

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTADES DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
FARMACIA Y BIOQUÍMICA, Y MEDICINA**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA**

**TESINA**

**Caracterización molecular de los integrones  
de clase1 en *Proteus mirabilis***

**Maestranda: María Adelaida Turina**

**Directora: Prof. Dra. Daniela Centrón**

**Directora Adjunta: Dra. María Paula Quiroga**

**Año 2015**

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Medicina

IMPAM (CONICET-UBA)

Laboratorio de Investigaciones de Mecanismos de Resistencia a Antibióticos

**Dedicatoria y agradecimientos.**

*A mi familia motor y pilar de todos mis sueños.*

*A los pacientes que me enseñan algo cada día y por los cuales estudio y trabajo.*

*A mi directora y directora adjunta de Tesis:*

*Prof. Dra. Daniela Centrón por su generosidad y paciencia y haberme brindado la posibilidad de desarrollar mi tesis en su laboratorio.*

*Y Dra. Paula Quiroga por sus consejos, enseñanzas e invaluable dedicación.*

*A la Dra Nancy Castañeda por su colaboración en el área experimental.*

*Agradezco también a todos los docentes de esta Maestría.*



# ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA y AGRADECIMIENTOS</b>	2
<b>1. INTRODUCCION</b>	7
1.1. Problemática de la resistencia antibiótica	7
1.2. Integrón	7
1.2.a) Reseña histórica	7
1.2.b) Definición de Integrón	9
1.2.c) Integrón de clase 1	11
1.2.d) Genes <i>Cassettes</i>	13
1.2.e) Integrasas	14
1.2.f) Integrones clase 1 complejos	16
1.2.g) Epidemiología de los integrones	16
1.2.h) Movilización de los integrones	17
1.3. Transposones	18
1.4. <i>Proteus mirabilis</i>	20
1.4.a) Propiedades generales. Epidemiología.	20
1.4.b) El género <i>Proteus</i>	21
1.4.c) Diferenciación fenotípica	22
1.4.d) Importancia clínica	22
1.4.e) Sensibilidad antimicrobiana	24
<b>2. OBJETIVO</b>	27
<b>3. HIPÓTESIS</b>	28



<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	29
4.1. Recolección de las muestras	29
4.2. Identificación de los aislamientos con el sistema API 20 NE	30
4.3. Test de sensibilidad a antimicrobianos	31
4.4. Extracción de ADN total	31
4.5. Medición de ADN	32
4.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).Cartografía por PCR	32
4.7. Geles de agarosa	36
4.8. Metodología utilizada para enviar a secuenciar los productos de amplificación por PCR	37
4.9. Análisis de bioinformática	37
4.10. Medios de cultivo, soluciones, <i>buffers</i> y otros reactivos utilizados de rutina	38
<b>5. RESULTADOS</b>	41
5.1. Determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos	41
5.2. Identificación de integrones de clase 1	46
5.2.a) Integrones de clase 1 complejos	51
5.2.b) Abundancia de los integrones de clase 1 a lo largo del período estudiado	53
5.3 Análisis bioinformático de la dispersión de integrones de clase 1 en <i>P.mirabilis</i>	56
<b>6. DISCUSIÓN</b>	61
<b>7. CONCLUSIONES</b>	70



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 4.6 a.</b> Secuencias de los cebadores utilizados en este estudio	35
<b>Tabla 5.1a.</b> Caracterización molecular de los integrones de clase 1 en <i>P.mirabilis</i> y datos de resistencia a los antimicrobianos	42
<b>Tabla 5.1b.</b> Porcentaje de aislamientos resistentes a los antimicrobianos testeados	46
<b>Tabla 5.2a.</b> Genes <i>cassettes</i> encontrados en los integrones de clase 1	48
<b>Tabla 5.2b.</b> Total de integrones de clase 1 encontrados en los aislamientos de <i>P. mirabilis</i>	49
<b>Tabla 5.2aa.</b> Integrones de clase 1 complejos encontrados en los aislamientos de <i>P. mirabilis</i>	52
<b>Tabla 5.3 a</b> Zonas variables de Integrones clase 1 en aislamientos de <i>P. mirabilis</i> publicados en INTEGRALL	58

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.2ba.</b> Estructura general del integrón	9
<b>Figura 1.2c.a.</b> Esquema del integrón clase 1 In2	12
<b>Figura 1.2h.a.</b> Localización celular de los integrones y genes <i>cassettes</i>	17
<b>Figura 1.2h.b.</b> Integrones de clase 1 y clase 2, y su asociación a transposones y secuencias de inserción	18
<b>Figura 4.6a.</b> Cartografía por PCR	34
<b>Figura 5.2a.</b> Cartografía por PCR para In35	47
<b>Figura 5.2aa.</b> Estructura del integrón clase 1 complejo In35	51



<b>Figura 5.2b.a.</b> Número de integrones de clase 1 presentes en cada cepa de <i>P. mirabilis</i>	54
<b>Figura 5.2b.b.</b> Número de familias de antimicrobianos a las que <i>P. mirabilis</i> presenta resistencia, en función del número de integrones presentes en los mismos	55
<b>RESUMEN</b>	75
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	79
<b>ANEXO</b>	95



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Problemática de la resistencia antibiótica

Según datos publicados por el C.D.C. hay en EEUU 90.000 muertes por año debidas a infecciones intrahospitalarias, 40.000 muertes por año debidas a cáncer de mama y 17.000 muertes al año debidas a HIV/ SIDA, lo cual muestra la importancia que poseen las infecciones intrahospitalarias.

Las bacterias son la forma de vida más antigua conocida en el planeta y han evolucionado de manera ininterrumpida. Se consideraba que lo hacían por un mecanismo de evolución clásica, donde las mutaciones jugaban un rol importante. Pero en los últimos años se habla de evolución moderna, donde no sólo entran en juego las mutaciones como un mecanismo genético importante para evolucionar y hacer a las bacterias resistentes a los antimicrobianos, sino que además se han puesto en evidencia otros mecanismos como la Transferencia Horizontal Genética (THG), el cual es un mecanismo complejo, multifactorial, e importante en la evolución de distintos organismos.

## 1.2. Integrón

### 1.2.a) Reseña histórica

Al poco tiempo de la introducción de la terapia antibiótica en 1950, para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos, se inició la presión de antimicrobianos en la comunidad, específicamente en los hospitales, que llevó a seleccionar eventos asociados a mutaciones puntuales, y en menor grado al desarrollo *de novo* de resistencias; pero el mayor motivo se debió, como se mencionó anteriormente, a que los

microorganismos adquirieron la resistencia a partir de la THG y se comenzó a hablar de una herencia extra cromosómica. Se encontró entonces, que varios aislamientos correspondientes a bacterias patógenas habían desarrollado resistencia a la mayoría de los antibióticos utilizados en la clínica (Liebert, C.A. y col., 1999). Más aún, cada aislamiento demostró ser resistente a más de una familia de antibióticos creándose una nomenclatura para este tipo de organismos, bacterias multirresistentes. Esta resistencia a los antimicrobianos es el mejor ejemplo del proceso de presión-selección y adaptación genómica y fenotípica basada en la THG, ya que aproximadamente el 80% de las resistencias son debidas a la THG.

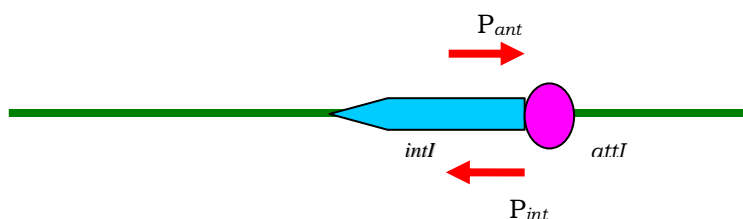
En 1970, se determinó que la adquisición de diferentes genes que subministraban a la bacteria nuevos mecanismos para una mejor adaptación a diversos ambientes, estaba mediada por diferentes elementos móviles como plásmidos (conjugativos y movilizables), transposones y secuencias de inserción capaces de transferir su material de un organismo a otro mediante mecanismos como conjugación, transformación y transducción de genes, siendo estos los mecanismos más conocidos de THG en las bacterias. Mientras que los plásmidos participan en la diseminación de la resistencia antibiótica a nivel celular, los transposones promueven el intercambio a nivel molecular. De esta manera, se comenzó a asociar a la multirresistencia antibiótica con la THG. Pero recién para 1980, se comenzó a estudiar que había una única estructura o plataforma que se construía intercambiando bloques de genes de resistencia y así se publicaron numerosos trabajos de distintos grupos de Australia, Suecia y Canadá que caracterizaron a aquellos elementos genéticos asociados a la adquisición y pérdida de genes, los que fueron identificados como integrones (Stokes, H. W. y Hall, R. M., 1989). Se postula que éstos comenzaron a contribuir con la dispersión de la multirresistencia hacia el año 1950 como lo indica el involucramiento del transposón



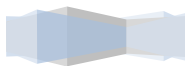
Tn21, un transposón que contiene un integrón de clase 1 (Liebert y col., 1999). Estudios con enzimas de restricción y técnicas de hibridación y el desarrollo de la técnica de secuenciación del ADN evidenciaron que diferentes genes de resistencia a antibióticos se encontraban en la misma ubicación en plásmidos relacionados, o en transposones y mostró que muchos de los genes de resistencia en bacterias gram-negativas se encontraban en un contexto genético similar (Ward y Grinsted, 1982). De esta forma, se descubrió un nuevo sistema de recombinación sitio-específica, totalmente independiente de la proteína RecA, encargada de los eventos de recombinación homóloga (Collis C.M y col., 1993).

### 1.2.b) Definición de Integrón

La definición actual de integrón es aquella formulada por Hall y Collis en el año 1995, en la cual se define al integrón como un elemento que contiene los determinantes genéticos para mediar la recombinación sitio-específica, siendo capaz de reconocer y capturar genes *cassettes* móviles. La estructura básica de un integrón consta de un gen que codifica para la integrasa (*intI*), un sitio de recombinación (*attI*) y un promotor que permite la expresión del o los genes *cassettes* que sean incorporados en forma consecutiva río abajo del gen de la integrasa (Hall y Collis, 1995) (Figura 1.2b.a).



**Figura 1.2b.a.** Estructura general del integrón: *intI*, gen que codifica para la integrasa; *attI*, sitio de recombinación;  $P_{int}$ , promotor que permite la expresión del gen de la integrasa y  $P_{ant}$  promotor que permitirá la expresión del o de los *cassettes* que sean incorporados en la estructura del integrón.



Los genes *cassettes* están formados por una secuencia codificante, seguida en el extremo 3' por un sitio de recombinación denominado *attC* o elemento de 59 bases (59-be) (Hall y col., 1991; Collis y Hall, 1992 a y b; Hall y Collis, 1995).

La integrasa codificada dentro de la estructura del integrón cataliza la recombinación sitio-específica *RecA* independiente entre el sitio *attC* de los genes *cassettes* y el sitio *attI*, de manera tal que las bacterias portadoras de integrones tienen la posibilidad de capturar y expresar genes encontrados en el citoplasma bacteriano bajo la forma de genes *cassettes* (Recchia y Hall 1995; Mazel, 2006). Por tanto pueden incorporar de esta manera un nuevo determinante de resistencia a antibióticos, o de resistencia a metales pesados, o de patogenicidad, o una nueva función metabólica, o una enzima de restricción, etc.; lo cual les brinda la posibilidad de poseer una mejor adaptación al medio ambiente donde se desarrollan (Partridge y col., 2009).

Los integrones fueron descritos por primera vez en aislamientos clínicos como pequeños arreglos de genes de resistencia a antibióticos. Posteriormente, se reportaron en el cromosoma de bacterias ambientales (Rowe-Magnus y col., 1999), y hoy en día se sabe que se encuentran ampliamente distribuidos en los diferentes géneros bacterianos y nichos ecológicos (Boucher y col., 2007). Se puede agrupar a los integrones con fines didácticos en dos grandes grupos: i) aquellos que se encuentran asociados a elementos móviles, los cuales en general están involucrados en la diseminación de la multirresistencia a antibióticos y ii) los hallados en el cromosoma de diferentes especies bacterianas, generalmente no patógenas y no asociadas a la multirresistencia antibiótica (Mazel, 2006).

Los integrones no son elementos móviles *per se*, sin embargo los genes *cassettes* incorporados en su estructura sí lo son, ya que tienen la capacidad de movilizarse de una región del genoma bacteriano a otra. Hasta la fecha, al menos cinco clases de integrones



asociados a elementos móviles han sido documentados. Esta clasificación se basa en la secuencia nucleotídica de la integrasa que codifican (Mazel, 2006). Muy brevemente se detallarán a continuación las diferentes clases.

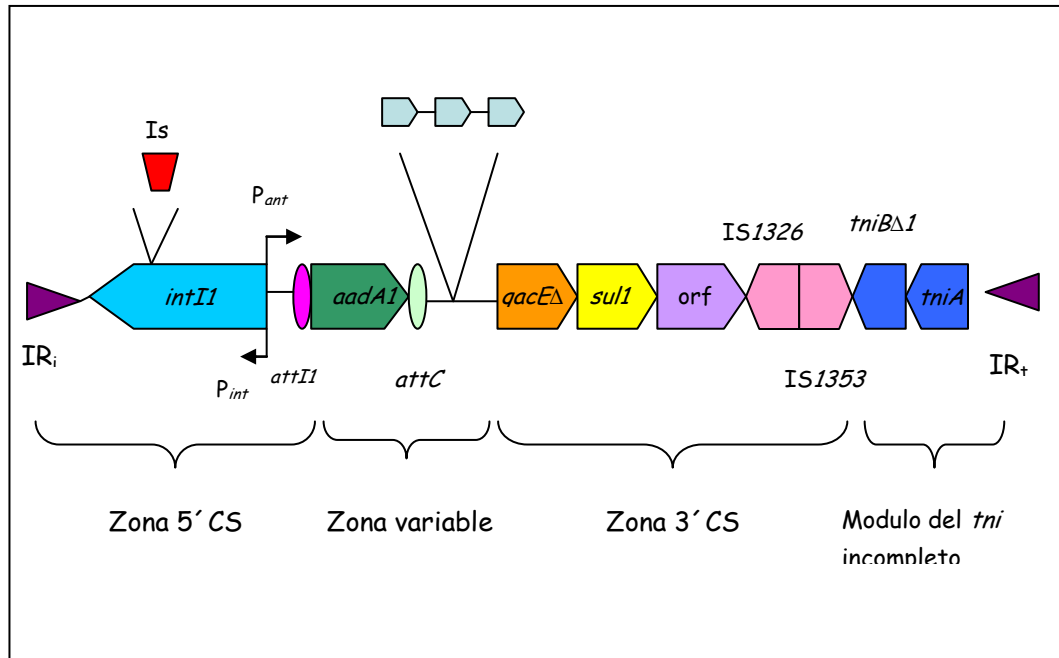
- i) Los integrones de clase 1 están asociados con transposones, defectivos o no, derivados del Tn402, que pueden estar embebidos en otros transposones más grandes, como es el caso del Tn21 (Radstrom y col., 1994; Brown y col., 1996).
- ii) Los integrones de clase 2 se encuentran, en la mayoría de los casos, asociados al transposón Tn7 y derivados (Sundstrom y col., 1991; Radstrom y col., 1994).
- iii) Los integrones de clase 3 se piensa que están localizados en transposones (Collis y col. 2002), los cuales están a su vez dentro de plásmidos aún no caracterizados, y han sido escasamente reportados (Arakawa y col., 1995; Shibata y col., 2003).
- iv) Las otras dos clases de integrones, de clase 4 y de clase 5, han sido identificadas debido a su contribución en la resistencia a trimetroprima en especies de *Vibrio* spp..

### 1.2.c) Integrón de clase 1

Los integrones de clase 1 son los más dispersos en los aislamientos clínicos de bacterias gram-negativas multirresistentes y están formados por una región denominada 5' conservada (5'-CS), compuesta por el gen de la integrasa de tipo 1 *intI1* (con su respectivo promotor), el sitio de recombinación *attI1* y el promotor  $P_{ant}$  (Leverstein-van Hall y col., 2003; Hall y Collis 1995). En el extremo exterior del gen de la integrasa se encuentra una secuencia de 25 pares de bases, denominada IRi; dicha secuencia es una repetición invertida de otra secuencia localizada río abajo de los genes insertados en el *attI1*, llamada IRt. Tanto IRi como IRt son sitios de reconocimiento para la transposición mediada por los transposones del tipo Tn402, de esta forma, se facilita el movimiento de la unidad móvil, en



la cual se encuentra inmerso el integrón de clase 1 (Figura 1.2c.a) (Kholodii y col., 1995; Kamali-Moghaddam y col., 2001).



**Figura 1.2c.a. Esquema del integrón de clase 1 In2.** En otros integrones de clase 1 pueden aparecer otros *cassettes* en la zona variable, y otras secuencias de inserción, en diferentes localizaciones.

La zona en la cual se encuentran los genes *cassettes* se denomina zona variable (VR), y puede contener desde ningún hasta 8 genes *cassettes* (Bissonnette y col., 1992; Naas y col., 2001). Esta región se encuentra río abajo del sitio de recombinación *attI1*.

En los primeros estudios de los integrones de clase 1, se definía una región 3' conservada (3'-CS), conteniendo tres marcos de lectura abierta (*qacEΔ1*, *sul1* y *orf5*), localizada río abajo de los diferentes arreglos de genes *cassettes* presentes en la zona variable del integrón (Levesque y col., 1994; Stokes y col., 1997). El gen *qacE* codifica para una proteína de membrana que da resistencia a amonios cuaternarios (antisépticos y desinfectantes) (Rouch y col., 1990; Neyfakh y col., 1991), mientras que cuando posee la delección (*qacEΔ1*)

confiere solo una resistencia marginal (Paulsen y col., 1993); *sulI* codifica para una proteína que confiere resistencia a las sulfonamidas (Swedberg y col., 1987); mientras que la función del producto que codifica el marco de lectura abierta *orf5* no ha sido aún dilucidada.

Sin embargo, estudios más recientes revelaron que, pese a que la mayoría de los integrones de clase 1 poseen la región 3'CS, existen muchos que, o bien poseen una región 3'CS de largo variable, pudiendo aparecer otros marcos de lectura abierta río abajo del *orf5*, como también la región 3'CS puede estar invadida por secuencias de inserción, o bien esta región 3'CS puede ausentarse por completo, como es el caso del Tn402 (Hall y col., 1994; Brown y col., 1996; Post y col., 2007).

Diferentes estudios realizados relacionados a la búsqueda de integrones de clase 1 han evidenciado la presencia de integrones en aproximadamente el 60-70% de los aislamientos multirresistentes, exponiendo la relación entre la multirresistencia y la presencia de integrones de clase 1 (Martínez-Freijo y col., 1998; Fluit y Schmitz, 1999; van Belkum y col., 2001; Nemeč y col., 2004; Peng y col., 2007).

#### **1.2.d) Genes *cassettes***

Los genes *cassettes*, como anteriormente ha sido mencionado, consisten en una secuencia codificante (*orf*), la cual en la mayoría de los casos no posee promotor propio, seguida de una secuencia repetida denominada sitio *attC* (antes denominado elemento 59-be). La función de los sitios *attCs* es proveer al gen *cassette* del sitio de recombinación para lograr la escisión o la integración del mismo en el genoma bacteriano. La integrasa reconoce estas estructuras (*attC*) y cataliza los procesos de recombinación sitio-específicos, ya sea integración o escisión entre *attI* x *attC* (evento más frecuente) o entre *attC* x *attC*



(Martínez y De la Cruz 1990; Hall y col., 1991; Stokes y col., 1997). Los *attCs*, no solo poseen un largo variable desde 57 a 141 pares de bases (Recchia y col., 1995), sino que también poseen una secuencia que varía de un *attC* a otro, quedando restringida la similitud nucleotídica hacia los extremos de dicha estructura. Las secuencias conservadas se denominan *inverse core site* (ICS), dicho sitio está formado por la secuencia 5' RYYAAC 3' (R: purina, Y: pirimidina) también conocido como 1L y *core site* (CS) formado por la secuencia 5'GTTRRRY 3' y también denominado 1R, siendo el punto de recombinación entre la G y T de esta última secuencia (Stokes y col., 1997; Collis y col., 1998). Se postula que los genes *cassettes* se encontrarían disueltos en el citoplasma bacteriano bajo una forma circular simple cadena de ADN (Collis y Hall, 1992) o bien formando parte de la estructura del integrón, en forma lineal y doble cadena.

Hasta la fecha hay descriptos más de 100 genes *cassettes*, de los cuales el 90% de ellos corresponde a genes *cassettes* de resistencia antimicrobiana, abarcando casi todas las familias de antibióticos disponibles en la clínica (Mazel y Davies, 1998; Fluit y Schmitz 1999; Ploy y col., 2000; Orman B. Tesis doctoral 2007). También han sido descriptos genes *cassettes* involucrados en patogenicidad (Ogawa y Takeda 1993), enzimas metabólicas (Barker y Manning 1997; Rowe Magnus y Mazel, 2001), enzimas de restricción (Rowe Magnus y Mazel 2001; Vaisvila y col., 2001) y de varios de ellos no ha sido aún dilucidada su función (Centrón y Roy 2002; Peters y col., 2001).

### 1.2.e) Integrasas

Existen dos familias de recombinasas sitio-específicas basadas en su secuencia aminoacídica y residuos catalíticos: las tirosina-recombinasas y las serina-recombinasas (Esposito y Scocca 1997; Nunes-Duby y col., 1998, Smith y Thorpe, 2002).



Las integrasas procarióticas asociadas a la resistencia a antibióticos pertenecen al grupo de las tirosina-recombinasas. Estas poseen varios residuos y motivos conservados involucrados activamente en el proceso de recombinación o en el plegado de la proteína (Esposito y Scocca 1997; Hansson y col., 1997; Messier y col., 2001).

Un alineamiento de las secuencias proteicas de integrasas de integrones (*IntI*) junto con otras tirosina-recombinasas reveló que las primeras poseen, no sólo todas las regiones conservadas con sus respectivos roles (Gravel y col., 1998), sino que también un dominio adicional conservado de aproximadamente 35 residuos. En algunas de las *IntIs*, entre ellas la integrasa de tipo 1, existe una secuencia altamente conservada dentro del dominio adicional, la cual se encuentra formada por los aminoácidos alanina, leucina, glutamato y arginina, ALER, la cual pareciera estar involucrada en la estabilización y posicionamiento del sitio activo o en la interacción con los *cassettes* a ser insertados (Nield y col., 2001). Las diferentes tipos de *IntIs* poseen entre sí una similitud, en cuanto a su secuencia proteica, que va desde un 41 a un 57%, mientras que la similitud con el resto de las tirosina-recombinasas es menos de un 25% (Nunes-Duby y col., 1998).

Como ha sido comentado con anterioridad, las integrasas forman parte de la estructura del integrón y suelen encontrarse asociadas a genes *cassettes*. Sin embargo, varias integrasas han sido halladas solas en los genomas bacterianos (Nield y col., 2001; Nemergut y col., 2004; Boucher y col., 2007). Así como los genes *cassettes* están asociados al sitio de recombinación *attC*, cada integrasa está asociada con un sitio único de reconocimiento y unión, denominado *attI*, el cual está involucrado en la recombinación sitio-específica. Este sitio *attI* difiere en la estructura y el tamaño con sus homólogos reconocidos por otras tirosina-recombinasas (Grindley y col., 2006). Por esta razón, se sugirió que los sitios de recombinación *attI* son específicos para las integrasas bacterianas.



### 1.2.f) Integrones clase 1 complejos

Los integrones complejos, son una versión extendida de los integrones de clase 1. Están formados por una región 5'CS donde se encuentra el gen de la integrasa de tipo 1, el sitio *attI1* y los promotores, una región variable (VR-1), seguido de una primer región 3'CS (3'CS1), luego una región común (CR) con el gen de la recombinasa sitio específica *orf513* o *ISCR1*, seguido por una segunda región variable (VR-2) donde se localizan los genes de resistencia a antimicrobianos tales como *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y una duplicación parcial de la región 3'CS (3'CS2) (Toleman y col., 2006).

### 1.2.g) Epidemiología de los integrones

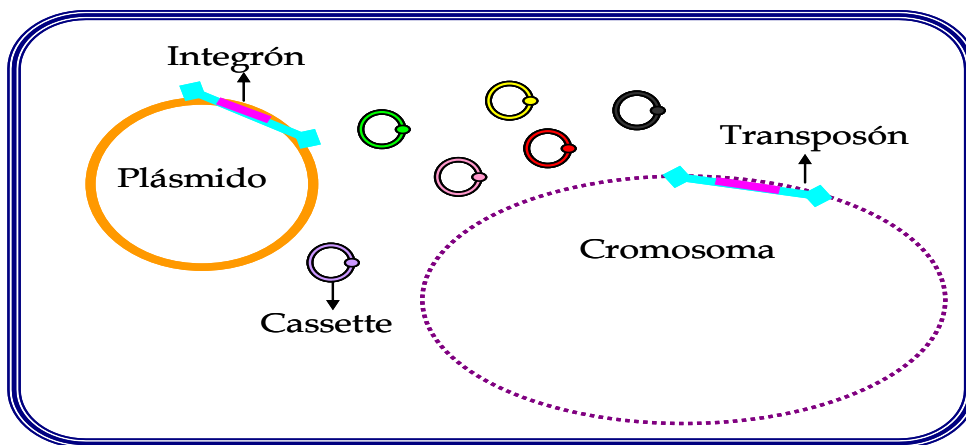
Los integrones se encuentran ampliamente distribuidos en las bacterias gram-negativas tanto clínicas como ambientales, en especial, en los diferentes géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (White y col., 2001), en la familia *Pseudomonaceae* (Vaisvila y col., 2001; Coleman y Holmes 2005; Yu y col., 2006; Gu y col., 2007), en algunos miembros de la familia *Vibrionaceae* (Heidelberg y col., 2000), en diversos aislamientos de *Acinetobacter baumannii* (Segal y Elisha 1997; Seward 1999; Gu y col., 2007), en aislamientos de *Aeromonas* spp. (Chang y col., 2007; Neuwirth y col., 2007), en *Xanthomonas* spp. (Rowe-Magnus y col., 1999; Gillings y col., 2005), en aislamientos de *Shewanella oneidensis* (Drouin y col., 2002), *Nitrosomonas europea* (León y Roy 2003) y en *Treponema denticola* (Coleman y col., 2004).

Además, los integrones no están restringidos a bacterias gram-negativas ya que varios fueron descritos en bacterias gram-positivas, como ser *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium fortuitum* (Martín y col., 1990; Nesvera y col., 1998) y *Staphylococcus aureus* (Xu y col., 2007).



