes de portación entre esta variante y CTX-M-15 en esta tesis, puede tener directa relación a un cambio epidemiológico que surge en Sudamérica con la diseminación exitosa de CTX-M-15, tal y como ha ocurrido en otras zonas geográficas del mundo, y puede ser debido a la amplia pesquisa de esta variante en el ámbito comunitario, ambiental y animal (Iroha *et al.*, 2012; Geser *et al.*, 2012; Cantón *et al.*, 2012). Es importante señalar que en el aislado *K. pneumoniae* UC363 se detectó la variante *bla*_{CTX-M-3}, correspondiendo este hallazgo a la primera descripción de este alelo en una cepa clínica en Chile de *K. oxytoca* y a la tercera enterobacteria descrita productora de esta variante en Sudamérica (Peirano *et al.*, 2011). CTX-M-3 corresponde a una de las variantes más diseminadas del grupo 1 en Europa; inicialmente descrita en Polonia, donde actualmente es endémica y, posteriormente, detectada en Francia, Grecia, Taiwán, Rusia y China (Carattoli., 2009; D' Andrea *et al.*, 2013). Cabe destacar que el gen *bla*_{CTX-M-3} pesquisado presentó tres mutaciones (G152T, G173A, T756C) al compararlo a la secuencia nucleotídica de referencia (Genbank ID: Y10278). Estas mutaciones, correspondieron a mutaciones silenciosas, lo que implica que no se traduce en cambios aminoacídicos en la cadena polipeptídica y, por ende, no se modifica su actividad hidrolítica. Es importante señalar que la sumatoria de mutaciones nucleotídicas podría generar la formación de una nueva variante de *bla*_{CTX-M} con propiedades enzimáticas diferentes (Stepanova *et al.*,

2008; Fursovaa *et al.*, 2013). Si bien en Chile, Hernandez (2013), describió dos cepas de *E. coli* portadoras de *bla*_{CTX-M-3} aisladas desde materia fecal de aves migratorias, estas aves provienen de las costas de Norteamérica, donde existen descripciones previas de *bla*_{CTX-M-3} (Wang *et al.*, 2013), y por tratarse de aves migratorias, no se puede atribuir el hallazgo a cepas autóctonas de Chile.

Tras los análisis de la CMI de cada una de las cepas, no se puede relacionar que la producción de alguna de las tres variantes de CTX-M pesquisadas dentro de las 13 cepas positivas (Tabla 3.7), contribuya en mayor o menor grado a aumentar los valores de CMI a los antibióticos carbapenémicos y sea responsable por si sola de los valores de CMI a otros β -lactámicos, ya que los resultados obtenidos, corresponderían a la sumatoria de mecanismos de resistencia que estarían involucrados en la resistencia a β -lactámicos presentes en las cepas. Respecto a esto, es importante destacar que posterior a la realización de ensayos de conjugación exitosos con la cepa *K. oxytoca* UC363 (material anexo), portadora de la variante *bla*_{CTX-M-3} se pudo evidenciar que en la cepa transconjugante TUC363, que recibió un plásmido portador de *bla*_{CTX-M-3}, la CMI a CTX fue $\geq 64 \mu\text{g} / \text{mL}$ y a CAZ $\leq 1 \mu\text{g} / \text{mL}$ (Tabla 6, material anexo), demostrando una actividad hidrolítica mayor a CTX que a CAZ, característica previamente informada para esta variante de CTX-M (Bonnet, 2004; Stepanova *et al.*, 2008; Lahlaoui *et al.*, 2014).

Con respecto a las plataformas genéticas en que se encuentra localizado *bla*_{CTX-M} en cepas de enterobacterias clínicas aisladas en Chile, sólo se dispone de un reporte de Díaz (2007), en el cual se caracterizó la plataforma de la variante *bla*_{CTX-M-2} estructurando un integrón clase 1 complejo o inusual, denominado InK283 (Genbank EU117158), similar al pesquisado en Argentina (Power *et al.*, 2005) y Uruguay (Vignoli *et al.*, 2006) previamente. En el caso de esta tesis, se determinaron las plataformas genéticas asociadas a las variantes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-3} y *bla*_{CTX-M-15} en seis diferentes aislados de EPC aisladas en hospitales chilenos.

Las plataformas genéticas asociadas a *bla*_{CTX-M-2} en los aislado *K. pneumoniae* UC332 (Genbank: KY315992) y UC338 (Genbank: KY286109), correspondieron a integrones complejos o inusuales de clase 1 cuyas principales diferencias radicaron en la zona variable del integrón y en la duplicación parcial del extremo 3' conservado. Los integrones caracterizados, corresponden a un elemento genético móvil, denominados complejos o inusuales por presentar la arquitectura clásica de un integrón de clase 1 más su asociación al elemento *ISCR1*. Dicho elemento, corresponde a un subgrupo de la familia *IS91*, los cuales se caracterizan por permitir re-arreglos genéticos que otras SI no pueden realizar fácilmente (Toleman *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2015). Actualmente se conocen más de 20 miembros de la familia de *ISCR*, de los cuales la mayoría se han catalogado como los responsables de la escisión de diversos genes de resistencia antibiótica y su transposición a otros elementos genéticos, describiéndose como importantes vehículos de diseminación de resistencia antimicrobiana (Toleman *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2015). Por otra parte, el análisis de la secuencia nucleotídica de *bla*_{CTX-M-2} en las cepas UC332 y UC338, demuestra que no posee el elemento de 59 pb, característico de los *cassettes* genéticos asociados a los integrones de clase 1, por tanto, la inserción de este gen en esta plataforma sería difícil de explicar si no existiera una recombinasa de sitio específico como la proteína codificada por *ISCR1*. La razón del por qué se encuentra asociado fuertemente este elemento a integrones de clase 1 se desconoce, pero si se sabe que este fenómeno contribuye a lo que es la co-selección de genes de resistencia antibiótica, por estructurar una plataforma genética móvil compleja asociada a la captura y expresión de genes de resistencia (Arduino *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 2003; Acosta-Pérez *et al.*, 2015).

En particular, la cepa *K. pneumoniae* UC332 (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{KPC-2}) presenta una plataforma genética compleja desde el punto de vista de caracterización, puesto que al amplificar la zona variable del integrón se obtuvo más de una banda electroforética, lo que indica que esta cepa porta dos integrones de clase 1 con zonas variables diferentes. Uno de estos elementos genéticos (Figura 3.15) presenta una zona variable

de 4.1 kb, en la que se encuentran los *cassettes* genéticos *arr-2/cmlA5/bla_{OXA-10}/aadA1*, re-arreglo idéntico al reportado en China en *Pseudomonas aeruginosa* (Genbank: EU886979); en Francia en *A. baumannii* (Fournier *et al.*, 2006) y en Sudáfrica y Taiwán en *S. enterica* (Krauland *et al.*, 2010). En lo referente a los *cassettes* portados, el gen *arr-2* codifica la enzima rifampicina ADP-ribosil transferasa, cuya primera descripción correspondió a un gen cromosomal en la cepa de *Mycobacterium smegmatis* (Fonseca *et al.*, 2008). Existen reportes de su portación como *cassette* genético en integrones de clase 1 cuya ubicación, generalmente, comprende la zona variable del integrón, inmediatamente después de la integrasa (*IntI*) (Guillaume *et al.* 2001), similar a lo dilucidado en la cepa *K. pneumoniae* UC332. Si bien, rifampicina no es utilizada de forma frecuente en el tratamiento de infecciones por BGN, la problemática radica en que este antibiótico constituye el tratamiento de primera línea frente a la tuberculosis, y a su vez, en la prevención de enfermedades meningocócicas. Aunque el 90% de la resistencia a rifampicina es mediada por mutaciones en el gen *rpoB*; el gen *arr* es considerado el principal mecanismo de resistencia a rifampicina mediado por plásmidos que por sí solo puede otorgar CMI dentro del rango de 32 a 256 µg/mL (Fonseca *et al.*, 2008), por tanto, las cepas portadoras de este *cassettes* genético, podrían figurar como un importante reservorio de estos genes de resistencia. Cabe señalar, que las zonas promotoras (-35 y -10) del gen *IntI1* de la cepa UC332 corresponden a promotores híbridos con una fuerza de expresión débil, lo cual podría ser causal del mantenimiento del *cassette arr-2* en esta estructura, a pesar de la posible no necesidad de la cepa de expresar la resistencia a este antibiótico (Guillaume *et al.* 2001).

En lo que respecta al *cassette cmlA5*, codifica un mecanismo de resistencia a cloranfenicol del tipo no-enzimático, específicamente una proteína de eflujo de membrana interna (Acosta-Pérez *et al.*, 2015). Se ha encontrado en múltiples grupos bacterianos, incluidos enterobacterias y BGN no fermentadores, principalmente asociados a integrones en forma de *cassette* genético (Acosta-Pérez *et al.*, 2015; Zhao

et al., 2013). La presencia de *cmIA5* podría relacionarse con la resistencia a CHL observado en esta cepa (Tabla 3.1).

Por otra parte, el *cassette bla_{OXA-10}* corresponde a una β -lactamasa del grupo D. Estas enzimas son conocidas como oxacilinasas por su alta hidrólisis a oxacilina, cloxacilina y bencilpenicilinas y se encuentran ampliamente distribuidas en BGN, siendo intrínsecas en algunas especies como *A. baumannii* y *P.aeruginosa* (Mathers, 2016). Algunas de las variantes de OXA se comportan como BLEE, o bien, carbapenemasas y la mayoría de las veces se pueden encontrar asociadas a integrones de clase 1 o bien secuencias de inserción como *ISEcp1* entre otras (Poirel *et al.*, 2010; Lunha *et al.*, 2016). El efecto de este *cassette* genético en la cepa UC332 no se puede dilucidar; sin embargo, contribuiría a lo que es la resistencia a los compuesto β -lactámicos ensayados.

El último *cassette* genético detectado en la zona variable del integrón de clase 1 corresponde al gen *aadA1* que codifica la enzima modificante de aminoglucósidos (EMAs) 3' adenililtransferasa la cual confiere por sí sola resistencia a estreptomina y espectinomicina. Este *cassette* genético se encuentra asociado, principalmente, a la zona variable de integrones de clase 1 y se encuentra distribuido globalmente en BGN (Acosta-Pérez *et al.*, 2015). A su vez se ha visto asociado frecuentemente a diversas plataformas de genes *bla_{CTX-M}*, principalmente a las variantes 1, 2, 9, 14, 39 y 59 (Wei-Hua *et al.*, 2013). La cepa UC332 presentó resistencia a AMK y GEN (Tabla 3.1); sin embargo, la presencia de este *cassette* por sí solo no sería la causa, por tanto la resistencia a estos antibióticos vendría de la mano de la existencia de otros mecanismos o EMAs presente en esta cepa. La estructuración por 4 *cassettes* genéticos de resistencia antimicrobiana en este integrón, tiene importantes implicaciones en lo que es el desarrollo y diseminación de la multidrogo-resistencia en las cepas de *K. pneumoniae* analizadas. Se buscó la asociación de este integrón con el elemento *ISCR1*; sin embargo, no se obtuvieron resultados, lo cual permite concluir que este integrón no se encuentra asociado al gen *bla_{CTX-M}* y no sería un integrón clase

1 complejo o inusual. Por otra parte, el segundo integrón caracterizado en la cepa UC332, está estructurado de una zona variable de 1760 pb con tres *cassettes* genéticos; *dfrA12*, *orfF/gcuF* y *aadA2*. Se logró asociar el *cassette orfF/gcuF* con el elemento *ISCR1*, por lo cual, este integrón, corresponde a la plataforma genética de *bla_{CTX-M-2}* y presenta la arquitectura característica de un integrón complejo o inusual de clase 1. El re-arreglo caracterizado es frecuentemente reportado en cepas de enterobacterias así como también en cepas de BGN no fermentadores (Partridge *et al.*, 2009) y asociado a otras variantes de CTX-M, como lo es CTX-M-62 (Zong *et al.*, 2010). Se encontraron diversas secuencias nucleotídicas similares a la plataforma completa de *bla_{CTX-M-2}* de la cepa *K. pneumoniae* UC332. Reportes en Uruguay (Márquez *et al.*, 2008), Guyana Francesa (García-Fernández *et al.*, 2007) y Estados Unidos (2012, sin publicar, Genbank: KU254578) hace entrever de que este integrón se encuentra diseminado en varias zonas geográficas del mundo, lo que a su vez estaría fomentando los fenómenos de co-selección de resistencia a múltiples antimicrobianos, de la mano con la diseminación de los genes productores de CTX-M. El alineamiento de la zona de 4,5 kb (*ISCR1/bla_{CTX-M-2}/orf3/qacEΔ1/sul1*) (Figura 3.18) demostró 99 % de homología nucleotídica con integrones previamente descritos, como InS21, caracterizado en el plásmido pS21 de *Proteus mirabilis* y In117, en *Vibrio cholerae*, ambas cepas caracterizadas en Argentina (Di Conza *et al.*, 2002; Arduino *et al.*, 2003, Power *et al.*, 2005). A su vez, este segmento de la plataforma presentó 100% de homología con InK283 descrito en Chile el año 2007 (Díaz, 2007), lo cual hace ver que sería una secuencia altamente conservada, y que la variabilidad está representada en los *cassettes* genéticos insertados en la zona variable del integrón complejo o inusual de clase 1.

