

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS DE MAESTRIA EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA

---

**Detección del determinante genético (*cfiA*) de la  
resistencia a carbapenems y su entorno  
molecular en aislamientos clínicos de bacilos  
gram negativos anaerobios**

---

**Autor: Bioq. Mirta Rosa Litterio**

**Directora: Dra. Marcela Radice**

**Directora Adjunta: Dra Daniela Cejas**

**2016**

**Cátedra de Microbiología - Laboratorio de Resistencia**

**Bacteriana- Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA**

**Servicio de Microbiología - Hospital de Pediatría J.P.Garrahan**

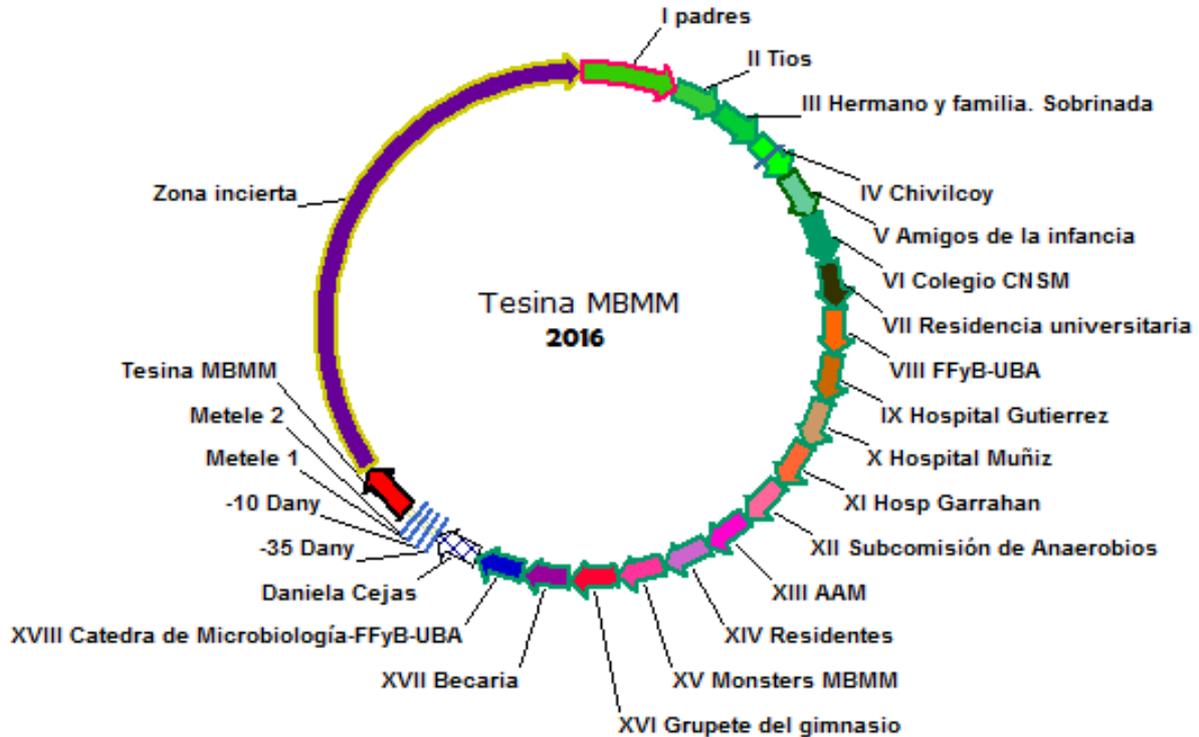
Los resultados del presente trabajo han dado lugar a las siguientes presentaciones en congresos internaciones:

- Characterization of *cfiA* from *Bacteroides fragilis* in Argentina. Litterio, M; Cejas, D; Rincón, G ; Rocchi, I.; Gutkind, G; Radice, M. Presentado en ICAAC 2014 (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy) (ASM). Washington DC. USA.
  
- Characterization of CfiA metallo- $\beta$ -lactamase in *Bacteroides fragilis*, in Argentina. Litterio, M; Cejas, D; Gutkind, G; Radice, M. Presentado en MICROBE 2016. (ASM). Boston. USA.

## INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN .....	8
INTRODUCCION .....	10
OBJETIVOS .....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Aislamientos bacterianos .....	24
1. Detección de la presencia de <i>cfiA</i> .....	31
1.1 Extracción de ADN total por lisis térmica.....	31
1.2 Extracción de ADN cromosomal [86] .....	32
1.3 Detección del fragmento interno de 339 pb de <i>cfiA</i> por amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32
2. Identificación de <i>cfiA/CfiA</i> .....	36
2.1 Detección del gen <i>cfiA</i> completo por PCR .....	36
2.2 Identificación del alelo de <i>cfiA</i> .....	37
2.3 Traducción del alelo de <i>cfiA</i> .....	38
3. Estudio del entorno genético de <i>cfiA</i> .....	38
3.1 Identificación de IS previamente reportadas upstream a <i>cfiA</i> .....	38
3.2 Identificación de las regiones flanqueantes a <i>cfiA</i> por PCR Inversa .....	39
3.3 Análisis de secuencias de ADN .....	42
RESULTADOS Y DISCUSION.....	43
1. Detección de la presencia de <i>cfiA</i> .....	43
2. Identificación del alelo de <i>cfiA/CfiA</i> .....	45
3. Estudio del entorno genético de <i>cfiA</i> .....	63
CONCLUSIONES .....	77
ANEXO I .....	79
BIBLIOGRAFÍA.....	85

## AGRADECIMIENTOS



- I. A mis padres que fueron el buffer, el CIMg<sub>2</sub>, los dNTPs, los primers, el agua miliQ, la Taq y el templado de donde salió mi secuencia original: Alfonso Damian Litterio y Mirta Noemí Bürki de Litterio.  
Y a todos los que contribuyeron con inserciones y deleciones, permanentes o transitorias con las que llegué hasta hoy:
- II. A mis tios
- III. A mi hermano y su familia, mis sobrinos.
- IV. A mi ciudad de origen: Chivilcoy.
- V. A mis amigas de la infancia: Malila, Carmen, Eugenia, Alicia.
- VI. A mi colegio primario y secundario: Colegio Nuestra Señora de la Misericordia, mis profesores todos y las hermanas de la institución:

- Juanita, Agüeda, Silvia, Virginia, Piedad, Dominga, Victoria y Laura. A mi "5 Sol".
- VII. Residencia Universitaria. Marita Narbaitz y flia. Nora Dackiewick. Ana María Peñaloza Chej.
- VIII. A mi Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA. 1976-1986. Ana Lia Masó, Sara Teper. Gabriela Pini.
- IX. Al Hospital de Niños R Gutierrez, el Dr Cesar Bergadá, bioquímicos, auxiliares y técnicos del Laboratorio de Bacteriología, la **Dra Rubeglio-me abrió las puertas a la práctica hospitalaria**, Marta Tokumoto, **Mabel Woloj- aprendí de Mabel lo que despues puse en práctica muchas veces: pruebas de dilucion en agar, entre otras cosas**, Laura Galanternik, Adriana Procopio. 1981-1986.
- X. Al Hospital F. J Muñiz, el Dr Negroni, la Dra Alicia Arechavala, la Dra Hardie, la Dra Di Lonardo, la Dra Martha Ambroggi, la Dra Isola. Mis compañeros de Residencia en Microbiología: Claudia Vellani, Ricardo Marino, Jorge Velázquez, Nora Costa, Rolando Soloaga. Alicia Rossi y José María Casellas: dos referentes de sensibilidad antibiótica que "había que escuchar" en cualquier congreso. 1987-1990.
- XI. Al Hospital de Pediatría J.P.Garrahan, sus profesionales médicos, al Servicio de Microbiología, su secretaria, las nuevas generaciones de bioquímicos, los auxiliares y técnicos, Horacio Lopardo, Claudia Hernández, Ma del Carmen Ceinos, Lidia Casimir. A los técnicos: Laura Lovadina, Marta Yuckosky, Alejandra Mastroiani, Miriam Quinteros, Noelia Dirialdi, Mariana Gareis, Verónica D'Amore y Gabriela Perez. 1990-a la fecha.