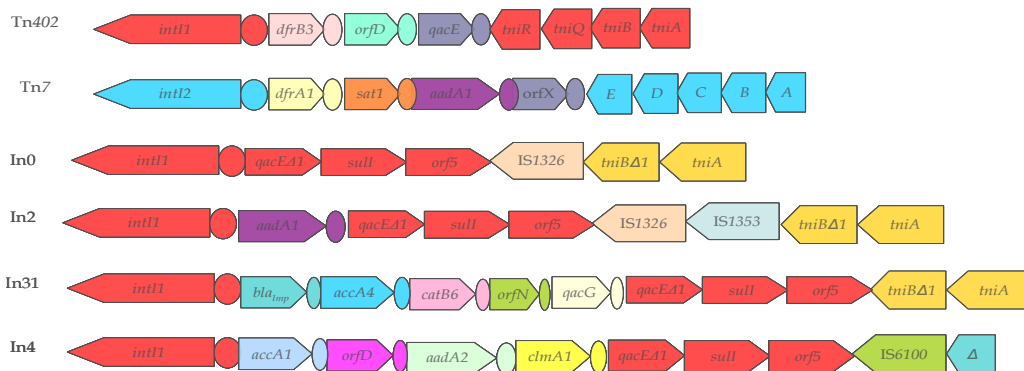
### 1.2.h) Movilización de los integrones

Los integrones *per se* no son elementos móviles. La estrategia genética que han encontrado para moverse a diferentes zonas del genoma bacteriano o de una bacteria a otra contribuyendo así en mucho a la diseminación de la resistencia a antibióticos entre otros factores, es asociarse a: 1) transposones, principalmente asociados a las familias de los Tn: Tn21, Tn402, Tn1403, Tn1464, Tn1469, Tn1412, Tn2424, Tn7 y Tn2000; 2) o a Secuencias de inserción (IS) como ser las IS26, IS1999, IS2000, IS6100, IS1326, IS1353, ISCR1 entre otras (Recchia y Hall 1997; Naas y col., 1998; Pitout y col., 1998; Preston y col., 1999; Partridge y col., 2001; Arduino y col., 2003; Quiroga y col., 2007); 3) y/o plásmidos, la mayoría de los cuales son conjugativos o mobilizables por ejemplo R388, R751, R483, pRSB105, pSa, R46, pVS1, pACM1 (Simonsen y col., 1983; Hirsch y col., 1986; Radstrom y col., 1994; Preston y col., 1999; Schlüter y col., 2007) (Figura 1.2h.a y 1.2h.b).



**Figura 1.2h.a.** Localización celular de los integrones y genes *cassettes* asociados a transposones y plásmidos, lo que permite la dispersión de dicho elemento. (Figura tomada de tesis doctoral de Ma. Soledad Ramírez).





**Figura 1.2h.b.** Integrones de clase 1 y clase 2, y su asociación a transposones y secuencias de inserción. (Figura tomada de tesis doctoral de Ma. Soledad Ramírez).

### 1.3. Transposones

Se denomina transposición al evento genético de recombinación no homóloga en el cual hay ruptura de enlaces y formación de enlaces fosfodiéster (Kleckner 1981; Craig 1996), como consecuencia de lo cual, una secuencia de ADN (transposón) es movilizada/copiada de un sitio a otro, generalmente no relacionado, ya sea en la misma molécula de ADN o en otra molécula.

Los transposones (Tn) son elementos genéticos móviles. Estos codifican para una proteína o complejo proteico denominado transposasa, encargado de mediar la transposición. Los mismos poseen en sus extremos pequeñas secuencias repetitivas invertidas denominadas IR, las cuales en la mayoría de los casos son idénticas o casi idénticas entre sí, siendo éstas las secuencias reconocidas por la transposasa para mediar la transposición (Craig, 1996).

Los Tn se encuentran muy distribuidos entre las diferentes especies bacterianas, siendo los responsables de la mayoría de los arreglos de ADN observados en el ADN bacteriano. El sitio blanco de un Tn, es la secuencia nucleotídica reconocida por la transposasa que corresponde al lugar de inserción del Tn. Los diferentes Tn difieren en el

nivel de selectividad hacia el sitio blanco respectivo. Algunos Tn, por ejemplo el transposón Tn5, se insertan en diversos lugares, en contraste con el transposón Tn402, el cual posee un mecanismo de inserción sitio-específico el cual lo moviliza a un sitio único dentro del cromosoma bacteriano, los denominados sitios *res* (Minakhina y col. 1999).

Además, los Tn poseen diferentes funciones, así es como algunos sólo poseen la capacidad de mover un segmento de ADN de un lugar a otro, mientras que otros movilizan genes que confieren alguna función adaptativa a la célula hospedadora del mismo (por ej, resistencia antibiótica). Diversas clasificaciones han sido utilizadas para hacer referencia a los distintos Tn, algunas los clasifican de acuerdo a la estructura, otros de acuerdo a la función, etc. Así por ejemplo se los puede dividir en tres grupos: Los Tn del grupo I, Tn del grupo II y los Tn del grupo III. Dentro de los Tn del grupo II o no compuestos, estos poseen una estructura más compleja que los elementos descritos anteriormente. No se encuentran flanqueados por elementos ISs, estos son de mucha importancia en la clínica, ya que son extremadamente eficientes en la diseminación de genes relacionados con la resistencia a antibióticos, metales pesados y a determinantes de patogenicidad. Poseen un gen que codifica para la transposasa (*tnp*) y uno que codifica para una recombinasa sitio específica llamada resolvasa (*tnpR*) (Liebert y col., 1999). Este grupo ha sido dividido en dos subgrupos: 1) subgrupo Tn3 y 2) subgrupo Tn21. Como ejemplos del segundo grupo encontramos al Tn21 (20 kb). La importancia de éste elemento, radica en su capacidad para favorecer la diseminación de la resistencia antibiótica múltiple. La mayoría de los integrones de clase 1, documentados hasta la fecha, mantienen alguna característica de su asociación con los Tn21 y Tn402.



#### **1.4. *Proteus mirabilis***

Se mencionó en párrafos anteriores que los integrones están ampliamente distribuidos en aislamientos clínicos, especialmente en la familia *Enterobacteriaceae* la cual es un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas y uno de los de mayor importancia médica. Dentro de esta familia se encuentra la Tribu Proteae a la que pertenece el género y especie *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*).

##### **1.4.a) Propiedades generales. Epidemiología**

Los miembros de la familia de las enterobacterias se encuentran ampliamente distribuidos en la tierra y en las plantas y son colonos normales del tracto intestinal de los seres humanos y los animales (Mandell 4° ed).

Estas bacterias explican aproximadamente el 80% de los aislamientos importantes de bacterias Gram negativas en el laboratorio clínico y alrededor del 50% de todos los clínicamente importantes. Estos microorganismos no se encuentran normalmente fuera del tracto gastrointestinal pero constituyen una causa muy importante de infecciones fuera de él. Por lo que los individuos con alteración de las barreras anatómicas normales contra la colonización y/o los pacientes hospitalizados, debidos a distintos tipos de estrés, son particularmente susceptibles a las colonización e infección por enterobacterias, lo que a menudo conduce a infecciones urinarias, neumonía, septicemia, meningitis, formación de abscesos, infecciones óseas y articulares, etc. De este modo estos microorganismos se encuentran entre las causas principales de infección intrahospitalaria (IIH) (Mandell 4° ed).

Se ha calculado que alrededor de un tercio de los aislamientos en septicemias, dos tercios de los aislamientos de las infecciones gastrointestinales bacterianas y un 75% de las del



tracto urinario son causadas por enterobacterias (Mandell 4° ed.; Schaberg, D.R. y col., 1991). Según datos de la red Whonet de Argentina (<http://whonet.org/DNN/>) (en el período comprendido entre enero-junio del 2007) de 55.685 aislamientos bacterianos totales, 6919 fueron microorganismos provenientes de IHH y de estos 42% son enterobacterias, entre las cuales, también existe una tendencia perturbadora a la recuperación de más especies resistentes a los antimicrobianos.

#### **1.4.b) El género *Proteus***

La taxonomía de la Tribu *Proteae* es una fascinante historia que está inmersa en la historia de la evolución de la ciencia microbiológica. Las especies dentro de este género que son comúnmente aisladas en laboratorios clínicos, no son consideradas patógenos *per se*, a diferencia de algunos otros miembros de la Familia *Enterobacteriaceae*.

Como otros patógenos oportunistas, el género *Proteus* también pueden causar morbi-mortalidad y puede ser capaz de causar enfermedades infecciosas de importancia en el ser humano. Su presencia en fluidos corporales naturalmente estériles y en algunas lesiones profundas o superficiales podría conducir a la sospecha de su rol etiológico. Si bien sus patrones de sensibilidad pueden ser considerados anticipadamente y muchos de estos microorganismos son fácilmente tratados, algunos problemas se han incrementado con el advenimiento de nuevos antimicrobianos de más amplio espectro que generan un ambiente favorable para la selección de cepas resistentes (O'Hara C. y col., 2000). El género *Proteus* descrito por primera vez por Hauser, actualmente consiste en 5 especies denominadas: *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, *P. myxofaciens* y *P. hauseri* y tres genoespecies sin denominación: *Proteus* genoespecies 4, 5 y 6 (O'hara C. y col., 2000).

#### 1.4.c) Diferenciación fenotípica

El género *Proteus* incluye bacilos Gram negativos (BGN) fermentadores de glucosa, lactosa negativos, móviles y que producen fenilalanina deaminasa. Existen varias especies del género *Proteus*, pero *P. mirabilis* y *P. vulgaris* dan cuenta o explican la vasta mayoría de los aislamientos clínicos de éste género. Ambos producen ureasa y *P. vulgaris* además es indol positivo. Miembros de éste género también producen sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>) (Koneman y col Diagnostic Microbiology Fifth editon). Estas bacterias tienen una movilidad característica que les da capacidad de “swarming” que los diferencia de las enterobacterias típicas, expresando fimbrias y miles de flagelos que translocan rápidamente a través de la superficie de la placa de agar. De hecho el nombre “*Proteus*” fue elegido por un personaje de la Odisea de Homero, quien era capaz de cambiar de forma (Mandell 6° ed.; O’hara C. y col., 2000).

#### 1.4.d) Importancia clínica

La mayoría de las infecciones por *Proteus spp.* se deben a *P. mirabilis*. Hasta un 10% de todas las infecciones no complicadas de las vías urinarias son causadas por esta especie. *Proteus spp* representa aproximadamente el 3 % en las infecciones nosocomiales (datos de la red WHONET 2007: <http://whonet.org/DNN/>) pudiendo causar infecciones de heridas, neumonía, empiema, bacteriemia y septicemia, meningoencefalitis neonatal y osteomielitis en pacientes con inmuno comprometido o enfermedades de base debilitantes como diabetes. En el hospital general de agudos Dr. Ignacio Pirovano de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Argentina) durante el período 2000-2005, *P. mirabilis* se encontró entre los diez primeros microorganismos más frecuentemente aislados en IHH



variando según el servicio de internación entre 3,61% y 4,92% del total de los aislamientos bacterianos, no sólo entre las enterobacterias (Turina, M. A., 2007). Como sucede con muchas infecciones oportunistas, el reservorio para muchas IIH por *P. mirabilis* resistentes a antimicrobianos es el tracto gastrointestinal de los pacientes (Mandell 4° ed).

El género *Proteus* se ubica entre el segundo y el tercer lugar, detrás de *E.coli* como causa de infecciones urinarias no complicadas, pielonefritis y prostatitis y ocasionalmente en huéspedes normales. También es aislado de hemocultivos, debido a bacteriemias secundarias a infecciones complicadas del tracto urinario, frecuentemente asociados a catéteres urinarios.

La patogénesis de las infecciones urinarias causadas por *P. mirabilis* ha recibido considerable atención. Estos microorganismos pueden producir varios tipos de pili, el más importante de los cuales es conocido como fimbria MR/P. Se ha demostrado en modelos murinos que la fimbria MR/P contribuye a la colonización de la vejiga. La habilidad de *P. mirabilis* de producir una potente ureasa ha sido confirmada como un factor de virulencia en este modelo murino de infección urinaria contribuyendo tanto a la colonización como a la formación de cálculos. De hecho, la enzima forma CO<sub>2</sub> y amonio al hidrolizar urea y alcaliniza la orina, lo cual conduce a la precipitación de estruvita y formación de cálculos y obstrucción de catéteres urinarios (Mandell 4° ed). Los cálculos urinarios sirven como cuerpos extraños en los cuales las bacterias son embebidas y de los cuales ellas emergen para causar infecciones recurrentes. Estas propiedades tienden a convertir a las infecciones causadas por *P. mirabilis* en crónicas y destructivas del parénquima renal. También se ha observado que la ureasa contribuye directamente a la toxicidad tubular renal, al elevar el pH urinario. *Proteus* spp. uropatógeno también sintetiza varias hemolisinas diferentes que pueden desempeñar un papel en la virulencia (Mandell 4° ed).

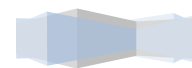
El tratamiento de infecciones causadas por *P. mirabilis* es generalmente sencillo porque la mayoría de las cepas son susceptibles a la mayoría de los antimicrobianos comúnmente utilizados excepto a tetraciclina, pero se han aislado cepas multirresistentes con cierta frecuencia (O'Hara CM y col., 2000).

#### **1.4.e) Sensibilidad antimicrobiana**

Como se ha mencionando, el patrón de infecciones con amenaza o riesgo de vida ha ido cambiando a lo largo del tiempo con las prácticas clínicas y la utilización de antimicrobianos. En los años recientes las infecciones causadas por BGN multiresistentes han sido crecientemente reconocidas como una importante causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes hospitalizados (Daikos, G.L. y col., 2007).

La utilización indiscriminada de antimicrobianos, contribuyó a seleccionar eventos asociados con mutaciones en el DNA cromosómico y en menor grado al desarrollo de resistencias *de novo*, pero el mayor impacto fue a través de la adquisición de genes de resistencia llevados por plásmidos o transposones. Y se conoce que una sustancial proporción de estos genes de resistencia, en BGN, son empaquetados como unidades móviles, discretas, pequeñas dentro de estructuras de DNA llamadas integrones. Estas estructuras genéticas operan en general como un sistema de captura de genes y proveen un poderoso mecanismo para la adquisición y diseminación de genes de resistencia a los antimicrobianos (Daikos, G.L. y col., 2007).

**Resistencia natural:** Al igual que todos los integrantes de la Tribu Proteae, *P. mirabilis* presenta resistencia intrínseca a nitrofuranos y polimixinas. La resistencia a tetraciclinas es otra característica de las especies de *Proteus*, pero es generalmente sensible a amino y ureido penicilinas (ampicilina, amoxicilina y piperacilina), cefalosporinas





(cefazolina, cefoxitina, cefuroxima, cefotaxima, cefatzidima y cefepime) aminoglucósidos (amikacina, gentamicina y tobramicina), carbapenemes (imipenem y meropenem) ciprofloxacina y trimetroprima (O'Hara C. M. y col., 2000).

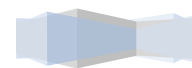
*P. mirabilis* es dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, el más sensible a los antibióticos beta lactámicos, probablemente por la gran permeabilidad de su membrana externa.

La producción de  $\beta$  -lactamasas cromosómicas es prácticamente indetectable. Por ello las cepas salvajes de *P. mirabilis* se presentan con sensibilidad incluso a Ampicilina, a diferencia de las cepas salvajes de otras especies del género *Proteus* que presentan generalmente resistencia natural a este agente.

La resistencia a los beta-lactámicos que presentan los miembros de *P. mirabilis* es casi siempre debida a la adquisición de distintas clases de enzimas plasmídicas (Fariñas M. C. y Martinez Martinez L., 2013; Nakako y col., 2012). En 1998 Bret y col describió un aislamiento clínico inusual con alto nivel de resistencia a las penicilinas, cefotaxima, ceftazidima y cefoxitina, no reversible por ácido clavulánico, mediada por AMP-C cromosómico (CMY-3) (Bret L. y col., 1998).

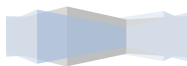
**Resistencia adquirida:** Según datos reportados por la red WHONET de Argentina, (<http://whonet.org/DNN/>), el 45% de los aislamientos recolectados durante el período 1997-2000 presentó resistencia adquirida a ampicilina (n=42189), de los que un 75% provenía de orina, 8% de sangre, 3.3% de tracto respiratorio, 2.7% de sangre y 11% de otros sitios anatómicos). La combinación de ampicilina con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (AMS) mejoró la actividad, bajando los niveles de resistencia a un poco más de la mitad de los obtenidos para ampicilina.

Las cefalosporinas de primera generación mostraron niveles de resistencia comparables a los de AMS. La resistencia a cefalosporinas de tercera generación, permaneció constante en el orden del 17% durante el período analizado. Al igual que en el resto del género, el porcentaje de resistencia a ampicilina (6,2%), piperacilina/tazobactam (3,5%) y carbapenems (0%) conservan amplia actividad, no así trimetoprima/sulfometoxazol (33,9%), piperacilina (32,7%), gentamicina (29,5%), cefalotina (28,2%) y las fluorquinolonas (18,6%) (Programa Nacional de control de calidad en Bacteriología Clínica, boletín 13 del 2001, Instituto “Dr C.G.Malbrán”). En *P. mirabilis* los porcentajes de resistencia para ceftazidima fueron en este período 2,2%, mucho menores que los observados para cefotaxima y ceftriaxona (17,9%). Esta disociación en el porcentaje de resistencia *in vitro* entre estas cefalosporinas de tercera generación se deben a que en nuestro medio, también en la Tribu *Proteae*, es más prevalente la cefotaximasa CTX-M-2 (Pasterán F. y col., 2000). También altos niveles de resistencia a ciprofloxacina han sido reportados para *P. mirabilis* en hospitales donde la utilización de este antimicrobiano es irrestricta (O’Hara C. y col., 2000). Si bien los carbapenems en este período permanecieron con una excelente actividad, ya ha sido descrita la emergencia de cepas resistentes al imipenem en aislamientos clínicos de *P. mirabilis* provenientes de Inglaterra y Francia que involucró fenómenos de permeabilidad (Mehtar, S. y col., 1991) o alteración de *Penicilin Binding Protein* (PBP) PBP1 y PBP2 (Neuwirth C., 1995). Recientemente, en esta especie han sido descritas las carbapenemasas denominadas *bla*<sub>N<sub>DM</sub>-1</sub> (en Nueva Zelanda) y *bla*<sub>K<sub>PC</sub>-2</sub> (en Whashington y China) (Williamson, D.A. y col., 2012; Tibbets y col., 2008; Hu Y.Y. y col., 2012).



## 2. OBJETIVO

Nuestro objetivo es conocer la frecuencia de integrones de clase 1 y los arreglos de genes *cassettes* en *P. mirabilis* así como también la evolución, a lo largo de 15 años en una colección de cepas no relacionadas epidemiológicamente que presentan al menos resistencia a dos familias de antimicrobianos.

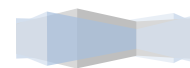


### 3. HIPÓTESIS

La alta prevalencia de aislamientos multirresistentes conduce a la utilización de antibióticos de más amplio espectro y también de antibióticos más antiguos como las Polimixinas, lo cual podría llevar a la selección de microorganismos naturalmente resistentes a este antimicrobiano tales como los de la Tribu *Proteae*, entre ellos los del género *Proteus*, específicamente *P. mirabilis* objeto de nuestro estudio. Este género, como se mencionó anteriormente, no es considerado patógeno *per se*, pero como otros patógenos oportunistas, también pueden causar morbi-mortalidad y pueden ser capaces de causar enfermedades infecciosas de importancia en el ser humano.

Ante esta presión de selección sucumbirán las poblaciones bacterianas más susceptibles de éste género y solo sobrevivirán las que hayan adquirido a través de la THG genes que le permitan una mejor capacidad de adaptación a diversos ambientes desafiando así los tratamientos empíricos clásicamente utilizados para este género.

Por ello, nuestra hipótesis es que encontraremos una frecuencia considerable de Integrones de clase 1 en *P. mirabilis* aisladas del ambiente intrahospitalario, como mecanismo adaptativo frente a la presión selectiva de antibióticos.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Recolección de las muestras

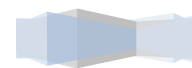
Las 35 muestras analizadas en el presente trabajo provienen de una colección de aislamientos de *Proteus mirabilis* no relacionados epidemiológicamente y que presentan resistencia a dos familias de antimicrobianos provenientes de cinco nosocomios de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de la Provincia de Buenos Aires, aislados entre los años 1993-2008.

Para la siembra primaria de las muestras clínicas y el aislamiento de las especies bacterianas, se usaron diferentes medios de cultivo sólidos, como ser agar Levine, agar CLDE, agar nutritivo, todos sin la adición de ningún antibiótico.

El agar Levine es un medio adecuado para la búsqueda y diferenciación de bacilos entéricos, a partir de muestras clínicas, aguas servidas y otros materiales. El medio CLDE (Cistina Lactosa Electrolito Deficiente) se usa también, para el aislamiento, especialmente, de bacilos Gram negativos en diferentes tipos de muestras clínicas y análisis de aguas. Permite la diferenciación entre bacterias fermentadoras de lactosa y las no fermentadoras (indicador azul de bromotimol).

Las bacterias fermentadoras de lactosa, producen colonias de color amarillo o amarillo pálido por acidificación del medio. Las bacterias no fermentadoras de lactosa producen colonias verdes, azuladas o incoloras.

En la sección 4.10 del presente capítulo se detalla la composición de cada uno de los medios de cultivo utilizados.



#### 4.2. Identificación de los aislamientos con el sistema API 20 NE

Los aislamientos bacterianos fueron identificados con el sistema API 20 NE (BIOMERIEUX), que es un sistema estandarizado para la identificación de enterobacterias.

La galería API 20 E combina 8 ensayos convencionales y 12 ensayos de asimilación, la misma incluye 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados.

En una primera fase, los microorganismos a identificar deben aislarse sobre un medio de cultivo, como agar el agar CLDE, anteriormente mencionado.

Para comenzar con la identificación se toma una cámara de incubación que trae el sistema y se le agrega agua para crear una atmósfera húmeda, luego se ubica en la cámara la galería.

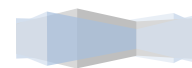
A continuación, se toman de 1 a 4 colonias y se hace una suspensión en una ampolla que trae el sistema, la cual contiene un medio salino, hasta una turbidez igual a 0,5 de McFarland (suspensión A).

Los ensayos convencionales se inoculan con la suspensión A que reconstituye los medios. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados por la acción de reactivos luego de la incubación correspondiente.

Luego, se transfieren 200 µl de la suspensión A a otra ampolla que trae el sistema, la cual contiene un medio mínimo (suspensión B).

Los ensayos de asimilación se inoculan con suspensión B y las bacterias crecen solamente si son capaces de utilizar el correspondiente sustrato.

Algunos microtubos se rellenan con parafina para crear un ambiente anaeróbico.



Por último, se cierra la cámara y se deja incubar a 37°C +/- 2°C durante 24 hs. Algunos de los microtubos requieren la adición de reactivos luego de la incubación para finalmente hacer una determinación del resultado.

La lectura de las reacciones se hace con la ayuda de una tabla de identificación y el reconocimiento se realiza mediante el catálogo analítico o con la ayuda de un programa de identificación.

Una vez obtenido el aislamiento y tipificación de *P.mirabilis*, se realizó un stock de cada muestra bacteriana en medio BHI con el agregado de glicerol al 10%, y se almacenó a -80°C.

#### **4.3. Test de sensibilidad a antimicrobianos**

El test de sensibilidad para los siguientes antimicrobianos: ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, cefepime, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, meropenem, imipenem, trimetoprima/sulfometoxazol, fue realizado por el método de difusión en agar de acuerdo a las guías del National Committee for Clinical Laboratory Standars (CLSI, 2013). Los discos de antimicrobianos fueron comprados a Sigma Chemical Co (St.Louis, Mo.).

#### **4.4. Extracción de ADN total**

Para la extracción del ADN total se utilizó, el método de fenol-cloroformo. Esta metodología fue descripta por Sambrook y col. en 1989.

Las cepas almacenadas a -80°C se repican para su desarrollo en 5 ml de caldo LB o BHI sin antibióticos a 37° C durante toda la noche con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm).

Al día siguiente, el cultivo es centrifugado durante 5 minutos a 6000 rpm para obtener un pellet de células. Se retira el sobrenadante.

El *pellet* es lavado con 500 µl de una solución de SSC 0.1X (ver composición en la sección 4.11 del presente capítulo) y centrifugado durante 5 min a 6000 rpm.

Luego se realiza una incubación con 500 µl de *buffer* de lisis (ver receta en sección 4.11 según el tipo de bacteria) durante 45-60 minutos a 37°C. Los ácidos nucleicos son extraídos utilizando igual volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), centrifugando durante 8-10 minutos a 13000 rpm. Posteriormente, la fase acuosa es transferida a un nuevo tubo *ependorf* y se adicionan 0.1 volumen de acetato de sodio (NaCH<sub>3</sub>COO) y 2 volúmenes de etanol 100%. Se centrifuga a 13000 rpm a temperatura ambiente (mejor a 4°C para obtener una mayor eficiencia) durante 20 minutos y se resuspende el *pellet* en 100 µl de agua destilada o TE y se guarda a -20°C.

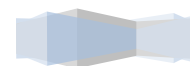
#### **4.5. Medición de ADN**

Las concentraciones de ADN en las muestras obtenidas a partir de las extracciones de ADN genómico total fueron medidas usando un espectrofotómetro de doble haz Hitachi a una D.O. de 260 nm (1 D.O. = 50 µg/ml de ADN).

Una vez conocida la cantidad de ADN de cada una de las muestras, se realizaron diluciones de las mismas, a modo de obtener una solución de concentración final 10 ng/µl para usar como ADN molde en el ensayo de PCR.