La zona variable del integrón clase 1 complejo o inusual caracterizado en el aislado *K. pneumoniae* UC338, correspondiente a la plataforma de *bla_{CTX-M-2}*, está estructurado por una zona variable de 1,5 kb, constituido de un único *cassette*, específicamente *aadA1*. Por otro lado, las zonas promotoras secuenciadas en la integrasa (*IntI*) en esta cepa demostraron que el promotor de los *cassettes* (Pc) constituye un promotor fuerte,

a diferencia de sitio promotor encontrado en la cepa UC332. Si bien el re-arreglo de la zona variable de este integrón es frecuente, al realizar alineamientos utilizando BLAST de la secuencia completa de 7,9 kb del integrón clase 1 inusual determinado (Genbank KY286109) (Figura 3.19), no se encontraron secuencias nucleotídicas 100 % homólogas. La secuencia que presentó mayor porcentaje de similitud (97 %) correspondió al integrón In117 en *E. coli* asociado a Tn21-like (Genbank ID: DQ125241.2); sin embargo, la diferencia radicó que en su zona variable, donde además de *aadA1*, presentó el gen *EstX* correspondiente a una esterasa/hidrolasa que confiere resistencia a estreptotricina (Valverde *et al.*, 2006), por tanto la plataforma genética de *bla_{CTX-M-2}* en la cepa UC338 correspondería a una secuencia nucleotídica de un integrón complejo o inusual de clase 1 que no había sido reportada previamente.

Determinada las plataformas de las cepas UC332 y UC338, se comprueba la hipótesis referente a que dichas plataformas funcionan como verdaderos coleccionistas de genes, creando estructuras complejas capaces de diseminarse de forma horizontal a varias especies microbianas y favorecerían los fenómenos de co-selección de resistencia cuando las bacterias son sometidas a presión selectiva (Di Conza *et al.*, 2002 Arduino *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 2003; Acosta-Pérez *et al.*, 2015). Estas estructuras estarían exacerbando lo que significa la problemática de la resistencia antibiótica, por lo cual su caracterización otorga valiosa información en lo que se refiere a la comprensión de los mecanismos moleculares asociados a los fenotipos MDR o XDR encontrados en las cepas productoras de carbapenemasas aisladas en los hospitales chilenos.

En lo que respecta a las plataformas genéticas determinadas para *bla_{CTX-M-3}* y *bla_{CTX-M-15}* (Figuras 3.11, 3.21, 3.23, 3.24), en general se encontró la asociación de *bla_{CTX-M}* río arriba con la secuencia de inserción *ISEcp1* y posterior a esta se encontraron algunas diferencias que serán comentadas más adelante. En tanto, posterior a *bla_{CTX-M}* se caracterizó el marco de lectura codificante de una proteína de función desconocida denominado *orf477*, lo cual corresponde a la arquitectura más

frecuentemente caracterizada para genes productores de CTX-M del grupo 1 (Lartigue *et al.*, 2004; Cantón *et al.*, 2012; Mahrouki *et al.*, 2012; Wei-Hua *et al.*, 2013; Zhong *et al.*, 2015). La secuencia de inserción *ISEcp1* juega un rol fundamental en esta plataforma, puesto que contribuye a la diseminación de los genes *bla*_{CTX-M} por codificar una transposasa (*tnpA*), y constituir la zona promotora de la expresión del gen *bla*_{CTX-M}, el cual carece de promotor propio (Poirel *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la ausencia de esta SI río arriba al gen *bla*_{CTX-M} provoca una pérdida de la expresión de *bla*_{CTX-M} (Poirel *et al.*, 2003) haciendo sensible a la cepa a la acción de los antibióticos β -lactámicos, principalmente C3G. Los fenómenos de transposición por esta SI, se ven potenciado bajo condiciones de estrés de temperatura para la bacteria (por ejemplo en el tracto gastrointestinal) (Cantón *et al.*, 2012), favoreciendo así la transposición de esta SI y permitiendo la diseminación de elementos genéticos portados en ésta como los genes *bla*_{CTX-M}. Además, recientemente se ha reportado el hallazgo de la transposición de *bla*_{KPC-2} desde un plásmido hacia el cromosoma de una cepa de *Acinetobacter baumannii* aislada en Puerto Rico en donde la secuencia de inserción *ISEcp1* jugaría un rol fundamental en este proceso (Martínez *et al.*, 2014). Por lo tanto, la detección de estos elementos genéticos puede constituir un importante dato epidemiológico en lo que respecta a elementos que favorecen la diseminación y permanencia de genes de resistencia a antimicrobianos.

Los alineamientos múltiples de la secuencia completa de la plataforma genética de *bla*_{CTX-M} de la cepa *E. coli* UC327 (Figura 3.11) demuestra que esta plataforma se ha caracterizado en varios géneros bacterianos y regiones del mundo tanto en cepas productoras como no productoras de carbapenemasas, lo cual puede señalar que se trataría de una plataforma conservada y estable (Lartigue *et al.*, 2004; Cantón *et al.*, 2012; Mahrouki *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2015). Un punto importante, es que la variante *bla*_{CTX-M-3} pesquisado en la cepa *K. oxytoca* UC363, señalado históricamente como el progenitor del alelo *bla*_{CTX-M-15} y, posiblemente, de algunas otras enzimas CTX-M (Rodríguez *et al.*, 2004), presentó similar plataforma genética (Figura 3.24) que la plataforma de la cepa *E. coli* UC327 (Figura 3.11); sin embargo, tras realizar los

alineamientos múltiples se encontraron gran cantidad de resultados, sin embargo, al hacer una revisión detallada de estos, todos correspondieron a plataformas asociadas a la variante *bla*_{CTX-M-15}, lo cual puede tener relación a que la diferencia entre *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-3} está determinada por 1 nucleótido (D' Andrea *et al.*, 2013).

En las demás cepas portadoras de *bla*_{CTX-M-15} se encontraron algunas variaciones en las plataformas genéticas caracterizadas. Por ejemplo, la cepa *K. pneumoniae* UC358 (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-370}) (Figura 3.21) rio arriba a *ISEcp1* presentó una secuencia idéntica a una porción del transposón Tn3, denominada Tn3-like (Matsumura *et al.*, 2015). El posible efecto de la inserción de este segmento Tn3-like en la expresión de *bla*_{CTX-M}, en la actividad de *ISEcp1*, o bien, en la movilización de esta plataforma no fue dilucidado pero constituye una evidencia de la variabilidad que pueden poseer las plataformas genéticas asociadas a *bla*_{CTX-M}. Rio arriba de Tn3-like se pesquisó la secuencia de inserción IS26, también codificante de una transposasa (*tnpA*). Esta SI no es exclusiva de esta plataforma genética y se ha encontrado formando parte de plataformas de diversos genes no sólo de resistencia si no con diferentes funcionalidades para la bacteria (Matsumura *et al.*, 2015). Importante resulta ser que la plataforma de *bla*_{CTX-M-15} en el aislado *K. pneumoniae* UC358 (Figura 3.21) presentó similitud con plataformas caracterizadas en cepas de *E. coli* aisladas en Japón (Matsumura *et al.*, 2015) y Arabia Saudita (Alyamani *et al.*, 2016), y más descripciones no figuran en la base de datos de Genbank ni en la literatura internacional, por lo cual pudiera tratarse de un re-arreglo poco común.

En lo que respecta a la plataforma genética de *bla*_{CTX-M-15} en el aislado *K. pneumoniae* UC361 (Figura 3.23), es relevante señalar que no ha sido reportada previamente para esta variante. Corresponde a un novedoso re-arreglo, que si bien, fue reportado en Japón para la variante *bla*_{CTX-M-3} en una cepa de *E. coli* (Matsumura *et al.*, 2015), no existen más reportes de dicho re-arreglo, por lo cual se puede presumir que tendría una distribución muy baja. El efecto de la inserción de IS1, desplazando las zonas promotoras de la transposasa de *ISEcp1* no fue dilucidado, pero posiblemente podría

tener un efecto en lo que es la movilidad de esta plataforma genética, puesto que IS 1 se ha relacionado como un promotor de re-arreglos moleculares, escisión, y deleciones genéticas (Turlan *et al.*, 1995) y, a su vez, podría ser determinante en lo que es la replicación plasmídica y la integración de plásmidos al genoma bacteriano (Machida *et al.*, 1982).

En general, respecto a las plataformas genéticas asociadas a genes *bla*_{CTX-M} de grupo 1, al encontrarse asociadas a secuencias de inserción como *ISEcp1*, *IS26*, e *IS1* presentarían una alta movilidad genética, ya sea dentro de un mismo plásmido, o bien, la capacidad de integrarse al genoma bacteriano, favoreciendo la permanencia y diseminación de genes *bla*_{CTX-M}. También es relevante señalar, que dichas SI, no sólo están involucradas en la diseminación de genes asociados a la producción de CTX-M, si no que se han visto involucradas a la movilización de otros genes de resistencia, incluido genes productores de carbapenemasas (Martinez *et al.*, 2014; Lunha *et al.*, 2016), por lo cual pueden constituir, importantes marcadores moleculares de vehículos genéticos que promueven la diseminación de genes de resistencia antimicrobiana.

En lo que respecta a los perfiles plasmídicos y ensayos de hibridación se logró determinar que no influyó en los resultados los diferentes medios de cultivo empleados (Caldo LB, Terrific Broth) como así tampoco los distintos métodos de extracción de ADN plasmidial (Kit comercial, lisis alcalina). A su vez, con la utilización de subsalicilato de bismuto (Domenico *et al.*, 1991) se observó que hubo una disminución de la producción de exopolisacárido en las cepas estudiadas, sin embargo no reflejo cambios en la calidad y cantidad de ADNpl extraído comparado con los lavados previos con NaCl 0,8 % previó extracción de ADNpl, siendo este último un protocolo más rápido, económico y sencillo de realizar. Uno de los puntos más importantes, y que significó la mayor variación a la hora de determinar los perfiles plasmídicos fueron las condiciones de electroforesis, puesto que si bien con la electroforesis de campo pulsado (PFGE) se obtuvo una buena resolución de los plásmidos de tamaño mediano a grandes, plásmidos inferiores a 11 kb no se visualizaron en el gel (Figura 3.26-27),

a diferencia de lo ocurrido con la electroforesis convencional, en la cual, con el ADNpl de tamaño grande (> 100 kb), no se obtuvo buena resolución para la estimación del tamaño, sin embargo, se pudieron rescatar plásmidos de tamaño inferior a 11 kb, por lo cual, la metodología a emplear para la determinación de perfiles plasmídicos debería considerar que las condiciones de electroforesis son un punto crítico a la hora de visualizar diferentes bandas de ADNpl de tamaño desconocido.