- XII. A la **Subcomisión de Bacterias Anaerobias- SADEBAC-AAM**: Hebe Bianchini, Liliana Fernández Canigia, Liliana Castello, Silvia Predari, Adelaida Rossetti, Cristina Legaria, Claudia Barberis, Raquel Rollet, Graciela Carloni, y sus ex integrantes. A los colegas "anaerobios" del interior. 1990 -a la fecha.
- XIII. A la Asociación Argentina de Microbiología. Sus profesionales y su personal administrativo. Bety, Ana, Luis
- XIV. A mis Residentes. 1990- al fecha
- XV. A mi grupo de cursada de la MBMM: "Monsters": Bertone, Garcia, Aya Castañeda, Castillo, Vaccaro, Cabral. 2008-2010.
- XVI. A mis profesores de gimnasia: Varze y Garelik. A mi "grupete": Nilda Alvarez , Cris Pogany, Caty Pogany, Julia Fernández, Eli Cataldo, Caro Gonzalez, Isabel Ramos, Gisella Cardozo, Sabrina Domecq, Pao Rotolo. Sus familias.
- XVII. A mi Becaria, Maldonado, M.L. 2016-2616.
- XVIII. A la Cátedra de Microbiología - Laboratorio de Resistencia Bacteriana- Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA. El **Dr Gabriel Gutkind** un grande que me conoce de chiquita y como un amigo, y como si nada, me ofreció su laboratorio para llevar a cabo el proyecto. **La Dra Marcela Radice**, LA DRA MARCELA RADICE, me supo esperar con todo y me apuró justo a tiempo. La **Dra Daniela Cejas**, **mi secuencia de inserción y la de mi tesina, mi promotora, le agradezco su paciencia y su impaciencia, todo el caudal de conocimientos conque fue llenando mi cabezota, las respuestas a todas mis preguntas, su entusiasmo, su fortaleza, su tiempo, su buen humor y su**

**dedicación. La Dra Giovanna Rincón, sus cuidados, su paciencia, su inmenso aporte en "los detalles" de mi aprendizaje, su tiempo, su dedicación.** Por el apoyo, las respuestas y la compañía con que alivianaron las horas de trabajo Barby Ghiglione, Melina Ruggiero, Silvina Fernández, Sabrina Di Gregorio, Mariana Papalia, y los "en via de": Johana Dominguez, Veronica Kovacec y Alan Elena. GRACIAS A TODOS.

## RESUMEN

*Bacteroides fragilis* es la especie del grupo *Bacteroides fragilis* que se asila con mayor frecuencia de especímenes clínicos, debido, en parte, a que es la especie más virulenta del grupo.

La mayoría de los aislamientos de *B. fragilis* resultan resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, excepto a los carbapenems, siendo el principal mecanismo de resistencia la producción de  $\beta$ -lactamasas. En *B. fragilis* se han descrito 3  $\beta$ -lactamasas diferentes: - CepA, una cefalosporinasa endógena que le confiere resistencia a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con excepción de las cefamicinas y carbapenems, y es inhibida por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. - CfxA la cual confiere resistencia a cefaloridina, cefoxitina y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos excepto imipenem. Y una metalo- $\beta$ -lactamasa CfiA con actividad frente a penicilinas, cefalosporinas, incluyendo las cefamicinas, y carbapenems. CfiA no es inhibida por el ácido clavulánico ni el sulbactam pero sí por EDTA y su actividad se recupera por el agregado de  $Zn^{2+}$ .

En nuestro país, la actividad de los antimicrobianos frente a los aislamientos del grupo *Bacteroides fragilis* se ha mantenido inalterable a lo largo de diferentes relevamientos efectuados. Sin embargo en un estudio de vigilancia llevado a cabo entre los años 2006 y el 2009, en 363 aislamientos clínicos de bacilos gram negativos anaerobios pertenecientes a este grupo, se detectaron 3 aislamientos con alto nivel de resistencia ( $CIM \geq 32 \mu\text{g/ml}$ ) a los carbapenems. Este hallazgo constituyó el primer reporte en nuestro país en aislamientos de *B. fragilis* procedentes de materiales clínicos.

En dichos aislamientos la presencia de una metalo- $\beta$ -lactamasa fue sospechada a partir de ensayos de inhibición con EDTA

El objetivo general de este trabajo fue analizar la presencia del marcador de resistencia *cfiA* en aislamientos de *B. fragilis* recuperados durante el estudio de vigilancia mencionado previamente, así como analizar el entorno genético de dicho marcador.

Este es el primer estudio en Argentina donde se informan 7 aislamientos de *B. fragilis* portadores de *cfiA*. Tres de ellos correspondieron a los aislamientos que presentaban resistencia a carbapenemes (CIM $\geq$ 32  $\mu$ g/ml). En 2/3 se identificó CfiA13 asociada a IS pertenecientes a la familia *IS1380*, grupo *IS942*. En el restante aislamiento resistente se identificó CfiA4 asociada a una IS perteneciente a la familia *IS21* asociada al gen codificante.

En los 4 aislamientos sensibles a imipenem se identificaron las variantes CfiA 4, CfiA 2 y dos nuevas variantes, de CfiA4 y CfiA13. No se hallaron IS en la región *upstream* al gen codificante. Solo en el aislamiento, que resultó intermedio para doripenem se identificaron las secuencias promotoras -10 y -35 en la región adyacente a *cfiA2*

## INTRODUCCION

Las bacterias anaerobias son los microorganismos numéricamente dominantes de la microbiota humana normal de las mucosas. Viven y se multiplican en condiciones de bajo potencial redox (Eh) y en ausencia de oxígeno, cuya acción es directamente tóxica sobre ellas [1]. La mayoría de las infecciones por bacterias anaerobias en humanos son de naturaleza endógena y polimicrobiana [2]. Los bacilos gram negativos anaerobios recuperados con mayor frecuencia pertenecen al grupo *Bacteroides fragilis* (GBF) [3]. En el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* en 1984, se proponía, basado en la clasificación que Holdeman y col., el género *Bacteroides* el cual comprendía una colección heterogénea de más de 50 especies de bacilos gram negativos anaerobios obligados. El análisis efectuado por Shah y col. mostró que estas especies exhibían una gran variedad de morfologías celulares y eran bioquímica y fisiológicamente muy heterogéneas. Por lo tanto, en 1989 propusieron que el género *Bacteroides sensu stricto* se restringiera a 10 especies muy relacionadas de acuerdo a la secuencia del gen codificante del ARN 16S [4]. La especies comprendidas en este grupo fueron: *Bacteroides caccae*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides merdae*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides vulgatus* y *Bacteroides fragilis*, estableciéndose esta última como especie tipo. En los últimos 10 años, merced a las técnicas de biología molecular, nuevamente se han producido modificaciones y hoy son más de 20 las especies incluidas en el género *Bacteroides sensu stricto* [5]. En este trabajo, con la denominación GBF, se

hará referencia en especial a las 10 especies postuladas por Shah y col., en 1989.

Los miembros del GBF son patógenos oportunistas. Normalmente son residentes benignos de la microbiota intestinal pero cuando ocurre ruptura del tracto gastro intestinal o cirugía intestinal pueden causar patologías serias incluyendo la formación de abscesos en distintos sitios del cuerpo (abdomen, cerebro, hígado, pelvis, pulmones) y bacteriemias [6-9]. La proporción de *B. fragilis* es 10 a 100 veces menor que la de otras especies de *Bacteroides* a nivel intestinal, sin embargo es el que se aísla con mayor frecuencia a partir de materiales clínicos. Asimismo *B. fragilis* es el más virulento dentro GBF, ya que presenta fimbrias y aglutininas que funcionan como adhesinas permitiéndole establecerse en los tejidos del huésped. Por su parte, el polisacárido capsular, el LPS y una variedad de enzimas lo protegen de la respuesta inmune. La cápsula es responsable de la formación de abscesos y las enzimas histolíticas encontradas en *B. fragilis* pueden mediar la destrucción tisular [10]. Por otro lado, se han reportado cepas de *B. fragilis*, productoras de una enterotoxina con actividad metaloproteasa dependiente de  $Zn^{2+}$ , pero aún se investiga su rol en el desencadenamiento de cuadros diarreicos [11-14].

Dado que la formación de abscesos es una complicación frecuente en las infecciones por anaerobios en general y *Bacteroides* en particular, uno de los puntos claves en la terapéutica, es el drenaje [2]. Por otro lado, uno de los dilemas que se presenta al decidir el tratamiento antimicrobiano en las infecciones en las que participan las bacterias anaerobias es la naturaleza polimicrobiana de las mismas y el otro, es la decisión, por lo general empírica, en cuanto a la selección del antibiótico. El tratamiento entonces debe apuntar

siempre a la cobertura de microorganismos aerobios y anaerobios [15]. En el pasado se consideraba que las infecciones por encima del diafragma raras veces involucraban *B. fragilis*, en contraste, era probable que en las infecciones subdiafragmáticas estuviera involucrado. Los fármacos de elección entre 1960-1970 eran penicilinas en infecciones por encima del diafragma, y clindamicina, cefoxitina, cloranfenicol y metronidazol para infecciones subdiafragmáticas [2]. Los cambios en la sensibilidad a antimicrobianos de las bacterias anaerobias y la cobertura inadecuada produjeron fallas en el tratamiento [16, 17]. En la actualidad en líneas generales, los antimicrobianos de uso empírico inicial más activos son la combinación  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, los carbapenems y el metronidazol (este último generalmente asociado a un antibiótico efectivo contra bacterias anaerobias facultativas). Aunque ya se han detectado cepas del GBF resistentes, las quinolonas fluoradas de cuarta generación como la moxifloxacina y la levofloxacina, también son una alternativa en infecciones en las que se sospechan anaerobios como las infecciones ginecológicas, las de piel y partes blandas y las infecciones por mordeduras [18, 19].