#### **4.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cartografía por PCR**

Las mezclas de reacción para las reacciones de PCR, se realizaron en un volumen final de 50 µl que contenía 20 pmoles de cada cebador, 10 µl de *Buffer*, 0.5 µl de dNTPs,

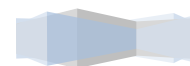


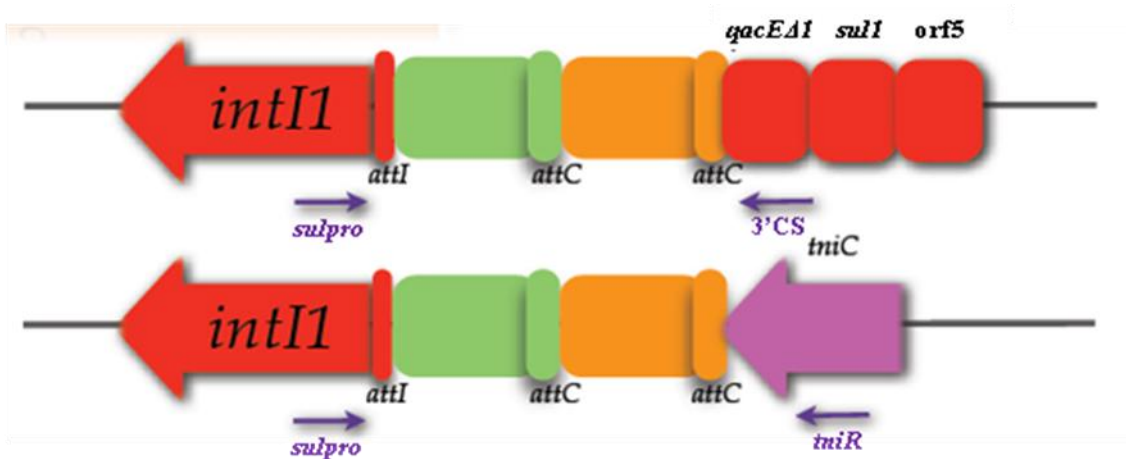


1,5 mM- 3mM de MgCl<sub>2</sub> 50mM y 1.25 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen –Promega). El ADN molde utilizado fue preparado como ha sido descrito en la sección 4.3 y 4.4, empleándose entre 5-10 µl de la dilución. En algunos casos las condiciones se ajustaron según los cebadores.

Las amplificaciones se realizaron en un ciclador térmico (Eppendorf y MJResearch), utilizando como ciclo para las reacciones de PCR con *Taq* polimerasa el siguiente ciclo: i) desnaturalización a 94°C – durante 5 min., ii) 94°C – durante 1min, iii) temperatura de apareamiento de los cebadores (Ta) según corresponda durante 30 seg., iv) amplificación a 72°C – durante 1 min./kb; los puntos ii, iii y iv se repitieron 35 veces, y por último se realizó una extensión final a 72°C – durante 5 o 10 min.

Para realizar caracterización de los integrones de clase 1 primero utilizamos cebadores específicos para detectar la presencia del gen de la integrasa de tipo 1, *intI1* (cebadores: *intI1F-intI1R*). En aquellos aislamientos que fueron positivos, se realizó cartografía por PCR con cebadores específicos para las zonas conservadas que permiten determinar la longitud de la zona variable del integrón utilizando los cebadores *sulpro* y 3'CS. También utilizamos la combinación de cebadores *sulpro* y *tniR*, este último tiene como blanco a uno de los genes del Tn402, para identificar los integrones que presenten esta estructura en vez de la zona 3'CS típica. Luego empleamos otras combinaciones de cebadores para identificar qué genes *cassettes* se encontraban en la zona variable de los integrones (Figura 4.6a).





**Figura 4.6a. Cartografía por PCR.** Se muestra cómo la utilización de diferentes combinaciones de cebadores (flechas delgadas), permiten detectar diferentes estructuras genéticas.

Conociendo la epidemiología local podemos conocer la resistencia que tenemos a las distintas familias de antimicrobianos y los mecanismos de esa resistencia. De esta forma nos pudimos orientar para saber que cebadores utilizar, dirigidos a que determinantes de resistencia y que genes *cassettes* pueden estar localizados en la zona variable del integrón. Los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación por PCR se detallan en la Tabla 4.6a.



**Tabla 4.6a. Secuencias de los cebadores utilizados en este estudio.**

Cebador	Secuencia (5' a 3')	Fuente
<i>intI1</i>		
IntI1F	CGA GGC ATA GAC TGT AC	Orman y col., 2002
IntI1R	TTC GAA TGT CGT AAC CGC	Orman y col., 2002
<i>orf513</i>		
orf 513F	ATG GTT TCA TGC GGG TT	Arduino y col., 2003
orf 513R	CTG AGG GTG TGA GCG AG	Orman y col., 2002
Cartografía		
sulpro	GCCTGACGATGCGTGGA	Lévesque y col., 1995
3'CS New <sup>a</sup>	AAGCAGACTTGACCTGATAG	Quiroga y col., 2013
TniR <sup>a</sup>	TTCAGCCGCATAAATGGAG	Post y col., 2007
arr3R <sup>a</sup>	TAAGTCCTCCAACGAATCC	Este estudio
LinFR <sup>a</sup>	TTACTTGTTGTGCGGCGTC	Este estudio
aac(6')F <sup>b</sup>	GAAGAAGCACGCCCGAC	Quiroga M.P., 2012
aac(6')R <sup>a</sup>	GTGTTGCTCGAATGCC	Quiroga M.P., 2012
Oxa2F <sup>b</sup>	GAA GAA ACG CTA CTC GC	Orman et al., 2002
Oxa2R <sup>a</sup>	TAC CCA CCA ACC CAT AC	Orman et al., 2002
dhfR1 <sup>b</sup>	AGCTGTTACCTTTGGC	Lévesque y col., 1995
dhfR1R <sup>a</sup>	CCTGAAATCCCCAGCAA	Ramírez y col., 2005

aadBF <sup>b</sup>	GTAACACGCAAGCACGATGA	Ramírez y col., 2005
aadBR <sup>a</sup>	GCCTGTAGGACTCTATGTGC	Ramírez y col., 2005
aadAR <sup>b</sup>	CGC AGA TCA GTT GGA AG	Arduino y col., 2003
aadA1R <sup>a</sup>	TCG ATG ACG CCA ACT AC	Orman y col., 2002
orf513F3 <sup>c</sup>	GTTCGATCCATCACAGAG	Quiroga y col., 2007
qacEΔ1B <sup>c</sup>	GCGATAACAAGAAAAAGCC	Quiroga y col., 2013
ctx-M2F <sup>c</sup>	ATGACTCAGAGCATTTCGC	Orman y col., 2002
ctx-M2R <sup>c</sup>	TCACTTTATCGGGACCAC	Orman y col., 2002

<sup>a</sup> Cebadores utilizados para realizar cartografía por PCR de integrones de clase 1 en combinación con Sulpro desde el gen *int11*. Los amplicones difieren en el tamaño esperado dependiendo de su localización en la zona variable del integron de clase 1.

<sup>b</sup> Cebadores utilizados para realizar cartografía por PCR de integrones de clase 1 en combinación con cebadores 3'CS desde el segmento conservado 3'CS. Los amplicones difieren en el tamaño esperado dependiendo de su localización en la zona variable del integron de clase 1.

<sup>c</sup> Cebadores utilizados para realizar cartografía por PCR de integrones de clase 1 complejos para determinar la VR-2.

#### 4.7. Geles de agarosa

Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8; 1% o 1,5%; preparados con *buffer* TBE 1X y agregado de Bromuro de Etidio para posterior visualización de la bandas a la luz UV. El *Buffer* de corrida utilizado fue TBE1X y la corrida se realizó a 100-110V durante 50-60 minutos. La visualización de las bandas se efectuó con lámpara UV en un transiluminador. Para la determinación del tamaño de las amplificaciones obtenidas se usó el marcador de peso molecular Milmarker (Biodynamics).



#### **4.8. Metodología utilizada para enviar a secuenciar los productos de amplificación por PCR**

Los productos de amplificación por PCR seleccionados para ser secuenciados se purificaron, cuantificaron y secuenciaron. Para juntar suficiente cantidad de producto para ser secuenciado, se realizaron varias reacciones de PCR manteniendo las mismas condiciones. Para la purificación de los amplicones se uso el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

En los casos en los que se obtuvieron más de una banda de amplificación como producto de una PCR, se purificó la banda o las bandas de interés de un gel de agarosa. Luego de la electroforesis, se realizó el corte de la banda y se ubicó en un tubo *ependorf* de 1,5 ml para continuar con el protocolo de purificación. Para la cuantificación del ADN purificado se sembró en un gel de agarosa 1%, el 10% del producto de amplificación purificado con 5  $\mu$ l de loading *buffer*, y se determinó la masa de ADN de acuerdo con una comparación de intensidad con las bandas de un marcador de cuantificación, *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

Una vez obtenida la cantidad de ADN requerida, se envió a secuenciar, donde generalmente se utilizó el equipo ABI3100 BioAnalyzer.

#### **4.9. Análisis de bioinformática**

Se realizó un estudio bioinformático de los integrones descritos en *P. mirabilis*. Para ello se realizó una búsqueda en la base de datos Integrall (<http://integrall.bio.ua.pt/>), la cual se complementó con búsquedas en la base de datos GenBank



(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se analizó la clase de integrón, la composición de genes *cassettes* en la zona variable de los integrones de clase 1 encontrados, así como de los genes y genes *cassettes* encontrados en la VR-1 y VR-2, respectivamente en los integrones de clase 1 complejos.

#### **4.10. Medios de cultivo, soluciones, *buffers* y otros reactivos utilizados de rutina**

La enzima *Taq* polimerasa empleada en el ensayo de PCR fue adquirida de Invitrogen. Los reactivos químicos de rutina fueron de Merck, Invitrogen y Sigma.

A continuación detallamos los medios de cultivo utilizados:

##### **- LB**

Peptona 10 gr/l

Extracto de levadura 5 gr/l

Cloruro de sodio 10 gr/l

##### **- Agar nutritivo (pH 7,3)**

Pluripeptona 5gr/l

Extracto de carne 3 gr/l

Cloruro de sodio 8 gr/l

Agar 15 gr/l

##### **- Agar Levine (pH 7,1 ± 0,2)**

Peptona 10 gr/l

Lactosa 10 gr/l

Fosfato dipotasico 2 gr/l Agar 15 gr/l



## Caracterización Molecular del los Integrones de clase 1 en *Proteus mirabilis*

Eosina 0,4 gr/l

Azul de metileno 0,065 gr/l

### - CLDE (Britania) (pH 7,3 ± 0,2)

Peptona 4gr/l

Extracto de carne 3 gr/l

L-cistina 0,128gr/l

Tripteína 4gr/l

Azul de bromotimol 0,02gr/

Lactosa 10gr/l // Agar 15gr/l

### - BHI (Britania) con glicerol

Extracto de cerebro 7,8gr/l

Extracto de corazon 9,7gr/l

Peptona de gelatina 10gr/l

Cloruro de sodio 5gr/l

Fosfato disódico 2,5gr/l

Glucosa 2gr/l

Glicerol 10%

La composición de *buffers* y soluciones utilizados se detallan a continuación:

### - *Buffer* 1X TBE

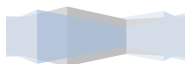
89mM Tris

89 mM acido borico

2 mM EDTA (pH 8)

---

Bioq.M.A TURINA |



**- Buffer de lisis (para bacterias gram negativas) (pH: 8)**

Tris-HCl 10 mM;

glucosa 20%,

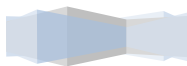
lisozima 2,5 mg/ml

**- SCC 20X (pH 7)**

NaCl 3M 175,3 gr

Citrato de Na 88,2 gr

Agua 800 ml





## 5. RESULTADOS

Se realizó el estudio en 35 aislamientos no relacionados epidemiológicamente de *P. mirabilis* provenientes de cinco nosocomios de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de la Provincia de Buenos Aires, aislados entre los años 1993-2008. El criterio de selección utilizado fue que los aislamientos debían ser resistentes al menos a dos familias de antimicrobianos (ítems 4.1 y 4.2 en Materiales y Métodos).

### 5.1. Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos

Como primer paso se determinó la susceptibilidad de los aislamientos en estudio a 11 antimicrobianos de relevancia clínica. Dentro de los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, se escogieron: aminopenicilinas como ampicilina, dos cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima y ceftazidima, y una cefalosporina de cuarta generación, cefepime. Dentro de los carbapenemes, se seleccionaron imipenem y meropenem. Entre los antibióticos aminoglucósidos se seleccionaron gentamicina y amikacina. Y dentro de la familia de las quinolonas se evaluó al ácido nalidíxico y ciprofloxacina (ver ítem 4.3 en Materiales y Métodos).

Los aislamientos fueron denominados como “Pr” por *P. mirabilis* y un número arábigo. Los resultados obtenidos del antibiograma y los integrones encontrados en los mismos se muestran en Tabla 5.1a. Los valores de los puntos de corte de sensibilidad fueron obtenidos utilizando las guías del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2013), las cuales indican la sensibilidad (S), sensibilidad intermedia (I) o resistencia (R) de dichos aislamientos a los antimicrobianos testeados (Anexo I).

**TABLA 5.1a. Caracterización molecular de los integrones de clase 1 en *P. mirabilis* y datos de resistencia a los antimicrobianos.**

Aislamiento	Año	H <sup>a</sup>	Región variable (VR-1) <sup>b</sup>	ISCR1	Amp	Caz	Ctx	Fep	Gen	Akn	Cip	Nal	Tms	BLEE <sup>c</sup>
Pr1	1993	H3		No	R	S	S	S	S	R	S	S	R	No
<b>3 integrones</b>			1- <i>aac(6')-Ib - aadA1</i>											
			2- <i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>											
			3- <i>catB2 - dfrA1</i>											
Pr2	1993	H3		No	R	S	S	S	S	R	S	S	R	No
<b>2 integrones</b>			1- <i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>											
			2- <i>catB2 - dfrA1</i>											
Pr3	1993	H3		No	R	S	S	S	S	R	S	S	R	No
<b>3 integrones</b>			1- <i>aac(6')-Ib - aadA1</i>											
			2- <i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>											
			3- <i>catB2 - dfrA1</i>											
Pr4	1993	H3			R	R	R	R	R	R	S	S	R	Sí
<b>3 integrones</b>			1- <i>aadB - aadA1</i>	Sí										
			2- <i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>											
			3- <i>catB2 - aadA1 - dfrA1</i>											
Pr5	1993	H3		No	R	S	S	S	S	R	S	S	R	No
<b>2 integrones</b>			1- <i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>											
			2- <i>catB2 - dfrA1</i>											
Pr6	1993	H3		No	R	S	S	S	S	R	S	S	R	No
<b>2 integrones</b>			1- <i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>											
			2- <i>catB2 - dfrA1</i>											
Pr7	1993	H3		No	R	S	S	S	S	R	S	S	R	No
<b>2 integrones</b>			1- <i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>											
			2- <i>catB2 - dfrA1</i>											
Pr8	1993	H3		No	R	S	S	S	S	R	S	S	R	No
<b>2 integrones</b>			1- <i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>											
			2- <i>catB2 - dfrA1</i>											



Caracterización Molecular del los Integrones de clase 1 en *Proteus mirabilis*

Aislamiento	Año	H <sup>a</sup>	Región variable (VR-1) <sup>b</sup>	ISCR1	Amp	Caz	Ctx	Fep	Gen	Akn	Cip	Nal	Tms	BLEE <sup>c</sup>
Pr9	1993	H3			R	R	R	R	R	R	R	R	R	Sí
<b>4 integrones</b>			1- <i>aadB</i> - <i>aacA7</i>											
			2- <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i> - <i>bla<sub>OXA-2</sub></i> - <i>orfD</i>	Sí										
			3- <i>aac(6')</i> - <i>Iq</i> - <i>aadA1</i>											
			4- <i>catB2</i> - <i>dfrA1</i>											
Pr10	1993	H3		No	R	S	S	S	R	R	S	S	R	No
<b>2 integrones</b>			1- <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i> - <i>bla<sub>OXA-2</sub></i> - <i>orfD</i>											
			2- <i>catB2</i> - <i>dfrA1</i>											
Pr11	1993	H3		No	R	S	S	S	R	R	S	S	R	No
<b>2 integrones</b>			1- <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i> - <i>bla<sub>OXA-2</sub></i> - <i>orfD</i>											
			2- <i>catB2</i> - <i>dfrA1</i>											
Pr12	1993	H3			R	R	R	R	R	R	R	R	R	Sí
<b>3 integrones</b>			1- <i>aadB</i> - <i>aadA1</i>	Sí										
			2- <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i> - <i>bla<sub>OXA-2</sub></i> - <i>orfD</i>											
			3- <i>catB2</i> - <i>aadA1</i> - <i>dfrA1</i>											
Pr15	1993	H3	1- <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i>	Sí	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Sí
Pr19	1993	H4	1- <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i> - <i>bla<sub>OXA-2</sub></i> - <i>orfD</i>	Sí	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Sí
Pr20	1993	H4			R	R	R	R	R	R	R	R	R	Sí
<b>2 integrones</b>			1- <i>aadB</i> - <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i>	Sí										
			2- <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i> - <i>bla<sub>OXA-2</sub></i> - <i>orfD</i>											
Pr 201	1999	H1		No	R	S	S	S	R	I	S	S	R	No
<b>2 integrones</b>			1- <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i> - <i>bla<sub>OXA-2</sub></i> - <i>orfD</i>											
			2- <i>aadB</i> - <i>aadA1</i>											
Pr 202	1999	H1			R	R	R	R	R	R	R	R	R	Sí
<b>3 integrones</b>			1- <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i>	Sí										
			2- <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i> - <i>bla<sub>OXA-2</sub></i> - <i>orfD</i>											
			3- <i>aadB</i> - <i>aadA1</i>											
Pr 300	1999	H2			R	R	R	R	R	R	S	S	R	Sí
<b>2 integrones</b>			1- <i>aadB</i> - <i>aadA1</i>	Sí										
			2- <i>aac(6')</i> - <i>Ib</i> - <i>bla<sub>OXA-2</sub></i> - <i>orfD</i>											



Caracterización Molecular del los Integrones de clase 1 en *Proteus mirabilis*

Aislamiento	Año	H <sup>a</sup>	Región variable (VR-1) <sup>b</sup>	ISCR1	Amp	Caz	Ctx	Fep	Gen	Akn	Cip	Nal	Tms	BLEE <sup>c</sup>
Pr401	2000	H5	<i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>	Sí	R	R	R	R	S	R	R	R	R	Sí
Pr2001	2001	H6	<i>aac(6')-Ib - aadA1 - aadB</i>	No	R	S	S	S	I	R	R	R	R	No
Pr 2003	2003	H6	<i>aac(6')-Ib - aadA1 - aadB</i>	No	S	S	S	S	S	R	S	R	S	
Pr 311	2004	H2	<i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>	Sí	R	R	R	R	S	R	R	R	R	Sí
Pr 312	2004	H2	<i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>	Sí	R	R	R	R	S	R	R	R	R	Sí
Pr 313	2005	H6	ND <sup>d</sup>	No	S	S	S	S	S	R	S	R	S	No
Pr 300	2005	H6			R	R	R	R	I	R	R	R	R	Sí
<b>3 integrones</b>			<i>1- aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>	Sí										
			<i>2-dfrA1 - aadA1</i>											
			<i>3-aac(6')-Ib - aadA1 - aadB</i>											
Pr2000	2006	H6	<i>1- aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>	Sí	R	R	R	R	S	R	R	R	R	Sí
Pr2001	2006	H6	<i>1- aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>	Sí	R	R	R	R	S	R	R	R	R	Sí
Pr 2006	2006	H6	ND <sup>d</sup>	No	S	S	S	S	S	R	S	R	S	No
Pr 9003	2007	H6			R	R	R	R	I	R	R	R	R	Sí
<b>3 integrones</b>			<i>1-aac(6')-Ib</i>											
			<i>2-aac(6')-Ib - aadA1 - aadB</i>											
			<i>3- aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>	Sí										
Pr700	2008	H6	<i>1- aac(6')-Ib - aadA1</i>	Sí	R	R	R	R	I	R	R	R	R	Sí
Pr 701	2008	H6		No	R	S	S	S	I	R	R	R	R	No
<b>2 integrones</b>			<i>1- aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>											
			<i>2- aadB - aadA1</i>											
Pr702	2008	H6		No	R	S	S	S	S	S	R	R	R	No
<b>2 integrones</b>			<i>1- dfrA1 - aadA1</i>											
			<i>2- aadA1</i>											
Pr703	2008	H6	<i>1- dfrA1 - aadA1</i>	No	R	S	S	S	S	S	R	R	R	No
Pr704	2008	H6		No	R	S	S	S	I	R	R	R	R	No
<b>2 integrones</b>			<i>1- aac(6')-Ib - bla<sub>OXa-2</sub> - orfD</i>											
			<i>2- aadB - aadA1</i>											
Pr 705	2008	H6			R	R	R	R	R	R	S	S	R	Sí
<b>2 integrones</b>			<i>1- aadB - aadA1</i>											
			<i>2- aac(6')-Ib - aadA1</i>	Sí										



## Caracterización Molecular del los Integrones de clase 1 en *Proteus mirabilis*

Amp: ampicilina, Caz: ceftazidima; Ctx: cefotaxima; Fep: cefepime; Gen: gentamicina; Akn: amikacina; Cip: ciprofloxacina; Nal: Ac. Nalidíxico; Tms: trimetoprima/sulfametoxazol; BLEE:  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido.

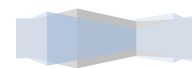
<sup>a</sup>H1: Hospital Alvarez, H2: Sanatorio Mitre, H3: Hospital de Munro, H4: CEMIC, H5: Hospital Durand, H6: Hospital de Clínicas José de San Martín.

<sup>b</sup> la caracterización de integrones de clase 1 se llevó a cabo por cartografía por PCR (ítem 4.5 en Materiales y Métodos).

<sup>c</sup> la determinación fenotípica de BLEE se llevó a cabo por el método de doble disco, utilizando Amoxicilina – clavulánico, Caz y Ctx.

<sup>d</sup> No se encontraron *cassettes* en la región variable de éstos integrones.

El 91,43% de los aislamientos fue resistente a ampicilina y solo un 8,57% de los mismos fue sensible. La resistencia a ceftazidima, cefotaxima y cefepime se evidenció en el 48,57% del total de los aislamientos, los cuales todos presentaban fenotipo de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) tipo CTX-M-2, mientras que el 51,43% fueron susceptibles a dichos antibióticos. El 100% de los aislamientos fueron sensibles a carbapenemes. El 31,43% de los aislamientos fue resistente a gentamicina, mientras que el 17,14% presentó sensibilidad intermedia. La resistencia a amikacina se manifestó en el 91,43% de los aislamientos, el 2,86% presentó sensibilidad intermedia y el 5,71% fue sensible a este antimicrobiano. La resistencia a ciprofloxacina y ácido nalidíxico en los aislamientos estudiados fue de 54,29% y 62,86%, respectivamente. El porcentaje de resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol de los mismos fue de 91,43%. En la Tabla 5.1b, se presenta el porcentaje de aislamientos resistentes a los antimicrobianos.



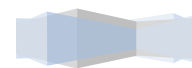
**TABLA 5.1b. Porcentaje de aislamientos resistentes a los antimicrobianos testeados.**

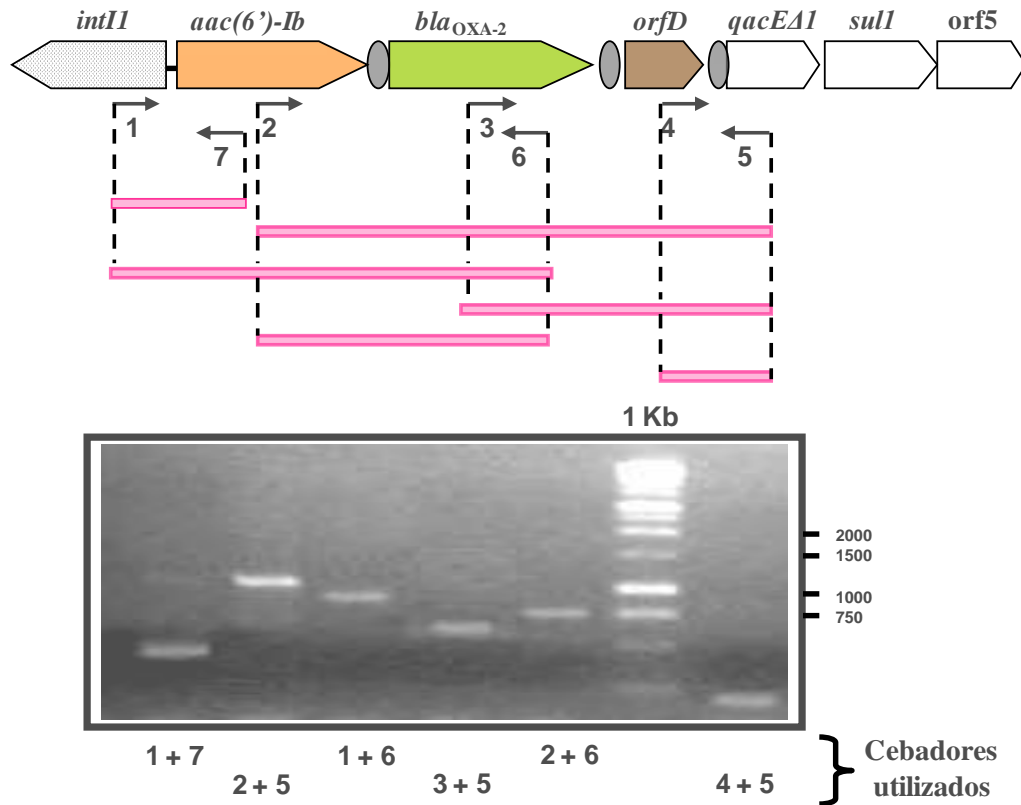
Antimicrobiano	% de aislamientos resistentes
Amp	91,43
Caz	48,57
Ctx	48,57
Fep	48,57
Gen	31,43
Akn	91,43
Cip	54,29
Nal	62,86
Tms	91,43

Amp: ampicilina, Caz: ceftazidima, Ctx: cefotaxima, Fep: cefepime, Imp: Imipenem, Gen: gentamicina, Akn: amikacina, Cip: Ciprofloxacina, Nal: Ac. Nalidíxico, Tms: trimetoprima/sulfometoxazol.

## 5.2. Identificación de integrones de clase 1

Para realizar la caracterización de los integrones de clase 1 se llevó a cabo cartografía por PCR, utilizando distintas combinaciones de cebadores a fin de caracterizar la estructura y el contenido de genes *cassettes* en la VR (Tabla 4.6 a; ítem 4.5 en Materiales y Métodos). Estos cebadores permiten detectar la región 5'conservada del integrón y detectar la presencia de *intI1*. En la figura 5.2a, se muestra un ejemplo de la ubicación de los cebadores para la cartografía realizada por PCR de integrones de clase 1.