En el caso de esta tesis, los plásmidos portadores de *bla*_{CTX-M} correspondieron a diversos rangos de tamaños moleculares de entre 80 kb hasta 254 kb (Tabla 3.11) lo cual se asocia a lo descrito previamente para plásmidos portadores de este gen (Cao *et al.*, 2002; Aires *et al.*, 2017). Descripciones de los tamaños moleculares de plásmidos asociados a genes *bla*_{CTX-M} en Chile no existen y en Sudamérica son escasos, pero se han reportados diversos rangos de tamaño molecular (García-Fulgueiras *et al.*, 2013) y grupos de incompatibilidad tales como IncA/C, IncFVII, IncI1, IncFIA, IncFIB, IncFII (Pallecchi *et al.*, 2007). En el caso de las cepas incluidas en esta tesis, mediante la tipificación de plásmidos sugerida por Carattoli (2005), en el aislado *E. coli* UC327 se pudo determinar que el plásmido de 254 kb portador de *bla*_{CTX-M-15}, pertenece al grupo de incompatibilidad IncA/C, lo cual había sido reportado previamente en Sudamérica (Pallecchi *et al.*, 2007). De igual forma, en el aislado *K. oxytoca* UC363 el plásmido de 208 kb portador de la variante *bla*_{CTX-M-3} pertenece al grupo de incompatibilidad IncL/M, principal grupo de incompatibilidad plasmídica asociado a la diseminación endémica de *bla*_{CTX-M-3} en países de Europa como Polonia, Francia y Bélgica y países de Asia, como Corea (Carattoli *et al.*, 2009), lo cual puede tener importantes implicancias epidemiológicas, puesto que el ST de este aislado (ST108), sólo ha sido descrito en Austria (Izdebski *et al.*, 2015), lo cual puede suponer que la descripción de CTX-M-3 en Chile, pudiera estar mediado por un caso de importación desde alguno de los países señalados.

De acuerdo a los resultados (Tabla 3.11), los perfiles plasmídicos de los seis aislados seleccionados fueron diferentes, existiendo similitud de tres bandas de ADNpl en los

aislados UC332 y UC338, las cuales no son clones, difieren en su ST, pero pertenecen al mismo complejo clonal (Tabla 2.1). En ambos casos el gen *bla*_{CTX-M} se ubicó en un plásmido de similar tamaño molecular y cuyo grupo de incompatibilidad plasmídico no fue tipificable mediante la metodología empleada (Carattoli *et al.*, 2005) pudiendo en este caso, sumado al perfil de resistencia antimicrobiana de ambas cepas (Tabla 3.1), tratarse del mismo plásmido.

En lo que respecta a la co-portación de *bla*_{CTX-M} y los genes productores de carbapenemasas, mediante los experimentos de hibridación, PCR, conjugación y curación plasmídica, se descartó que ambos genes pudieran estar insertos en el mismo elemento genético móvil, siendo esto previamente descrito por otros autores (Miró *et al.*, 2010; Seiffert *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2015), en donde *bla*_{CTX-M} puede estar asociado a múltiples genes de resistencia antimicrobiana dentro de un mismo plásmido pero no necesariamente compartir ubicación con genes productores de carbapenemasas, aunque, de forma contraria, también existen descripciones donde ambos genes de resistencia a compuestos β -lactámicos pueden estar insertos en el mismo elemento genético móvil (Villa *et al.*, 2012; Potron *et al.*, 2013).

Con relación a la cepa *K. pneumoniae* UC358, presentó tres bandas de ADNpl de tamaño pequeño (4 kb, 3,2 kb y 2,2 kb), pudiendo significar tres plásmidos diferentes o bien, un solo plásmido en diferente conformación, sin embargo, en ninguna de las tres bandas de ADNpl se detectaron genes *bla*_{CTX-M-15} y/o *bla*_{OXA-370}, lo que hace pensar de una posible ubicación cromosomal. Para determinar esto último, se realizaron experimentos de conjugación y curación, siendo la transferencia negativa pero sí se obtuvieron cepas curadas. Estos resultados permiten plantear las siguientes posibilidades: El o los plásmidos portadores de los genes *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{OXA-370} en esta cepa no pudieron ser recuperados con la metodología de extracción plasmídica empleada, o bien, estos genes se encuentran asociados a transposones de ubicación cromosomal, lo cual, mediado por la presión ejercida por las condiciones de estrés bacteriano al realizar el procedimiento de curación por temperatura, provocó la

eliminación desde el cromosoma bacteriano (Stokes *et al.*, 2011). Un punto a considerar es que la asociación de la carbapenemasa OXA-370 y la BLEE CTX-M-15 probablemente contribuye a la elevación de la CMI contra C3G, puesto que la actividad de las oxacilinasas frente a este grupo de antimicrobianos no es efectivo, pudiendo esto significar, que ambos genes pudieran de forma estratégica compartir el mismo elemento genético, lo cual ha sido reportado previamente (Sampaio *et al.*, 2015), sin embargo, esto no fue posible demostrar con los experimentos desarrollados en esta tesis. Es importante señalar que la cepa UC358 pertenece al ST16 y que la variante OXA-370, portada por esta cepa, solo ha sido descrita en Brasil asociada a plásmidos de 25 a 150 kb (Pereira *et al.*, 2015). De acuerdo a lo publicado por Pereira (2015), las cepas aisladas en Brasil portadoras de esta variante de carbapenemasa generalmente presentan resistencia a CIP y STX, sumado a que en una prevalencia del 91% son portadoras de *bla*_{CTX-M}, ambas características similares a lo observado en la cepa UC358.

Con respecto a la cepa *K. pneumoniae* UC361 portadora de NDM-1, al igual que en la cepa UC358 no se obtuvieron bandas de ADNpl tras la realización de los perfiles plasmídicos. Sin embargo, esta cepa se sometió a ensayos de conjugación (Quezada-Aguiluz *et al.*, 2016) (material anexo) y se obtuvo la transferencia exitosa a 27°C de *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *aac(6')Ib-cr* y *qnrB* a una cepa de *E. coli*. La cepa transconjugante que presentó un fenotipo MDR, denominada T01 (Tabla 5, material anexo), se sometió a ensayos de extracción de plásmidos, pero tal como en la cepa donante UC361, no se visualizaron bandas de ADNpl. Es importante señalar que Aires (2017), reportó una cepa de *K. pneumoniae* aislada en Rio de Janeiro entre el año 2013 y 2014 perteneciente al mismo ST reportado en la cepa UC361 (ST1588), la cual presenta idéntico perfil de genes de resistencia (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *qnrB*, *aac(6')Ib-cr*) y similar fenotipo de resistencia antimicrobiana. En dicha cepa, *bla*_{NDM-1} se asoció a un plásmido de 430 kb., determinado mediante secuenciación masiva del genoma bacteriano, por lo cual, existiendo la posibilidad de que la cepa UC361 portadora de NDM-1 aislada en Chile sea similar a la cepa reportada en Brasil, al tratarse de un

plásmido de gran tamaño, este no haya sido posible extraer o recuperar por la metodología utilizada.

Los antecedentes dilucidados de las cepas de *K. pneumoniae* UC358 (*bla*_{OXA-370}, *bla*_{CTX-M-15}) y UC361 (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}), permiten plantear la hipótesis de que ambas cepas reportadas en Chile el año 2014, por poseer las mismas características que las cepas Brasileñas (ST, genes de resistencia, perfil de susceptibilidad, fechas de aislamiento), posiblemente corresponden a casos de importación proveniente de ese país. Estos antecedentes recalcan la contribución de los viajes en lo que respecta a la diseminación de mecanismos de multirresistencia antimicrobiana en el mundo, y tal como se señala en Cifuentes (2015), esta evidencia respalda que frente a pacientes que hayan estado hospitalizados en países con endemia de enzimas del tipo carbapenemasas, por medio de programas de vigilancia epidemiológica, previo o durante los primeros días de hospitalización, se debería descartar la presencia de cepas como colonizantes con la finalidad de evitar la posible diseminación de genes de resistencia de baja frecuencia en el país.

La habilidad de la bacteria para adquirir y diseminar genes exógenos a través de elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones es uno de los mayores factores implicados en el desarrollo de la multi-drogo-resistencia en los pasados 50 años. Los integrones están presentes en casi todas las especies bacterianas Gram negativas, principalmente bacilos entéricos y *Pseudomonas*, y tienen la capacidad de expresar elementos incorporados en forma de marcos de lectura abiertos (*cassettes* genéticos) y convertirlos en genes funcionales para la bacteria. Su asociación con genes productores de BLEE como CTX-M, convierte a estos elementos en unos verdaderos promotores de fenotipos de multi-drogo-resistencia de alta capacidad de diseminación, ya sea porque se encuentran asociados a elementos como SI que potencian este fenómeno o bien a otros genes de resistencia que permiten su co-selección bajo presión selectiva (Acosta-Pérez *et al.*, 2015). Cabe señalar que la actualización de la epidemiología respecto a las BLEE y genes productores de

mecanismos de resistencia enzimáticos transferibles circulantes en Chile, debería ser algo constante en el tiempo, puesto que nos permite evaluar que enzimas circulan en el país de tal forma de tener en cuenta los fenómenos que podrían estar contribuyendo en el avance de la resistencia sobre todo en el ambiente hospitalario. También es necesario recalcar la importancia en la detección precoz de mecanismos de resistencia antimicrobiana a nivel de los laboratorios clínicos de los diversos recintos hospitalarios del país, como también la necesidad de la actualización de la información pública de forma frecuente respecto a la epidemiología de patógenos del grupo ESCAPE asociados a IAAS, ya que la información actualmente disponible a nivel país data del año 2015 (ISP Chile, 2015), y es bastante probable, de acuerdo a lo expuesto, que haya cierto grado de variación en la prevalencia de algunos mecanismos enzimáticos transferibles que pueden generar cambios en la epidemiología nacional sobre la resistencia antibiótica.

Para finalizar, cabe señalar que informes de la OMS del año 2014 (WHO, 2014), señalan elevadas tasas de resistencia a C3G en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, lo cual se traduce que el tratamiento de las infecciones graves por estos microorganismos depende, muchas veces, del uso de antibióticos carbapenémicos. La disponibilidad de estos antimicrobianos no siempre es segura, puesto que se asocian a un elevado costo económico y a la necesaria hospitalización de los pacientes, sumado a que fomentarían el desarrollo y selección de cepas resistentes. Es de gran preocupación que cepas de enterobacterias resistente a carbapenémicos (ERC) han sido identificadas en gran parte del mundo, alcanzando reportes de hasta un 54% de resistencia (WHO, 2014). La falta de información en lo que respecta al conocimiento de estos patrones de resistencia, y la importancia en la determinación de los mecanismos implicados en la multi-resistencia es preocupante, y es donde la comunidad científica debe seguir aportando al desarrollo del conocimiento puesto que se ha demostrado que sólo una vigilancia eficaz, proactiva, alineada con intervenciones regionales, permitirá el control y la prevención de la propagación de

estos microorganismos multi-resistentes en diferentes tipos de ambientes hospitalarios o comunitarios.



5. CONCLUSIONES

- Las cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas en hospitales chilenos presentan un perfil de resistencia a antimicrobianos del tipo multi-drogo resistente (MDR) y extremadamente resistente (XDR).
- La detección de diferentes mecanismos enzimáticos de resistencia a β -lactámicos en cepas productoras de carbapenemasas debe realizarse con diferentes inhibidores enzimáticos y evaluarse en conjunto, sumado a que los resultados deben corroborarse con la pesquisa molecular de genes de resistencia de interés.
- La prevalencia de *bla*_{CTX-M} así como la mayor frecuencia de las variantes *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-15} se relaciona a lo reportado previamente en Sudamérica para cepas no productoras de carbapenemasas.
- Las plataformas genéticas de *bla*_{CTX-M} pertenecientes al grupo 1 se relacionada con diferentes secuencias de inserción y el marco de lectura *orf477* y no contribuye a los fenotipos MDR y/o XDR en cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas.
- Las plataformas genéticas de *bla*_{CTX-M} pertenecientes al grupo 2 se asocia a *ISCR1* formando parte de integrones clase 1 complejos o inusuales que contribuyen a los fenotipos MDR y/o XDR en cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas.
- Los genes *bla*_{CTX-M} y genes codificantes de carbapenemasas, no comparten ubicación genética y se asocian a elementos genéticos móviles como transposones y/o plásmidos de diverso tamaño molecular.