El GBF se destaca del resto de las bacterias anaerobias: 1) por constituir el grupo más frecuentemente aislado de infecciones clínicas relevantes y 2) por su resistencia a los antibióticos de uso habitual, principalmente los  $\beta$ -lactámicos [20-26].

La producción de  $\beta$ -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos entre las bacterias gram negativas. Las  $\beta$ -lactamasas catalizan la hidrólisis irreversible del enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico, liberando productos biológicamente inactivos. La gran mayoría de las  $\beta$ -

lactamasas clínicamente relevantes presentan una serina en su sitio activo responsable de la hidrólisis del  $\beta$ -lactámico. Otras, las metalo- $\beta$ -lactamasas, utilizan iones de zinc para romper el anillo  $\beta$ -lactámico [27, 28].

Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y la presencia de motivos conservados (clasificación de Ambler), así como mediante un esquema funcional (clasificación de Bush y col.). La clasificación de Ambler fue propuesta en 1980 y establece cuatro clases moleculares: A, B, C y D. Las  $\beta$ -lactamasas de clase A, C y D son serino-enzimas y las de clase B son metalo- $\beta$ -lactamasas [29]. Por otro lado, el esquema propuesto por Bush y col. inicialmente en 1989, modificado en 1995 y actualizado en 2010, contempla el perfil de sustratos e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas, así como el peso molecular y el punto isoeléctrico de las mismas [30]. En la clasificación de Bush y col. del 2010, se definen cuatro grupos de  $\beta$ -lactamasas que comprenden: 1) cefalosporinasas pobremente inhibidas por el ácido clavulánico, pertenecientes a la clase molecular C de Ambler; 2) penicilinasas, cefalosporinasas y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido que son generalmente inhibidas por inhibidores clásicos y pertenecen a la clase molecular A o D; 3) metalo- $\beta$ -lactamasas, clase molecular B, que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenems, y que son inhibidas por EDTA y p-cloromercuribenzoato (pCMB) y 4) penicilinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico.

Hace aproximadamente 50 años surgieron las primeras publicaciones sobre la resistencia en *B. fragilis* debida a la producción de  $\beta$ -lactamasas [31-33]. Rogers y col., en 1993, caracterizaron el gen *cepA* que codifica para una serino  $\beta$ -lactamasa perteneciente a la clase A de Ambler [34]. Esta cefalosporinasa

cromosómica se encuentra en más del 90% de los aislamientos de *B. fragilis*, confiere resistencia a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con excepción de las cefamicinas y carbapenems, y es inhibida por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Un año más tarde, Rogers y col. describieron en la zona *upstream* a *cepA* una región que presentaba alta homología con la secuencia de inserción (IS) IS21, sugiriendo que la expresión de *cepA* estaría sujeta a la presencia de estos elementos que activarían la transcripción del gen [35].

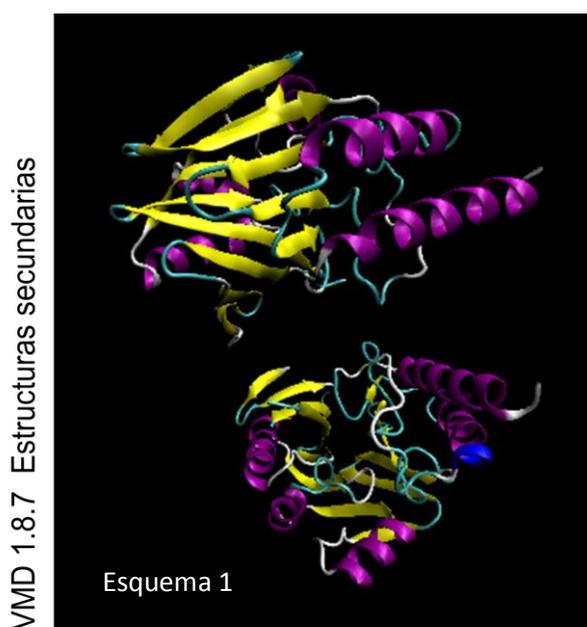
Por otro lado, Parker y col., en 1993, caracterizaron el gen codificante de la  $\beta$ -lactamasa CfxA en un aislamiento de *B. vulgatus*, la cual confiere resistencia a cefaloridina, cefoxitina y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos excepto imipenem [36]. La expresión de *cfxA* está asociada a la presencia de IS tales como IS614B [37].

Hasta 1990, sólo tres aislamientos de *B. fragilis* habían sido reportados como resistentes a los carbapenems. El primero de ellos, en 1983, fue dado a conocer por Akira Yotsuji y col. en Japón (*B. fragilis* G-237) [33]. La actividad de la enzima purificada a partir del *B. fragilis* G-237 comprendía a los siguientes sustratos: benzilpenicilinas, ampicilina, carbenicilina, cloxacilina y piperacilina, más activamente que cefaloridina, cefuroxima y cefamicinas, e imipenem. El segundo y tercero de los aislamientos fueron publicados por Cuchural y col. en el año 1986, en USA. Este trabajo daba cuenta de dos aislamientos clínicos de *B. fragilis* (TAL2480 y TAL3636) con resistencia a imipenem mediada por la producción de una  $\beta$ -lactamasa dependiente de  $Zn^{2+}$  [38]. Posteriormente, Thompson y col. identificaron en los aislamientos TAL2480 y TAL3636 la secuencia del gen *cfiA* cromosómico (750-pb), también

conocido como *ccrA*, responsable de la síntesis de la proteína CfiA de 249 aminoácidos y PM 25-33 kDa [39, 40].

En 1990 Hurlbut y col. también describieron una carbapenemasa cromosómica en una cepa de *Parabacteroides distasonis* (TAL6870) pero, a diferencia de CfiA descrita en *B. fragilis*, era inhibible por ácido clavulánico [41].

La metalo-β-lactamasa cromosómica CfiA pertenece a la clase B de Ambler, grupo 3a de K. Bush [29, 30]. En el esquema 1 se muestra el modelo computacional de CfiA construido con el Programa VMD1.8.7 Biología computacional, MBMM 2008-2010.



El perfil de sustratos de CfiA incluye a todos los antibióticos β-lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, incluyendo las cefamicinas, y carbapenems [42]. A diferencia de la cefalosporinasa de *B. fragilis* codificada por el gen *cepA* [34], la actividad de CfiA no es inhibida por el ácido clavulánico ni

el sulbactam pero sí por EDTA, y se recupera por el agregado de  $Zn^{2+}$  [42, 43].

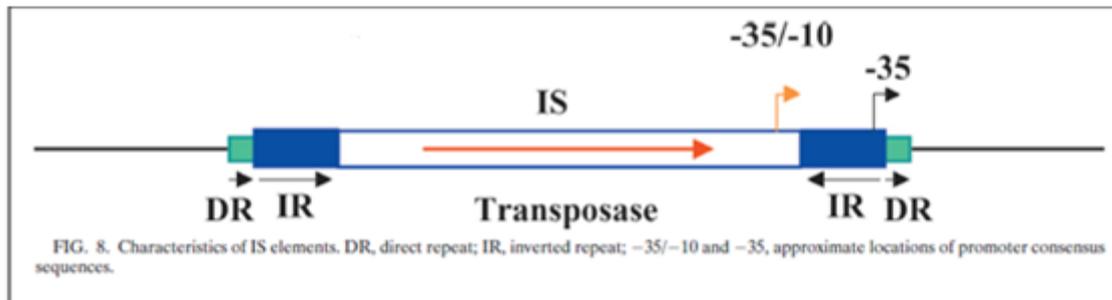
El gen *cfiA* ha sido mayoritariamente detectado en la especie *B. fragilis*, sin embargo, Boente y col. han reportado recientemente su presencia en un aislamiento de *P. distasonis* procedente de la microbiota intestinal [44].

La presencia diferencial de *cfiA* y *cepA* en la población de *B. fragilis* ha sido propuesta por diferentes autores como Gutacker y col. y Podglajen y col. entre

otros, para separar dicha población en dos Divisiones, las cuales exhiben entre sí una distancia genética muy grande [45, 46]. La División I se caracteriza por la presencia frecuente del gen *cepA* y la ausencia de *cfiA*, mientras que la División II se caracteriza por la presencia de *cfiA*, un alto grado de homología genética, y la ausencia de *cepA*. Se ha propuesto que la conservación en los genes de *cfiA* y *cepA* en cada una de las divisiones propuestas estaría vinculada con su transferencia de tipo vertical [45, 46]. En contraste, la diseminación de *cfxA* entre *Bacteroides* y otros géneros se debería a su transmisión horizontal [37, 47, 48]. A pesar de estas observaciones Ayala y col. describieron dos cepas de *B. fragilis* con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de imipenem de 2 y 4 µg/ml portando a su vez los genes *cepA* y *cfiA* de manera conjunta [49].

