

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



Ambiente genético del gen *bla*_{CTX-M2} en cepas de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* aisladas en hospitales chilenos

Tesis presentada a la Escuela de Graduados para optar al grado de
Magíster en Ciencias Mención Microbiología

Por

PATRICIA MARÍA DÍAZ QUEZADA

2007

RESUMEN

Las enzimas del grupo CTX-M forman una familia de β - lactamasas de espectro extendido (BLEE) de rápido crecimiento, distribuidas en diversas áreas geográficas y en un amplio rango de bacterias clínicas, en particular, miembros de la familia *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella pneumoniae*. Estas enzimas hidrolizan preferentemente cefotaxima, y su prevalencia en Chile es de 40,2%, en cepas de *K pneumoniae* subsp *pneumoniae* productoras de BLEE.

Según lo indicado por diversos estudios, en la movilización de genes *bla*_{CTX-M} estarían involucrados elementos genéticos, como por ejemplo la secuencia *ISCR1* e integrones de clase 1. Estos últimos elementos han sido los más estudiados y caracterizados, principalmente por su alta diseminación y, además, porque han sido encontrados en cepas aisladas en hospitales.

La organización general de los integrones clase 1 consiste de un extremo 5' conservado (5'CS), donde se encuentra el gen *intl1*, el que codifica para una proteína denominada integrasa y que corresponde a una recombinasa sitio específica. Además, posee un extremo 3' conservado (3'CS) con los genes *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5* que codifican resistencia a compuestos de amonio cuaternario, bromuro de etidio, sulfonamidas y a una proteína de función desconocida, respectivamente. Entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra una zona variable con presencia o ausencia de *cassettes* genéticos de resistencia.

Recientemente se informó la presencia de integrones clase 1 complejos (ejemplos, In35 e InS21, descritos en Argentina), los cuales presentan una duplicación parcial o completa del extremo 3'CS. En este caso los *cassettes* genéticos se ubican entre el 5'-CS y la primera copia del 3'CS, tal como en un integrón clase 1 tradicional. Entre el segundo 3'CS se halla una región conservada de 2.100 pb, que incluye la secuencia *ISCR1* y una segunda región variable adyacente, donde se han encontrado insertos genes *bla*_{CTX-M}. La secuencia *ISCR1* contiene un único marco de lectura, *orf513*, que codifica para una recombinasa putativa.

Hasta el momento no existen publicaciones en Chile que asocien la presencia del gen *bla*_{CTX-M-2} a este tipo de estructuras genéticas, por lo cual, el Objetivo General de esta Tesis fue caracterizar el ambiente genético del gen *bla*_{CTX-M-2} presente en cepas de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* aisladas en hospitales chilenos.

En este estudio se incluyeron 6 cepas de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (K143, K283, K288, K291, K292, y K296) multirresistentes productoras de la BLEE CTX-M2, y también la cepa transconjugante K283^{tr}. Se caracterizó, mediante PCR, la zona variable del integrón clase 1 presente en estas cepas, como también la duplicación del extremo 3' CS del integrón clase 1 complejo, utilizando combinaciones de partidores específicos descritos en la literatura internacional, y se comparó los resultados con los obtenidos en la cepa control UC244 (In35+). De acuerdo a los resultados de los experimentos anteriores, y de un estudio de clonalidad de las cepas, se secuenció los productos de amplificación del ambiente genético del gen *bla*_{CTX-M2} de la cepa K283. Para el ensamblaje y análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas se utilizaron diversos programas computacionales.

Los resultados revelaron que, en todas las cepas estudiadas, incluyendo la cepa K283^{tr}, el gen *bla*_{CTX-M2} se encuentra inserto en un integrón clase 1 complejo, asociado a la presencia de la secuencia *ISCR1*. La arquitectura de este integrón es similar a los integrones clase 1 complejos detectados en Argentina y Uruguay.

Se determinó que la zona variable del integrón clase 1 contiene el siguiente ordenamiento de *cassettes* genéticos: *aac(6ⁱ)-Ib*, *bla*_{OXA2} y *orfD*. Corriente abajo del primer extremo 3'CS, se encontró una zona de 2.985 pb que posee un 95% de identidad con los primeros integrones clase 1 complejos descritos, In6 e In7, e incluye la secuencia *ISCR1*. Al hacer el alineamiento múltiple de la secuencia codificante de *orf513*, se determinó que comparte 100% de identidad con aquella descrita para los integrones In35 e InK13, descritos en Argentina y Uruguay, respectivamente. Corriente abajo de esta secuencia, se

encontró ubicado el gen *bla*_{CTX-M2}, que comparte un 98% de identidad con *bla*_{KLUA-1} de *Kluyvera ascorbata*.

La secuencia corriente abajo del gen *bla*_{CTX-M2} se puede dividir en dos partes: una región homóloga a *bla*_{KLU-A-1}, la secuencia ORF3 (88% homóloga con la de *K. ascorbata*) y el gen *qacEΔ1*, el cual es el primer componente de la duplicación del extremo 3' del integrón clase 1 complejo.

Se concluye que el gen *bla*_{CTX-M2} presente en cepas hospitalarias de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* se encuentra en un integrón clase 1 complejo, denominado InK283, adyacente a la secuencia ISCR1, y de igual arquitectura que aquellos integrones descritos en Argentina y Uruguay. Este integrón clase 1 complejo se encuentra ubicado en un plásmido conjugativo, que podría estar movilizándose entre las cepas chilenas.