6. PROYECCIONES

1. Determinar las plataformas genéticas de *bla*_{CTX-M} en un número mayor de cepas, con la finalidad de determinar que otras estructuras o genes de resistencia antimicrobianos asociados.
2. Determinar los perfiles plásmidos y grupos de incompatibilidad en un número mayor de cepas, con la finalidad de ampliar la información sobre los plásmidos circulantes en el país portadores de diferentes genes de resistencia antimicrobiana.
3. Evaluar la capacidad de transferencia de *bla*_{CTX-M} y *bla*_{KPC} en las cepas UC327, UC332 y UC338.
4. Ampliar la caracterización de las posibles cepas implicadas en casos importados de carbapenemasas (UC358, UC361, UC363), con la finalidad de dilucidar la dicha hipótesis y fomentar lo propuesto por otros autores sobre la vigilancia activa en pacientes viajeros provenientes de zonas con endemia de carbapenemasas u otros mecanismos de resistencia antimicrobiana.
5. A raíz de la emergencia en el mundo de la pesquisa del gen transferible *mcr-1* codificante de resistencia a colistin y su co-portación con otros genes de relevancia clínica (Delgado-Blas *et al.*, 2016; Sun J *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2016) sería interesante realizar la pesquisa molecular del genes *mcr* y/o determinantes moleculares de resistencia a polimixinas, considerando que estas constituyen una opción terapéutica en el caso de infecciones por ERC (Gelband *et al.*, 2015).

7. REFERENCIAS

Acosta-Pérez G., Ibáñez-Cervantes G., Bello-López JM., Hernández JM., Hernández-Montañez Z., Giono-Cerezo S., León-García G., León-Avila G. 2015. Structural diversity of class 1 integrons in multiresistant strains of *Escherichia coli* isolated from patients in a hospital in Mexico City. *Curr Microbiol.* **71**(4):501-8.

Adler M., Anjum M., Andersson DI., Sandegren L. 2016. Combinations of mutations in *envZ*, *ftsI*, *mrdA*, *acrB* and *acrR* can cause high-level carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob Chemother.* **71**(5):1188-98.

Aires CA., Pereira PS., de Araujo CF., Chagas TP., Oliveira JC., Buonora SN., Albano RM., Carvalho-Assef AP., Asensi MD. 2017. Multiclonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* Mar 24; **61**(4). pii: e01048-16.

Akpaka P., Swanston W., Ihemere H., Correa A., Torres J., Tafur J., Montealegre M., Quinn J., Villegas M. 2009. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J. Clin Microbiol.* **47**(8): 2670–2671.

Alyamani E., Khiyami A., Booq R., Bahwerth F., Vaisvil B., Schmitt D., Kapatal V. 2016. Genome sequence and comparative pathogenic determinants of Uropathogenic *Escherichia coli* O25b:H4, a clinical isolate from Saudi Arabia. *J Pure Appl Microbio* **10**(4), p. 2475-2484.

Ambler RP. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **289**(1036): 321-31.

Andrade L., Curiao T., Ferreira J., Longo J., Clímaco E., Martinez R., Bellissimo-Rodrigues F., Basile-Filho A., Evaristo M., Del Peloso P., Ribeiro V., Barth A., Paula

M., Baquero F., Cantón R., Darini A., Coque T. 2011. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 3579-3583.

APUA. 2014. Alliance for the prudent uses of Antibiotics; General background about antibiotic resistance. Disponible en: http://emerald.tufts.edu/med/apua/about_issue/about_antibioticres.shtml. Consultado: 24/07/2016.

Araque M, Millán B, Mendoza E., Salas M. 2013. CTX-M-32 β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated in Latin America. *J Infect Dev Ctries* **7**(5): 432-5.

Arduino SM., Catalano M., Orman BE., Roy P., Centrón D. 2003. Molecular epidemiology of *orf513*-bearing class 1 integrons in multiresistant clinical isolates from Argentinean hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3945-3949.

Ayre Lab. 2016. Alkaline lysis Mini-Preps. Department of Biological Sciences. University of North Texas. Ayre Lab Protocols. Disponible en: <https://biology.unt.edu/ayre-lab-plant-physiology-biochemistry-and-signaling/ayre-lab-protocols>. Consultado el 23/12/2016.

Barría-Loaiza C., Pincheira A., Quezada M., Vera A., Valenzuela P., Domínguez M., Lima C., Araya I., Araya B., Prat S., Aguayo C., Fernández J., Hormazábal J., Bello-Toledo H., González-Rocha G. 2016. Molecular typing and genetic environment of the *bla*_{KPC} gene in Chilean isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist.* Mar; **4**:28-34.

Bauernfeind A., Schweighart S., Grimm H. 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* **18**: 294-8.

Bello H., Trabal N., Ibáñez D., Reyes A., Domínguez M., Mella S., Zemelman C., Zemelman R., Gonzalez G. 2005. β -lactamasas de familias diferentes a TEM y SHV en cepas de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* aisladas de hospitales Chilenos. *Rev Med Chile* **133**: 737-739.

Bernard H., Tancrede C., Liyrelli V., Morand A., Barthelemy M., Labia R. 1992. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J. Antimicrob. Chemother* **29**: 590-2.

Birgy A., Bidet P., Genel N., Doit C., Decré D., Arlet G., Bingen E. 2012. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* **50**(4); 1295-302.

Blair J., Webber M., Baylay A., Ogbulu D., Piddock L. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* **13**(1):42-51.

Bonnet R. 2004. Growing group of extended-spectrum- β -Lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(1): 1-14.

Boucher H., Talbot G., Bradley J., Edwards., Gilbert D., Rice L., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. 2009. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* **48**:1-12.

Bush K., Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **54** (3): 969-76.

Cantón R. 2008. Diseminación de BLEE y carbapenemasas en el medio hospitalario. Disponible en: http://www.sochinf.cl/Congreso2008/pdf/dr_cantonm.pdf. Consultado: 27/11/2016

Cantón R., Coque T. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* **9**(5): 466-75.

Cantón R., Gonzalez-Alba J., Galan J. 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* **3**:110.

Cao V., Lambert T., Courvalin P. 2002. ColE1-Like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum β -lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1212-1217.

Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(6): 2227-38.

Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins KL., Threlfall EJ. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. Dec; **63**(3):219-28.

Carmeli Y., Trilet N., Karcher AW., Samore MH. 1999. Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Intern Med* **159**: 1127-32.

Carvalho-Assef AP., Pereira P., Albano R., Berião GC., Tavares CP., Chagas TP., Marques EA., Timm LN., Da Silva RC., Falci DR., Asensi MD. 2014. Detection of NDM-1, CTX-M-15 and *qnrB4* producing *Enterobacter hormaenchei* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **58**; 2475-2476.

Cattoir V., Nordmann P., Silva J., Espinal P., Poirel L. 2008. ISEcp1-Mediated Transposition of *qnrB*-like gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(8): 2929–2932.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Antibiotic resistance threats in the United States. Disponible en: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Consultado: 20/05/2015.

Cifuentes M., García P., San Martín P., Silva F., Zúñiga J., Reyes S., Rojas R., Ponce R., Quinanilla R., Delpiano L., Wolff M. 2012. Primer caso de detección de *bla_{KPC}* en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. *Rev Chil Infect* **29**(2): 224-228.

Cifuentes M., Silva F., Arancibia M., Rosales R., Ajenjo C., Riedel G., Camponovo R., Labarca J., en representación del Grupo Colaborativo de Resistencia Bacteriana. 2015. Grupo colaborativo de resistencia bacteriana, Chile: recomendaciones 2014 para el control de la resistencia bacteriana. *Rev Chilena Infectol*; **32**(3): 305-318.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2017. Performance standards for antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI documents M02, M07 and M100, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Collis CM., Kim MJ., Stokes HW., Hall RM. 2002. Integron-encoded *IntI* integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site. *Mol Microbiol*. **46**(5): 1415-27.

Cosgrove S. 2006. The Relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: Mortality, length of hospital stay, and health care cost. *Clin Infect Dis* **42**(2) S82-S89.

Chain E., Florey H., Adelaide M., Gardner A., Heatley N., Jennings M., Orr-Ewing J., Sanders A. 1940. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*; **236**(6104): 226-8.

Chen X., Zhang W., Pan W., Yin J., Pan Z., Gao S., Jiao X. 2012. Prevalence of *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**(6): 3423-7.

Cheng MF., Chen WL., Hung WY., Huang IF., Chiou YH., Chen YS., Lee SS., Hung CH., Wang JL. 2015. Emergence of extended spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* 025b-ST131: A major community-acquired uropathogen in infants. *Pediatr Infect Dis J* **34**(5): 469-75.

D'Andrea M., Arena F., Pallecchi L., Rossolini GM. 2013. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* **303**: 305-17.

Decousser J., Poirel L., Nordmann P. 2001. Characterization of a chromosomally encoded Extended-Spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 3595- 3598.

Delgado-Blas JF., Ovejero CM., Abadia-Patiño L., Gonzalez-Zorn B. 2016. Coexistence of *mcr-1* and *bla_{NDM-1}* in *Escherichia coli* from Venezuela. *Antimicrob Agents Chemother.* **23**; 60 (10):6356-8.

Di Conza J., Ayala J., Power P., Mollerach M., Gudkind G. 2002. Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*_{CTX-M-2} in *Salmonella* enterica serovar *Infantis*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2257-2261.

Diaz P. (2007) Ambiente genético del gen *bla*_{CTX-M2} en cepas de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* aisladas en hospitales chilenos. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Microbiología. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología.

Domenico P., Landolphi D., Cunha B. 1991. Reduction of capsular polysaccharide and potentiation of aminoglycoside inhibition in gram-negative bacteria by bismuth subsalicylate. *J Antimicrob Chemother.* **28**(6):801-10.

Dortet L., Nordmann P., Poirel L. 2011. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a Bleomycin Resistance Protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob agents Chemoter* **58**(4) 1693-1697.

Eckert C., Gautier V., Arlet G. 2006. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. *J. Antimicrob Chemother.* Jan; **57** (1): 14-23.

Eckert C., Gautier V., Saladin-Allard M., Hidri H., Verdet C., Ould-Hocine Z., Barnaud G., Delisle F., Rossier A., Lambert T., Philippon A., Arlet G. 2004. Dissemination of CTX-M-type β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1249–1255.

EUCAST. 2017. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>. Consultado: 14/05/2017.

Ewers C., Bethe A., Semmler T. 2012. Extended spectrum β -lactamase producing AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. Clin. Microbiol. Infect **18**. 646-655.

Ewers C., Stamm I., Pfeifer Y., Wieler LH., Koop PA., Shonning K., Prenger-Berninghoff E., Scheufen S., Günter S., Bethe A. 2014. Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. J Antimicrob Chemother **69** (10): 2676-80.

Famiglietti A., Quinteros M., Vázquez M., Marín M., Nicola F., Radice M., Galas M., Pasterán F., Bantar C., Casellas JM., Kovensky Pupko J., Couto E., Goldberg M., Lopardo H., Gutkind G., Soloaga R., Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de bacteriología clínica (Asociación Argentina de Microbiología). 2005. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. Rev Argent Microbiol; **37**(1): 57-66.

Fonseca E., Freitas F., Amorim J., Vicente C. 2008. Detection of New *arr-4* and *arr-5* Gene Cassettes in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* Strains from Brazil. Antimicrob Agents Chemother. **52**(5): 1865–1867.

Fournier P., Vallenet D., Barbe V., Audic S., Ogata H., Poirel L., Richet H., Robert C., Mangenot S., Abergel C., Nordmann P., Weissenbach J., Raoult D., Claverie J. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet. **2**(1): e7.