El gen *cfiA* puede ser silente o expresarse en diferentes grados, dando lugar a un amplio rango de niveles de resistencia a los β-lactámicos, incluyendo a los carbapenems [21, 46, 50]. Los diferentes niveles de expresión de *cfiA* resultan de la introducción de IS *upstream* del gen más que por variaciones en su secuencia codificante [51, 52]. En este sentido, Edwards y col. plantearon la posibilidad de la selección intra-tratamiento de *B. fragilis* resistente a imipenem a partir de un cepa sensible, debido a la adquisición de un elemento IS [53].

Las IS son elementos móviles que por su capacidad de translocación generan mutaciones y re-arreglos genómicos. La presencia o movilidad de estos elementos puede afectar la expresión de factores de virulencia o patogenicidad bacterianos, y/o genes de resistencia a antibióticos [51, 54-56].



Esquema 2: Organización típica de una IS

En su organización típica (Esquema 2 [56]) las IS poseen 2 terminaciones repetidas invertidas, izquierda y derecha (Terminal inverted repeats, Left-Right, IRL-IRR) de aproximadamente 50 pb, flanqueando el marco de lectura (*Open reading frame*, ORF) de la transposasa, enzima que promueve su movilidad. Flanqueando al elemento IS se encuentran secuencias de repetición directa corta (*Directly repeated sequences*, DR) de 5-11-pb [56, 57]. Las terminaciones repetidas, IR, son específicas de cada elemento IS y deben estar íntegras para lograr la transposición, siendo o no sitio específica. Es importante destacar que pueden contener promotores generalmente localizados en sus extremos y orientados hacia afuera con capacidad para activar genes vecinos [56]. Las IS se agrupan en familias, algunas muy heterogéneas [55].

Asimismo, la zona *upstream* a *cfiA* puede presentar plasticidad genética, la cual fue evidenciada en un aislamiento clínico (*B. fragilis* K2-28) en el que Walsh y col. identificaron un promotor híbrido localizado a 158 pb del codón de iniciación de *cfiA* cuya región -10 presentó 100% de identidad con IS613 y la -35 con IS612 [58].

En una revisión realizada en el año 1998, Mahillon y col. mostraron las diferentes IS asociadas a *cfiA* descritas hasta ese momento en *B. fragilis*, *B. vulgatus* y *B. thetaiotaomicron*: IS942, IS1168, IS1168F, IS1169, IS1179,

IS1186, IS4351, ISBf1, ISBf2 [55]. Posteriormente se han descrito otras IS, así como su rol como promotores en la expresión del gen *cfiA* [51, 59-62]. La eficiencia en la transcripción de *cfiA* en *B. fragilis* depende de la presencia completa de la IS y los promotores en las regiones -35 y -10 reconocidos por los factores  $\sigma^{70}$  [56]. Algunas IS como IS942, IS1186 y IS4351 funcionan como promotores eficientes y se asocian con altos niveles de resistencia a los carbapenems [63].

Además, se han descrito aislamientos de *B. fragilis* resistentes a carbapenems, portadores de *cfiA* donde no se observa la presencia de IS en la región *upstream*. En estos casos se sugiere que diferentes mecanismos podrían estar involucrados, como por ejemplo la existencia de mutaciones en la zona *upstream* que originen regiones promotoras para *cfiA*, alteraciones en el perfil proteico de la membrana externa o sobreexpresión de bombas de eflujo [46, 61, 64-66].

Diferentes estudios de sensibilidad a nivel mundial han reportado un incremento paulatino de los niveles de resistencia a antibióticos entre las bacterias anaerobias [6, 67-77].

En una actualización realizada por Snyderman y col., publicada en el año 2011, sobre la resistencia del GBF en USA entre los años 2006-2009, sobre más de 1000 aislamientos, se observó un aumento en los porcentajes de resistencia en *B. fragilis* frente a cefoxitina, piperacilina-tazobactama, imipenem, doripenem, meropenem, ertapenem, moxifloxacin y tigeciclina. En el estudio se incluyeron también especies de GBF no *B. fragilis* (Bnf) como *B. distasonis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* y *B. vulgatus*. Todos los Bnf estudiados

aumentaron sus porcentajes de resistencia frente a cefoxitina y ninguno fue resistente a imipenem o piperacilina-tazobactama excepto la especie *B. thetaiotaomicron*. Sólo *B. ovatus* aumentó el porcentaje de resistencia frente a ampicilina-sulbactama. En el resto de los antibióticos probados el aumento de la resistencia varió con la especie de Bnf. Sólo se encontró un aislamiento resistente a metronidazol. De los 20 aislamientos resistentes a los carbapenems 15 correspondieron a *B. fragilis*, 13 de éstos fueron portadores de *cfiA* y sólo 3 presentaron valores de CIM  $\geq$  32  $\mu$ g/ml a los carbapenems. En 2 de ellos la secuencia *upstream* a *cfiA* presentó identidad con IS1170, y en el tercero con el Tn4555, un transposón que en *B. fragilis* se asocia generalmente al gen *cfxA* [23].

Boyanova y col. revisaron la evolución de la resistencia utilizando datos de aislamientos recuperados entre los años 2000 y 2013 procedentes de Canadá, USA y varios países de Europa y Asia. Estos autores reportaron un incremento en la resistencia de *Bacteroides* / *Parabacteroides* spp. frente a cefoxitina, clindamicina, amoxicilina-ácido clavulánico, moxifloxacina y metronidazol. También se reportó un aumento en la resistencia de *B. fragilis* frente a ampicilina-sulbactama y meropenem [69].

En Brasil, Boente y col. en un estudio publicado en el año 2010 sobre 60 aislamientos de *Bacteroides* spp. procedentes de materiales clínicos y contenido intestinal reportaron dos aislamientos con sensibilidad disminuida a metronidazol (CIM=8 $\mu$ g/ml). La resistencia a cefoxitina y clindamicina fue de 9,6% y 19,2%, respectivamente. En el estudio observaron 9 aislamientos portadores de *cfiA*. Ocho correspondieron a *B. fragilis* (1 de material clínico y 7

de contenido intestinal) y 1 a *P. distasonis*. Solo 1 de los aislamientos de *B. fragilis* presentó resistencia a imipenem [44].

El común denominador observado, también en relevamientos efectuados en Argentina, fue la variabilidad en los patrones de resistencia entre las especies que componen el GBF [78, 79]. *B. fragilis* sigue siendo la especie más sensible comparada con el resto de la especies del GBF. Fernández Canigia y col. observaron, en un estudio de tendencias en el perfil de sensibilidad de aislamientos del GBF obtenidos en Buenos Aires entre 1989 y 2002, un aumento significativo en la resistencia frente a cefoxitina y clindamicina y un 100% de sensibilidad frente a metronidazol [79].

El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido identificar los mecanismos involucrados en la resistencia aun mucho tiempo después del aislamiento del microorganismo [42, 63, 80]. En la actualidad el porcentaje de aislamientos de *B. fragilis* resistentes a carbapenems es bajo, sin embargo a nivel mundial se han reportado infecciones por *B. fragilis* resistentes debido a la producción de CfiA, así como la emergencia de cepas multi-resistentes [7, 58, 81-83].

Los estudios de vigilancia sobre *B. fragilis* portadores de *cfiA* son escasos. En un estudio realizado por Soki y col en el año 2004, analizaron 224 muestras de materia fecal entre las cuales se recuperaron 5 aislamientos de *B. fragilis* portadores de dicho marcador. De estos aislamientos, 2 presentaron resistencia a imipenem y meropenem, sin embargo no se detectó la presencia de IS *upstream* a *cfiA* [84]. En el mismo año, Paula G, R. y col. en Brasil, sobre 76 muestras de microbiota intestinal y 17 de tracto genital encontraron 3 aislamientos portadores de *cfiA* y *cfxA* [52].

### Antecedentes en el tema de investigación:

En nuestro país la actividad de algunos antimicrobianos frente al GBF se ha mantenido inalterable a lo largo de diferentes relevamientos efectuados [20].

En un estudio de vigilancia llevado a cabo entre los años 2006 y el 2009 se evaluó la sensibilidad de 363 aislamientos clínicos de bacilos gram negativos anaerobios pertenecientes al GBF [21]. Los microorganismos fueron identificados por pruebas bioquímicas convencionales [3] y métodos comerciales de galerías miniaturizadas, API 20 A System Bio- Merieux S.S., Marcy l' Etoile, France. La sensibilidad a antibióticos se determinó mediante la prueba de dilución en agar siguiendo las recomendaciones del CLSI Documento M11A7 [85]. Se emplearon los puntos de corte establecidos por dicho documento; los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) que correlacionaban con las categorías sensible, intermedia y resistente a imipenem y ertapenem fueron  $\leq 4$ , 8 y  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente [85]. Estos puntos de corte se aplicaron también para doripenem. Se detectaron 3 aislamientos con alto nivel de resistencia ( $\text{CIM} \geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ ) a los carbapenems probados: imipenem, doripenem y ertapenem. Subrayamos este hallazgo porque constituye el primero de los reportados en nuestro país en aislamientos de *B. fragilis* procedentes de materiales clínicos.