**Figura 5.2a. Cartografía por PCR para In35.** El integrón de clase 1 compuesto por los *cassettes* *aac(6')-Ib*, *bla<sub>OXA-2</sub>* y *orfD* en la zona variable, denominado In35. Las flechas denotan la ubicación de los cebadores utilizados en las PCRs. En la foto se muestran los productos de PCR obtenidos utilizando los cebadores indicados al pie de cada calle del gel. 1Kb denota al marcador de peso molecular.

Se encontraron integrones de clase 1 en 35/35 (100%) de los aislamientos, y se detectó a *ISCR1* en 17/35 (48,57%) de los mismos.

Se encontraron en total 64 integrones de clase 1 en los 35 aislamientos, entre los que se distinguieron 12 arreglos de genes *cassettes* diferentes en su zona variable, que incluyen la combinación de 9 genes *cassettes*, 8 de los cuales corresponden a genes de resistencia a antimicrobianos que codifican para la resistencia a antibióticos β-lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima y cloranfenicol. El gen *cassette orfD*, contiene un marco de lectura abierto sin ninguna proteína asignada ni con función conocida. En la Tabla 5.2a se

muestran los genes *cassettes* encontrados en integrones de clase 1 de los aislamientos evaluados, ordenados según las respectivas resistencias a antibióticos para la cual codifican.

**TABLA 5.2a. Genes *cassettes* encontrados en los integrones de clase 1.**

Aminoglucósidos	$\beta$ -lactámicos	Trimetoprima	Cloranfenicol	Otros
<i>aac(6')-Ib</i>	<i>bla<sub>OXA-2</sub></i>	<i>dfrAI</i>	<i>catB2</i>	<i>orfD</i>
<i>aac(6')-Iq</i>				
<i>aadB</i>				
<i>aacA7</i>				
<i>aadA1</i>				

Los genes *cassettes aac(6')-Ib*, *aac(6')-Iq* y *aacA7* otorgan resistencia a amikacina, mientras que el gen *cassette aadB* otorga resistencia a gentamicina. El gen *cassette aadA1* confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina. El gen *cassette bla<sub>OXA-2</sub>* otorga resistencia a oxacilina y cefalosporinas de 1<sup>ra</sup> generación. Por último, los genes *cassettes dfrAI* y *catB2* confieren resistencia a trimetoprima y cloranfenicol, respectivamente.

En la Tabla 5.2b se describen los arreglos de genes *cassettes* de los integrones encontrados en el relevamiento de los 35 aislamientos de *P. mirabilis* y la frecuencia de los mismos.





**TABLA 5.2b. Total de integrones de clase 1 encontrados en los aislamientos de *P. mirabilis*.**

<b>Integrón</b>	<b>Cassettes en la zona variable</b>	<b>Frecuencia (%)<sup>a</sup></b>	<b>Nomenclatura internacional</b>
1	<i>aac(6')-Ib - bla<sub>OXA-2</sub> - orfD</i>	74,29	In35
2	<i>catB2 - dfrA1</i>	28,57	
3	<i>aadB - aadA1</i>	20,00	In290
4	<i>aac(6')-Ib - aadA1</i>	11,43	In4
5	<i>aac(6')-Ib - aadA1 - aadB</i>	11,43	
6	<i>aac(6')-Ib</i>	8,57	In46
7	<i>dfrA1 - aadA1</i>	8,57	In18
8	<i>catB2 - aadA1 - dfrA1</i>	5,71	
9	<i>aadB - aacA7</i>	2,86	
10	<i>aac(6')-Iq - aadA1</i>	2,86	
11	<i>aadB - aac(6')-Ib</i>	2,86	In307
12	<i>aadA1</i>	2,86	In2

<sup>a</sup>: El 100 % (35/35) de los aislamientos poseían al menos un integrón de clase 1. Los porcentajes de frecuencia fueron referidos al número de aislamientos totales (n=35), La suma de los mismos excede al 100% porque tal como se muestra en la tabla 5.1a, se encontró más de un integrón en 22 de las cepas estudiadas.

Los integrones encontrados contienen en su región variable un número no fijo de genes *cassettes*. Así, encontramos integrones con un único gen *cassette*, por ejemplo el In46 y el In2 a los que corresponden a los genes *cassettes aac(6')-Ib* y *aadA1* respectivamente, dos de los genes *cassettes* más frecuentes entre los integrones de clase 1 en esta población. Se encontraron también integrones conteniendo dos y tres genes *cassettes*, la mayoría de ellos conteniendo el gen *cassette aac(6')-Ib* o bien *bla<sub>OXA-2</sub>*, o *aadA1*. Estos genes *cassettes* se encuentran entre los más relevados en estos aislamientos,



con una frecuencia del 88,57% (31/35), 74,29% (26/35) y 51,43% (18/35), respectivamente.

El gen *cassette aac(6')-Ib*, codifica para una acetiltransferasa, enzima modificante de aminoglucósidos que otorga resistencia a amikacina, tobramicina y netilmicina. El gen *cassette aadA1*, codifica para una adeniltransferasa que confiere resistencia a estreptomomicina y espectinomomicina.

Asimismo, se encontraron *cassettes* que confieren resistencia a otro de los miembros de la familia de los aminoglucósidos, como el gen *cassette aadB*, que codifica para otra adeniltransferasa que confiere resistencia a gentamicina, encontrándose en el 40% (14/35) de los aislamientos estudiados. Así como también se hallaron los genes *cassettes aacA7* y *aac(6')-Iq* en el 2,86% (1/35) de los aislamientos. Estos dos últimos genes *cassettes* codifican para la resistencia a amikacina.

Con respecto a los genes *cassettes* que confieren resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, el que se encontró en mayor cantidad fue el gen *bla<sub>OXA-2</sub>* en el 74,29% (26/35), siendo este gen *cassette* el segundo en frecuencia de los integrones de clase 1 (26/64) en esta serie de aislamientos. Entre los genes *cassettes* que confieren resistencia a la trimetoprima relevados en estos integrones de clase 1, se encontró a *dfrA1* en el 42,86% (15/35) del total de aislamientos.

También se encontró el gen *cassette catB2* que codifica para la resistencia al cloranfenicol, en el 34,29% (12/35) de los aislamientos.

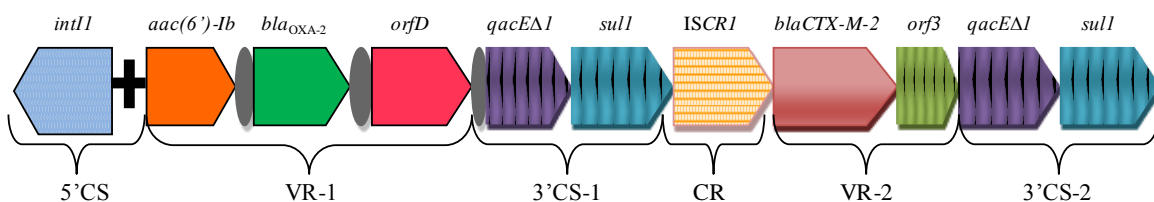
Dentro de los aislamientos sin BLEE, observamos que 5,56% (1/18) tiene sensibilidad a gentamicina aunque presenta el gen *cassette aadB*, mientras que en 16,67% (3/18) de los aislamientos se observa sensibilidad intermedia a gentamicina y en todos ellos se detectó el gen *cassette aadB*.



Continuando con el análisis de estos aislamientos sin BLEE, se observa en 27,78% (5/18) resistencia a ciprofloxacina y ácido nalidíxico, no detectándose en ellos *aac(6')-Ib-cr* ni *qnrB10* (ver más adelante). El 83,33% (15/18) de los aislamientos poseen resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol y de estos 15 aislamientos, sólo 73,33% (11/15) presentan el gen *cassette dfrA1*. En 11,11% (2/18) de los aislamientos se observa resistencia solamente a amikacina y ácido nalidíxico en presencia de *intI1* y sin haberse detectado genes *cassettes* asociados a dicha resistencia en la zona variable del mismo (ver Pr 2006 y Pr 313 en Tabla5.1a).

### 5.2.a) Integrones de clase 1 complejos

Al relacionar los arreglos de genes *cassettes* de los integrones de clase 1 con los resultados de sensibilidad a los antimicrobianos ensayados, se observa que todos los aislamientos resistentes a ceftazidima, cefotaxima y cefepime 17/35 (48,57%), tienen integrones de clase 1 complejos que albergan a *ISCR1* con el gen *bla<sub>CTX-M-2</sub>* en la VR-2 (Figura 5.2aa).



**Figura 5.2aa. Estructura del integrón clase 1 complejo In35.** VR-1 denota la región variable del integrón de clase 1, en donde se insertan los genes *cassettes*. VR-2 se refiere a la segunda región variable de los integrones complejos.



En la tabla 5.2aa se observan los diferentes arreglos de genes *cassettes* de la VR-1 que presentaban estos 17 aislamientos con integrones de clase 1 complejos.

**TABLA5.2aa. Integrones de clase 1 complejos encontrados en los aislamientos de *P. mirabilis*.**

Integrón	<i>Cassettes</i> en la zona variable	Frecuencia (%)	Nomenclatura internacional
1	<i>aac(6')-Ib- bla<sub>OXA-2</sub>- orfD</i>	52,94	In35::ISCR1::bla <sub>CTX-M-2</sub>
2	<i>aadB - aadA1</i>	17,64	In290::ISCR1::bla <sub>CTX-M-2</sub>
3	<i>aac(6')-Ib</i>	11,76	In46::ISCR1::bla <sub>CTX-M-2</sub>
4	<i>aac(6')-Ib - aadA1</i>	11,76	In4::ISCR1::bla <sub>CTX-M-2</sub>
5	<i>aadB - aac(6')-Ib</i>	5,88	In 307::ISCR1::bla <sub>CTX-M-2</sub>

Los genes *cassettes* en orden de frecuencia encontrados en éstos aislamientos fueron: *aac(6')-Ib* 82,35% (14/17); *bla<sub>OXA-2</sub>* 52,94% (9/17); *orfD* 52,94% (9/17); *aadA1* 29,41% (5/17) y *aadB* 23,53% (4/17). Todos los aislamientos con integrones de clase 1 complejos presentan arreglos de genes *cassettes* en la VR-1 con genes de resistencia para aminoglucósidos. Ambos antimicrobianos, los aminoglucósidos y las cefalosporinas de tercera generación, son usualmente administrados en forma conjunta a los pacientes internados. O sea que las cepas portadoras de In35::ISCR1::bla<sub>CTX-M-2</sub> serían potencialmente resistentes a ambas familias de antibióticos. Dentro de estos aislamientos con BLEE, 47,06% (8/17) presentan resistencia a gentamicina y de éstos 8, 6 aislamientos poseen el *cassette aadB* como parte de la VR-1 del integrón complejo, y en los dos restantes éste gen *cassette* se encuentra formando parte de otros integrones dentro de dichos aislamientos. Entre los aislamientos que presentan integrones de clase 1 complejos, 17,65% (3/17) presentan sensibilidad intermedia a gentamicina. Uno de estos tres aislamientos con



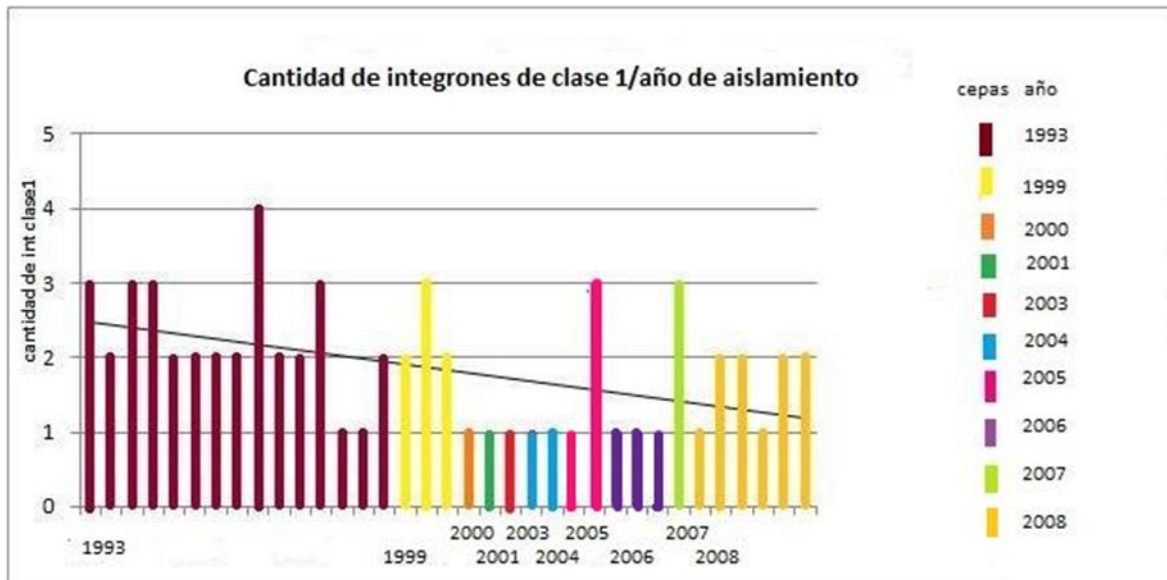
sensibilidad intermedia, no posee el gen *cassette aadB* y los dos aislamientos restantes, poseen el gen *cassette aadB* pero no en la VR-1 del integrón complejo, sino que lo poseen en la región variable de un segundo integrón de clase 1 portado por la misma cepa. En 35,29 % (6/17) de estos aislamientos se observó sensibilidad a gentamicina. Respecto a amikacina, el 100% (17/17) de los aislamientos con BLEE presentaron resistencia a éste antimicrobiano. Se encontró el gen *cassette aac(6')-Ib* dentro de la VR-1 del integrón complejo en 82,35% (14/17) de éstos aislamientos.

Del total de los aislamientos con ISCR1, el 100% (17/17) presentó resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol, pero sólo el 23,53% (4/17) tiene el gen *cassette* de resistencia *drfA1* en otro integrón dentro del mismo aislamiento. Por otro lado, el 82,35% (14/17) de los aislamientos presentaron resistencia a ciprofloxacina y ácido nalidíxico. Se realizó secuenciación de estos integrones y no se detectó en ellos las mutaciones características de *aac(6')-Ib-cr* ni el determinante de resistencia asociado a quinolonas *qnrB10*. En todas las VR-2 de los integrones complejos se detectó en todas las cepas el gen *bla<sub>CTX-M-2</sub>*.

### **5.2b) Abundancia de los integrones de clase 1 a lo largo del período estudiado**

En 22 de las cepas identificamos más de un integrón de clase 1 por aislamiento, tal como se puede observar en el gráfico de la figura 5.2b.a

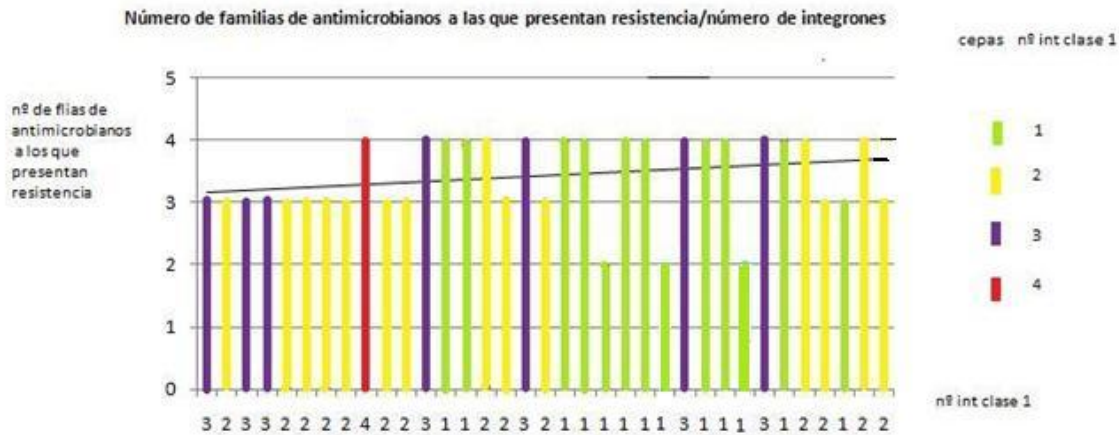




**Figura 5.2b.a. Número de integrones de clase 1 presentes en cada cepa de *P. mirabilis*.** La cantidad de integrones se muestran según el año de aislamiento.

Entre los aislamientos correspondientes al año 1993, observamos 2 cepas con 1 integrón de clase 1, 8 cepas con 2 integrones de clase 1, 4 cepas con 3 integrones de clase 1 y 1 cepa con 4 integrones de clase 1. Entre los aislamientos del año 1999, analizamos 2 cepas con 2 integrones y 1 cepa con 3 integrones de clase 1. En los años 2000 y 2001, recuperamos 1 cepa con 1 integrón de clase 1. En los años 2003 y 2004, encontramos 1 cepa con 1 integrón de clase 1 y 2 cepas con 1 integrón de clase 1, respectivamente. En los años 2005 y 2006 analizamos 2 cepas con *intII* en las que no detectamos genes *cassettes* en la zona variable y 1 cepa con 3 integrones de clase 1 y 2 cepas con 1 integrón de clase 1, respectivamente. En el año 2007 encontramos 1 cepa con 3 integrones de clase 1. Por último, en el año 2008, hallamos 2 cepas con 1 integrón de clase 1, y 4 cepas con 2 integrones de clase 1. Aunque la cantidad de integrones por cepa no aumenta a lo largo del tiempo con respecto a los primeros aislamientos, se observa una tendencia a aumentar el

número de familias de antimicrobianos a los que estos aislamientos presentan resistencia (Figura 5.2b.b).



**Figura 5.2b.b. Número de familias de antimicrobianos a las que *P. mirabilis* presenta resistencia, en función del número de integrones presentes en los mismos.**

De los 35 aislamientos de *P. mirabilis* estudiados, 2 de éstos aislamientos sólo presentan *intI1* sin detectarse genes *cassettes* en la zona variable, sin embargo estas cepas son resistentes a dos familias de antimicrobianos (aminoglucósidos y quinolonas).

Entre los 13/35 aislamientos que sólo contienen un integrón de clase 1, 9/13 presentan resistencia a 4 familias de antimicrobianos y de los 4 aislamientos restantes, uno presenta resistencia a 3 familias de antimicrobianos y 3 aislamientos presentan resistencia a 2 familias.

Dentro 14/35 aislamientos que contienen 2 integrones de clase 1, 3/14 presenta resistencia a 4 familias de antimicrobianos y 11/14 presentan resistencia a 3 familias de antimicrobianos.

En 7/35 aislamientos que contienen 3 integrones , 3/7 presentan resistencia a 3 familias de antimicrobianos, y 4/7 a 4 familias.



Un solo aislamiento de los 35 estudiados, contiene 4 integrones y presenta resistencia a 4 familias de antimicrobianos.

*A priori* pareciera observarse que el número de familias de antimicrobianos a los que cada cepa es resistente depende de los genes y genes *cassettes* que conforman la estructura del integrón más que del número de integrones contenidos en la cepa, ya que el 52,94% (9/17) de las cepas que presentan resistencia a 4 familias de antimicrobianos, contienen un solo integrón, de las cuales 8/9 presentan integrones de clase 1 complejos. En el 47,06 % (8/17) de cepas restantes que presentan resistencia a 4 familias de antimicrobianos encontramos que: 3/17 cepas contienen 2 integrones, 1 de éstas 3 cepas contiene un integron complejo; 4/17 contienen 3 integrones y las 4 tienen integrones complejos. Y 1/17 contiene 4 integrones, uno de los cuales es un integrón complejo. Estos resultados ponen en evidencia que el 82,35% de las cepas que contienen integrones complejos presentan resistencia a 4 familias de antimicrobianos.

### **5.3. Análisis bioinformático de la dispersión de integrones clase 1 en *P. mirabilis***

En un período de 20 años (1993-2013) se han publicado 32 números de acceso correspondientes a 30 aislamientos de *P. mirabilis* con integrones de clase 1 en la base de datos de INTEGRALL, dentro de los cuales 3 poseen integrones complejos (ítem 4.9 de Materiales y Métodos). Estos integrones se encuentran solos como tales o formando parte de otras estructuras como islas genómicas, plásmidos y transposones.

Estos aislamientos son de diversas fuentes y áreas geográficas: hisopado de cloaca de aves (Italia), de alimentos (China), de muestras clínicas de pacientes (Palestina, Australia, Portugal, Francia, Grecia y China). En ellos se encontraron 34 integrones de



clase 1, con 27 arreglos de genes *cassettes* diferentes en su zona variable, que incluyen la combinación de 29 genes *cassettes*, de los cuales 25 corresponden a genes de resistencia a antimicrobianos que codifican para la resistencia a  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima y cloranfenicol. Sólo 4 son marcos de lectura abiertos sin función conocida: *orfF* (4/30), *orfC* (2/30), *orfD* (1/30) y *orfI* (1/30).

Los arreglos de genes *cassettes* en orden de frecuencia son: *dfrA15* y *dfrA12* - *orfF* - *aadA2* 10% (3/30), *aadB* - *aadA2*, *aadA2*, *bla<sub>VIM-1</sub>* - *aacA7* - *dfrA1* - *aadA1* 6,67% (2/30). El resto de arreglos de genes *cassettes* que figuran en la Tabla 5.3.a, se encuentran en el orden del 3,33% (1/30).

Los genes *cassettes* encontrados en estos aislamientos son: *aadA2* 30% (9/30); *drfA1* 23,33% (7/30); *aadB* y *drfA12* 13,33% (4/30); *aac(6')-Ib*, *aadA1<sub>a</sub>*, *drfA15*, *bla<sub>VIM-1</sub>*, *aadA1*, *aacA7* 10% (3/30); *aadA7*, *estX*, *bla<sub>PSE-1</sub>*, 3,23% (2/30); *bla<sub>P-2</sub>*, *bla<sub>CARB-9</sub>*, *bla<sub>OXA-2</sub>*, *drfA*, *bla<sub>P1</sub>*, *smr2*, *cat*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *aacC1*, *aacC5*, *drfA7*, *bla<sub>VIM-25</sub>* y *aacCA5* 3,33% (1/30).

Se encontraron en estos aislamientos 3 integrones complejos (3/30), cuyos arreglos de genes *cassettes* en la VR-1 fueron: *aac(6')-Ib* - *bla<sub>OXA-2</sub>* - *orfD*, *dfrA12* - *aadA2* y *aac(6')-Ib* - *aadB* - *dfrA1*. Los genes encontrados en la VR-2 fueron: *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>VEB-6</sub>*, *qnrA1* y *AmpR*, respectivamente.



**Tabla 5.3.a Zonas variables de Integrones clase 1 en aislamientos de *P. mirabilis* publicados en INTEGRALL.**

Nº de acceso	Año	Cassettes en la VR-1	Genes en la VR-2	Comentarios
<a href="#">PRMPBLAP</a>	1993	<i>bla<sub>p2</sub></i>		Penicilinasa mediada por pCS229.No publicado
<a href="#">D86225</a>	1998	<i>bla<sub>CARB-9</sub></i>		Penicilinasa que hidroliza carbeniciina (pc5229) posee aprox 98% de similitud con una carbenicilinasa mediada por plásmidos específica de <i>P.aeruginosa</i> PSE4
<a href="#">AY079169</a>	2002	<i>aac(6<sup>+</sup>)-Ib - bla<sub>oxa-2</sub> - orfD</i>	<i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	plásmido <i>pMAR12</i>
<a href="#">AY677093</a>	2004	<i>aadA1</i>		Aislamiento con multirresistencia mediada por plásmidos, aislada de carne de pollo
<a href="#">AY681136</a>	2004	<i>aadB - aadA2</i>		Aislamiento con multirresistencia mediada por plásmidos, aislado de carne de pollo
<a href="#">AB269788</a>	2006	<i>dfrA15</i>		Aislamiento clínico con nueva variante de SGI1 con 2 integrones de clase 1.
<a href="#">AB269789</a>	2006	<i>bla<sub>p1</sub></i>		
<a href="#">DQ221761</a>	2006	<i>dfrA1 - aadA1a</i>		Aislamiento proveniente de hisopados de cloaca de gaviotas (reserva natural NE de Italia)
<a href="#">DQ520936</a>	2006	<i>dfrA15</i>		Aislamiento proveniente de hisopados de cloaca de gaviotas (reserva natural NE de Italia)
<a href="#">DQ520937</a>	2006	<i>aacC5 - aadA7</i>		Aislamiento provenientes de hisopados de cloaca de gaviotas (reserva natural NE de Italia)
<a href="#">DQ520938</a>	2006	<i>estX</i>		Aislamiento provenientes de hisopados de cloaca de gaviotas (reserva natural NE de Italia)
<a href="#">DQ520939</a>	2006	<i>aadB - aadA2</i>		Aislamiento proveniente de hisopados de cloaca de gaviotas (reserva natural NE de Italia)
<a href="#">DQ520940</a>	2006	<i>estX - smr2 - aadA1a</i>		Aislamiento proveniente de hisopados de cloaca de gaviotas (reserva natural NE de Italia)
<a href="#">DQ520941</a>	2006	<i>orf1 - cat - aadA1a</i>		Aislamiento proveniente de hisopados de cloaca de gaviotas (reserva natural NE de Italia)

Caracterización Molecular del los Integrones de clase 1 en *Proteus mirabilis*

Nº de acceso	Año	Cassettes en la VR-1	Genes en la VR-2	Comentarios
<a href="#">DQ322594</a>	2006	<i>aadA2</i>		Malasia
<a href="#">EF093146</a>	2006*	<i>bla<sub>VIM-1</sub> - dfrA - aadA1</i>		Aislamiento recuperado de meningitis nosocomial secundaria a trauma craneo-espinal
<a href="#">EU006710</a>	2007	<i>dfrA1 - orfC</i>		Integrón clase 1, en variante de SGII (SGII-O) aislado en China.
<a href="#">EU006711</a>	2007	<i>bla<sub>PSE1</sub> - aadA2</i>		Integrón de clase 1, no asociado con SGII, en idem cepa <a href="#">EU006710</a>
<a href="#">EU259884</a>	2008	<i>bla<sub>TEM-1</sub> - aac(6')-Ib - aadB - dfrA1 - orfC, bla<sub>VEB-6</sub></i>		Rmtc 16S rRNA y <i>bla<sub>VEB-6</sub></i> en Australia. Integrón de clase 1 con una estructura compleja que incluye a VEB-6, no es integron complejo.
<a href="#">EU851865</a>	2008	<i>aacC1</i>		Aislamiento hospitalario resistente a gentamicina Portugal. No publicado.
<a href="#">EU860402</a>	2008	<i>dfrA7</i>		Aislamiento hospitalario resistente a trimetoprima .Portugal. No publicado
<a href="#">GQ891753</a>	2009	<i>dfrA12 - aadA2</i>	<i>qnrA1- AmpR</i>	Cepa de aguas residuales cercanas al hospital.China. No publicado
<a href="#">GU724870</a>	2010	<i>bla<sub>VIM-1</sub> - aacA7 - dfrA1 - aadA1</i>		Paciente colonizado con 6 cepas distintas productoras de carbapenemasas clase A y B
<a href="#">HM106447</a>	2010	<i>dfrA12 - orfF - aadA2</i>		Integrón de clase 1 con arreglo de genes <i>cassettes</i> encontrados por primera vez en esta especie. Aislamiento clínico. IH, China
<a href="#">HM106454</a>	2010	<i>dfrA12 - orfF - aadA2</i>		Integrón de clase 1 en aislamiento clínico multiresistente. IH.China
<a href="#">HM750249</a>	2010	<i>bla<sub>VIM-25</sub> - aacA7</i>		<i>P. mirabilis</i> que alberga plásmido P13, con integrón clase 1, con <i>bla<sub>VIM-25</sub></i> y <i>aacA7</i> .(INDIA)



## Caracterización Molecular del los Integrones de clase 1 en *Proteus mirabilis*

Nº de acceso	Año	Cassettes en la VR-1	Genes en la VR-2	Comentarios
<a href="#">HQ880252</a>	2011	<i>dfrA1 - orfF</i>		Cepa, procedente de aislamiento clínico no especificado, Idem hosp HM106447/454. China, fuente no mencionada
<a href="#">HQ880253</a>	2011	<i>dfrA12 - orfF - aadA2</i>		Cepa, procedente de aislamiento clínico no especificado, Idem hosp HM106454/447. China, fuente no mencionada
<a href="#">HQ880254</a>	2011	<i>aadA2</i>		Cepa, procedente de aislamiento clínico no especificado, Idem hosp HM106454/447. China, fuente no mencionada
<a href="#">HQ888851</a>	2011	<i>aac(6')-Ib - aadB - dfrA1</i>	<i>bla<sub>VEB-6'</sub> qnrA1</i>	Nueva variante de Isla genómica de <i>Salmonella</i> (SG11-V) en aislamiento clínico en Francia.
<a href="#">JQ690541</a>	2012	<i>bla<sub>VIM-1</sub> - aacA7 - dfrA1 - aadA1</i>		Plásmido que codifica VEB-1 y VIM-1 .VEB Se encuentra en la VR de un integron que fue invadida por IS donde no se puede observar <i>intI1</i>
<a href="#">JX121641</a>	2013	<i>aacCA5 - aadA7, dfrA15, bla<sub>PSE-1</sub></i>		(SG11) en aislamientos clínicos de <i>P. mirabilis</i> Dijon, France/ <i>bla<sub>PSE-1</sub></i> está dentro de integrón no funcional, <i>intI1</i> está invadida por <i>groEl</i>

(\*) cepa aislada en 2003



## 6. DISCUSIÓN

*P. mirabilis* es uno de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* más sensibles a antibióticos, debido entre otras causas, a la ausencia de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas. La resistencia en esta especie se debe fundamentalmente a la adquisición de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas. El aislamiento de cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación se ha ido incrementando, alcanzando un 18% en esta especie en Argentina (Rodríguez C. y col., 2005; Pasterán F. y col., 2000).