Fursova N., Pryamchuka S., Kruglovb A., Abaeva I., Pecherskikha E., Kartseva N., Svetocha E., Dyatlov I. 2013. The Novel CTX-M-116 β -Lactamase gene discovered in *Proteus mirabilis* is composed of parts of the CTX-M-22 and CTX-M-23 genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**(3): 1552–1555.

García P., Rubilar C., Vicentini D., Román J., León E., Muñoz G., Domínguez M., González G., Bello H., Labarca J. 2011. Caracterización clínica y molecular de bacteriemias causadas por enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido. 2004-2007. *Rev Chil Infect*; **28**: 563-571.

García-Fernández A., Cloeckert A., Bertini A., Praud K., Doublet B., Weill FX., Carattoli A. 2007. Comparative analysis of IncHI2 plasmids carrying *bla*_{CTX-M-2} or *bla*_{CTX-M-9} from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and humans. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(11):4177-80.

García-Fulgueiras V., Bado I., Cordeiro N., Algorta G., Vignoli R. 2013. First report of the ceftazidimase CTX-M-19 in South America. *New Microbe New Infect* **1**(3): 44-47.

Garzón J., Lemos E., Rivas R. 2004. Prevalencia de β -lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* del hospital Occidente de Kennedy. Nivel III, Bogotá *Rev. Cienc. Salud* vol.2 no.2 Bogotá.

Gaze W., Abdousslam N., Hawkey P., Wellington E. 2005. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob Agents Chemother.* May; **49**(5): 1802-1807.

Gelband H., Miller-Petrie M., Pant S., Gandra S., Levinson J., Barter D., White A., Laxminarayan R. (2015) *The State of the World's Antibiotics, 2015*. Center for

disease dynamics, economics & policy. Disponible en: http://www.cddep.org/publications/state_worlds_antibiotics_2015#sthash.duaYHSZ6.dpbs. Consultado el 25/06/2017

Georgios M., Egki T., Efforsyni. 2014. Phenotypic and molecular methods for the detection of antibiotic resistance mechanisms in gram negative nosocomial pathogens. In: Shailendra K (ed) Trends in infectious Diseases". ISBN: 978-953-51-1312-6.

Geser N., Stephan R., Hächler H. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet Res. **7**:8:21.

Giske CG., Gezelius L., Samuelsen O., Warner M., Sundsfjord A., Woodford N. 2010. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect **17**: 552-556.

Guggiana P. (2014) Identificación de alelos de B-lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M y su localización genética en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* aisladas de hospitales chilenos en el periodo 2008 a 2011. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Microbiología. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología.

Guillaume A., Nadjar D. 2001. Plasmid-mediated rifampin resistance encoded by an *arr-2*-like gene cassette in *Klebsiella pneumoniae* producing an ACC-1 class C β -Lactamase. Antimicrob Agents Chemother. **45**(10): 2971–2972.

Guzmán-Blanco M., Labarca JA., Villegas MV., Gotuzzo E., on behalf of the Latin America Working Group on Bacterial Resistance. 2014. Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. *Braz J Infect Dis*; **18**(4):421–33.

Hernandez J., Johansson A., Stedt J., Bengtsson S., Porczak A., Granholm S., González-Acuña D., Olsen B., Bonnedahl J., Drobní M. 2013. Characterization and comparison of extended-spectrum β -Lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia coli* isolated from Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and humans in Chile. *PLoS ONE* **8**(9): e76150.

Hernández JR., Martínez L., Cantón R., Coque TM., Pascual A. 2005. Spanish group for nosocomial infections (GEIH): Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2122-2125.

Hoban DJ., Reinert RR., Bouchillon SK., Dowzicky MJ. 2015. Global in vitro activity of tigecycline and comparator agents: Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial 2004-2013. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* May **10**; 14: 27.

Hoenigl M., Valentin T., Zarfel G., Wuerstl B., Leitner E., Salzer HJ., Posch J., Krause R., Grisold AJ. 2012. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. *Antimicrob Agents Chemother.* Apr; **56**(4):2158-61.

Hunter SB., Vauterin P., Lambert-Fair MA., Van Duyne MS., Kubota K., Graves L., Wrigley D., Barrett T., Ribot E. 2005. 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.* **43**(3):1045-50.

Iroha I., Esimone C., Neumann S., Marlinghaus L., Korte M., Szabados F., Gatermann S., Kaase M. 2012. First description of *Escherichia coli* producing CTX-M-15- extended spectrum beta lactamase (ESBL) in out-patients from south eastern Nigeria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **23**; 11:19.

ISP Chile. 2014. Instituto de Salud Pública de Chile Confirma Aislamiento de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemasa Tipo OXA-370. Suplemento informativo. Disponible en: <http://www.ispch.cl/noticia/21060>. Consultado: 29/04/2015.

ISP Chile. 2014b. Instituto de Salud Pública de Chile Confirma Aislamiento de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemasa Tipo NDM-1. Suplemento informativo. Disponible en: <http://www.ispch.cl/noticia/21026>. Consultado: 29/04/2015.

ISP Chile. 2015. Vigilancia de resistencia a antimicrobianos en bacterias que pueden producir Infecciones asociadas a la Atención en Salud. Boletín instituto de Salud Pública de Chile Vol 5, N°4, Abril de 2015 (Versión 2, actualizada). Consultado: 29/04/2015.

Izdebski R., Fiett J., Urbanowicz P., Baraniak A., Derde LP., Bonten MJ., Carmeli Y., Goossens H., Hryniewicz W., Brun-Buisson C., Brisse S., Gniadkowski M. 2015. Phylogenetic lineages, clones and β -lactamases in an international collection of *Klebsiella oxytoca* isolates non-susceptible to expanded-spectrum cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* **70**(12):3230-7.

Kayama S., Shigemoto N., Kuwahara R., Oshima K., Hirakawa H., Hisatsune J., Jové T., Nishio H., Yamasaki K., Wada Y., Ueshimo T., Miura T., Sueda T., Onodera M., Yokozaki M., Hattori M., Ohge H., Sugai M. 2015. Complete nucleotide

sequence of the IncN plasmid encoding IMP-6 and CTX-M-2 from emerging carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **59**(2): 1356-9.

Krauland M., Harrison L., Paterson D., Marsh J. 2010. Novel Integron Gene Cassette arrays identified in a global collection of Multi-Drug resistant Non-Typhoidal *Salmonella enterica*. *Curr Microbiol. Mar*; **60**(3): 217–223.

Labrador I., Araque M. 2014. First Description of KPC-2-Producing *Klebsiella oxytoca* Isolated from a Pediatric Patient with Nosocomial Pneumonia in Venezuela. *Case Rep Infect Dis*. 2014:434987.

Lahlaoui H., Ben Haj Khalifa A., Ben Moussa M. 2014. Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). *Med Mal Infect. Sep*; **44**(9): 400-4.

Lartigue M., Poirel L., Aubert D., Nordmann P. 2006. In vitro analysis of *ISEcp1B*-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M} of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother*. Apr; **50**(4):1282-6.

Laxminarayan R., Duse A., Wattal C., Zaidi A., Wertheim H., Sumpradit N., Vlieghe E., Hara G., Gould I., Goossens H., Greko C., So A., Bigdeli M., Tomson G., Woodhouse W., Ombaka E., Peralta AQ, Qamar FN., Mir F., Kariuki S., Bhutta ZA., Coates A., Bergstrom R., Wright GD., Brown ED., Cars O. 2013. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. Dec; **13**(12):1057-98.

Le Rouzic A., Capy P. 2005. The first steps of transposable elements invasion: parasitic strategy vs. genetic drift. *Genetics*. Feb; **169**(2): 1033–1043.

Lin L., Ling BD., Li XZ. 2009. Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*–*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int J Antimicrob Agents* **33**: 27-32.

Lunha K., Chanawong A., Lulitanond A., Wilailuckana C., Charoensri N., Wonglakorn L., Saenjamla P., Chaimanee P., Angkititrakul S., Chetchotisakd P. 2016. High-level carbapenem-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* with a novel *OmpK36* variant and low-level, carbapenem-resistant, non-porin-deficient, OXA-181-producing *Escherichia coli* from Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Jun; **85**(2): 221-6.

Machida Y., Machida Ch., Ohtsubo H; Ohtsubo E. 1982. Factors determining frequency of plasmid cointegration mediated by insertion sequence IS1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan; **79**(2): 277–281.

Magiorakos A., Srinivasan A., Carey R., Carmeli Y., Falagas M., Giske C., Harbarth S., Hindler J., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D., Rice L., Stelling J., Struelens M., Vatopoulos A., Weber J., Monnet D. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* Mar; **18**(3): 268-81.

Mahrouki S., Belhadj O., Chihi H., Moussa Mohamed B., Celanza G., Amicosante G., Perilli M. 2012. Chromosomal *bla*_{CTX-M-15} associated with *ISEcp1* in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* isolated at the Military Hospital of Tunis, Tunisia. *Journal of Med Microbiol* **61**; 1286-1289.

Mammeri H., Van De Loo., Poirel L., Martinez-Martinez L., Nordmann P. 2005. Emergence of plasmid mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 71-6.

Márquez C., Labbate M., Raymondo C., Fernández J., Gestal AM., Holley M., Borthagaray G., Stokes HW. 2008. Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *J Clin Microbiol*. Oct; **46**(10): 3417-25.

Martinez J. 2012. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Front Microbiol*; **3**: 1.

Martinez J., Baquero F. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. Jul; **44**(7):1771-7.

Martinez T., Vázquez G., Aquino E. 2014. *ISEcp1*-mediated transposition of *bla_{KPC}* into the chromosome of a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* from Puerto Rico. *J Med Microbiol* **63**(Pt 12): 1644-8.

Mathers A. 2016. Mobilization of Carbapenemase-Mediated Resistance in *Enterobacteriaceae*. *Microbiol Spectr*. Jun; **4**(3).

Matsumoto Y., Ikeda F., Kamimura T., Yokota Y., Mine Y. 1988. Novel plasmid-mediated β -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. **32** (8) 1243-1246.

Matsumura Y., Johnson J., Yamamoto M., Nagao M., Tanaka M., Takakura S., Ichiyama S., Kyoto–Shiga Clinical Microbiology Study Group. 2015. CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal

group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. J Antimicrob Chemother. 5; **70**(6):1639-49.

Meletis G. 2016. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. Ther Adv Infect Dis. **3**(1): 15–21.

Miró E., Segura C., Navarro F. 2010. Spread of plasmids containing the *bla*(VIM-1) and *bla*(CTX-M) genes and the *qnr* determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. J Antimicrob Chemother **65**(4): 661-5.

Moreno A., Bello H., Guggiana D., Dominguez M., González G. 2008. Extended-spectrum β -lactamases belonging to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from companion animals treated whit enrofloxacin. Vet Microbiol **129**. 203-208.

Morrissey I., Hackel M., Badal R., Bouchillon S., Hawser S., Biedenbach D. 2013. A Review of Ten Years of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) from 2002 to 2011. Pharmaceuticals (Basel). **6**(11): 1335–1346.

Naas T., Cuzon G., Villegas MV., Lartigue MF., Quinn JP., Nordmann P. 2008. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. Antimicrob Agents Chemother; **52**: 1257-63.

Nordmann P., Poirel L. 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. Clin Microbiol Infect. Sep; **20**(9): 821-30.

Nordmann P., Poirel L., Walsh T., Livermore D. 2011. The emerging NDM carbapenemases. Trends Microbiol; **19**: 588-95.

Novais A., Cantón R., Valverde A., Machado E., Galán JC., Peixe L., Carattoli A., Baquero F., Coque TM. 2006. Dissemination and persistence of *bla*_{CTX-M-9} are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-a, and IncFI Groups. *Antimicrobial Agents Chemother* **50**: 2741-2750.

OMS. (2017) Organización mundial de la Salud. Lista de prioridades globales de bacterias resistentes a los antibióticos para guiar la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en>. Consultado: 11/03/2017.