En dichos aislamientos la presencia de la metalo- $\beta$ -lactamasa CfiA se evaluó fenotípicamente por la inhibición de la enzima ante el agregado de EDTA. La inhibición se consideró positiva cuando se obtuvo una reducción de por lo menos tres diluciones en el valor de CIM de imipenem en presencia de 0.4mM

de EDTA con respecto al valor de CIM de imipenem solo. Tabla 1 de Materiales y Métodos.

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue analizar la presencia del marcador de resistencia *cfiA* en aislamientos de *B. fragilis* recuperados durante el estudio de vigilancia mencionado previamente, así como analizar el entorno genético de dicho marcador.

Objetivos específicos:

1. Investigar la presencia de *cfiA* en los aislamientos de *B. fragilis* resistentes a carbapenems.
2. Investigar la presencia de *cfiA* en aislamientos de *B. fragilis* categorizados, según CLSI Documento M11A7, como intermedios (I) (CIM=8µg/ml) y sensibles (S) (CIM ≤ 4µg/ml) a los carbapenems, a fin de detectar la portación de *cfiA* en aislamientos que no presentan resistencia fenotípica a estos antibióticos.
3. Identificar los alelos de *cfiA* en los aislamientos portadores.
4. Estudiar la asociación de *cfiA* a diferentes IS descritas en la literatura, localizadas *upstream* y reportadas como responsables de la expresión de dicho marcador.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamientos bacterianos

En el presente estudio se incluyeron los 3 aislamientos que presentaron resistencia a los carbapenems. A continuación se muestran los datos de sensibilidad de estos aislamientos (Tabla 1) y los datos clínicos de los pacientes de los cuales fueron recuperados (Tabla 2).

Asimismo se incluyeron 76 aislamientos que no presentaban resistencia a carbapenems según CLSI Documento M11A7. Estos aislamientos se recuperaron de los siguientes hospitales:

- Hospital Nacional de Pediatría J. P. Garrahan (HG), CABA (n: 27)
- Hospital Alemán (HA), CABA (n: 25)
- Hospital General de Agudos Dr. E. Tornú (HT), CABA (n: 12)
- Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IL), CABA (n: 11)
- HIGA Dr. A Piñero, Junin, (BA), Pcia. de Buenos Aires (n: 1)

En la tabla 3 se muestran los valores de sensibilidad de dichos aislamientos.

En la tabla 4 y en el gráfico 1 se muestra la distribución de los valores de CIM para cada carbapenem. En base a esta distribución los aislamientos sensibles fueron divididos en dos categorías: sensibilidad disminuida (SD) (CIM  $>0.25 - \leq 4$   $\mu\text{g/ml}$ ) y extrema sensibilidad (ES) (CIM  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/ml}$ ).

Tabla 1: Sensibilidad antibiótica según las normas CLSI Documento M11A7 ( $\mu\text{g/ml}$ ) y *screening* fenotípico de la MBL en los 3 aislamientos resistentes a carbapenems.

Aislamiento/ Origen <sup>1</sup>	Antibiótico <sup>2</sup> CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) ( categoría de sensibilidad)										IMI+ 0.4m M EDTA
	AMS	TAZ	CXT	IMI	DOR	ERT	CLI	MOX	TIG	MET	
<i>B fragilis</i> 3091 / HG	32(R)	4 (S)	64 (R)	32 (R)	32 (R)	32 (R)	2 (S)	0,5 (S)	0,125 (S)	0,5 (S)	0,125
<i>B fragilis</i> 3189 / HG	128(R)	256 (R)	256 (R)	32 (R)	>64 (R)	>64 (R)	2 (S)	1 (S)	0,125 (S)	0,25 (S)	0,06
<i>B fragilis</i> 3409 / Cba	256(R)	>512 (R)	64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	>64 (R)	512 (R)	0,125 (S)	0,125 (S)	1 (S)	0,015

<sup>1</sup> HG: Hospital Garrahan, Cba: Pcia. de Córdoba. <sup>2</sup>AMS: ampicilina-sulbactama, TAZ: piperacilina-tazobactama, CXT: cefoxitina, IMI: imipenem, DOR: doripenem, ERT: ertapenem, CLI: clindamicina, MOX: moxifloxacina, TIG: tigeciclina; MET: metronidazol. (S) sensible, (R) resistente

Tabla 2: Datos clínicos de los pacientes de los cuales se recuperaron los *B. fragilis* resistentes a carbapenems

	Paciente1	Paciente2	Paciente3
Aislamiento (año)	3091 (2007)	3189 (2007)	3409 (2008)
Edad/sexo	1a/M	5a/F	65 a/M
Antecedentes	Malformación intestinal. Cirugía abdominal. Perforación y resección intestinal. Colostomía permanente.	Transplante cardíaco. Diálisis peritoneal. Drenaje mediastinal y pleural.	Cáncer rectal y de vejiga. Absceso glúteo. Peritonitis. Cirugía abdominal. Infección herida.
Flora acompañante recuperada	Ninguna	Ninguna	Polimicrobiana
Tratamiento Antibiótico previo	Vancomicina Meropenem	Vancomicina Colistin Meropenem	Ceftazidima Clindamicina
Muestra	Sangre	Líquido pericárdico	Herida Qx abdominal
Tratamiento Antibiótico posterior	continúa	continúa	Metronidazol
Evolución	buena	buena	Mala

Tabla 3: Sensibilidad antibiótica según las normas CLSI Documento M11A7 ( $\mu\text{g/ml}$ ) en los 76 aislamientos no resistentes a carbapenems

Aislamiento/ Origen <sup>1</sup>	Antibióticos <sup>2</sup> CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	AMS	TAZ	CXT	IMI	DOR	ERT	CLI	MOX	TIG	MET
<i>B fragilis</i> 3010 / HG	4	0,03	32	0,25	4	2	2	0,5	0,125	1
<i>B fragilis</i> 3116 / HG	16	0,03	64	1	4	4	1	0,5	0,25	0,5
<i>B fragilis</i> 3178 / HG	2	0,5	32	1	4	4	4	1	0,25	0,5
<i>B fragilis</i> 3527 / BA	2	0,5	32	0,25	8	4	$\geq 256$	0,5	0,125	0,5
<i>B fragilis</i> 3603 / HG	16	0,03	64	2	2	4	2	0,5	0,125	0,5
<i>B fragilis</i> 3654 / HG	8	8	128	0,5	1	4	2	4	1	0,5
<i>B fragilis</i> 3584 / HG	8	1	64	2	2	2	1	1	0,125	0,5
<i>B fragilis</i> 3589 / HG	4	0,258	16	0,25	0,25	0,5	$\leq 0,125$	0,5	0,25	0,5
<i>B fragilis</i> 3590 / HG	4	0,25	16	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	1
<i>B fragilis</i> 3469 / HG	4	8	16	0,5	0,25	0,5	1	0,5	0,25	1
<i>B fragilis</i> 3176 / HG	2	0,5	32	0,125	0,125	0,5	1	1	0,25	0,5
<i>B fragilis</i> 3592 / HG	2	0,125	32	0,06	0,25	0,25	2	0,5	0,25	0,5
<i>B fragilis</i> 3465 / HG	0,5	0,125	16	0,5	0,25	0,25	1	1	0,25	1
<i>B fragilis</i> 3449 / HG	1	0,125	16	0,25	0,25	0,25	2	0,25	0,125	0,25
<i>B fragilis</i> 3350 / HG	4	0,25	8	0,125	0,125	0,25	2	0,5	0,25	0,25
<i>B fragilis</i> 3601 / HG	4	0,03	16	0,5	1	0,25	1	2	0,125	0,5
<i>B fragilis</i> 3653 / HG	8	8	128	0,06	0,125	0,25	2	1	1	0,5
<i>B fragilis</i> 3543 / HG	1	0,125	8	0,03	0,125	0,125	2	0,5	0,125	0,25
<i>B fragilis</i> 3579 / HG	1	0,06	8	0,5	0,25	0,125	1	0,5	0,06	1
<i>B fragilis</i> 3593 / HG	4	0,125	8	0,06	0,125	0,125	0,5	0,5	0,125	0,5
<i>B fragilis</i> 3596 / HG	0,5	0,25	8	0,25	0,25	0,125	1	0,5	0,125	1
<i>B fragilis</i> 3597 / HG	2	4	16	0,5	0,25	0,125	4	0,25	0,125	1
<i>B fragilis</i> 3598 / HG	2	2	16	0,25	0,25	0,125	1	8	0,125	1