En el estudio de Rodríguez C. y col (2005), de las 87 cepas de *Proteus* spp. estudiadas, 47 (54%) fueron sensibles a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos utilizados; 24 (28%) fueron sólo resistentes a las aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generación, y 16 (18%) resultaron resistentes a alguna de las cefalosporinas de tercera generación ensayadas. Las enzimas de espectro extendido más frecuentemente halladas en *P. mirabilis*, en Estados Unidos y Europa son derivadas de enzimas tipo TEM, como TEM-3, TEM-10 y TEM-26, siendo la más frecuente TEM-1. En cambio en Argentina, las enzimas del tipo CTX-M-2 son prevalentes en esta especie (Quiroga, M. P. y col., 2013; Rodríguez C. y col., 2005; Pasterán F. y col., 2000), así como también es posible aislar PER-2. De hecho, el primer aislamiento productor de PER-2 en nuestro país fue identificado en una cepa de *P. mirabilis* en la década del '90 (Rodríguez C. y col, 2005). Más recientemente, en Israel entre abril del 2000 y enero del 2001, se ha descrito por primera vez la presencia de CTX-M-2 en cepas de *P. mirabilis* de origen hospitalario, excluyendo aislamientos urinarios (Morlote M.M. y col., 2003)

En un relevamiento de enterobacterias de la red WHONET del año 2007, de un total de 2663 *Proteus* spp., el 28% presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación

y dentro de estos, considerando solo los aislamientos intrahospitalarios, el 41% (n=534) presentaron resistencia a las mismas, no especificándose los datos por especie. (<http://www.whonet.org/DNN/>).

El análisis de los datos de pacientes internados en los años 2006 – 2007 del Sistema informático de Resistencia (SIR) (SADEBAC-AAM) en Argentina, muestra en dos cortes de prevalencia en pacientes internados que los porcentajes de resistencia de *P. mirabilis* a ampicilina fueron de 61% (n=174) y 72% (n=110), respectivamente, donde los porcentajes de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación fueron: resistencia a Ctx 24% en 2006 (n=174) y 34% en 2007 (n=110) y la resistencia a Caz 11% en ambos años (n=174, n=110). En este análisis también se evaluó la resistencia a aminoglucósidos en *P. mirabilis*. Así se encontró en los cortes de prevalencia realizados, un porcentaje de resistencia a gentamicina de 36% en 2006 (n=174) y de 32% en 2007 (n=110) y los porcentajes de resistencia a amikacina fueron 4% y 6%, respectivamente.

Los resultados obtenidos del análisis de los 35 aislamientos estudiados en esta tesis correspondientes al período 1993-2008, están en concordancia con los datos publicados respecto al incremento del nivel de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en esta especie, ya que un 48,57% (17/35) de nuestros aislamientos mostró resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, existen ciertas diferencias en los porcentajes de resistencia a aminoglucósidos encontrados en nuestros aislamientos, sobre todo a amikacina donde detectamos un 91,43% (32/35) de resistencia, respecto a los datos presentados en el SIR 2006-2007 donde en esos años observaron un 4 % y 6% de resistencia, respectivamente. Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en la utilización de amikacina o gentamicina y por lo tanto a variaciones en la presión de selección de resistencias hacia

estos antimicrobianos en los diferentes nosocomios de donde provienen los aislamientos analizados.

En este trabajo encontramos una elevada frecuencia de integrones de clase 1 (100%, 35/35) en la colección de *P. mirabilis* provenientes de aislamientos clínicos y resistentes a dos o más familias de antimicrobianos. Del total de estos integrones de clase 1, 48,57% (17/35) fueron integrones complejos. En un estudio realizado por Arduino S. y col en el 2003, se analizaron 130 aislamientos de los cuales 100 eran bacilos Gram negativos que abarcaban tanto miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como Bacilos Gram negativos no fermentadores. De éstos, 35/100 albergaban integrones complejos clase 1 con el gen *bla<sub>CTX-M-2</sub>* en la VR-2, de los cuales 12/35 eran *P. mirabilis*. De las cepas que no portaban el gen *bla<sub>CTX-M-2</sub>* (65/100), todos tenían al menos un integrón de clase 1, entre éstos, 2/65 eran *P. mirabilis* (Arduino S. y col., 2003). En nuestro estudio, los 35 aislamientos de *P. mirabilis* analizados presentan todos al menos un integrón de clase 1 y algunas cepas presentan más de uno. Así tenemos que: 13 (37,14%) albergan un solo integrón de clase 1; 14 (40%) de los aislamientos presentan 2 integrones de clase 1; 7 (20%) presentan 3 integrones de clase 1, 1 (2,86%) presenta 4 integrones de clase 1. Y 2 (2,71%) de las cepas presentan *intI1*, sin arreglos de *cassettes* en la zona variable. En un estudio realizado en el período 2008-2009 en China, Wu y col (2012) encontraron que de 10/34 aislamientos de *P. mirabilis* que tenían *intI1*, solamente 7 poseían 1 integrón de clase 1 con arreglos de genes *cassettes* en la zona variable, mientras que las 3 cepas restantes sólo presentaban *intI1* sin genes *cassettes* en la zona variable. Las razones principales de no detectarse genes *cassettes* en la zona variable según ellos mismos describen podrían ser: defectos o mutaciones en la zona 3'CS, o arreglos de genes *cassettes* nuevos, complejos o inusuales integrones de clase 1 o que la zona variable sea demasiado extensa para ser amplificada (Wu y col., 2012). Hoy



en día es sabido que existe otra posibilidad además de las detalladas, que corresponde a integrones que presentan parte de los genes de la transposición del transposón Tn402 en lugar de la región 3'-CS (Stokes y col., 2006; Sajjad, A. y col., 2011) tal como también se ha encontrado en estudios previos de nuestro laboratorio (Vilacoba y col., 2014).

En nuestro estudio encontramos un total 64 integrones de clase 1 en los 35 aislamientos, entre los que se distinguieron 12 arreglos de genes *cassettes* diferentes en su zona variable, que incluyen la combinación de 9 genes *cassettes*, 8 de los cuales corresponden a genes de resistencia a antimicrobianos. Las combinaciones de *cassettes* *aac(6')-Ib* - *bla<sub>OXA-2</sub>* - *orfD* (74,29%), *aadB* - *aadA1* (20%), *aac(6')-Ib* - *aadA1* (11,43%), *aac(6')-Ib* (8,5%), encontrados en estos aislamientos de *P. mirabilis* estudiados, fueron también descritos en integrones de clase 1 de otros aislamientos clínicos de Argentina, correspondientes a otras enterobacterias además de *P. mirabilis*. Así *aac(6')-Ib* - *bla<sub>OXA-2</sub>* - *orfD* fue descrita en *Morganella morganii*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp, *Salmonella* Infantis (Arduino, S. y col., 2003; Power y col., 2005; Soler Bistue y col., 2006; Orman, B. y col., 2002; Di Conza, J., 2002); *aac(6')-Ib* - *aadA1* fue descrita en *Citrobacter freundii*, *E. cloacae*, *S. maltophilia* (Di Conza J.A. y Gutkind G.O., 2010; Quiroga, M.P. y col., 2007; Arduino y col., 2003; Barbolla y col., 2004) y *aadB* - *aadA1* y *aac(6')-Ib* en especies no especificadas de enterobacterias (Arduino y col., 2003). En el estudio anteriormente citado, realizado entre enero 2008 a diciembre del 2009 por Wu y col (2012) en China, evaluando la presencia de integrones de clase 1 en 1447 aislamientos de bacterias Gram negativas multirresistentes, provenientes de diversas muestras clínicas de pacientes internados, de 825 que tenían integrones de clase 1 (825/1447), 10 (10/34) eran *P. mirabilis*, 7 de los cuales (7/10) presentaban 3 arreglos distintos de genes *cassettes* en su zona variable, que incluían 4 genes *cassettes*: *aadA2*, *drfA1* - *orfF* y *dfrA12* - *orfF* - *aadA2*,



donde este último arreglo fue encontrado por primera vez en esta especie (AN: HQ880254, HM106447, HQ880252, respectivamente; Tabla 5.3a). Estos arreglos de genes *cassettes* no fueron encontrados en los 35 aislamientos analizados en nuestro estudio.

Nuestro estudio parece indicar que *intI1* es frecuente en *P. mirabilis* en Argentina (35/35). En China Wu y col (2012), en un período de 2 años, encontraron *intI1* en 10/34 cepas de *P. mirabilis*, y en un grupo de cepas estudiadas en Francia por Siebor E. y Neuwirth C. (2013) sólo se encontró *intI1* en 7/66 cepas de esta especie. Aunque nuestros resultados parecen indicar que hay elevada frecuencia de integrones de clase 1 en esta especie en Argentina, se debería tomar un número mayor de aislamientos de cada año para confirmarlo.

Como ya se mencionó, del total de estos integrones de clase 1 encontrados en nuestros aislamientos de *P. mirabilis*, casi la mitad fueron integrones complejos. El arreglo de genes *cassettes* más frecuentemente encontrado en la VR-1 de éstos fue *aac(6')-Ib - bla<sub>OXA-2</sub> - ofrD* (52,94%) seguido por *aadB - aadA1* (17,64%), *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ib - aadA1* (11,76% para ambos). Este resultado está en concordancia con lo reportado por Arduino, S. y col. (2003), donde si bien los distintos arreglos de los genes *cassettes* de la VR-1 no fueron relacionados a la especie bacteriana, se encontró que *aac(6')-Ib - bla<sub>OXA-2</sub> - ofrD* fue el arreglo de genes *cassettes* más frecuente en los 35 aislamientos con *bla<sub>CTX-M-2</sub>* (74%). De igual forma, los otros arreglos tales como *aadB - aadA1* (6%), *aac(6')-Ib* y *aac(6')-Ib - aadA1* (3%), si bien en menor proporción a lo hallado en nuestros aislamientos, también fueron encontrados por Arduino y col.2003. En los aislamientos estudiados se encontró también *aadB - aac(6')-Ib* (5,8%), el cual no fue encontrado en los aislamientos analizados en el estudio de Arduino y col. en el 2003 ni entre los mencionados por Di Conza J., Gutkind G. en el 2010.



Como se mencionó al realizar un análisis bioinformático de la dispersión de integrones de clase 1 en *P. mirabilis*, se han publicado en la base de datos INTEGRALL 30 aislamientos de *P. mirabilis* entre 1993 y 2013 con 34 integrones de clase 1 y 27 arreglos de arreglos de genes *cassettes* diferentes en su zona variable; dentro de los cuales 3 son integrones complejos y uno de estos fue publicado por Arduino S. y col en el 2002. Estos aislamientos publicados provenían de distintas fuentes tanto de reservorios animales (aves fundamentalmente), alimentos, como así también de muestras clínicas.

En los trabajos publicados sobre las cepas de *P. mirabilis* de origen clínico, estas presentaban resistencia a ampicilina y/o gentamicina y/o trimetoprima/sulfametoxazol, así como también presentaban resistencia a cefalosporinas de tercera generación, similar a nuestras cepas estudiadas (Tsakris, A. y col., 2007; Ahmed, A.M. y col., 2007; Boyd, D.A. y col., 2008; Falcone, M. y col., 2009; Siebor, E. y Neuwirth, C., 2011; Wu K. y col., 2012; Siebor, E. y Neuwirth, C., 2013).

Siebor, E. y Neuwirth, C. (2013), realizaron un estudio en un período de 6 meses entre 2011 y 2012 en Francia, sobre 220 aislamientos de *P. mirabilis* provenientes de diversas muestras clínicas, principalmente orina, pero también de sangre, esputo, tejido óseo y materia fecal. De 57/220 cepas seleccionadas por su fenotipo de resistencia a ampicilina y/o gentamicina y/o trimetopirima/sulfametoxazol, y 9 cepas de *P. mirabilis* con BLEE seleccionadas de una colección entre 2005-2012, se observó que 5/57 y 2/9 de las cepas de *P. mirabilis* con BLEE portaban integrones de clase 1, los cuales están mayormente asociados a resistencia antimicrobiana y también son llamados integrones móviles por estar asociados a transposones y plásmidos, estaban contenidos en islas genómicas de *Salmonella* (SGII), así como también en algunas de sus variantes, las cuales parecen estar ampliamente distribuidas en *P. mirabilis*. Estos datos, muestran que estos



integrones de clase 1 pueden encontrarse también en islas genómicas en el cromosoma, con todas las posibles consecuencias que ello implica, de mayor diseminación de genes de resistencia así como también de cepas más virulentas como ya ha sido demostrado en otros géneros bacterianos.

Se ha observado en éstas cepas publicadas de *P. mirabilis* una amplia variedad de regiones de multirresistencia a antimicrobianos (MDR). Estas regiones, algunas de ellas ubicadas en integrones complejos clase 1, contienen una amplia variedad de genes *cassettes* que codifican para la resistencia a diferentes antimicrobianos y ya han sido descritos en otros aislamientos tanto de *P. mirabilis* como de otras enterobacterias (Wu y col., 2012; Siebor, E. y Neuwirth, C., 2013). Estas MDR confieren resistencia no solamente a antimicrobianos más antiguos, los que no son ampliamente utilizados en infecciones severas, sino que también ponen en peligro la actividad de quinolonas, cefalosporinas de tercera generación así como también de los carbapenemes, como lo demuestra la presencia de los genes y genes *cassettes qnrA1*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>VEB-6</sub>* y *bla<sub>VIM-1</sub>*, en éstos aislamientos publicados (Tsakris, A. y col., 2007; Siebor, E. y Neuwirth, C., 2011).

Además algunas de estas regiones de MDR son estructuralmente muy complejas y están compuestas por un mosaico de genes resultante de la combinación de integrones y transposones. Esta compleja estructura involucrada en estos rearrreglos facilita la adquisición y/o movimiento de genes de resistencia a antimicrobianos.

Al comparar nuestros datos con lo publicado en INTEGRALL se puede observar que el 87,09% (29/30) de los aislamientos publicados poseen un integrón de clase 1, el 6,67% (2/30) posee dos integrones de clase 1 y 3,33% (1/30) poseen tres integrones de clase 1. Algunos de los aislamientos publicados en INTEGRALL AN: AB269789 y

JX121641 tienen integrones no funcionales ya que presentan *intI1* invadida por *groEl*, no habiendo esto sido detectado esto en nuestros aislamientos.

Algunos de los genes *cassettes* encontrados más frecuentemente entre nuestros aislamientos, como *aac(6')-Ib* (88,57%), *drfA1*(42,86%) y *aadB* (40%); también se encuentran entre los más frecuentes en los aislamientos publicados en INTEGRALL, aunque en porcentajes diferentes: *drfA1* (23,33%), *aadB* (13,33%) y *aac(6')-Ib* (10%). Encontramos también entre nuestros aislamientos el gen *cassette aacA7* (2,86%) en menor proporción a lo publicado en INTEGRALL (10%). Los demás genes *cassettes* publicados en INTEGRALL: *aadA2* 30% (9/30); *drfA12* 13,33% (4/30); *aadA1<sub>a</sub>*, *drfA15*, *bla<sub>VIM-1</sub>*, *aadA1*, *aadA7*, *estX*, *bla<sub>PSE1</sub>* 6,67% (2/30), *aacCA5*, *aacC5*, *bla<sub>P2</sub>*, *bla<sub>CARB-9</sub>*, *bla<sub>OXA-2</sub>*, *drfA*, *bla<sub>P1</sub>*, *smr2*, *cat*, *bla<sub>TEM-1</sub>*, *aacC1*, *drfA7*, *bla<sub>VIM-25</sub>* 3,33% (1/30), no fueron encontrados en nuestros 35 aislamientos.

Si bien los arreglos de genes *cassettes* correspondientes a la zona variable de los integrones de clase 1 aislados en otros países y publicados en INTEGRALL difieren de los encontrados en nuestros aislamientos, esto no afectaría en general el fenotipo de resistencia. La única excepción a ello sería la presencia de los genes *cassettes bla<sub>VIM-1</sub>* y *bla<sub>VIM-25</sub>* que codifican para la metalobetalactamasa VIM en algunos aislamientos (AN: [EF093146](#) meningitis nosocomial secundaria a trauma, Galani I. y col.,2007), [GU724870](#) (paciente colonizado; Drieux L. y col., 2010.No publicado.), [HM750249](#) (Kumarasamy, K. y Krishnan, P., 2010. No publicado) y [JQ690541](#) (aislamiento recuperado de paciente internado, no se especifica tipo de muestra o sitio anatómico; Papagiannitsis C.C., 2012),

Estos genes *cassettes bla<sub>VIM-1</sub>* y *bla<sub>VIM-25</sub>* no fueron encontrados en nuestros aislamientos de *P. mirabilis*. En Argentina de acuerdo a los datos publicados por el Servicio de Antimicrobianos ANLIS –INSTITUTO C. G. MALBRAN ([antimicrobianos.com.ar](http://antimicrobianos.com.ar))



(2005 - 2013) y Pagniez, G. y col 2006, esta carbapenemasa, metalo- $\beta$ -lactamasa, sería prevalente hasta el momento en *Pseudomonas aeruginosa*, donde se encontraron los genes *cassettes bla<sub>VIM-2</sub>* y *bla<sub>VIM-11</sub>*. Habiéndose encontrado también estas variantes de *bla<sub>VIM</sub>* en coinfecciones con *Enterobacter cloacae* (hospital de agudos Dr. I Pirovano) (Gomez, S.A. y col., 2013). Se ha descrito también en Argentina la primera infección en humanos por *Pseudomonas chlororaphis* y grupo *P. alcaliphila/oleovorans* portadoras del gen *bla<sub>VIM-2</sub>* (Faccone, D. y col., 2013).

En un análisis realizado por Pasterán y col en el 2005, se encontró en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* portadora de una BLEE tipo Ges-1, una nueva variante de *bla<sub>VIM-11</sub>*, una *bla<sub>VIM-2-like</sub>*. Ambos genes *cassettes bla<sub>VIM-2-like</sub>* y *bla<sub>GES-1-like</sub>* fueron encontrados como primer *cassette* de dos integrones clase 1 diferentes. Esto podría hacer suponer dada la ubicuidad y alta frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa* en las unidades de terapia intensiva y otras unidades críticas de nuestros hospitales que sólo es cuestión de tiempo para que éstas enzimas sean transferidas por THG a otras especies de bacilos Gram negativos y puedan así ser encontradas en otras enterobacterias como *P. mirabilis*, cuya presencia está aumentando en dichas unidades críticas por la elevada utilización de colistín, ya que *P. mirabilis* es resistente natural a este antimicrobiano. De hecho en el Hospital general de Agudos Dr. Ignacio Pirovano, se produjo un hallazgo casual de un *Enterobacter cloacae* portador de *bla<sub>VIM-2</sub>*, dentro de un integrón de clase 1 con un nuevo arreglo de genes *cassettes bla<sub>VIM-2</sub> - aac(6')-Ib - aacA5*, en un screening para portación de KPC (*Klebsiella pneumoniae* portadora de carbapenemasa KPC). Siendo hasta la fecha según concluye el análisis de Gomez y col en el 2013 *Enterobacter cloacae* la especie preferida de bacilo Gram negativo para portar y diseminar horizontalmente metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL<sub>S</sub>) similares a *bla<sub>VIM</sub>* en diversas estructuras de integrones de clase 1.



## 7. CONCLUSIONES

- Se encontró en esta colección de *P. mirabilis* provenientes de aislamientos clínicos una elevada frecuencia de integrones de clase 1 35/35 (100%) confirmando la hipótesis planteada y se detectó a *ISCR1* en 17/35 (48,57%) de los mismos.
- Se encontró en total 64 integrones de clase 1 en los 35 aislamientos, entre los que se distinguieron 12 arreglos de genes *cassettes* diferentes en su zona variable, que incluyen la combinación de 9 *cassettes*, 8 de los cuales corresponden a genes de resistencia a antimicrobianos que codifican para la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima y cloranfenicol.
- El integrón de clase 1 más frecuente fue In35, detectado en el 71,43% de los aislamientos.
- Dentro de los integrones de clase 1 complejos, In35::*ISCR1*::*bla*<sub>CTX-M-2</sub> fue el más frecuente, presente en el 52,94% (9/17) de los aislamientos con BLEE.
- Los hallazgos a nivel molecular confirman lo evidenciado por el fenotipo de resistencia ya que el 48,57% del total de los aislamientos resultó ser resistente a ceftazidima, cefotaxima y cefepime. En estas cepas el análisis de la cartografía por PCR y secuenciación de la VR-2 de los integrones de clase 1 complejos, evidenció la presencia de la BLEE *bla*<sub>CTX-M-2</sub>.
- En ninguno de los aislamientos se detectó resistencia a los carbapenemes.
- La presencia de integrones de clase 1 es importante para la resistencia a los aminoglucósidos encontrada en nuestros aislamientos:
  - i) La resistencia a gentamicina fue del 31,43% mientras que el 17,14% de los aislamientos presentó sensibilidad intermedia. Se encontró un único gen *cassette* de resistencia a gentamicina, *aadB*, presente en el 40% de los aislamientos.

ii) La resistencia a amikacina fue del 91,43%, mientras que el 2,86% de los aislamientos presentó sensibilidad intermedia. Se encontraron 3 genes *cassettes* de resistencia a este aminoglicósido: *aac(6')-Ib* (88,57%), *aacA7* (2,86%) y *aac(6')-Iq* (2,86%).

- Respecto a la resistencia a quinolonas fluoradas, ésta se encuentra relacionada con el uso de las mismas en un país o región; ciertamente la resistencia es mayor en las cepas de origen intrahospitalario, pero el uso indiscriminado en la comunidad está elevando los porcentajes de resistencia en Latinoamérica.
- La resistencia en estos aislamientos donde no se detectaron *qnr* y/o *aac(6')-Ib-cr* puede ser debida a: alteraciones del sitio blanco por mutaciones puntuales en la región Quinolone Resistance Determining Region (QRDR), por disminución de la concentración citoplasmática de la droga, ya sea por reducción de la permeabilidad por deficiencia en las porinas OmpF, OmpC, o por eflujo familia RND. Otra posibilidad dado el alto porcentaje de resistencia acompañante de aminoglucósidos en estos aislamientos es que haya asociadas enzimas *rmtB* (metilasa ARNr 16S), que están en la misma plataforma genética que *QepA*, pero que no fueron objeto de este estudio y no fueron detectadas en estos aislamientos.
- El 91,43% (32/35) de los aislamientos fue resistente a Tms, de los cuales solamente 15/35 (42,86%) presentaba el gen *cassette dfrA1*. Este nivel de resistencia es algo importante a tener en cuenta dado que Tms es una opción terapéutica para los tratamientos por vía oral.
- En los aislamientos estudiados correspondientes al período 1993-2008 aunque la cantidad de integrones por cepa no aumenta a lo largo del tiempo con respecto a los primeros aislamientos, se observa una tendencia a aumentar el número de familias de antimicrobianos a los que estos aislamientos presentan resistencia. Y el número de familias

de antimicrobianos a los que cada cepa es resistente parece depender, como previamente se mencionó, de los genes *cassettes* que conforman la estructura del integrón más que del número de integrones contenidos en la cepa, ya que tenemos 9 cepas que contienen un solo integrón que presentan resistencia a 4 familias de antimicrobianos, donde 8 de las cuales presentan integrones de clase 1 complejos.