Palzkill T. 2013. Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci*. Jan; **1277**: 91-104.

Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, Gotuzzo E, Kronvall G, Paradisi F, Rossolini GM. 2007. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*. Aug; **51**(8):2720-5.

Partridge S., Tsafnat G., Coiera E., Iredell J. 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*. Jul; **33**(4): 757-84.

Pasteran F., Mora M., Albornoz E., Faccione D., Franco R., Ortellado J., Melgarejo N., Gomez S., Riquelme I., Matheu J., Ramon-Pardo P., Corso A. 2014. Emergence of genetically unrelated NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* strains in Paraguay. *J Antimicrob Chemother*. Sep; **69**(9): 2575-8.

Paterson D., Bonomo R. 2005. Extended Spectrum β -lactamases: A clinical Update. *Clin Microbiol Rev*. **18**(4): 657-686.

Paterson D., Doi Y. 2007. A step closer to extreme drug resistance (XDR) in Gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* **45**(9): 1179-1181.

Peirano G., Asensi MD., Pitondo-Silva A., Pitout JD. 2011. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect.* **17**(7): 1039-43.

Pereira PS., Borghi M., Araújo CF., Aires CA., Oliveira JC., Asensi MD., Carvalho-Assef AP. 2015. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* **59**(8): 4453-6.

Peterson L. 2009. Bad bugs, no drugs: No ESCAPE Revisited. *Clin Infect Dis.* **49**(6) 992-993.

Phan MD., Peters KM., Sarkar S., Lo AW., Stanton-Cook M., Roberts LW., Upton M., Beatson SA., Schembri MA. 2015. Third-generation cephalosporin resistance conferred by a chromosomally encoded *bla*_{CMY-23} gene in the *Escherichia coli* ST131 reference strain EC958. *J Antimicrob Chemother.* **70**(7): 1969-72.

Pitout J., Laupland K. 2008. Extended-spectrum β -Lactamase producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis* **8**, 159-166.

Poirel L., Decousser J., Nordmann P. 2003. *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} β -Lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**: 2938-45.

Poirel L., Héritier C., Tolün V., Nordmann P. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* Jan; **48**(1):15-22.

Poirel L., Lartigue M., Decousser J., Nordmann P. 2005. *ISEcp1B*-mediated transposition of *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* Jan; **49**(1): 447–450.

Poirel L., Naas T., Nordmann P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* Jan; **54**(1): 24–38.

Poirel L., Walsh TR., Cuvillier V., Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **70**(1): 119-23.

Potin M., Garrido O. 2016. Prevención de Infecciones (IAAS), El niño hospitalizado: un problema frecuente. Disponible en: <http://publicacionesmedicina.uc.cl/pediatriaHosp/Infecciones.html>. Consultado: 26/11/2016.

Potron A., Nordmann P., Rondinaud E., Jaureguy F., Poirel L. 2013. A mosaic transposon encoding OXA-48 and CTX-M-15: towards pan-resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**(2): 476-477.

Potron A., Poirel L., Rondinaud E., Nordmann P. 2013b. Intercontinental spread of OXA48 β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill*; **18**. pii: 20549.

Pournaras S., Kristo I., Vrioni G., Ikonomidis K., Poulou A., Petropoulou D., Tsakris A. 2010. Characteristics of Meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-Producing clinical Isolates of *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* Jul; **48**(7): 2601–2604.

Power P., Galleni M., Di Conza J., Ayala J., Gutkind G. 2005. Description of In116, the first *bla*_{CTX-M-2} containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. *J Antimicrob Chemother* **55**: 461-465.

Quezada-Aguiluz M., Zenis J., Ríos C., Carrasco-Anabalón S., Opazo A., Lima C., Bello-Toledo H., Domínguez M., Cifuentes M., Silva F., Barrera B., Prat S., Araya P., Fernández J., Hormazábal JC., González-Rocha G. 2016. Transferencia de *bla*_{NDM-1} y co-transferencia de otros determinantes genéticos de resistencia a antibióticos desde *Klebsiella pneumoniae* ST1588 a *Escherichia coli*. Comunicación oral en Congreso Chileno de Infectología año 2016.

Quinteros M., Radice M., Di Conza J., Gutkind G. 2002. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 602-604.

Reyes A., Bello H., Dominguez M., Mella S., Zemelman R., Gonzalez G. 2003. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* from several Chilean hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **51** (2): 317-321.

Rodriguez M., Power P., Radice M., Vay C., Famiglietti A., Galleni M., Ayala J., Gutkind G. 2004. Chromosome-Encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-Derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(12): 4895-4897.

Sambrook J., Russel D. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*: Capítulo 6: Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA, Introduction to Protocols 8, 9 y 10. Cold Spring Harbor Laboratory Press (ed). ISBN: 978-1-936113-42-2.

Sampaio J., Ribeiro V., Campos J., Rozales F., Magagnin C., Falci D., Cassol R., Dalarosa M., Luz D., Vieira F., Antochévis L., Barth A., Zavascki A. 2014. Detection of OXA-370, an OXA-48 Related Class D β -Lactamase in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents and Chemother* Jun; **58**(6): 3566–3567.

Sarria J., Vidal A., Kimbrough R. 2001. Infections caused by *Kluyvera* species in humans. *Clin. Infect. Dis.* **33**, E69–E74.

Seiffert SN., Marschall J., Perreten V., Carattoli A., Furrer H., Endimiani A. 2014. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents*. Sep; **44**(3):260-2.

Stepanova M., Pimkin M., Nikulin A., Kozyreva V., Agapova E., Edelstein M. 2008. Convergent *In Vivo* and *In Vitro* selection of ceftazidime resistance mutations at position 167 of CTX-M-3 β -Lactamase in hypermutable *Escherichia coli* Strains. *Antimicrob Agents Chemother*. April vol. **52** no. 4 1297-1301.

Stokes HW., Gillings MR. 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* **35**(5):790-819.

Stokes HW., Tomaras C., Parsons Y., Hall RM. 1993. The partial 3'- conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. *Plasmid*. Jul; **30**(1): 39-50.

Suárez C., Gudiol F. 2009. β -lactam antibiotics. *Enferm Infec Microbiol Clin.* **27**(2): 116-29.

Sun J., Li XP., Yang RS., Fang LX., Huo W., Li SM., Jiang P., Liao XP., Liu YH. 2016. Complete Nucleotide Sequence of an IncI2 Plasmid Coharboring *bla*_{CTX-M-55} and *mcr-1*. *Antimicrob Agents Chemother*. Jul 22; **60**(8): 5014-7.

Swathi C., Chikala R., Ratnakar K., Sritharan V. 2016. A structural, epidemiological & genetic overview of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs). Indian J Med Res. Jul; **144**(1): 21–31.

Toleman M., Bennet P., Walsh T. 2006. Common regions e.g *orf513* and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. J Antimicrob Chemother **58**(1): 1-6.

Totsika M. 2016. Benefits and challenges of antivirulence antimicrobials at the dawns of the post-antibiotic Era. Curr Med Chem; **6**(1): 30–37.

Tugce O., Guvenek A., Yildiz S., Talha-Tamer Y., Mumcuyan N., Burak V., Senturk G., Cokol M., Yeh P., Toprak E. 2014. Strength of selection pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution. Mol Biol Evol. Sep; **31**(9): 2387–2401.

Tumbarello M., Sanguinetti M., Montuori E., Trecarichi EM., Posteraro B., Fiori B., Citton R., D'Inzeo T., Fadda G., Cauda R., Spanu T. 2007. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother. Jun; **51**(6): 1987-94.

Turlan C., Chandler M. 1995. IS1-mediated intramolecular rearrangements: formation of excised transposon circles and replicative deletions. EMBO J. Nov **14**(21): 5410–5421.

Validi M., Soltan MM., Douraghi M., Mehrabadi F., Foroushani R. 2016. Identification of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing *Klebsiella*

oxytoca in Clinical Isolates in Tehran Hospitals, Iran by Chromogenic Medium and Molecular Methods. *Osong Public Health Res Perspect.* Oct; **7**(5):301-306

Valverde A., Cantón R., Galán J., Nordmann P., Baquero F., Coque T. 2006. In117, an Unusual In0-Like Class 1 Integron Containing CR1 and *bla*_{CTX-M-2} and Associated with a Tn21-Like Element. *Antimicrob Agents Chemother.* Feb; **50**(2): 799–802.

Vignoli R., Cordeiro N., Seija V., Schelotto F., Radice M., Ayala JA., Power P., Gutkind G. 2006. Entorno genético de CTX-M-2 en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes hospitalizados en Uruguay. *Rev Argent Microbiol* **38**: 84-88.

Villa L., Poirel L., Nordmann P., Carta C., Carattoli A. 2012. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15} and *qnrB1* genes. *J Antimicrob Chemother*; **67**: 1645 –1650.

Villegas MV., Kattan JN., Quinteros MG., Casellas JM. 2008. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect* **14** Suppl 1: 154-8.

Wachino J., Yamane K., Kimura K., Shibata N., Suzuki S., Ike Y., Arakawa Y. 2006. Mode of transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by *ISEcp1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 3212–3215.

Wang G., Huang T., Surendraiah PKM., Wang K., Komal R., Zhuge J., Chern C., Kryszuk A., King C., Wormser G. 2013. CTX-M β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in suburban New York City, New York, USA. *Infect Dis Vol.* **19**; 11.

Wei-Hua Z., Zhi-Qing H. 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev in Microbiol*; **39**(1): 79–101.

WHO. 2014. Antimicrobial resistance; Global Report on Surveillance. World Health Organization. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en>. Consultado: 05/07/2016.

Woodford N., Fagan E., Ellington M. 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* **57**:154-155.

Wozniak A., Villagra NA., Undabarrena A., Gallardo N., Keller N., Moraga M., Román JC., Mora GC., García P. 2012. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *J Med Microbiol*. **61**(Pt 9): 1270-9.

Xu G., Jiang Y., An W., Wang H., Zhang X. 2015. Emergence of KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in an urban river in Harbin, China. *World J Microbiol Biotechnol. Sep*; **31**(9):1443-50.

Ye Q., Zhao J., Wan Q., Qiao B., Zhou J. 2014. Frequency and clinical outcomes of ESKAPE bacteremia in solid organ transplantation and the risk factors for mortality. *Transpl Infect Dis* **16**(5): 767-74.

Yong D., Tolema M., Giske C., Cho H., Sundman K., Lee K., Walsh T. 2009. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella*

pneumoniae sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother; **53**: 5046–54.

Zaragoza R., Gimeno C., Pemán J., Salavert M. 2008. Microbiología aplicada al Paciente Crítico. 1° Edición. Editorial Panamericana. Argentina. Cap 20, 247.

Zhao WH., Zhi-Qing H. 2013. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in gram-negative bacteria. Crit Rev Microbiol **39**, 79–101.

Zhao WH., Zhi-Qing H. 2015. Acquired metallo- β -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. Future Microbiol; **10**(5):873-87.

Zhong L-. Zhang ., Doi Y., Huang X., Zhang X., Zeng K., Shen C., Patil S., Xing Y., Zou Y., Tian G. 2016. Co-production of MCR-1 and NDM-1 by colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from healthy individual. Antimicrob. Agents Chemother. **61** no. 1 e01962-16.

Zong Z., Partridge SR., Iredell JR. 2010. ISEcp1-mediated transposition and homologous recombination can explain the context of *bla*(CTX-M-62) linked to *qnrB2*. Antimicrob Agents Chemother. Jul; **54**(7): 3039–3042.

Zurita J., Parra H., Gestal MC., McDermonntt J., Barba P. 2015. First case of NDM-1 producing *Providencia rettgeri* in Ecuador. J Glob Antimicrob Resist. Dec; **3**(4): 302-303.

ANEXO

Tabla 1. Partidores utilizados para amplificación diversos genes mediante PCR.