Tabla3: continuación

<i>B fragilis</i> 3460 / HG	0,5	0,5	16	0,25	0,125	0,125	2	1	0,25	0,5
<i>B fragilis</i> 3455 / HG	1	0,125	8	0,06	0,25	0,125	1	0,5	0,125	1
<i>B fragilis</i> 3452 / HG	2	0,25	64	0,5	0,25	0,125	2	0,5	0,125	1
<i>B fragilis</i> 3447 / HG	1	0,06	8	≤0,015	0,125	0,125	0,5	0,5	0,06	0,5
<i>B fragilis</i> 3586 / HG	1	0,03	8	0,5	0,5	0,125	0,125	1	0,125	0,5
<i>B fragilis</i> 7068-102 / HA	2	0,06	16	0,25	0,25	2	2	8	0,06	1
<i>B fragilis</i> 8051-12 / HA	8	1	16	0,5	0,125	0,5	2	8	0,125	0,5
<i>B fragilis</i> 8056-13 / HA	8	0,5	16	0,125	0,125	0,5	2	8	0,125	0,5
<i>B fragilis</i> 302062 / HA	2	8	32	≤0,015	0,25	0,5	2	0,5	0,25	2
<i>B fragilis</i> 7085-121 / HA	4	8	16	0,125	0,125	0,5	≥256	64	1	1
<i>B fragilis</i> 7123-90 / HA	1	2	32	0,125	0,25	0,5	≥256	2	1	1
<i>B fragilis</i> 7177-61 / HA	4	1	16	0,06	0,25	0,5	2	0,25	0,06	0,5
<i>B fragilis</i> 8244-3070 / HA	8	0,25	8	0,125	0,125	0,25	2	2	0,5	0,5
<i>B fragilis</i> 7240-3085 / HA	1	0,25	8	0,03	0,125	0,125	2	1	0,5	1
<i>B fragilis</i> 8012-27 / HA	2	≤0,03	16	0,03	0,125	0,125	2	0,5	0,125	2
<i>B fragilis</i> 8037-3002 / HA	0,5	0,25	8	≤0,015	0,125	0,125	≥256	0,5	0,25	1
<i>B fragilis</i> 8244-3052 / HA	4	0,25	8	0,125	0,03	0,125	1	0,25	0,125	0,5
<i>B fragilis</i> 8111-5 / HA	1	0,25	2	≤0,015	0,125	0,125	≥256	0,5	0,125	1
<i>B fragilis</i> 8114-25 (1) / HA	1	0,25	16	≤0,015	0,125	0,125	1	0,5	0,125	1
<i>B fragilis</i> 8218-47 / HA	1	0,25	8	≤0,015	0,06	0,125	2	0,5	0,125	1
<i>B fragilis</i> 6072-2 / HA	1	0,25	8	0,125	0,125	0,125	2	0,25	0,06	0,5
<i>B fragilis</i> 7050-95 / HA	1	0,125	8	0,25	0,125	0,125	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>B fragilis</i> 7040-77 / HA	1	0,25	8	0,03	0,125	0,125	1	2	0,5	1
<i>B fragilis</i> 7979-87 / HA	1	0,25	8	0,03	0,125	0,125	>256	1	0,5	0,5
<i>B fragilis</i> 7116-129 / HA	0,25	0,25	8	0,03	0,125	0,125	1	0,5	0,06	0,5
<i>B fragilis</i> 8276-47 / HA	0,5	0,25	8	0,03	0,125	0,125	1	0,25	0,125	0,5
<i>B fragilis</i> 8233-3132 / HA	0,5	0,25	8	≤0,015	0,5	0,125	0,5	0,25	0,125	0,125
<i>B fragilis</i> 7133-18 / HA	0,5	0,25	16	0,03	0,125	0,125	1	0,5	0,5	0,5

Tabla 3: continuación

<i>B. fragilis</i> 9033-6 / HA	1	0,25	16	0,125	0,125	0,125	≥256	0,5	2	0,5
<i>B. fragilis</i> 9070-9(1) / HA	4	0,25	2	0,03	0,06	0,125	0,125	1	0,25	0,5
<i>B. fragilis</i> L270 / IL	1	≤0,03	8	0,25	0,125	0,25	1	0,25	0,25	0,5
<i>B. fragilis</i> H989 / IL	1	≤0,03	8	1	0,125	0,25	2	0,25	0,5	1
<i>B. fragilis</i> H327 / IL	1	1	8	0,125	0,25	0,25	1	8	0,25	1
<i>B. fragilis</i> L142 / IL	1	≤0,03	8	0,25	0,125	0,25	2	0,25	0,25	1
<i>B. fragilis</i> L149 / IL	1	1	8	1	0,25	0,25	1	0,25	0,5	0,125
<i>B. fragilis</i> H755 / IL	1	≤0,03	8	0,25	0,25	0,25	1	0,5	0,125	1
<i>B. fragilis</i> L40 / IL	0,5	0,25	8	0,03	0,125	0,25	2	0,5	0,25	0,25
<i>B. fragilis</i> H32 / IL	1	≤0,03	8	0,125	ND	0,125	1	1	0,25	0,5
<i>B. fragilis</i> L143 / IL	1	≤0,03	8	0,06	0,25	0,125	2	0,5	0,25	2
<i>B. fragilis</i> L104 / IL	0,5	0,25	16	0,03	0,125	0,125	≥256	2	0,5	0,06
<i>B. fragilis</i> H737 / IL	0,5	0,25	8	0,03	0,125	0,125	1	0,5	0,125	0,5
<i>B. fragilis</i> 575 / HT	1	≤0,03	8	0,03	0,125	0,125	1	0,25	0,25	1
<i>B. fragilis</i> 591 / HT	1	≤0,03	8	0,125	0,125	0,25	1	0,25	0,125	0,5
<i>B. fragilis</i> 617 / HT	1	≤0,03	8	0,03	0,125	0,125	2	0,25	0,25	1
<i>B. fragilis</i> 646 / HT	1	4	32	0,25	0,125	0,5	≥256	1	1	0,5
<i>B. fragilis</i> 647 / HT	4	0,25	8	1	0,125	0,25	1	0,25	≤0,03	1
<i>B. fragilis</i> 681 / HT	1	≤0,03	8	0,25	0,25	0,25	1	0,5	0,25	0,25
<i>B. fragilis</i> 684 / HT	1	0,125	4	≤0,015	0,125	0,125	≤0,125	0,25	0,125	0,125
<i>B. fragilis</i> 685 / HT	8	≤0,03	16	0,06	1	0,5	0,25	0,25	1	0,25
<i>B. fragilis</i> 700 / HT	1	<0,03	8	0,03	0,125	0,125	0,5	0,25	1	0,5
<i>B. fragilis</i> 704 / HT	8	1	8	0,5	0,25	0,5	1	0,25	≤0,03	1
<i>B. fragilis</i> 711 / HT	1	<0,03	4	0,03	0,125	0,125	≤0,125	0,5	2	0,25
<i>B. fragilis</i> 712 / HT	8	0,125	8	0,03	0,125	0,25	2	8	2	0,25

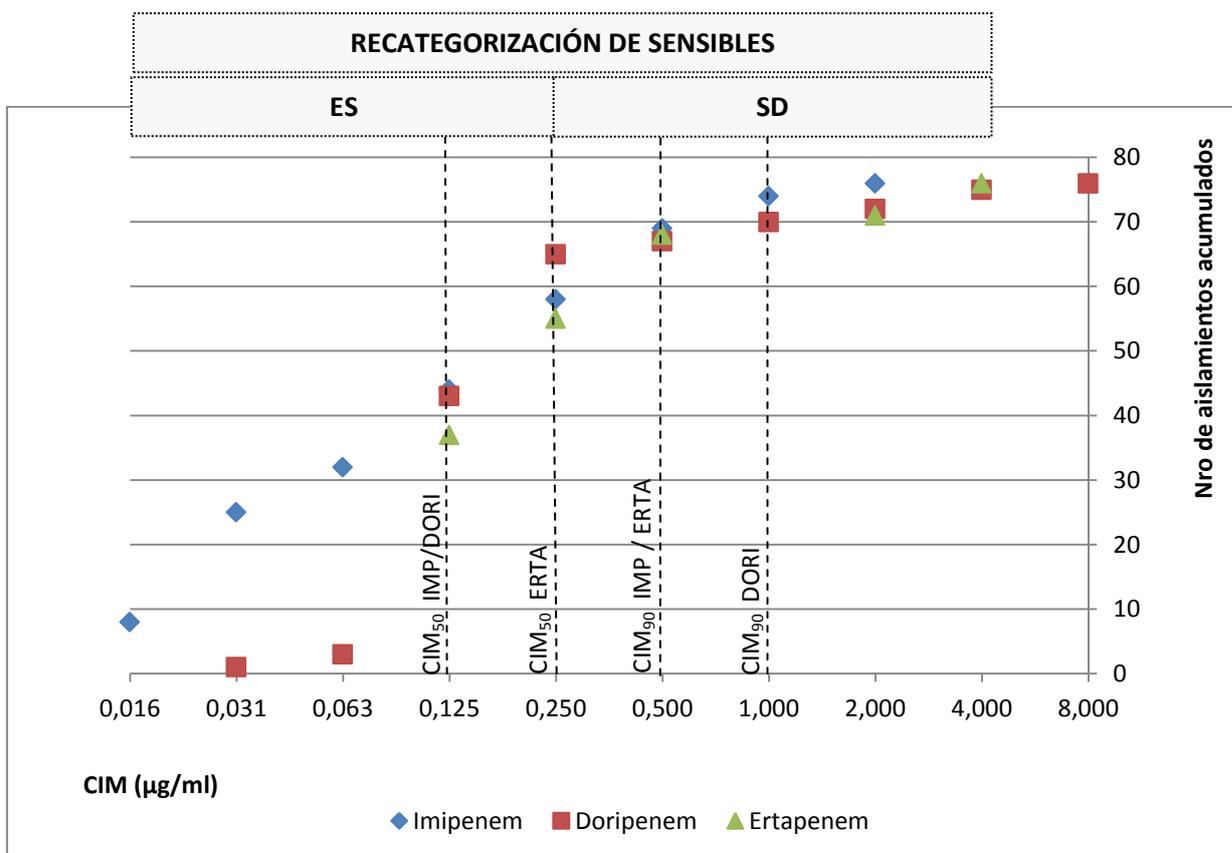
AMS: ampicilina-sulbactama, PTZ: piperacilina-tazobactama, CXT: cefoxitina, IMI: imipenem, DOR: doripenem, ERT: ertapenem, CLI: clindamicina, MOX: moxifloxacina, TIG: tigeciclina; MET: metronidazol.