- Nuestros resultados y los datos publicados en INTEGRALL, muestran una vez más que la THG y junto a ella la resistencia a múltiples familias de antimicrobianos ya no es patrimonio de ciertas cepas en particular. Y si bien la evaluación del entorno genético de los integrones de clase 1 encontrados en los 35 aislamientos evaluados no fue el objetivo de nuestro estudio, se ha visto que *P. mirabilis* es una especie bacteriana que podría ser considerada un importante hospedador de islas genómicas tales como islas genómicas de *Salmonella* (SGI1) y sus variantes o Islas Genómicas de *Proteus* (PGI1). Estas islas son elementos integrativos cromosómicos de portan integrones de clase 1. Las posibles consecuencias que ello implica son una mayor diseminación de genes de resistencia así como también de cepas más virulentas como se ha demostrado previamente.
- En nuestros aislamientos no han sido detectados genes y genes *cassettes* como *bla<sub>VEB</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* o *qnr*. Pero se debería prestar especial atención para su detección a los pacientes con fallas de tratamiento o mala evolución clínica.
- Los aislamientos estudiados corresponden a infecciones intrahospitalarias y aproximadamente la mitad de las cepas de los años 1993 y 1994 proceden de pacientes sometidos a diálisis y en concordancia con los resultados del análisis multivariado de Tumbarello y col. 2012, se confirmaría la asociación histórica entre el contacto previo con el sistema de cuidado de salud, ya sea éste hospital de día, geriátricos, internación en

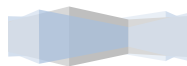


hospital de agudos y/o con la utilización de oxymino cefalosporinas y quinolonas fluoradas, con el aislamiento y diseminación de *P. mirabilis* multirresistente.

- La exposición a piperacilina-tazobactam y el uso de cefalosporinas han sido identificados como un factor de riesgo para el paciente, para la posterior colonización/infección del mismo por *P. mirabilis* multirresistente en las unidades de cuidados intensivos.
- Las bacterias Gram negativas y *P. mirabilis* en particular, son reconocidas por su habilidad de colonizar en forma persistente el tracto gastrointestinal de pacientes tratados con antimicrobianos, lo cual erradica las bacterias susceptibles y modifica la resistencia de la microbiota del huésped. De este modo, un microorganismo resistente a múltiples drogas puede estar más sujeto a selección, por la utilización de uno de estos antimicrobianos. Y su efecto negativo sobre la microbiota normal también puede incrementar la vulnerabilidad del huésped a ser colonizado por nuevas cepas, elevando así el riesgo de colonización por cepas resistentes.
- La rápida identificación del microorganismo infectante y su sensibilidad antimicrobiana *in vitro* deben ser la prioridad de los laboratorios de microbiología, los cuales deberían llevar estrictas estadísticas de vigilancia de resistencia y epidemiológicas en los propios nosocomios, a fin de que los tratamientos empíricos iniciales sean los adecuados según la prevalencia de resistencia en el lugar, para posteriormente desescalar o no el tratamiento empírico adecuándolo al antibiograma de cada aislamiento y paciente en particular.
- Se debe además tener muy en cuenta, los datos epidemiológicos del paciente a la hora de elaborar los protocolos de dichos tratamientos empíricos iniciales. Ya que el reciente contacto hospitalario, sean internaciones prolongadas, hospitales de día, geriátricos, estudios invasivos entre otros, así como tratamientos con quinolonas fluoradas y oxymino

cefalosporinas hacen que se deba considerar como más probable la posibilidad de que el microorganismo causante de la infección sea multirresistente.

- Así pues la información que otorgan los resultados obtenidos, si bien en un número limitado de cepas deberían ser tenidos en cuenta para mejorar la eficacia de los tratamientos empíricos iniciales, pero también para asegurar que serán tomadas conductas de control de infecciones, rápidas y efectivas, para prevenir la diseminación de estas cepas multirresistentes en el ambiente hospitalario y su posterior diseminación en la comunidad.

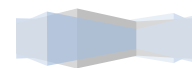


## RESUMEN

Según datos publicados por el C.D.C. ocurren en EEUU 90.0000 muertes por año debidas a infecciones intrahospitalarias. En los últimos años se habla de evolución moderna, donde no sólo entran en juego las mutaciones como importante mecanismo genético para evolucionar y hacer a las bacterias resistentes a los antimicrobianos, sino que además se han puesto en evidencia otros mecanismos como la Transferencia Horizontal Genética (THG), el cual es un mecanismo complejo, multifactorial, e importante en la evolución de distintos organismos. La resistencia a los antimicrobianos es el mejor ejemplo del proceso de presión-selección y adaptación genómica y fenotípica basada en la THG, ya que aproximadamente el 80% de las resistencias son debidas a este mecanismo. Hacia 1980, se observaron elementos genéticos asociados a la adquisición y pérdida de genes, los que fueron identificados como integrones. La definición actual de integrón define al integrón como un elemento que contiene los determinantes genéticos para mediar la recombinación sitio-específica, siendo capaz de reconocer y capturar genes *cassettes* móviles, muchos de los cuales codifican determinantes de resistencia a antibióticos.

Nuestro objetivo es conocer la frecuencia de integrones de clase 1 y los arreglos de genes *cassettes* en *P. mirabilis* así como también la evolución, a lo largo de 15 años en una colección de cepas no relacionadas epidemiológicamente que presentan al menos resistencia a dos familias de antimicrobianos.

Se realizó el estudio en 35 aislamientos no relacionados epidemiológicamente de *P. mirabilis* provenientes de cinco nosocomios de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de



la Provincia de Buenos Aires, aislados entre los años 1993-2008. El criterio de selección utilizado fue que los aislamientos debían ser resistentes al menos a dos familias de antimicrobianos. Se determinó la susceptibilidad de los aislamientos en estudio a once antimicrobianos de relevancia clínica por el método de difusión en agar de acuerdo a las guías del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2013). Para realizar la caracterización de los integrones de clase 1 se llevó a cabo cartografía por PCR, utilizando distintas combinaciones de cebadores a fin de caracterizar la estructura y el contenido de genes *cassettes* en la zona variable.

El 91,43% de los aislamientos fue resistente a ampicilina. La resistencia a ceftazidima, cefotaxima y cefepime se evidenció en el 48,57% del total de los aislamientos, los cuales todos presentaban fenotipo de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) tipo CTX-M-2. El 100% de los aislamientos fueron sensibles a carbapenemes. El 31,43% de los aislamientos fue resistente a gentamicina, mientras que el 17,14% presentó sensibilidad intermedia. La resistencia a amikacina se manifestó en el 91,43% de los aislamientos, el 2,86% presentó sensibilidad intermedia. La resistencia a ciprofloxacina y ácido nalidíxico en los aislamientos estudiados fue de 54,29% y 62,86%, respectivamente. El porcentaje de resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol de los mismos fue de 91,43%.

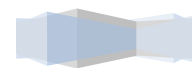
Se encontró integrones de clase 1 en 35/35 (100%) de los aislamientos, y se detectó a *ISCR1* en 17/35 (48,57%) de los mismos. Se encontraron en total 64 integrones de clase 1 en los 35 aislamientos, entre los que se distinguieron 12 arreglos de genes *cassettes* diferentes en su zona variable, que incluyen la combinación de 9 genes *cassettes*, 8 de los cuales corresponden a genes de resistencia a antimicrobianos. El arreglo de genes *cassettes* más frecuente en los 35 aislamientos evaluados fue *aac(6')-Ib- bla<sub>OXA-2</sub>-orfD*, tanto en los

integrones clase 1 complejos y no complejos, correspondiente a In35. Al relacionar los arreglos de genes *cassettes* de los integrones de clase 1 con los resultados de sensibilidad a los antimicrobianos ensayados, se observa que todos los aislamientos resistentes a ceftazidima, cefotaxima y cefepime 17/35 (48,57%), tienen integrones de clase 1 complejos que albergan a *ISCR1* con el gen *bla<sub>CTX-M-2</sub>* en la VR-2.

Al realizar un estudio bioinformático, observamos que en un período de 20 años (1993-2013) se publicaron 30 aislamientos de *P. mirabilis* con integrones de clase 1 en la base de datos INTEGRALL, dentro de los cuales 3 son integrones de clase 1 complejos. Estos integrones se encuentran formando parte de otras estructuras como islas genómicas, plásmidos y transposones. En ellos se encontraron 34 integrones de clase 1, con 27 arreglos de genes *cassettes* diferentes en su zona variable, que incluyen la combinación de 29 genes *cassettes*, de los cuales 25 corresponden a genes de resistencia a antimicrobianos.

Se encontró en esta colección de *P. mirabilis* provenientes de aislamientos clínicos una elevada frecuencia de integrones de clase 1 35/35 (100%) y se detectó a *ISCR1*, en 17/35 (48,57%) de los mismos. Dentro de los integrones de clase 1 complejos, In35::*ISCR1*::*bla<sub>CTX-M-2</sub>* fue el más frecuente.

En los aislamientos estudiados correspondientes al período 1993-2008 aunque la cantidad de integrones por cepa no aumenta a lo largo del tiempo con respecto a los primeros aislamientos, se observa una tendencia a aumentar el número de familias de antimicrobianos a los que estos aislamientos presentan resistencia. Además, el número de familias de antimicrobianos a los que cada cepa es resistente depende de los genes *cassettes*



que conforman la estructura del integrón más que del número de integrones contenidos en la cepa.

Nuestros resultados muestran una vez más que la THG, y junto a ella, la resistencia a múltiples familias de antimicrobianos ya no es patrimonio de ciertas cepas en particular.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Ahmed, A. M., Hussein, A.I.A. and Shimamoto, T. (2007).** *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. *J Antimicrob Chemother.* **59:** 184–190.

**Arakawa, Y. , Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N. & Ohta, M. (1995).** A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>IMP</sub>. *Antimicrob Agents Chemother.* **39:** 1612-1615.

**Arduino, S. M., Catalano, M., Orman, B. E., Roy, P. H. & Centrón, D. (2003).** Molecular epidemiology of orf513-bearing class 1 integrons in multiresistant clinical isolates from Argentinean hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* **47:** 3945-3949.

**Arduino, S. M., Roy, P. H., Jacoby, G. A., Orman, B. E., Pineiro, S. A., and Centron, D. (2002).** *bla*<sub>CTX-M-2</sub> Is Located in an Unusual Class 1 Integron (In35) Which Includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother.* **46:** 2303–2306.

**Barbolla, R., Catalano, M., Orman, B. E., Famiglietti, A., Vay, C., Smayevsky, J., Centrón, D. and Piñeiro, S. A. (2004).** Class 1 Integrons Increase Trimethoprim-Sulfamethoxazole MICs against Epidemiologically Unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates *Antimicrob Agents Chemother.* **48:** 666–669.

**Barker, A. & Manning, P. A. (1997).** VlpA of *Vibrio cholerae* O1: the first bacterial member of the alpha 2-microglobulin lipocalin superfamily. *Microbiology.* **143:** 1805-1813.

**Bissonnette, L., Roy, P. H. (1992).** Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of Gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* **174:**1248-1257.

**Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J. E. & Stokes, H. W. (2007).** Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol.* **15:** 301-309.

**Boyd, D.A., Shi, X., Hu, Q., King Ng, L., Doublet, B., Cloeckert, A. and Mulvey, M.R. (2008).** *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1), Variant SGI1-I, and New Variant SGI1-O in *Proteus mirabilis* Clinical and Food Isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**: 340–344.

**Bret L., Chanal-Claris C., Sirot D., Chaibi E.B, Labia R., and Siroti J.(1998).** Chromosomally Encoded AmpC-Type  $\beta$ -Lactamase in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**: 1110–1114.

**Brown, H. J., Stokes, H. W. & Hall, R. M. (1996).** The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *J Bacteriol.* **178**: 4429-4437.

**Centrón, D. & Roy, P. H. (2002).** Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:1402-1409.

**Chang, Y. C., Shih, D. Y., Wang, J. Y. & Yang, S. S. (2007).** Molecular characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in *Aeromonas* strains from foodborne outbreak-suspect samples and environmental sources in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **59**: 191-197.

**Clinical and Laboratory Standards Institute (2013).** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement M100-S23* CLSI, Wayne, PA USA,

**Coleman, N. V. & Holmes, A. J. (2005).** The native *Pseudomonas stutzeri* strain Q chromosomal integron can capture and express *cassette*-associated genes. *Microbiology.* **151**: 1853-1864.

**Coleman, N., Tetu, S., Wilson, N. & Holmes, A. (2004).** An unusual integron in *Treponema denticola*. *Microbiology.* **150**: 3524-3526.

**Collis, C. M., Kim, M. J., Stokes, H. W. & Hall, R. M. (2002).** Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-bp site. *Mol Microbiol.* **46**: 1415-1427.





**Collis, C. M., Kim, M. J., Stokes, H. W. & Hall, R. M. (1998).** Binding of the purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol Microbiol.* **29:** 477-490.

**Collis, C. M., Grammaticopoulos, G., Briton, J., Stokes, H. W. & Hall, R. M. (1993).** Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol.* **9:** 41-52.

**Collis, C. M. & Hall, R. M. (1992).** Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol.* **174:** 1574-1585.

**Collis, C. M., and R. M. Hall. (1992).** Gene Cassettes from the Insert Region of Integrons Are Excised as Covalently Closed Circles. *Mol Microbiol.* **19:** 2875-85.

**Craig, N. L. (1996).** Transposon Tn7. *Curr Top Microbiol Immunol* **204**, 27-48.

**Daikos G. L., Kosmidis C., Tassios P. T., Petrikkos G., Vasilakopoulou A., Psychogiou M., Stefanou I., Avlami A., and Katsilambros N. (2007).** *Enterobacteriaceae* Bloodstream Infections: Presence of Integrons, Risk Factors, and Outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **51:** 2366–2372.

**Di Conza, J, Gutkind G. (2010).** Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología.* **42:**63-78.

**Di Conza, J., Ayala, J. A., Power, P., Mollerach, M. and Gutkind, G. (2002).** Novel Class 1 Integron (InS21) Carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub> in *Salmonella enterica* Serovar Infantis. *Antimicrob Agents Chemother.* **46:** 2257–2261.

**Drouin, F., Melancon, J. & Roy, P. H. (2002).** The IntI-like tyrosine recombinase of *Shewanella oneidensis* is active as an integron integrase. *J Bacteriol.* **184:** 1811-1815.

**Esposito, D. & Scocca, J. J. (1997).** The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res.* **25:** 3605-3614.



**Faccone, D., Pasteran, F., Albornoz, E., Veliz, O., Bucciarelli, R., Gonzales, L., Corso, A.(2014).** Human Infection due to *Pseudomonas chlororaphis* and *P. oleovorans* harboring new *bla*<sub>VIM-2</sub>-borne integrons. *Infection, Genetics and Evolution*. **28**: 276–277.

**Falcone, M., Perilli, M., Mezzatesta, M. L., Mancini, C., Amicosante, G., Stefani, S. and Venditti, M. (2009).** Prolonged bacteraemia caused by VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Proteus mirabilis*: first report from Italy. *Clin Microbiol Infect*. **16**: 179–181.

**Fariñas M.C. y Martínez-Martínez L. (2013).** Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gran negativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **31**::402–409.

**Fluit, A. C. & Schmitz, F. J. (1999).** Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **18**: 761-770.

**Galani, I., Souli, M., Koratzanis, E., Koratzanis, G., Chryssouli, Z. and Giamarellou H.(2007).** Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* clinical isolates harbouring the same transferable plasmid coding for metallo- $\beta$ -lactamase VIM-1 in Greece. *J Antimicrob Chemother*. **59**:578 – 579.

**Gillings, M. R., Holley, M. P., Stokes, H. W. & Holmes, A. J. (2005).** Integrons in *Xanthomonas*: a source of species genome diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**: 4419-4424.

**Gomez, S. A., De Belder, D., Faccone, D., Anchordoqui, M., Pasteran, F., Giovanakis Rey, M. C., Garbaz, C, Arias, M., Petroni, A., Corso, A.(2013).**; *bla*<sub>VIM-11</sub> and *bla*<sub>VIM-2</sub> in a New Class I Integron Array Found in a Co-infection of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* From Argentina 53rd International Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy (ICAAC ), Denver. **Resumen: C2-1102**

**Gravel, A., Messier, N. & Roy, P. H. (1998).** Point mutations in the integron integrase IntI1 that affect recombination and/or substrate recognition. *J Bacteriol*. **180**: 5437-5442.

**Grindley, N. D., Whiteson, K. L. & Rice, P. A. (2006).** Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* **75**: 567-605.

**Gu, B., Tong, M., Zhao, W., Liu, G., Ning, M. & Pan, S. (2007).** Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. *J Clin Microbiol.* **45**: 241-243.

**Hall, R. M. & Collis, C. M. (1995).** Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* **15**: 593-600.

**Hall, R. M., Brown, H. J., Brookes, D. E., Stokes, H.W. (1994).** Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J Bacteriol.* **176**: 6286-6294.

**Hall, R. M., Brookes, D. E. & Stokes, H. W. (1991).** Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol.* **5**: 1941-1959.

**Hansson, K., Skold, O. & Sundstrom, L. (1997).** Non-palindromic *attL* sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets. *Mol Microbiol.* **26**: 441-453.

**Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Umayam, L., Gill, S. R., Nelson, K. E., Read, T. D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M. D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R. D., Nierman, W. C., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Colwell, R. R., Mekalanos, J. J., Venter, J. C. & Fraser, C. M. (2000).** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* **406**: 477-483.

**Hirsch, P. R., Wang, C. L. & Woodward, M. J. (1986).** Construction of a Tn5 derivative determining resistance to gentamicin and spectinomycin using a fragment cloned from R1033. *Gene.* **48**: 203-209.



**Hu, Y.-Y., Cai, J., Zhang, R., Zhou, H., Sun, Q. and Chen, G. (2012).** Emergence of *Proteus mirabilis* Harboring *bla*<sub>KPC-2</sub> and *qnrD* in a Chinese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**: 2278-2282.

**Kamali-Moghaddam, M., Sundström L. (2001).** Arrayed transposasebinding sequences on the ends transposon Tn5090/Tn402. *Nucleic Acids Res.* **29**: 1005-1011.

**Kholodii, G. Y., Mindlin S. Z., Bass I. A., Yurieva O. V., Minakhina S. V. & Nikiforov V. G. (1995).** Four genes, two ends, and *res* región are involved in transposition of Tn5053: paradigm for a novel family of transposons carryng either a *mer* operon or an integron. *Mol Microbiol.* **17**: 1189-1200.

**Kleckner, N. (1981).** Transposable elements in prokaryotes. *Annu Rev Genet* **15**: 341-404.

**Koneman, E. W., Allen, S. E., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, Jr. W. C.,** Diagnostic Microbiology Fifth editon Lippincot Company (1997). chapter **4**: 211.

**Leon, G. & Roy, P. H. (2003).** Excision and integration of cassettes by an integron integrase of *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol.* **185**: 2036-2041.

**Leverstein-van Hall, M.A., Blok, H.E.M., Donders, A.R.T., Paauw, A., Fluit, A. C. & Verhoef, J. (2003).** Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis.* **187**: 251-259.

**Levesque, C., Brassard, S., Lapointe, J. & Roy, P. H. (1994).** Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene.* **142**: 49-54.

**Liebert, C. A., Hall, R. M. & Summers, A. O. (1999).** Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol. Rev* **63**: 507-522.

**Mandell, Bennett & Dolin Principles and Practice of Infectious Diseases 6<sup>th</sup>.ed (2005).** Churchill Livinstone, An inprint of Elsiever Inc Part III, Infecctious diseases and their

etiologic agents. Section F. Bacterial diseases. 215- *Enterobacteriaceae*-the specific pathogens-*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*.

**Mandell, Bennett & Dolin.** Principles and Practice of Infectious Diseases 4<sup>th</sup> ed. Ed. Médica Panamericana.(1997). Part III, Infecctious diseases and their etiologic agents. Section Section F. Bacterial diseases, 196 - *Enterobacteriaceae*. -the specific pathogens-*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*.

**March A., Aschbacher R., Dhanji H., Livermore D. M., Bottcher A., Sleghe1 F., Maggi S., Noale M., Larcher C. and N. Woodford.(2010).** Colonization of residents and staff of a long-termcare facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clin Microbiol Infect.* **16**:934 –944.

**Martin, C., Timm, J., Rauzier, J., Gomez-Lus, R., Davies, J. & Gicquel, B. (1990).** Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature.* **345**: 739-743.

**Martínez, E. & de la Cruz, F. (1990).** Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *Embo J.* **9**: 1275-1281.

**Martínez-Freijo, P., Fluit, A. C., Schmitz, F. J., Grek, V. S., Verhoef, J. & Jones, M. E. (1998).** Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother.* **42**: 689-696.

**Mazel, D. (2006)** Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* **4**, 608-620.

**Mazel, D. & Davies, J. (1998)** Antibiotic resistance. The big picture. *Adv Exp Med Biol.* **456**: 1-6.

**Mehtar, S., A. Tsakris, and T. L. Pitt (1991).** Imipenem resistance in *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother.* **28**:612-615.

**Messier, N. & Roy, P. H. (2001)** Integron integrases possess a unique additional domain necessary for activity. *J Bacteriol.* **183**: 6699-6706.

**Minakhina, S., Kholodii, G., Mindlin, S., Yurieva, O. & Nikiforov, V. (1999).** Tn5053 family transposons are res site hunters sensing plasmidal res sites occupied by cognate resolvases. *Mol.Microbiol.* **33**: 1059-1068.

**Morlote M.M., Navon-Venezia, S., Carmeli, Y., Venkataraman, L.(2003).** Presence of CTX-M-2 in *Proteus mirabilis* isolated of an Israeli Hospital. Proceedings of the 43rd annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemoterapy (ICAAC) Chicago, Illinois, USA, 2003; p. 110).

**Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L. & Nordmann, P. (2001).** Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J Bacteriol.* **183**: 235-249.

**Naas, T., Sougakoff, W., Casetta, A. & Nordmann, P. (1998).** Molecular characterization of *OXA-20*, a novel class D  $\beta$ -lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**: 2074-2083.

**Nakano, R., Nakano, A., Abe, M., Inoue, M., Okamoto, R. (2012).** Regional outbreak of CTX-M-2  $\beta$ -lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Japan. *J. Med Microbiol.* **61**: 1727-35.

**Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., van den Broek, P. & Dijkshoorn, L. (2004).** Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol.* **53**: 1233-1240.

**Nemergut, D. R., Martin, A. P. & Schmidt, S. K. (2004).** Integron diversity in heavy-metal-contaminated mine tailings and inferences about integron evolution. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 1160-1168.

**Nesvera, J., Hochmannova, J. & Patek, M. (1998).** An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett.* **169**: 391-395.



**Neuwirth, C., Siebor, E., Robin, F. & Bonnet, R. (2007).** First occurrence of an IMP metallo- $\beta$ -lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in a French isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 4486-8.

**Neuwirth C, Siébor E, Duez J M, Péchinot A, Kazmierczak A. (1995).** Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J Antimicrob Chemother.* **36**: 335–342.

**Neyfakh, A. A., Bidnenko V. E. & Chen L.B. (1991).** Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA* **88**:4781-4785.

**Nield, B. S., Holmes, A. J., Gillings, M. R., Recchia, G. D., Mabbutt, B. C., Nevalainen, K. M. & Stokes, H. W. (2001).** Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol Lett.* **195**: 59-6.

**Nunes-Duby, S. E., Kwon, H. J., Tirumalai, R. S., Ellenberger, T. & Landy, A. (1998).** Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* **26**: 391-406.

**O'hara, C. M., Brenner, F. W., and Miller, J. M. (2000).** Classification, Identification, and Clinical Significance of, *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews.* **13**: 534–546.

**Ogawa, A. & Takeda, T. (1993).** The gene encoding the heat-stable enterotoxin of *Vibrio cholerae* is flanked by 123-base pair direct repeats. *Microbiol Immunol.* **37**: 607-616.

**Orman, B. E. (2007).** Epidemiología de los genes de resistencia a antibióticos en aislamientos GRAM (-) multirresistentes de hospitales de capital federal. *Tesis Doctoral* Facultad de Medicina UBA.

**Orman, B. E., Piñeiro, S. A., Arduino,S., Galas, M., Melano,R., Caffer,M. I., Sordelli, D. O., and Centrón, D. (2002).** Evolution of Multiresistance in Nontyphoid *Salmonella* Serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 3963–3970.

**Pagani,L., Migliavacca,R. Pallecchi,L., Matti,C., Giacobone,E., Amicosante,G., Romero,E. and Rossolini,G. M.(2002).** Emerging Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol.* **40** (4) 1549–1552.

**Pagniez, G., Radice, M., Cuirolo, A.,Rodriguez, O., Rodriguez, H., Vay, C., Famiglietti,A., Gutkind, G. (2006).** Prevalencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes en un Hospital Universitario de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología.* **38**: 33-37.

**Papagiannitsis, C. C., Miriagou, V., Kotsakis, S. D., Tzelepi, E., Vatopoulos, A. C., Petinaki, E., Touzvelekis L. S (2012).** Characterization of a Transmissible Plasmid Encoding VEB-1 and VIM-1 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **56**: 4024–4025.

**Partridge, S. R., G. Tsafnat, E. Coiera, and J. R. Iredell.(2009)** Gene Cassettes and Cassette Arrays in Mobile Resistance Integrons." *FEMS Microbiol* **33**: 757-84.

**Partridge, S. R., Brown, H. J., Stokes, H. W. & Hall, R. M. (2001).** Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 1263-1270.

**Pasterán F, Gagetti P, Galas M, Aguilar J, Melano R, Rapoport M et al. (2000).** Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) in *Proteus* spp. in Argentina. 40th International Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy (ICAAC) Toronto, Canadá Resumen C-2006.

**Pasteran, F., Faccione, D., Petroni, A.,Rapoport, M., Galas, M., (2005).**Novel Variant ( $bla_{VIM-11}$ ) of the Metallo- $\beta$ -Lactamase  $bla_{VIM}$  Family in a GES-1 Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*, Clinical Isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**: 474–475.

**Paulsen, I. T.,Littlejohn T. G.,Rastrom P., Sundstrom L., Skold o., Swedberg G. & Skurray R. A. (1993).** The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated



with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**: 761-768.

**Peng, C. F., Lee, M. F., Fu, H. T., Chen, Y. J. & Hsu, H. J. (2007).** Characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in CTX-M-3-producing *Serratia marcescens* isolates from southern Taiwan. *Jpn J Infect Dis.* **60**: 250-256.