Partidor	Secuencia 5' → 3'	ADN blanco	Amplicón	Referencia
rrs1	GGATTAGATACCCTGGTAGTCC	16s ARNr	320 pb	Esta tesis
rrs2	TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC			
mCTX-MG1R	AGCTTATTCATCGCCACGTT	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	415 pb	
mCTX-MG1F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC			
mCTX-MG2R	CCAGCGTCAGATTTTTTCAGG	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	552 pb	
mCTX-MG2F	CGACGCTACCCCTGCTAT			
mCTX-MG8R	AACCCACGATGTGGGTAGC	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	666 pb	Woodford <i>et al.</i> , 2006
mCTX-MG8F	TCGCGTTAAGCGGATGATGC			
mCTX-MG9R	AACCCACGATGTGGGTAGC	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	205 pb	
mCTX-MG9F	CAAAGAGAGTGCAACGGATG			
mCTX-MG25R	AACCCACGATGTGGGTAGC	<i>bla</i> _{CTX-M-25}	327 pb	
mCTX-MG25F	GCACGATGACATTCGGG			
KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	<i>bla</i> _{KPC}	893 pb	Akpaka <i>et al.</i> , 2009
KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC			
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	<i>bla</i> _{IMP}	232 pb	
IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC			
SPM-F	AAAATCTGGGTACGCAAACG	<i>bla</i> _{SPM}	271 pb	
SPM-R	ACATTATCCGCTGGAACAGG			
VIM-F	GATGGTGTGGTTCGCATA	<i>bla</i> _{VIM}	390 pb	
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG			
OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	<i>bla</i> _{OXA-48}	438 pb	Poirel <i>et al.</i> , 2011
OXA-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG			
GIM-F	TCGACACACCTTGGTCTGAA	<i>bla</i> _{GIM}	477 pb	
GIM-R	AACTTCCAACCTTGGCCATGC			
SIM-F	TACAAGGGATTCGGCATCG	<i>bla</i> _{SIM}	570 pb	
SIM-R	TAATGGCCTGTTCCCATGTG			
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	<i>bla</i> _{NDM}	621 pb	
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC			

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2. Partidores extragénicos para la determinación de variantes genéticas de

*bla*_{CTX-M}.

Nombre del partidor	Secuencia 5'→3'	ADN blanco	Amplicón	Referencia
Full CTX-M-F CTX-MB	AAACACACGTGGAATTTAGGG ACCGCGATATCGTTGGT	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	820 pb	Geser <i>et al.</i> , 2012
Full CTX-M-R CTX-MA	CCGATGACTATGCGCACTGGG CGCTTTGCGATGTGCAG			
BLA1 BLA2	TTAATGATGACTCAGAGCATT GATACCTCGCTCCATTTATTGC	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	910 pb	

Fuente: Elaboración propia.



Tabla 3. Partidores utilizados para la determinación del entorno genético de *bla_{CTX-M}* de grupo 2.

Nombre del partidor	Secuencia 5'→3'	ADN blanco	Tamaño amplicón	Referencia
IntA	GTCAAGGTTCTGGACCAGTTGC	<i>intl1</i>	893 pb	Gaze <i>et al.</i> , 2005
IntB	ATCATCGTCGTAGAGACGTCGG			
HS-915	CGTGCCGTGATCGAAATCCAG	<i>intl1</i>	371 pb	Márquez <i>et al.</i> , 2008
HS-916	TTCGTGCCTTCATCCGTTTCC			
HS-458	GTTTGATGTTATGGAGCAGCAACG	RV integrón clase 1	Variable	
HS-459	GCAAAAAGGCAGCAATTATGAGC			
CASS1	TGATCCGCATGCCCGTTCATACAG	RV integrón clase 1	Variable	Reyes <i>et al.</i> , 2003
CASS2	GGCAAGCTTAGTAAAGCCCTCGCTAG			
Int-2	TAGAGCGCAGGGTCAGGAAA	Int. Clase 1 (<i>qacEΔ1</i>)	Variable	Vignoli <i>et al.</i> , 2006
qac. F	GGCTGGCTTTTTCTTGTATCG	<i>qacEΔ1</i>	244 pb	Vignoli <i>et al.</i> , 2000
qac. R	CAAGCTTTTGCCCATGAAGC			
Sul1.F	GTATTGCGCCGCTCTTAGAC	<i>sul1</i>	283 pb	Reyes <i>et al.</i> , 2003
Sul1.R	CCGACTTCAGCTTTTGAA			
F12.F	GTATTGCGCCGCTCTTAGAC	<i>sul1+orf513</i>	1974 pb	Power <i>et al.</i> , 2005
F12.R	AAACCAGCATGGTTGGCTAC			
Orf513. F	ATGGTTTCATGCGGGTT	<i>orf513</i>	475 pb	Arduino <i>et al.</i> , 2003
Orf513. R	CTGAGGGTGTGAGCGAG			
Orf513InK13	CACCCTGCAAACCTTGCCAGG	<i>orf513 + bla_{CTX-M-2}</i>	1309 pb	Vignoli <i>et al.</i> , 2006
Blaup	GGCTTCCAGCTGCTGTTGCAC			
QacE.REV	CAAGCTTTTGCCCATGAAGC	<i>qacEΔ1</i>	Variable *	Esta tesis
OrfEND	CCGTTAAGCTCTTATGTGGG	<i>orf513</i>		
Bladown	TTGACTGACGACCCCAAATCC	<i>bla_{CTX-M-2}</i>	*	Díaz <i>et al.</i> , 2007
ARR3 F	CAACGATGTTACGCAGCAGG	<i>aar2-3</i>	Variable *	Esta tesis
aadA1-R	GTCGTTGATCAAAGCTCGCC	<i>AadA1</i>		
SC1	ATGATGACTCAGAGCATTGCG	<i>bla_{CTX-M-2}</i>		
SC3	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	<i>qacEΔ1</i>		
SC4	AGTTCTAGGCGTTCTGCG	<i>orf5</i>		
SC5	CGATATCGACGAGGTTGTGC	<i>orf5</i>		
SC6	ACTGTCATAGCGGTTACGTT	IS1326		
Aar2-F	TTTGCGGATTGGTGAATTGCT	<i>aar</i>		
aadA1b-R	CCCAGTATCAGCCCGTCATAC	<i>AadA1</i>		
cmla5-F	TGCTCCAATGTGGCTAGTGG	<i>cmla5</i>		
ISCR1-R	TATTCTCGGCATCACGCTCC	ISCR1		
aadA1-R	AGGCTTGATGAAACAACGCG	<i>aadA1</i>		

* Partidores utilizados en asociación con otros partidores para la determinación del entorno genético.
RV: Región variable

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Partidores utilizados para la determinación del entorno genético de *bla*_{CTX-M} de grupo 1.

Nombre del partidor	Secuencia 5'-->3'	ADN blanco	Tamaño amplicón	Referencia
CTX-M-1_540 orf477	GCGTGATACCACTTCACCTC GAAGGAGAACCAGGAACCAC	<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>orf477</i>	461 pb	Iroha <i>et al.</i> , 2012
<i>tnpA</i> ISEcp1	AATACTACCTTGCTTTCTGA	ISEcp1 <i>tnpA</i>	Variable *	Eckert <i>et al.</i> , 2006
ISEcp1 5' ISEcp1 R	TTCAAAAAGCATAATCAAAGCC CAACCACCTTTCAATCATTTTT	ISEcp1 ISEcp1	1546	Iroha <i>et al.</i> , 2012
IS26 F	CAAAGTTAGCGATGAGGCAG	IS26	*	Eckert <i>et al.</i> , 2006
<i>tnpA</i> IS26	AGCGGTAAATCGTGGAGTGA	IS26 <i>tnpA</i>	*	Eckert <i>et al.</i> , 2004
Orf477R	ACTTCAAAAATTATGCCACC	<i>orf477</i>	*	Eckert <i>et al.</i> , 2006
<i>mucALW</i>	GGCATCAGGCAGGCGTAAGG	<i>mucA</i>	*	
m13-LW	TTGGTGACGATTTTAGCCGC	<i>bla</i> _{CTX-M1}	*	
ISEcp1_CTX_F ISEcp1_CTX_R	TGCTCTGCGGTCACCTTCATT GCTAAGCTCAGCCAGTGACA	ISEcp1 y <i>bla</i> _{CTX-M1}	1729 pb	Esta tesis
IS26-F IS26-R	TCACTCCACGATTTACCGCT CTTACCAGGCGCATTTTCGCC	IS26	558 pb	Esta tesis

*Partidores utilizados en asociación con otros partidores para la determinación del entorno genético.

Fuente: Elaboración propia.

Experimento de conjugación

La transferencia de genes de resistencia se llevó a cabo por experimentos de conjugación en medio sólido y líquido utilizando como dadoras las cepas de *Klebsiella pneumoniae* UC358 ($bla_{OXA-370}^+$, $bla_{CTX-M-15}^+$), *Klebsiella pneumoniae* UC361 (bla_{NDM-1}^+ , $bla_{CTX-M-15}^+$), *Klebsiella oxytoca* UC363 (bla_{KPC-2}^+ , $bla_{CTX-M-3}^+$) y, como receptora la cepa de *Escherichia coli* J53 (UC231) (lac^- , resistente a azida de sodio (AZS), rifampicina (RIF^R) y ácido nalidixico (NAL^R).

El ensayo de conjugación se realizó de acuerdo a lo descrito previamente (Potron *et al.*, 2013b) utilizando como medio de selección agar tripticasa de soya (ATS) (Oxoid Ltd.) adicionado con ampicilina (AMP) 16 µg/mL, cefotaxima (CTX) 4 µg/mL, ertapenem (ETP) 0,125 µg/mL, amikacina (AMK) 4 µg/mL y azida de sodio (AZS) 300 µg/mL. La capacidad de transferencia fue estudiada a 37 °C y 27 °C.

La identificación de las cepas dadoras, receptora y transconjugantes se realizó mediante el sistema automatizado VITEK-2C, y se determinó su similitud genética mediante ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive inter-genic consensus*) de acuerdo a protocolo previamente descrito (Acosta-Peréz *et al.*, 2015). La susceptibilidad de las cepas a diversos antimicrobianos fue realizada mediante el sistema automatizado VITEK-2C.

Las cepas dadoras, receptora y transconjugante fueron sometidas a los ensayos fenotípicos para la determinación de BLEE y carbapenemasas y, a su vez, se demostró molecularmente la portación de los genes de resistencia: $bla_{OXA-370}$, bla_{NDM-1} , bla_{KPC} , bla_{CTX-M} , mediante protocolos descritos previamente.

Experimento de curación

Las cepas UC-358 y UC-363 fueron sometidas a eliminación de plásmidos por crecimiento a elevadas temperaturas, de acuerdo a lo descrito por Barría-Loiza *et al.*, 2016).

Las cepas fueron incubadas en caldo tripticasa de soya (Oxoid Ltd.) a diferentes temperaturas (UC-358: 44°C, UC-363: 43,5°C) bajo agitación constante a 150 rpm por 15 días, transfiriéndolas todos los días a caldo fresco y cada dos días comprobando la pureza del cultivo realizando trasposos a Agar Sangre (bioMérieux) y BBL™ CHROMagar™ Orientation® (Becton, Dickinson and Company). Al día 15, se transfirieron 100 µL de un cultivo equivalente 10^{-4} , 10^{-8} a agar ATS, a Agar Sangre (bioMérieux) y BBL™ CHROMagar™ Orientation® (Becton, Dickinson and Company) con la finalidad de chequear la pureza del cultivo y de obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron a 37 °C por 16-24 horas.

Posteriormente, se prepararon placas de AMH sin antibióticos, y con una concentración subinhibitoria de ertapenem (4 µg/mL). A continuación, se sembraron 100 colonias aisladas en replicados en paralelos en la placa con y sin antibiótico. Las colonias bacterianas que se desarrollaron en la placa sin antibiótico y no se desarrollaron en la placa con antibiótico (pérdida de resistencia) fueron seleccionadas y se traspararon ATS para ser incubadas durante 16-24 h. Por último, las cepas seleccionadas se sometieron a identificación y ensayos de susceptibilidad antimicrobiana mediante el equipo automatizado VITEK 2C. Con la finalidad de comprobar la identidad genética de las cepas curadas y las cepas salvajes, se sometieron a un ensayo de ERIC-PCR (Acosta-Pérez *et al.*, 2015). Además, se realizaron ensayos fenotípicos para la demostración de la producción de carbapenemasas y BLEE y la detección molecular de genes de resistencia. Los resultados del ensayo de curación se pueden observar en la Tabla 7.