Tabla 4: Distribución de los valores de CIM para cada carbapenem en los 76 aislamientos no resistentes

Categorías	CIM ( µg/ml)	Nro de aislamientos por antibiótico (Nro. acumulado / % acumulado)		
		Imipenem	Doripenem	Ertapenem
ES	≤0.015	8 (8 / 10.5)		
	0.03	17 (25 / 32.9)	1 (1 / 1.3)	
	0.06	7 (32 / 42.1)	2 (3 / 3.9)	
	0.125	12 (44 / 57.9)	40 (43 / 56.6)	37 (37 / 48.7)
	0.25	14 (58 / 76.3)	22 (65 / 85.5)	18 (55 / 72.4)
SD	0.5	11 (69 / 90.8)	2 (67 / 88.2)	13 (68 / 89.5)
	1	5 (74 / 97.4)	3 (70 / 92.1)	
	2	2 (76 / 100)	2 (72 / 94.7)	3 (71 / 93.4)
	4		3 (75 / 98.7)	5 (76 / 100)
I	8		1 (76 / 100)	

ES: extrema sensibilidad, SD: sensibilidad disminuida, I: intermedio

Grafico 1: Distribución acumulada de los 76 aislamientos no resistentes entre los valores de CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los 3 carbapenems ensayados.



## 1. Detección de la presencia de *cfiA*

### 1.1 Extracción de ADN total por lisis térmica

Se Inoculó la cepa en estudio en agar sangre anaerobio y se incubó durante 48hs a 37°C en anaerobiosis. Una ansada del cultivo se resuspendió en 200 $\mu\text{l}$  de agua MilliQ, se agitó con vórtex y se hirvió a baño María durante 10 minutos. Se centrifugó 2 minutos a 13.000 rpm en microcentrífuga y el sobrenadante se conservó a -20° C hasta su utilización.

## 1.2 Extracción de ADN cromosomal [86]

Se cultivaron las bacterias en caldo LB (30-50 ml) a 37°C durante 24 hs, en atmósfera anaerobia. Se centrifugaron las células a 8000 rpm por 20 min, a 4°C en centrífuga Sorvall, rotor SS-34. Se resuspendieron los pellets bacterianos en 5 ml de buffer NaCl/EDTA. Se agregó 1 ml de SDS 20% y se incubaron a 37°C por 10 min. Se adicionaron 0.2 ml de KCl 2.5 M y se mezclaron utilizando vortex. Se realizó la extracción con 5ml de cloroformo:isoamilico (24:1). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 27000 g por 15 min, a 4C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril y se precipitó el ADN por tratamiento *overnight* con 2 volúmenes de etanol 95% frío. Se extrajo el ADN con varilla de vidrio y se transfirió a un tubo estéril. Se resuspendió el ADN en 40 µl de buffer TE.

## 1.3 Detección del fragmento interno de 339 pb de *cfiA* por amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la detección del fragmento interno de *cfiA* se empleó la siguiente mezcla de reacción y condiciones de ciclado. Se emplearon los oligonucleótidos GBI-1F y GBI-2R, descritos por Kato y col., cuyas secuencias se muestran en la Tabla 3 del Anexo I [87]

Mezcla de reacción	Volumen (µl)
Buffer 10X de <i>Taq</i> polimerasa	2.5
Cl <sub>2</sub> Mg 25mM	2,5
dNTPs 10mM	1,5
<b>GBI-1 F</b> 10pM/µl	2.5
<b>GBI-2 R</b> 10pM/µl	2.5
<i>Taq</i> polimerasa 5 U/µl	0.2
Agua MilliQ	10.8
ADN	2.5
Volumen final	25

Condiciones de Ciclado:

Paso	Temperatura °C	Tiempo min	
1	95	3	
2	95	1	
3	57	1	30 Ciclos
4	72	1	
5	72	10	Extensión final

Una alícuota de 5µl del producto de amplificación fue analizado utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X (Tris base, ácido acético glacial y EDTA). La electroforesis se llevó a cabo durante 30 min a 140 mA y 90 Volts. Los productos fueron revelados con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y las bandas fueron visualizadas con un transiluminador UV, Molecular Imager GelDoc XR Sistem, Bio-Rad.

La detección de *cfiA* se llevó a cabo de manera individual en los aislamientos con alto nivel de resistencia a los carbapenems: imipenem, doripenem y

ertapenem (CIM $\geq$ 32  $\mu$ g/ml), empleando como molde ADN extraído por lisis térmica.

La búsqueda de *cfiA* en los 76 aislamientos categorizados como intermedio (I), sensibilidad disminuida (SD) y extrema sensibilidad (ES) a los carbapenems se llevó a cabo a partir de *pooles* de ADN.

Se evaluaron dos formas de preparación de los *pooles* de ADN a fin de comprobar su utilidad en la detección de *cfiA*

- ❖ *Pooles* de mezcla de sobrenadante (MS): se prepararon incorporando 10  $\mu$ l de SN obtenido por lisis térmica de cada aislamiento sensible a ser incluido en el *pool* y 10  $\mu$ l de SN obtenido por lisis térmica de 1 aislamiento bacteriano control positivo (*B. fragilis* 3409). En la Tabla 1, Anexo I se muestra la composición de los *pooles* MS
- ❖ *Pooles* de mezcla de colonia (MC): se prepararon mezclando colonias de cada aislamiento bacteriano sensible a ser incluido en el *pool* y colonias de 1 aislamiento bacteriano control positivo (*B. fragilis* 3409), en 200 $\mu$ l de agua milliQ las que posteriormente fueron sometidas a lisis térmica. En la Tabla 2, Anexo I se muestra la composición de los *pooles* MC

En ambos casos los resultados obtenidos fueron equivalentes. Los *pooles* de ADN de MS fueron operativamente más sencillos de obtener y permitieron su conservación en *freezer* evitando subcultivar los aislamientos cada vez que se requirió efectuar una experiencia. En los ensayos posteriores llevados a cabo sobre los aislamientos que no presentaban resistencia a carbapenems se optó por emplear estos *pooles*.

Para investigar la presencia del fragmento interno de *cfiA* en los 76 aislamientos no resistentes a carbapenems se prepararon las siguientes muestras:

- ❖ *Pooles* de MS de los aislamientos procedentes del Hospital Nacional de Pediatría J. P. Garrahan (HG) e HIGA Dr. A Piñero, Junin (BA):

MSG1: *B. fragilis* (3409, 3189, 3091 y 3527)

MSG2: *B. fragilis* (3178, 3603, 3116 y 3654)

MSG3: *B. fragilis* (3584, 3010, 3589, 3590 y 3469)

MSG4: *B. fragilis* (3176, 3592, 3465, 3449 y 3350)

MSG5: *B. fragilis* (3601, 3653, 3543, 3579 y 3593)

MSG6: *B. fragilis* (3596, 3597, 3598, 3460 y 3455)

MSG7: *B. fragilis* (3452, 3447 y 3586)

- ❖ *Pooles* de MS de los aislamientos procedentes del Hospital Alemán (HA):

MSA1: *B. fragilis* (7068-102, 8051-12, 8056-13, 302062 y 7085-121)

MSA2: *B. fragilis* (7123-90, 7177-61, 8244-3070, 7240-3085 y 8012-27)

MSA3: *B. fragilis* (8037-3002, 8244-3052, 8111-5, 8114-25 y 8218-47)

MSA4: *B. fragilis* (6072-2, 7050-95, 7040-77, 7979-87 y 7116-129)

MSA5: *B. fragilis* (8276-47, 8233-3132, 7133-18, 9033-6 y 9070-9)

En los *pooles* donde se obtuvieron resultados positivos, los aislamientos fueron analizados de manera individual.

Los 11 aislamientos procedentes del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IL) y los 12 del Hospital General de Agudos Dr. E. Tornú (HT) fueron analizados de manera individual.