**Perilli M, Segatore B., De Massis, M. R., Franceschini N., Bianchi, C. Rossolini, G.M. and Amicosante G., (2002).** Characterization of a new extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (TEM-87) isolated in *Proteus mirabilis* during an Italian survey. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 925–928.

**Peters, E. D., Leverstein-van Hall, M. A., Box, A. T., Verhoef, J. & Fluit, A. C. (2001).** Novel gene cassettes and integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 2961-2964.

**Pitout, J. D., Thomson, K. S., Hanson, N. D., Ehrhardt, A. F., Coudron, P. & Sanders, C. C. (1998)** Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**: 596-600.

**Ploy, M. C., Lambert, T., Couty, J. P. & Denis, F. (2000).** Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med.* **38**: 483-487.

**Post, V., Recchia, G. D. & Hall, R. M. (2007).** Detection of gene cassettes in Tn402-like class 1 integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 3467-3468.

**Power, P., Galleni, M., Di Conza, J., Ayala, J. A., and Gutkind, G. (2005).** Description of In116, the first *bla*<sub>CTX-M-2</sub>-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. *J. Antimicrob Chemother.* **55**: 461–465.

**Preston, K. E., Radomski, C. C. & Venezia, R. A. (1999).** The cassettes and 3' conserved segment of an integron from *Klebsiella oxytoca* plasmid pACM1. *Plasmid.* **42**: 104-114.

**Programa Nacional de control de calidad en Bacteriología Clínica, boletín 13 del 2001, Instituto “Dr C.G.Malbrán”** Directores: Marcelo Galas ,Alejandra Corso.



**Quiroga, M. P., Andres, P., Petroni, A., Soler-Bistue, A., Guerriero, L., Jorda Vargas, L., Zorreguieta, A., Tokumoto, M., Quiroga, C., Tolmasky, M., Galas, M. & Centrón, D. (2007).** "Complex class 1 integrons with diverse variable regions including *aac(6')-Ib-cr* and a novel allele *qnrB10* associated to *ISCR1* in clinical enterobacterial isolates from Argentina". *Antimicrob Agents Chemother.* **51:** 4466-4470.

**Radstrom, P., Skold, O., Swedberg, G., Flensburg, J., Roy, P. H. & Sundstrom, L. (1994).** Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol.* **176:** 3257-3268.

**Recchia, G. D. & Hall, R. M. (1997).** Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* **5:** 389-394.

**Recchia, G. D. & Hall, R. M. (1995).** Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the *incQ* plasmid RSF1010. *Mol Microbiol* **15:** 179-187.

**Recchia, G. D., and R. M. Hall.(1995).** Gene Cassettes: A New Class of Mobile Element. *Microbiology* **141:** 3015-27.

**Rodríguez, C., Radice, M., Perazzi, B. Castro, S., Juárez, J., Santini,P., Vay, C., Famiglietti, A.y Gutkind, G.(2005).** Resistencia enzimática a betalactámicos en el género *Proteus* y evaluación de los fenotipos y genotipos de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en *Proteus mirabilis*. *Enferm Infec Microbiol Clin.* **23:**122-6.

**Rouch, D. A., Cram D. S., Di Berrardino D., Littlejohn T. G. & Skurray R. A.(1990).** Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline-and sugar-transport proteins. *Mol Microbiol.* **4:** 2051-2062.

**Rowe-Magnus, D. A. & Mazel, D. (2001).** Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol.* **4:** 565-569

**Rowe-Magnus,D.A., Guerout,A.M. & Mazel,D. (1999).** Superintegrons. *Res Microbiol* **150:** 641-651

**Sajjad, A., Holley, M. P., Labbate, M., Stokes, H. W. and Gillings, M. R. (2011).** Preclinical Class 1 Integron with a Complete Tn402-Like Transposition Module. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**: 335–337.

**Schaberg, D. R., Culver, D. H., Gaynes, R. P., (1991).** Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med*. **91**:72S-75S.

**Schluter, A., Szczepanowski, R., Kurz, N., Schneiker, S., Krahn, I. & Puhler, A. (2007).** Erythromycin resistance-conferring plasmid pRSB105, isolated from a sewage treatment plant, harbors a new macrolide resistance determinant, an integron-containing Tn402-like element, and a large region of unknown function. *Appl Environ Microbiol*. **73**: 1952-1960.

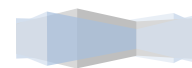
**Segal, H. & Elisha, B. G. (1997).** Identification and characterization of an *aadB* gene cassette at a secondary site in a plasmid from *Acinetobacter*. *FEMS Microbiol Lett* **153**: 321-326.

**Seward, R. J. (1999).** Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* **5**: 308-318.

**Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibayama, K., Kato, H., Kai, K. & Arakawa, Y. (2003).** PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol*. **41**: 5407-5413.

**Siebor, E. and Neuwirth, C.(2014).** *Proteus* genomic island 1 (PGI1), a new resistance genomic island from two *Proteus mirabilis* French clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. **68**:1750-1756.

**Siebor, E. and Neuwirth, C. (2013).** Emergence of *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) among *Proteus mirabilis* clinical isolates in Dijon, France. *J Antimicrob Chemother* **68**: 1750–1756.



**Siebor, E. and Neuwirth, C. (2011).** The new variant of *Salmonella* genomic island 1 (SGI1-V) from a *Proteus mirabilis* French clinical isolate harbours *bla*<sub>VEB-6</sub> and *qnrA1* in the multiple antibiotic resistance region. *J Antimicrob Chemother.* **66:** 2513–2520.

**Simonsen, C. C., Chen, E. Y. & Levinson, A. D. (1983).** Identification of the type I trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified by the *Escherichia coli* R-plasmid R483: comparison with procaryotic and eucaryotic dihydrofolate reductases. *J Bacteriol.* **155:** 1001-1008.

**SISTEMA INFORMATICO DE RESISTENCIA (SIR), Argentina.(2006 -2007) Quinteros, M., Radice, M., Giovanakis, M.; Famiglietti ,A., Nicola, F., Kovensky, J., Marín, M. ,Casellas, Análisis de los datos de pacientes internados, años 2006 – 2007**

**Smith, M. C. & Thorpe, H. M. (2002).** Diversity in the serine recombinases. *Mol Microbiol.* **44:** 299-307.

**Soler Bistue, A. J. C., Martín, F. A., Petroni, A., Faccone, D., Galas, M., Tolmasky, M. E. and Zorreguieta, A.(2006).** *Vibrio cholerae* InV117, a Class 1 Integron Harboring *aac(6′)-Ib* and *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, Is Linked to Transposition Genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **50:** 1903–1907.

**Stokes, H. W, Nesbo, C. L, Holley, M, Bahl, M.I., Gillings, M. R., and Boucher, Y. (2006).** Class 1 Integrons Potentially Predating the Association with Tn402-Like Transposition Genes Are Present in a Sediment Microbial Community. *Journal of Clinical Bacteriology.* **188:** 5722–5730.

**Stokes, H. W., O’Gorman, D. B., Recchia, G. D., Parsekhian, M. & Hall, R. M. (1997).** Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol.* **26:** 731-745.

**Stokes, H. W. & Hall, R. M. (1989).** A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol.* **3:**1669-1683.

**Sundström, L., P. H.& Skold, O. (1991).** Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7. *J Bacteriol.* **173:** 3025-3028.



**Swedberg, G. (1987).** Organization of two sulfonamide resistance genes on plasmids of gram negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* **31:** 306-311.

**Toleman, M. A, Bennett, P. M, Walsh, T. R.(2006).** ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev.* **70:** 296-316.

**Tsakris, A., Ikonomidis, A., Poulou, A., Spanakis, N., Pournaras, S., and Markou, F. (2007).** Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother.* **60:** 136–139.

**Tumbarello, M., Trecarichi, E. M., Fiori, B., Losito, A. R., D’Inzeo T., Campana, L., Ruggeri, A Di Meco, E., Liberto, E., Fadda, G., Cauda, R. and Spanu, T. (2012).** Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Bloodstream Infections: Risk Factors and Outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **56:** 3224–3231.

**Turina, M. A., Casimiro, A. (2007).** **Presentación oral de tema libre seleccionado:** “Prevalencia de *Enterococcus spp* resistente a vancomicina en el Hospital Pirovano”. (Estudio retrospectivo de 6 años). **XXXVII Jornadas Científicas Hospital Pirovano.** “**Medicina basada en la evidencia vs. Medicina basada en el paciente**”.

**Vaisvila, R., Morgan, R. D., Posfai, J. & Raleigh, E. A. (2001).** Discovery and distribution of super-integrins among pseudomonads. *Mol Microbiol.* **42:** 587-601.

**van Belkum, A., Goessens, W., van der Schee, C., Lemmens-den Toom, N., Vos, M. C., Cornelissen, J., Lugtenburg, E., de Marie, S., Verbrugh, H., Lowenberg, B. & Endtz, H. (2001).** Rapid emergence of ciprofloxacin-resistant *Enterobacteriaceae* containing multiple gentamicin resistance-associated integrins in a Dutch hospital. *Emerg Infect Dis.* **7:** 862-871..

**Vilacoba, E., Quiroga, C., Pistorio, M., Famiglietti, A. Rodríguez, H., Kovensky, J., Déraspe, M., Raymond, F. Roy, P. H., Centrón, D.(2014)** A *bla*<sub>VIM-2</sub> plasmid disseminating in extensively drug-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* isolates *Antimicrob. Agents Chemother.* **58:**7017-7018.

**Ward, J. M. & Grinsted, J. (1982).** Analysis of the Inc P-1 group plasmids R906 and R751 and their relationship to RP1. *Plasmid* **8**: 244-252.

**White, P. A., McIver, C. J. & Rawlinson, W. D. (2001).** Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 2658-2661.

**Williamson, D. A., Sidjabat, H. E., Freeman, J. T., Roberts, S. A., Silvey, A., Woodhouse, R., Mowat, E., Dyet, K., Paterson, D. L., Blackmore, T., Burns, A., Heffernan, H., (2012).** Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing *Enterobacteriaceae* from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* **39**:529-33.

**Wu, K., Wang, F., Sun, J., Wang, Q., Chen, Q., Yu, S., Rui, Y. (2012).** Class 1 integron gene *cassettes* in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. *International Journal of Antimicrobial Agents.* **40**: 264– 267.

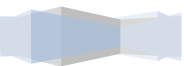
**Xu, H., Davies, J. & Miao, V. (2007).** Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J Bacteriol.* **189**: 6276-6283.

**Yu, Y. S., Qu, T. T., Zhou, J. Y., Wang, J., Li, H. Y. & Walsh, T. R. (2006).** Integrons containing the VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase gene among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from different Chinese hospitals. *J Clin Microbiol.* **44**: 4242-4245.



## **ANEXO**

**Tablas con valores de los puntos de corte de sensibilidad del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013)**





CLINICAL AND  
LABORATORY  
STANDARDS  
INSTITUTE®

January 2013

# M100-S23

## Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement

This document provides updated tables for the Clinical and Laboratory Standards Institute antimicrobial susceptibility testing standards M02-A11, M07-A9, and M11-A8.

An Informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process.





**Table 2A. Zone Diameter and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Interpretive Standards for Enterobacteriaceae**

Testing Conditions	Routine Quality Control (QC) Recommendations (See Tables 3A and 4A for acceptable QC ranges.)
<p><b>Medium:</b> Disk diffusion: Mueller-Hinton agar (MHA) Broth dilution: cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) Agar dilution: MHA</p> <p><b>Inoculum:</b> Growth method or direct colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard</p> <p><b>Incubation:</b> 35±2°C; ambient air. Disk diffusion: 16 to 18 hours Dilution methods: 16 to 20 hours</p>	<p><i>Escherichia coli</i>/ATCC® 25922 <i>Escherichia coli</i>/ATCC® 35218 (for [β-lactam][β-lactamase inhibitor combinations])</p>

\* ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

Refer to Table 2A Supplemental Tables 1, 2, and 3 at the end of Table 2A for additional recommendations for testing conditions, reporting suggestions, and QC.

**General Comments**

- (1) For disk diffusion, test a maximum of 12 disks on a 150-mm plate and 5 disks on a 100-mm plate (see M02, Section 9.2). Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. Hold the Petri plate a few inches above a black background illuminated with reflected light. The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth. Strains of *Proteus* spp. may swarm into areas of inhibited growth around certain antimicrobial agents. With *Proteus* spp., ignore the thin veil of swarming growth in an otherwise obvious zone of growth inhibition. With trimethoprim and the sulfonamides, antagonists in the medium may allow some slight growth; therefore, disregard slight growth (20% or less of the lawn of growth) and measure the more obvious margin to determine the zone diameter.
- (2) When fecal isolates of *Salmonella* and *Shigella* spp. are tested, only ampicillin, a fluoroquinolone, and trimethoprim-sulfamethoxazole should be reported routinely. In addition, for extraintestinal isolates of *Salmonella* spp., a third-generation cephalosporin should be tested and reported, and chloramphenicol may be tested and reported if requested. **Susceptibility testing is indicated for typhoidal *Salmonella* (S. Typhi and *Salmonella* Paratyphi A–C) isolated from extraintestinal and intestinal sources. Routine susceptibility testing is not indicated for nontyphoidal *Salmonella* spp. isolated from intestinal sources.**
- (3) The dosage regimens shown in the comment column below are those required to achieve plasma drug exposures (in adults with normal renal and hepatic functions) on which breakpoints were based. When implementing new breakpoints, it is strongly recommended that laboratories share this information with infectious disease practitioners, pharmacists, pharmacy and therapeutics committees, and infection control committees.

**NOTE:** Information in boldface type is new or modified since the previous edition.



Table 2A. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>PENICILLINS</b>									
A	Ampicillin	10 µg	≥17	14–16	≤13	≤8	16	≥32	(4) Results of ampicillin testing can be used to predict results for amoxicillin. See comment (2).
B	Piperacillin	100 µg	≥21	18–20	≤17	≤16	32–64	≥128	
O	Mecillinam	10 µg	≥15	12–14	≤11	≤8	16	≥32	(5) For testing and reporting of <i>E. coli</i> urinary tract isolates only.
O	Ticarcillin	75 µg	≥20	15–19	≤14	≤16	32–64	≥128	
<b>β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS</b>									
B	Amoxicillin-clavulanic acid	20/10 µg	≥18	14–17	≤13	≤8/4	16/8	≥32/16	
B	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥15	12–14	≤11	≤8/4	16/8	≥32/16	
B	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	18–20	≤17	≤16/4	32/4–64/4	≥128/4	
B	Ticarcillin-clavulanate	75/10 µg	≥20	15–19	≤14	≤16/2	32/2–64/2	≥128/2	
<b>CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)</b>									
(6) WARNING: For <i>Salmonella</i> spp. and <i>Shigella</i> spp., first- and second-generation cephalosporins and cephamycins may appear active <i>in vitro</i> , but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.									
(7) Following evaluation of PK-PD properties, limited clinical data, and MIC distributions, revised interpretive criteria for cephalosporins (cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, ceftiofime, and ceftioxime) and aztreonam were first published in January 2010 (M100-S20) and are listed in this table. Cefazolin interpretive criteria were revised again in June 2010 and are listed below. Cefepime and cefturoxime (parenteral) were also evaluated; however, no change in interpretive criteria was required for the dosages indicated below. When using the current interpretive criteria, routine ESBL testing is no longer necessary before reporting results (i.e., it is no longer necessary to edit results for cephalosporins, aztreonam, or penicillins from susceptible to resistant). However, ESBL testing may still be useful for epidemiological or infection control purposes. For laboratories that have not implemented the current interpretive criteria, ESBL testing should be performed as described in Table 2A Supplemental Table 1.									
Note that interpretive criteria for drugs with limited availability in many countries (e.g., moxalactam, cefonicid, cefamandole, and cefoperazone) were not evaluated. If considering use of these drugs for <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , or <i>Proteus</i> spp., ESBL testing should be performed (see Table 2A Supplemental Table 1). If isolates test ESBL positive, the results for moxalactam, cefonicid, cefamandole, and cefoperazone should be reported as resistant.									
(8) <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , and <i>Serratia</i> may develop resistance during prolonged therapy with third-generation cephalosporins as a result of derepression of AmpC β-lactamase. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within three to four days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.									
A	Cefazolin	30 µg	≥23	20–22	≤19	≤2	4	≥8	(9) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 2 g every 8 h. See comment (7).
C	Ceftaroline	30 µg	≥23	20–22	≤19	≤0.5	1	≥2	(10) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 600 mg every 12 h.
U	Cephalothin	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	(11) Cephalothin interpretive criteria can be used only to predict results to the oral agents, cefadroxil, cefpodoxime, cephalixin, and loracarbef. Older data that suggest that cephalothin results could predict susceptibility to some other cephalosporins may still be correct, but there are no recent data to confirm this.

Table 2A  
Enterobacteriaceae  
M02 and M07



Table 2A  
Enterobacteriaceae  
M02 and M07

Table 2A. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)			MIC Interpretive Criteria ( $\mu\text{g/mL}$ )			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.) (Continued)</b>									
B	Cefepime	30 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$	$\leq 8$	16	$\geq 32$	(12) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h or 2 g every 12 h. See comment (7).
B	Cefotaxime or ceftriaxone	30 $\mu\text{g}$	$\geq 26$	23-25	$\leq 22$	$\leq 1$	2	$\geq 4$	(13) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 24 h for ceftriaxone and 1 g every 8 h for cefotaxime. See comment (7).
B		30 $\mu\text{g}$	$\geq 23$	20-22	$\leq 19$	$\leq 1$	2	$\geq 4$	
B	Cefotetan	30 $\mu\text{g}$	$\geq 16$	13-15	$\leq 12$	$\leq 16$	32	$\geq 64$	(14) The interpretive criteria are based on a dosage regimen of at least 8 g per day (eq. 2 g every 6 h).
B	Cefoxitin	30 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$	$\leq 8$	16	$\geq 32$	
B	Cefuroxime (parenteral)	30 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$	$\leq 8$	16	$\geq 32$	(15) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1.5 g every 8 h. See comment (7).
C	Ceftazidime	30 $\mu\text{g}$	$\geq 21$	18-20	$\leq 17$	$\leq 4$	8	$\geq 16$	(16) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h. See comment (7).
O	Cefamandole	30 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$	$\leq 8$	16	$\geq 32$	See comment (7).
O	Cefmetazole	30 $\mu\text{g}$	$\geq 16$	13-15	$\leq 12$	$\leq 16$	32	$\geq 64$	
O	Cefonicid	30 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$	$\leq 8$	16	$\geq 32$	See comment (7).
O	Cefoperazone	75 $\mu\text{g}$	$\geq 21$	16-20	$\leq 15$	$\leq 16$	32	$\geq 64$	
O	Ceftizoxime	30 $\mu\text{g}$	$\geq 25$	22-24	$\leq 21$	$\leq 1$	2	$\geq 4$	(18) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 12 h. See comment (7).
O	Moxalactam	30 $\mu\text{g}$	$\geq 23$	15-22	$\leq 14$	$\leq 8$	16-32	$\geq 64$	See comment (7).
<b>CEPHEMS (ORAL)</b>									
B	Cefuroxime (oral)	30 $\mu\text{g}$	$\geq 23$	15-22	$\leq 14$	$\leq 4$	8-16	$\geq 32$	(19) Do not test <i>Citrobacter</i> , <i>Providencia</i> or <i>Enterobacter</i> spp. with ceftinir or loracarbef by disk diffusion because false-susceptible results have been reported.
O	Loracarbef	30 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$	$\leq 8$	16	$\geq 32$	
O	Cefaclor	30 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$	$\leq 8$	16	$\geq 32$	See comment (19).
O	Ceftinir	5 $\mu\text{g}$	$\geq 20$	17-19	$\leq 16$	$\leq 1$	2	$\geq 4$	
O	Cefixime	5 $\mu\text{g}$	$\geq 19$	16-18	$\leq 15$	$\leq 1$	2	$\geq 4$	(20) Do not test <i>Morganella</i> spp. with ceftixime by disk diffusion.
O	Cefpodoxime	10 $\mu\text{g}$	$\geq 21$	18-20	$\leq 17$	$\leq 2$	4	$\geq 8$	See comment (20).
O	Cefprozil	30 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$	$\leq 8$	16	$\geq 32$	(21) Do not test <i>Providencia</i> spp. with ceftprozil by disk diffusion because false-susceptible results have been reported.
Inv.	Cefetamet	10 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$	$\leq 4$	8	$\geq 16$	See comment (20).
Inv.	Ceftibuten	30 $\mu\text{g}$	$\geq 21$	18-20	$\leq 17$	$\leq 8$	16	$\geq 32$	(22) For testing and reporting of urine isolates only.



Table 2A. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>MONOBACTAMS</b>									
C	Aztreonam	30 µg	≥21	19–20	≤17	≤4	8	≥16	(23) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h. See comment (7).
<b>CARBAPENEMS</b>									
<p>(24) Following evaluation of PK-PD properties, limited clinical data, and MIC distributions that include recently described carbapenemase-producing strains, revised interpretive criteria for carbapenems were first published in June 2010 (M100-S20-U) and are listed below. Because of limited treatment options for infections caused by organisms with carbapenem MICs or zone diameters in the intermediate range, clinicians may wish to design carbapenem dosage regimens that use maximum recommended doses and possibly prolonged intravenous infusion regimens, as has been reported in the literature.<sup>1-4</sup> Consultation with an infectious diseases practitioner is recommended for isolates for which the carbapenem MICs or zone diameter results from disk diffusion testing are in the intermediate or resistant ranges.</p> <p>Until laboratories can implement the current interpretive criteria, the modified Hodge test (MHT) should be performed as described in the updated Table 2A Supplemental Table 3. After implementation of the current interpretive criteria, the MHT does not need to be performed other than for epidemiological or infection control purposes (refer to Table 2A Supplemental Table 2).</p> <p>The following information is provided as background on carbapenemases in <i>Enterobacteriaceae</i> that are largely responsible for MICs and zone diameters in the new intermediate and resistant ranges, and thus the rationale for setting revised carbapenem breakpoints:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>The clinical effectiveness of carbapenem treatment of infections produced by isolates for which the carbapenem MIC or disk diffusion test results are within the new intermediate (I) range is uncertain due to lack of controlled clinical studies.</li> <li>Imipenem MICs for <i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> spp., and <i>Morganella morganii</i> tend to be higher (eg, MICs in the new intermediate or resistant range) than meropenem or doripenem MICs. These isolates may have elevated imipenem MICs by mechanisms other than production of carbapenemases.</li> </ul>									
B	Doripenem	10 µg	≥23	20–22	≤19	≤1	2	≥4	(25) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 500 mg every 8 h.
B	Ertapenem	10 µg	≥22	19–21	≤18	≤0.5	1	≥2	(26) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 24 h.
B	Imipenem	10 µg	≥23	20–22	≤19	≤1	2	≥4	(27) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 500 mg every 6 h or 1 g every 8 h.
B	Meropenem	10 µg	≥23	20–22	≤19	≤1	2	≥4	(28) Interpretive criteria are based on a dosage regimen of 1 g every 8 h.
<b>AMINOGLYCOSIDES</b>									
(29) WARNING: For <i>Salmonella</i> spp. and <i>Shigella</i> spp., aminoglycosides may appear active <i>in vitro</i> but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.									
A	Gentamicin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
A	Tobramycin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
B	Amikacin	30 µg	≥17	15–16	≤14	≤16	32	≥64	
O	Kanamycin	30 µg	≥18	14–17	≤13	≤16	32	≥64	
O	Netilmicin	30 µg	≥15	13–14	≤12	≤8	16	≥32	
O	Streptomycin	10 µg	≥15	12–14	≤11	–	–	–	(30) There are no MIC interpretive standards.



Table 2A  
Enterobacteriaceae  
M02 and M07

Table 2A. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>TETRACYCLINES</b>									
(31) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.									
C	Tetracycline	30 µg	≥15	12–14	≤11	≤4	8	≥16	
O	Doxycycline	30 µg	≥14	11–13	≤10	≤4	8	≥16	
O	Minocycline	30 µg	≥16	13–15	≤12	≤4	8	≥16	
<b>FLUOROQUINOLONES</b>									
NOTE: Reevaluation of fluoroquinolones is ongoing.									
See comment (2).									
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥21	18–20	≤15	≤1	2	≥4	(32) For testing and reporting of <i>Enterobacteriaceae</i> except for <i>Salmonella</i> spp.
B	Levofloxacin	5 µg	≥17	14–16	≤13	≤2	4	≥8	(33) For testing and reporting of <i>Salmonella</i> spp. (including <i>S. Typhi</i> and <i>S. Paratyphi A–C</i> ). See comment (2).
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥31	21–30	≤20	≤0.06	0.12–0.5	≥1	
B	Levofloxacin	-	-	-	-	≤0.12	0.25–1	≥2	(34) If MIC testing is not performed or if interpretive criteria cannot be implemented, see comment (37).
B	Ofloxacin	-	-	-	-	≤0.12	0.25–1	≥2	
U	Lomefloxacin or ofloxacin	10 µg	≥22	19–21	≤18	≤2	4	≥8	
U	Norfloxacin	5 µg	≥16	13–15	≤12	≤2	4	≥8	
U	Norfloxacin	10 µg	≥17	13–16	≤12	≤4	8	≥16	
O	Enoxacin	10 µg	≥18	15–17	≤14	≤2	4	≥8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥20	15–17	≤14	≤2	4	≥8	
O	Gemifloxacin	5 µg	≥20	16–19	≤15	≤0.25	0.5	≥1	(35) FDA-approved for <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
O	Creprofloxacin	5 µg	≥18	15–17	≤14	≤1	2	≥4	
Inv.	Fleroxacin	5 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	

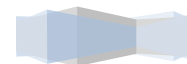




Table 2A. (Continued)

QUINOLONES		100 µg	≥19	15–18	≤14	≤16	32	≥64	See comment (22). (36) These interpretive criteria are for urinary tract isolates of <i>Enterobacteriaceae</i> , and for all isolates of <i>Salmonella</i> .  (37) Until laboratories can implement the current interpretive criteria for ciprofloxacin, levofloxacin, and/or ofloxacin, nalidixic acid may be used to test for reduced fluoroquinolone susceptibility in <i>Salmonella</i> . Strains of <i>Salmonella</i> that test resistant to nalidixic acid may be associated with clinical failure or delayed response in fluoroquinolone-treated patients with salmonellosis.  <b>Note that nalidixic acid may not detect all mechanisms of fluoroquinolone resistance.</b>
O	Cinoxacin		≥19	15–18	≤14	≤16	32	≥64	
O	Nalidixic acid	30 µg	≥19	14–18	≤13	≤16	–	≥32	
FOLATE PATHWAY INHIBITORS									See comment (22).
B	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/ 23.75 µg	≥16	11–15	≤10	≤2/38	–	≥4/76	See comment (2).
U	Sulfonamides	250 or 300 µg	≥17	13–16	≤12	≤256	–	≥512	(38) Sulfisoxazole can be used to represent any of the currently available sulfonamide preparations.
U	Trimethoprim	5 µg	≥16	11–15	≤10	≤8	–	≥16	
PHENICOLS									
C	Chloramphenicol	30 µg	≥18	13–17	≤12	≤8	16	≥32	(39) Not routinely reported on isolates from the urinary tract.
FOSFOMYCINS									
O	Fosfomicin	200 µg	≥16	13–15	≤12	≤64	128	≥256	(40) For testing and reporting of <i>E. coli</i> urinary tract isolates only. (41) The 200-µg fosfomicin disk contains 50 µg of glucose-6-phosphate. (42) The only approved MIC method for testing is agar dilution using agar media supplemented with 25 µg/mL of glucose-6-phosphate. Broth dilution MIC testing should not be performed.
NITROFURANS									
U	Nitrofurantoin	300 µg	≥17	15–16	≤14	≤32	64	≥128	

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; ESBL, extended-spectrum β-lactamase; FDA, US Food and Drug Administration; MHA, Mueller-Hinton agar; MHT, modified Hodge test; MIC, minimal inhibitory concentration; PK-PD, pharmacokinetic-pharmacodynamic; QC, quality control.