Resultados de experimentos de conjugación y curación de plásmidos:

- Para la cepa *K. pneumoniae* UC358 (*bla*_{OXA-370}, *bla*_{CTX-M-15}) no se obtuvieron cepas transconjugantes utilizando las diferentes temperaturas ni medios ensayados.
- Para la cepa *K. pneumoniae* UC361 (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}) la conjugación sólo fue posible a la temperatura de 27 °C, mientras que para la cepa *K. pneumoniae* UC363 (*bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-3}) esto fue posible a 37°C (Tabla 5 y 6, material anexo). Mediante ERIC-PCR se demostró la identidad genética entre las cepas receptoras y transconjugantes, difiriendo ambas del perfil genético obtenido en las cepas donantes.
- En lo que respecta a los ensayos de curación, fue posible obtener cepas curadas para ambas cepas estudiadas (UC358 y UC363), observándose una pérdida de resistencia a diversos antimicrobianos, y test fenotípicos de BLEE y carbapenemasas negativos, comprobado mediante los resultados negativos en la pesquisa molecular mediante PCR de genes *bla*_{CTX-M} y genes productores de carbapenemasas (Tabla 6 y 7, material anexo).

Tabla 5. Características fenotípicas y moleculares de la cepa dadora (*K. pneumoniae* UC361), receptora (*E. coli* UC231) y transconjugante (*E. coli* T01) obtenidas mediante conjugación en medio líquido y sólido a 27°C.

	Donante UC361		Receptora UC231		Transconjugante T01	
Identificación *	<i>K. pneumoniae</i> (99%)		<i>E. coli</i> (99%)		<i>E. coli</i> (99%)	
Susceptibilidad antimicrobiana *	CMI µg/mL	Int	CMI µg/mL	Int	CMI µg/mL	Int
Ertapenem	≥ 8	R	≤ 0,5	S	≥ 8	R
Imipenem	≥ 16	R	≤ 0,25	S	≥ 16	R
Meropenem	≥ 16	R	≤ 0,25	S	≥ 16	R
Cefotaxima	≥ 64	R	≤ 0,5	S	≥ 64	R
Ceftazidima	≥ 64	R	≤ 1	S	≥ 64	R
Ceftriaxona	≥ 8	R	≤ 0,5	S	≥ 8	R
Ampicilina/sulbactam	≥ 32	R	4	S	≥ 32	R
Amikacina	≤ 2	S	≤ 2	S	≤ 2	S
Gentamicina	≥ 16	S	≤ 1	S	≤ 1	S
Ciprofloxacino	2	I	≤ 1	S	2	I
Test Fenotípicos						
BLEE	-		-		-	
BLEE + AFB	-		-		-	
HODGE	+		-		+	
Test CBP ^Δ	EDTA +		-		EDTA +	
Detección Molecular						
<i>bla</i> _{NDM-1}	+		-		+	
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	+		-		+	

* Sistema automatizado VITEK 2C, tarjeta GN y AST-N249 (biomerieux®). (%): Porcentaje de identificación exitosa de acuerdo a la base de datos incluida en el equipo automatizado.

Int: Interpretación de acuerdo a CLSI, 2017, documento M100.

Δ: Inhibidor con el cual el test fenotípico de producción de carbapenemasa (CBP) presentó positividad.

+: Positivo, -: Negativo.

S: Susceptible, I: Susceptibilidad intermedia, R: Resistente.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6. Características fenotípicas y moleculares de las cepas dadora (*K. oxytoca* UC363), receptora (*E. coli* UC231), transconjugante (*E. coli* TUC363) y curada *K. oxytoca* UC363c, obtenidas en el ensayo de conjugación a 37°C y curación a 43,5°C.

	Donante UC363		Receptora UC231		Transconjugante Tuc363		UC363c	
Identificación *	<i>K. oxytoca</i> (99%)		<i>E. coli</i> (99%)		<i>E. coli</i> (99%)		<i>K. oxytoca</i> (99%)	
Susceptibilidad antimicrobiana *	CMI µg/mL	Int	CMI µg/mL	Int	CMI µg/mL	Int	CMI µg/mL	Int
Ertapenem	2	R	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S
Imipenem	8	R	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
Meropenem	4	R	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
Cefotaxima	≥ 64	R	≤ 0,5	S	≥ 64	R	8	R
Ceftazidima	≥ 64	R	≤ 1	S	≤ 1	S	≥ 64	R
Ceftriaxona	≥ 8	R	≤ 0,5	S	≥ 8	R	≥ 8	R
Ampicilina/sulbactam	≥ 32	R	4	S	≥ 32	R	≥ 32	R
Amikacina	≥ 64	R	≤ 2	S	32	I	≥ 64	R
Gentamicina	4	S	≤ 1	S	≤ 1	S	2	S
Ciprofloxacino	≤ 0,25	S	≤ 1	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S
Test Fenotípicos								
BLEE	-		-		+		+	
BLEE + AFB	+		-		+		+	
HODGE	+		-		-		-	
Test CBP ^Δ	AFB +		-		-		-	
Detección Molecular								
<i>bla</i> _{KPC-2}	+		-		-		-	
<i>bla</i> _{CTX-M-3}	+		-		+		-	

* Sistema automatizado VITEK 2C, tarjeta GN y AST-N249 (biomerieux®). (%): Porcentaje de identificación exitosa de acuerdo a la base de datos incluida en el equipo automatizado.

Int: Interpretación de acuerdo a CLSI, 2017, documento M100.

Δ: Inhibidor con el cual el test fenotípico de producción de carbapenemasa (CBP) presentó positividad.

+: Positivo, -: Negativo.

S: Susceptible, I: Susceptibilidad intermedia, R: Resistente.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Determinación de actividad antibacteriana de diferentes antibióticos y características fenotípicas y moleculares de las cepas salvaje y curada de Resultado experimento de curación a 44°C en cepa *Klebsiella pneumoniae* UC358.

	Salvaje UC358		Curada UC358c	
Identificación *	<i>K. pneumoniae</i> (99%)		<i>K. pneumoniae</i> (99%)	
Susceptibilidad antimicrobiana *	CMI µg/mL	Int	CMI µg/mL	Int
Ertapenem	≥ 8	R	≤ 0,5	S
Imipenem	2	I	≤ 0,25	S
Meropenem	4	R	≤ 0,25	S
Cefotaxima	≥ 64	R	4	S
Ceftazidima	≥ 64	R	2	S
Ceftriaxona	≥ 64	R	2	S
Ampicilina/sulbactam	≥ 32	R	≥ 32	R
Amikacina	≤ 2	S	≤ 2	S
Gentamicina	≤ 1	S	≤ 1	S
Ciprofloxacino	≥ 4	R	≥ 4	R
Test Fenotípicos				
BLEE	-		-	
BLEE + AFB	-		-	
HODGE	+		-	
Test CBP ^Δ	-		-	
Detección Molecular				
<i>bla</i> _{OXA-370}	+		-	
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	+		-	

* Sistema automatizado VITEK 2C, tarjeta GN y AST-N249 (biomerieux®). (%): Porcentaje de identificación exitosa de acuerdo a la base de datos incluida en el equipo automatizado.

Int: Interpretación de acuerdo a CLSI, 2017, documento M100.

Δ: Inhibidor con el cual el test fenotípico de producción de carbapenemasa (CBP) presentó positividad.

+: Positivo, -: Negativo.

S: Susceptible, I: Susceptibilidad intermedia, R: Resistente.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de diferentes antibióticos para las cepas de enterobacterias utilizadas para la determinación de la plataforma genética de *bla*_{CTX-M} determinada mediante sistema automatizado VITEK-2C.

	UC327	UC332	UC338	UC358	UC361	UC363
Identificación *	<i>E. coli</i> (99%)	<i>K. pneumoniae</i> (99%)	<i>K. pneumoniae</i> (99%)	<i>K. pneumoniae</i> (99%)	<i>K. pneumoniae</i> (99%)	<i>K. oxytoca</i> (99%)
Susceptibilidad antimicrobiana *	CMI µg/mL	CMI µg/mL	CMI µg/mL	CMI µg/mL	CMI µg/mL	CMI µg/mL
Ertapenem	≥ 8 (R)	≥ 8	≥ 8	≥ 8 (R)	≥ 8 (R)	2 (R)
Imipenem	≥ 16 (R)	8	≥ 16	2 (I)	≥ 16 (R)	8 (R)
Meropenem	≥ 16 (R)	≥ 16	≥ 16	4 (R)	≥ 16 (R)	4 (R)
Cefotaxima	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)
Ceftazidima	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)	≥ 64 (R)
Ceftriaxona	≥ 8 (R)	≥ 8 (R)	≥ 8 (R)	≥ 8 (R)	≥ 8 (R)	≥ 8 (R)
Ampicilina/sulbactam	≥ 32 (R)	≥ 32 (R)	≥ 32 (R)	≥ 32 (R)	≥ 32 (R)	≥ 32 (R)
Amikacina	8 (S)	≥ 64	≥ 64 (R)	≤ 2 (S)	≤ 2 (S)	≥ 64 (R)
Gentamicina	≥ 16 (R)	≥ 16	≥ 16 (R)	≤ 1 (S)	≥ 16 (R)	4 (S)
Ciprofloxacino	≥ 4 (R)	≥ 4 (R)	≥ 4 (R)	≥ 4 (R)	2 (I)	≤ 0,25(S)
Colistin†	≤ 0,5 (S)	≥ 16	≥ 16	≤ 0,5 (S)	≤ 0,5 (S)	≤ 0,5 (S)
Tigeciclina	≤ 0,5 (S)	≤ 0,5 (S)	≤ 0,5 (S)	2 (S)	≤ 0,5 (S)	≤ 0,5 (S)
SXT	≥ 320 (R)	≤ 20 (S)	≤ 20 (S)	≥ 320 (R)	≥ 320 (R)	40 (S)
Piperacilina/ Tazobactam	≥ 128 (R)	≥ 128 (R)	≥ 128 (R)	≥ 128 (R)	≥ 128 (R)	≥ 128 (R)

* Sistema automatizado VITEK 2C, tarjeta GN y AST-N249 (biomerieux®). (%): Porcentaje de identificación exitosa de acuerdo a la base de datos incluida en el equipo automatizado. (S): Susceptible, (I): Susceptibilidad intermedia, (R): Resistente. Interpretación de acuerdo a CLSI, 2017, documento M100.

†: CMI a colistin chequeada mediante microdilución en caldo según los criterios del CLSI, 2017.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9. Partidores utilizados para la caracterización molecular de la cepa *Klebsiella oxytoca* UC363 y la cepa transconjugante *Escherichia coli* TUC363.

Partidor	Secuencia 5' → 3'	ADN blanco	Tamaño fragmento	Referencia
Int2.F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	<i>Int12</i>	746	Márquez <i>et al.</i> , 2008
Int2.R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG			
hep74	CGGACGGCATGCACGATTTGTA	<i>Int12</i> variable region	Variable	Collis <i>et al.</i> , 2002
hep51	GATGCCATCGCAAGTACGAG			
qnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA1</i> a	580	Chen <i>et al.</i> , 2012
qnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	<i>qnrA6</i>		
qnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG*	<i>qnrB1</i> a	264	
qnrBm-R	TTTGCYGYCCGCCAGTCGAA*	<i>qnrB6</i>		
qnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	<i>qnrS1</i> a	428	
qnrSm-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	<i>qnrS2</i>		
qepA-F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	<i>qepA</i>	617	
qepA-R	GGACATCGGCTTCTTC			
aac(6')-IbF	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	<i>aac(6')-Ib</i>	482	

Fuente: Elaboración propia.