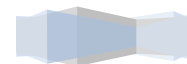


Table 2A Supplemental Table 1  
Screening and Confirmatory Tests  
for ESBLs

**Table 2A Supplemental Table 1. Screening and Confirmatory Tests for ESBLs in *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* for Use With Table 2A**

NOTE: Following evaluation of PK-PD properties, limited clinical data, and MIC distributions, revised interpretive criteria for ceftazolin, cefotaxime, ceftazidime, ceftiozime, ceftinaxone, and aztreonam were published in January 2010 (M100-S20) and are listed in Table 2A. Cefepime and cefuroxime (parenteral) were also evaluated; however, no change in interpretive criteria was required with the dosages included in Table 2A. When using the current interpretive criteria, routine ESBL testing is no longer necessary before reporting results (ie, it is no longer necessary to edit results for cephalosporins, aztreonam, or penicillins to resistant). However, ESBL testing may still be useful for epidemiological or infection control purposes. For laboratories that have not implemented the current interpretive criteria, ESBL testing should be performed as described in this table.

Test	Initial Screen Test		Phenotypic Confirmatory Test	
	Disk diffusion	Broth microdilution	Disk diffusion	Broth microdilution
Medium	MHA	CAMHB	MHA	CAMHB
Antimicrobial concentration	For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime 10 µg or Ceftazidime 30 µg or Aztreonam 30 µg or Cefotaxime 30 µg or Ceftinaxone 30 µg  For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime 10 µg or Ceftazidime 30 µg or Cefotaxime 30 µg  (The use of more than one antimicrobial agent for screening improves the sensitivity of ESBL detection.)	For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime 4 µg/mL or Ceftazidime 1 µg/mL or Aztreonam 1 µg/mL or Cefotaxime 1 µg/mL or Ceftinaxone 1 µg/mL  For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime 1 µg/mL or Ceftazidime 1 µg/mL or Cefotaxime 1 µg/mL  (The use of more than one antimicrobial agent for screening improves the sensitivity of ESBL detection.)	Ceftazidime 30 µg Ceftazidime-clavulanic acid <sup>a</sup> 30/10 µg  and  Cefotaxime 30 µg Cefotaxime-clavulanic acid 30/10 µg  (Confirmatory testing requires use of both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanic acid.)	Ceftazidime 0.25–128 µg/mL Ceftazidime-clavulanic acid 0.25/4–12.8/4 µg/mL  and  Cefotaxime 0.25–64 µg/mL Cefotaxime-clavulanic acid 0.25/4–64/4 µg/mL  (Confirmatory testing requires use of both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanic acid.)
Inoculum	Standard disk diffusion recommendations	Standard broth dilution recommendations	Standard disk diffusion recommendations	Standard broth dilution recommendations
Incubation conditions	35 ± 2°C; ambient air	35 ± 2°C; ambient air	35 ± 2°C; ambient air	35 ± 2°C; ambient air
Incubation length	16–18 hours	16–20 hours	16–18 hours	16–20 hours



For Use With M02-A11 and M07-A9

M100-S23

Table 2A Supplemental Table 1. (Continued)

Test	Initial Screen Test	Phenotypic Confirmatory Test
<p><b>Test Method Results</b></p> <p>Disk diffusion For <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, and <i>E. coli</i>: Cefpodoxime zone ≤17 mm Ceftazidime zone ≤22 mm Aztreonam zone ≤27 mm Cefotaxime zone ≤27 mm Ceftriaxone zone ≤25 mm</p> <p>For <i>P. mirabilis</i>: Cefpodoxime zone ≤22 mm Ceftazidime zone ≤22 mm Cefotaxime zone ≤27 mm</p> <p>Zones above may indicate ESBL production.</p>	<p>Broth microdilution Growth at or above the screening concentrations may indicate ESBL production (e, for <i>E. coli</i>, <i>K. pneumoniae</i>, and <i>K. oxytoca</i>, MIC ≥8 µg/mL for cefpodoxime or MIC ≥2 µg/mL for ceftazidime, aztreonam, cefotaxime, or ceftriaxone; and for <i>P. mirabilis</i>, MIC ≥2 µg/mL for cefpodoxime, ceftazidime, or cefotaxime).</p>	<p>Disk diffusion A ≥5-mm increase in a zone diameter for either antimicrobial agent tested in combination with clavulanic acid vs the zone diameter of the agent when tested alone = ESBL (eg, ceftazidime zone = 16; ceftazidime-clavulanic acid zone = 21).</p> <p>Broth microdilution A ≥3 twofold concentration decrease in an MIC for either antimicrobial agent tested in combination with clavulanic acid vs the MIC of the agent when tested alone = ESBL (eg, ceftazidime MIC = 8 µg/mL; ceftazidime-clavulanic acid MIC = 1 µg/mL).</p>
<b>Reporting</b>		<p>For all confirmed ESBL-producing strains: If laboratories do not use current cephalosporin and aztreonam interpretive criteria, the test interpretation should be reported as resistant for all penicillins, cephalosporins, and aztreonam.</p> <p>If laboratories use current cephalosporin and aztreonam interpretive criteria, then test interpretations for these agents do not need to be changed from susceptible to resistant.</p>

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2A Supplemental Table 1  
Screening and Confirmatory Tests  
for ESBLs

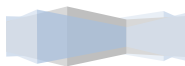




Table 2A Supplemental Table 1  
Screening and Confirmatory Tests  
for ESBLs

Table 2A Supplemental Table 1. (Continued)

Test Method	Initial Screen Test	Phenotypic Confirmatory Test
QC recommendations	<p>Disk diffusion When testing ESBL-screening antimicrobial agents, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 is provided as a supplemental QC strain (eg, for training, competency, or test evaluation). Either strain, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 or <i>E. coli</i> ATCC® 25922, may then be used for routine QC (eg, weekly or daily).</p> <p><i>E. coli</i> ATCC® 25922 (see acceptable QC ranges in Table 3A)</p> <p><i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603: Cefpodoxime zone 9–16 mm Ceftazidime zone 10–18 mm Aztreonam zone 9–17 mm Cefotaxime zone 17–25 mm Ceftriaxone zone 16–24 mm</p>	<p>Disk diffusion When performing the ESBL confirmatory tests, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 and <i>E. coli</i> ATCC® 25922 should be used for routine QC (eg, weekly or daily).</p> <p><b>Acceptable QC:</b> <i>E. coli</i> ATCC® 25922: ≤2-mm increase in zone diameter for antimicrobial agent tested in combination with clavulanic acid vs the zone diameter when tested alone. <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603: ≥5-mm increase in zone diameter of ceftazidime-clavulanic acid vs ceftazidime alone; ≥3-mm increase in zone diameter of cefotaxime-clavulanic acid vs cefotaxime alone.</p> <p>Broth microdilution When performing the ESBL confirmatory tests, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 and <i>E. coli</i> ATCC® 25922 should be tested routinely (eg, weekly or daily).</p> <p><b>Acceptable QC:</b> <i>E. coli</i> ATCC® 25922: &lt; 3 twofold concentration decrease in MIC for antimicrobial agent tested in combination with clavulanic acid vs the MIC of the agent when tested alone. <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603: ≥ 3 twofold concentration decrease in MIC for an antimicrobial agent tested in combination with clavulanic acid vs the MIC of the agent when tested alone.</p>

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; ESBL, extended-spectrum β-lactamase; MHA, Mueller-Hinton agar; MIC, minimal inhibitory concentration; PK-PD, pharmacokinetic-pharmacodynamic; QC, quality control.

**Footnote**

- a. Preparation of ceftazidime-clavulanic acid (30 µg/10 µg) and cefotaxime-clavulanic acid (30 µg/10 µg) disks: Using a stock solution of clavulanic acid at 1000 µg/mL (either freshly prepared or taken from small aliquots that have been frozen at -70°C), add 10 µL of clavulanic acid to ceftazidime (30 µg) and cefotaxime (30 µg) disks. Use a micropipette to apply the 10 µL of stock solution to the ceftazidime and cefotaxime disks within one hour before they are applied to the plates, allowing about 30 minutes for the clavulanic acid to absorb and the disks to be dry enough for application. Use disks immediately after preparation or discard; do not store.

**Table 2A Supplemental Table 2. Confirmatory Test for Suspected Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae for Use With Table 2A**

Until laboratories can implement the revised carbapenem interpretive criteria (now considered current), the MHT should be performed as described in Table 2A Supplemental Table 3. If using current interpretive criteria, the MHT does not need to be performed other than for epidemiological or infection control purposes (refer to Table 2A Supplemental Table 2) and no change in the interpretation of carbapenem susceptibility test results is required for MHT-positive isolates.

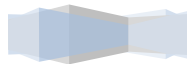
<b>When to do this test:</b>	Institutional infection control procedures or epidemiological investigations may require identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Carbapenemase-producing isolates usually test intermediate or resistant to one or more carbapenems using the current interpretive criteria as listed in Table 2A (Note: Ertapenem nonsusceptibility is the most sensitive indicator of carbapenemase production), and usually test resistant to one or more agents in cephalosporin subclass III (eg, cefoperazone, cefotaxime, ceftazidime, ceftioxime, and ceftiraxone). Therefore, for infection control or epidemiological investigations, testing could be limited to isolates with these characteristics.												
<b>Test method</b>	MHT												
<b>Medium</b>	MHA												
<b>Antimicrobial concentration</b>	Ertapenem disk 10 µg or Meropenem disk 10 µg												
<b>Inoculum</b>	(1) Prepare a 0.5 McFarland standard suspension (using either direct colony suspension or growth method) of <i>E. coli</i> /ATCC® 25922 (the indicator organism) in broth or saline, and dilute 1:10 in saline or broth. Inoculate an MHA plate as for the routine disk diffusion procedure. Allow the plate to dry 3 to 10 minutes. Place the appropriate number of ertapenem or meropenem disks on the plate as noted below and shown in Figures 1 and 2.  (2) Using a 10-µL loop or swab, pick 3 to 5 colonies of test or QC organism grown overnight on a blood agar plate and inoculate in a straight line out from the edge of the disk. The streak should be at least 20 to 25 mm in length. Test the number of isolates per plate as noted below and shown in Figures 1 and 2.  Capacity of small and large MHA plates (100-mm or 150-mm diameter, respectively):  <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td></td> <td>Small</td> <td>Large</td> </tr> <tr> <td>Disks</td> <td>1</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>Test isolates</td> <td>1</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>QC isolates</td> <td>2</td> <td>2</td> </tr> </table>		Small	Large	Disks	1	1-4	Test isolates	1	1-6	QC isolates	2	2
	Small	Large											
Disks	1	1-4											
Test isolates	1	1-6											
QC isolates	2	2											
<b>Incubation conditions</b>	35±2°C; ambient air												
<b>Incubation length</b>	16 to 20 hours												

Table 2A Supplemental Table 2  
Confirmatory Test for Suspected  
Carbapenemase Production  
in Enterobacteriaceae

Table 2A Supplemental Table 2. (Continued)

Results	<p>Following incubation, examine the MHA plate for enhanced growth around the test or QC organism streak at the intersection of the streak and the zone of inhibition (see Figures 1 and 2).</p> <p>Enhanced growth = positive for carbapenemase production.</p> <p>No enhanced growth = negative for carbapenemase production.</p> <p>Some test isolates may produce substances that will inhibit growth of <i>E. coli</i> ATCC® 25922. When this occurs, a clear area will be seen around the streak (see Figure 3), and the MHT is uninterpretable for these isolates.</p> <p>For isolates with positive MHTs, perform MIC tests before reporting any carbapenem results, since carbapenem MIC interpretations are based solely on the MIC and should not be changed regardless of the MHT result.</p> <p><b>NOTE:</b> Not all carbapenemase-producing isolates of <i>Enterobacteriaceae</i> are MHT positive, and MHT-positive results may be encountered in isolates with carbapenem resistance mechanisms other than carbapenemase production.</p>
Reporting	<p>Report results of the MHT to infection control or those requesting epidemiological information.</p> <p>No change in the interpretation of carbapenem susceptibility test results is required for MHT-positive isolates.</p>
QC recommendations	<p>Test positive and negative QC organisms each day of testing.</p> <p><i>K. pneumoniae</i> ATCC® BAA-1705—MHT positive</p> <p><i>K. pneumoniae</i> ATCC® BAA-1706—MHT negative</p>

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; MHA, Mueller-Hinton agar; MHT, modified Hodge test; MIC, minimal inhibitory concentration; QC, quality control.



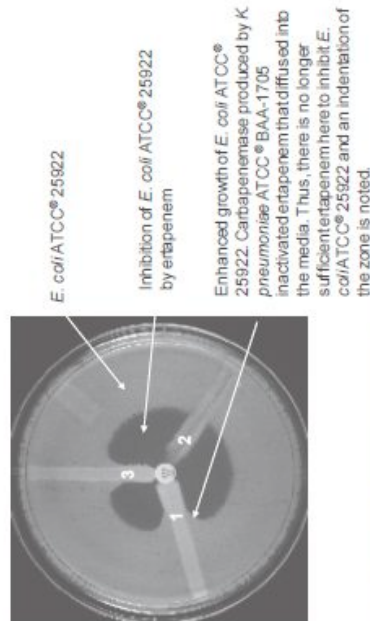
For Use With M02-A11 and M07-A9

M100-S23

**Table 2A Supplemental Table 2. (Continued)**

**NOTES:**

1. Test recommendations were largely derived following testing of US isolates of *Enterobacteriaceae*, and provide for a high level of sensitivity (> 90%) and specificity (> 90%) in detecting KPC-type carbapenemases in these isolates. The sensitivity and specificity of the test for detecting other carbapenemase production can vary. For example, the sensitivity of the test for detecting NDM-type (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-type) carbapenemases is low (ie, 11%).
2. No data exist on the usefulness of these tests for the detection of carbapenemase production in nonfermenting gram-negative bacilli.



**Figure 1. The MHT Performed on a Small MHA Plate.**  
 (1) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705, positive result;  
 (2) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706, negative result;  
 and (3) a clinical isolate, positive result

Table 2A Supplemental Table 2. (Continued)

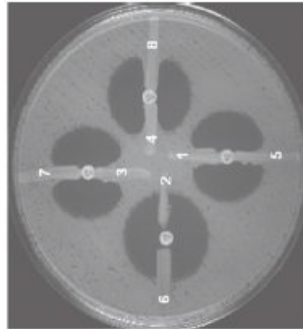


Figure 2. The MHT Performed on a Large MHA Plate With Ertapenem. (1) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705, positive result; (2) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706, negative result; (3–8) clinical isolates; (6) negative result; (3, 4, 5, 7, 8) positive result.

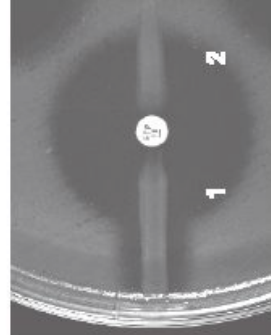
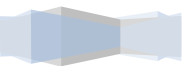


Figure 3. An Example of an Indeterminate Result. (1) A clinical isolate with an indeterminate result; and (2) a clinical isolate with a negative result.





**Table 2A Supplemental Table 3. Screening and Confirmatory Tests for Suspected Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae* When Using “Old” Interpretive Criteria for Carbapenems (for Use With Table 2A in M100-S20 [January 2010])**

Until the current interpretive criteria for carbapenems are implemented, the screen and confirmatory tests should be performed and reported using the instructions for a positive MHT described below. It is not necessary to test an isolate for a carbapenemase by the MHT when all of the carbapenems that are reported by a laboratory test as either intermediate or resistant (ie, intermediate or resistant results should be reported as tested). However, if the isolate tests intermediate or resistant, the MHT may be performed for epidemiological purposes to determine if a carbapenemase is present.

Test	Initial Screen Test	Phenotypic Confirmatory Test
When to do this test	The following applies ONLY when using interpretive criteria for carbapenems described in M100-S20 (January 2010).	Positive screening test and resistance to one or more agents in cephalosporin subclass III (eg, cefoperazone, cefotaxime, ceftazidime, ceftizoxime, and ceftioxime).
Test method	Disk diffusion	MHT
Medium	MHA	MHA
Antimicrobial concentration	Ertapenem 10 µg or Meropenem 10 µg (NOTE: The imipenem disk test performs poorly as a screen for carbapenemases.)	Ertapenem disk 10 µg or Meropenem disk 10 µg
Inoculum	Standard disk diffusion recommendations	(1) Prepare a 0.5 McFarland standard suspension (using either direct colony suspension or growth method) of <i>E. coli</i> ATCC® 25922 (the indicator organism) in broth or saline, and dilute 1:10 in saline or broth. Inoculate an MHA plate as for the routine disk diffusion procedure. Allow the plate to dry 3 to 10 minutes. Place the appropriate number of ertapenem or meropenem disks on the plate as noted below and shown in Figures 1 and 2.  (2) Using a 10-µL loop or swab, pick 3 to 5 colonies of test or QC organism grown overnight on a blood agar plate, and inoculate in a straight line out from the edge of the disk. The streak should be at least 20 to 25 mm in length. Test the number of isolates per plate as noted below and shown in Figures 1 and 2.  Capacity of small and large MHA plates (100-mm or 150-mm diameter, respectively):
Incubation conditions	35±2°C; ambient air	Disks Test Isolates 1 QC Isolates 2 35±2°C; ambient air
Incubation length	16–18 hours	Small 1 Large 1–4 1–6 2 16–20 hours

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

**Table 2A Supplemental Table 3  
Screening and Confirmatory Tests for Suspected  
Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae*  
Using “Old” Interpretive Criteria**

Table 2A Supplemental Table 3  
Screening and Confirmatory Tests for Suspected  
Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae*  
Using "Old" Interpretive Criteria

January 2013

Vol. 33 No. 1

**Table 2A Supplemental Table 3. (Continued)**

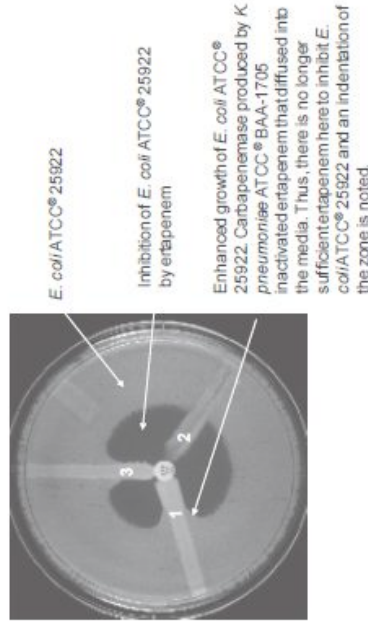
Test	Initial Screen Test	Phenotypic Confirmatory Test
<p><b>Results</b></p> <p>Ertapenem 19–21 mm Meropenem 16–21 mm</p> <p>The zone diameters of inhibition listed above may indicate carbapenemase production, despite the fact that they are in the old susceptible interpretive categories. For confirmation, perform the MHT.</p> <p>(NOTE: The imipenem disk test performs poorly as a screen for carbapenemases.)</p>	<p>Ertapenem 2 µg/mL Imipenem 2–4 µg/mL Meropenem 2–4 µg/mL</p> <p>MICs listed above may indicate carbapenemase production, despite the fact that they are in the old susceptible interpretive categories in M100-S20 (January 2010).</p> <p>For confirmation, perform the MHT.</p>	<p>Following incubation, examine the MHA plate for enhanced growth around the test or QC organism streak at the intersection of the streak and the zone of inhibition (see Figures 1 and 2).</p> <p>Enhanced growth = positive for carbapenemase production.</p> <p>No enhanced growth = negative for carbapenemase production.</p> <p>Some test isolates may produce substances that will inhibit growth of <i>E. coli</i> ATCC® 25922. When this occurs, a clear area will be seen around the streak (see Figure 3) and the MHT is uninterpretable for these isolates.</p> <p>For isolates positive with the ertapenem or meropenem disk screen AND positive with the MHT, perform the MIC test before reporting any carbapenem results.</p>
<b>Reporting</b>		<p>The following applies ONLY when using interpretive criteria for carbapenems described in M100-S20 (January 2010).</p> <p>For isolates that are MHT positive and have an ertapenem MIC of 2–4 µg/mL, imipenem MIC of 2–8 µg/mL, or meropenem MIC of 2–8 µg/mL, report all carbapenems as resistant.</p> <p>If the MHT is negative, interpret the carbapenem MICs using CLSI interpretive criteria as listed in Table 2A in M100-S20 (January 2010).</p> <p>NOTE: Not all carbapenemase-producing isolates of <i>Enterobacteriaceae</i> are MHT positive and MHT-positive results may be encountered in isolates with carbapenem resistance mechanisms other than carbapenemase production.</p> <p>Test positive and negative QC organisms each day of testing.</p> <p><i>K. pneumoniae</i> ATCC® BAA-1705—MHT positive</p> <p><i>K. pneumoniae</i> ATCC® BAA-1706—MHT negative</p>
<b>QC recommendations</b>	<p><i>E. coli</i> ATCC® 25922 (see acceptable QC ranges in Table 3A).</p>	<p><i>E. coli</i> ATCC® 25922 (see acceptable QC ranges in Table 4A).</p>

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; MHA, Mueller-Hinton agar; MHT, modified Hodge test; MIC, minimal inhibitory concentration; QC, quality control.

**Table 2A Supplemental Table 3. (Continued)**

**NOTES:**

1. *Proteus* spp., *Providencia* spp., and *Morganella* spp. may have elevated MICs to imipenem by mechanisms other than production of carbapenemases; thus, the usefulness of the imipenem MIC screen test for the detection of carbapenemases in these three genera is not established. Also, the imipenem disk test performs poorly as a screen for carbapenemases for all *Enterobacteriaceae*.
2. The screening and confirmatory test recommendations were largely derived following testing of US isolates of *Enterobacteriaceae*, and provide for a high level of sensitivity (> 90%) and specificity (> 90%) in detecting KPC-type carbapenemases in these isolates. The sensitivity and specificity of the test for detecting other carbapenemase production can vary. For example, the sensitivity of the test for detecting NDM-type carbapenemases is low (ie, 11%).
3. No data exist on the usefulness of these tests for the detection of carbapenemase production in nonfermenting gram-negative bacilli.



**Figure 1. The MHT Performed on a Small MHA Plate.**  
 (1) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705, positive result;  
 (2) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706, negative result;  
 and (3) a clinical isolate, positive result.



Table 2A Supplemental Table 3. (Continued)

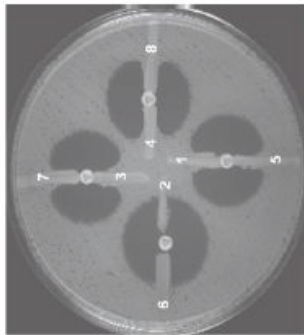


Figure 2. The MHT Performed on a Large MHA Plate With Ertapenem.  
(1) *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705, positive result; (2) *K. pneumoniae*  
ATCC® BAA-1706, negative result; (3–8) clinical isolates; (6) negative  
result; (3, 4, 5, 7, 8) positive result.

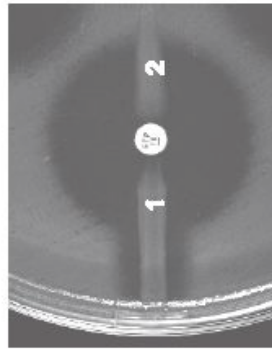


Figure 3. An Example of an Indeterminate Result. (1) A clinical isolate  
with an indeterminate result; and (2) a clinical isolate with a negative result.



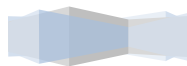
**Table 2A Supplemental Table 3. (Continued)**

References

- 1 Perrott J, Mabasa VH, Ensom MH. Comparing outcomes of meropenem administration strategies based on pharmacokinetic and pharmacodynamic principles: A qualitative systematic review. *Ann Pharmacother.* 2010;44:557-564.
- 2 Cirillo I, Vaccaro N, Turner K, Solanki B, Natarajan J, Redman R. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of doripenem after 0.5-, 1-, and 4-hour infusions in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2009;49:798-806.
- 3 Sakka SG, Glauner AK, Bulitta JB, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of continuous versus short-term infusion of imipenem-dasitatin in critically ill patients in a randomized, controlled trial. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3304-3310.
- 4 Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 2010;362:1804-1813.

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2A Supplemental Table 3  
Screening and Confirmatory Tests for Suspected  
Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae*  
Using "Old" Interpretive Criteria



**Table 2A Supplemental Table 3. (Continued)**

References

- 1 Perrott J, Mabasa VH, Ensom MH. Comparing outcomes of meropenem administration strategies based on pharmacokinetic and pharmacodynamic principles: A qualitative systematic review. *Ann Pharmacother.* 2010;44:557-564.
- 2 Cirillo I, Vaccaro N, Turner K, Solanki B, Natarajan J, Redman R. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of doripenem after 0.5-, 1-, and 4-hour infusions in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2009;49:798-806.
- 3 Sakka SG, Glauner AK, Buitta JB, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of continuous versus short-term infusion of imipenem-dialetatin in critically ill patients in a randomized, controlled trial. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3304-3310.
- 4 Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 2010;362:1804-1813.

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2A Supplemental Table 3  
Screening and Confirmatory Tests for Suspected  
Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae*  
Using "Old" Interpretive Criteria