## 2. Identificación de *cfiA*/CfiA

### 2.1 Detección del gen *cfiA* completo por PCR

Se evaluó la presencia del gen codificante de la metalo- $\beta$ -lactamasa CfiA en todos los aislamientos de *B. fragilis* en los que se detectó la secuencia interna de 339 pb.

Para amplificar y secuenciar el gen *cfiA* completo (750 pb) se diseñaron oligonucleótidos **pcfiA-START-F** y **pcfiA-FIN-R**, basados en la secuencia correspondiente a *cfiA4*, Nro de acceso AB087229, depositada en la base de datos. Se empleó el programa Vector NTI 11.0 (Invitrogen). La secuencia de los oligonucleótidos diseñados se muestra en la Tabla 3 del Anexo I. Se empleó el protocolo de PCR y las condiciones de ciclado que se muestran a continuación:

Mezcla de reacción	Volumen ( $\mu$ l)
Buffer 10X de <i>Taq</i> polimerasa	2.5
Cl <sub>2</sub> Mg 25mM	2,5
dNTPs 10mM	1,5
<b>pcfiA START F</b> 10pM/ $\mu$ l	2
<b>pcfiA FIN F</b> 10pM/ $\mu$ l	2
<i>Taq</i> polimerasa 5 U/ $\mu$ l	0.2
Agua MilliQ	11.8
ADN	2.5
Volumen final	25

Paso	Temperatura °C	Tiempo min	
1	95	4	
2	95	1	
3	57	1	30 Ciclos
4	72	1	
5	72	10	Extensión final

En cada caso, una alícuota de 5µl del producto de amplificación fue analizado utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X (Tris base, ácido acético glacial y EDTA). La electroforesis se llevó a cabo durante 30 min a 140 mA y 90 Volts. Los productos fueron revelados con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y las bandas fueron visualizadas con un transiluminador UV, Molecular Imager GelDoc XR System, Bio-Rad. Los productos de amplificación fueron purificados y enviados a secuenciar (Macrogen Inc.).

## 2.2 Identificación del alelo de *cfiA*

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó por comparación con base de datos, utilizando la herramienta BLASTn disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Por otro lado se realizó la descarga de todos los alelos de *cfiA* depositados en el *GenBank*. Utilizando la herramienta AlignX (ClustalW) del Programa Vector NTI 11.0 (Invitrogen), dichas secuencias fueron alineadas entre ellas y con las obtenidas para los aislamientos en estudio.

### 2.3 Traducción del alelo de *cfiA*

Para la identificación de los cambios aminoacídicos presentes en cada una de las variantes de CfiA, las secuencias nucleotídicas obtenidas en los diferentes aislamientos en estudio así como aquellas provenientes de los alelos descargados de la base se tradujeron a proteína utilizando el programa Vector NTI 11.0 (Invitrogen).

## 3. Estudio del entorno genético de *cfiA*

### 3.1 Identificación de IS previamente reportadas upstream a *cfiA*

Para detectar las IS en la región *upstream* a *cfiA* en primera instancia se realizó la amplificación con los cebadores G-F y E-R descritos por Kato y col. [87]. Se propone que cuando una IS se encuentra localizada *upstream* a *cfiA*, el producto de amplificación es de aproximadamente 1.500 pb. Por el contrario, cuando el producto de amplificación presenta un tamaño aproximado de 400 pb no habría una IS asociada a *cfiA* [87]. Los productos obtenidos fueron purificados y enviados a secuenciar (Macrogen Inc.).

También se utilizaron las siguientes combinaciones de oligonucleótidos específicos para la identificación de IS previamente reportadas en asociación a *cfiA* (Tabla 5):

Tabla 5: Oligonucleótidos específicos para la identificación de IS previamente reportadas

IS	Oligonucleótido-F	Oligonucleótido-R	Tamaño esperado (pb)
<b>IS942</b>	IS942-F	CfiA3-R	940
<b>IS1186</b>	IS1186-F	E-R	1319
<b>IS4351</b>	IS4351-F	E-R	1042
<b>IS21</b>	IS21-F	E-R	1014
<b>IS614-12</b>	IS614-12-F	CfiA3-R	1670

La secuencia de los oligonucleótidos diseñados se detalla en la Tabla 3 del Anexo I. Los fragmentos obtenidos por PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 0,8%, teñidos con bromuro de etidio 0,5 µg/ml y visualizados con el transiluminador UV. Los productos de amplificación fueron purificados y enviados a secuenciar (Macrogen Inc.)

### 3.2 Identificación de las regiones flanqueantes a *cfiA* por PCR Inversa

La PCR Inversa se empleó en situaciones en las que el entorno no pudo ser mapeado usando las metodologías previamente mencionadas.

Fundamento de la PCR Inversa:

El ensayo de PCR Inversa se basa en el empleo de cebadores divergentes, es decir, cebadores cuyos extremos 3' OH se dirigen hacia el exterior de la secuencia conocida. Con este tipo de cebadores una reacción de PCR estándar no funcionaría. En la reacción de PCR inversa, se trata el ADN con una enzima de restricción que debe ser de corte frecuente en el ADN del microorganismo portador del gen en estudio. Para analizar la frecuencia de corte de distintas enzimas de restricción se puede utilizar la herramienta digital disponible en <http://insilico.ehu.es/digest/>.

La región deseada debe quedar comprendida en un pequeño fragmento de restricción, el cual posteriormente se circulariza por complementariedad de los extremos cohesivos. Una vez circularizado el fragmento, se lleva a cabo una reacción de PCR estándar utilizando los cebadores divergentes mencionados previamente y una polimerasa que permita amplificar fragmentos grandes. Los amplicones obtenidos son secuenciados empleando dichos oligonucleótidos.

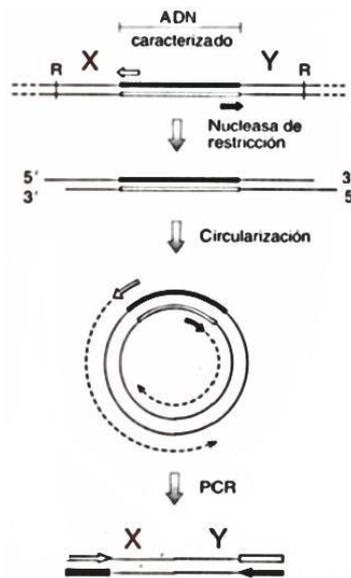


Figura: **Fundamento de la PCR Inversa.** Las regiones X e Y representan las secuencias desconocidas que se desean estudiar. Los cebadores se diseñan de forma que se unan a la secuencia de ADN conocida (caracterizada), con sus extremos 3' orientados en sentidos opuestos. El ADN es sometido a la digestión con una enzima de corte frecuente. Se circularizan los fragmentos obtenidos. Alguno de ellos será el que presente la secuencias X e Y de interés. Las secuencias flanqueantes quedarán en contacto y los extremos 3' de los cebadores quedan orientados para que ahora pueda tener lugar la PCR estándar.

Protocolo de PCR inversa:

Se empleó como templado de la reacción ADN cromosomal (aprox 1.5 µg/ml) obtenido según se detalla en el punto 1.2 de Materiales y Métodos.

Se analizaron las frecuencias de corte de distintas enzimas con la página <http://insilico.ehu.es/digest/>. y se eligieron las enzimas: **EcoRV**, **EcoRI** y **HindIII**.

Se empleó la siguiente mezcla de reacción para la digestión (Vf: 20 µl).

1	H <sub>2</sub> O MilliQ	9.9 µl
2	10x Buffer EcoRI	2 µl
3	ADN	8 µl
4	EcoRV 20000U/ml	0.1 µl

Se incubó *overnight* en baño a 37°C y se purificó la mezcla de digestión con columnas de purificación de ADN Accuprep Gel Purification Kit. Se eluyó en 30 µl de agua MilliQ precalentada.

La ligación de los fragmentos de la digestión se realizó según se indica a continuación (Vf: 50 µl), incubando 1 hr a 22 °C.

1	H <sub>2</sub> O MilliQ	13 µl
2	Buffer Ligasa	5 µl
3	Fragmentos de ADN digerido purificado	30 µl
4	T4 ADN LIGASA	2 µl

La mezcla de ligación se empleó como molde para la siguiente reacción de PCR.

Mezcla de reacción	Volumen (µl)
Buffer 10X con 15mM MgCl <sub>2</sub>	5
dNTPs 10mM	5
<b>pcfiADS F</b> 10pM/µl	5
<b>pcfiA3 R</b> 10pM/µl	5
Long Taq 5U/µl	0.25
Agua MilliQ	4.5
ADN Ligación	25
Volumen final	50

Condiciones de Ciclado:

Paso	Temperatura °C	Tiempo min	
1	94	3	
2	94	1	
3	58	1	30 Ciclos
4	72	1.5	
5	72	10	Extensión final
6	15	24 horas	

Los fragmentos obtenidos en la PCR se purificaron y se enviaron a secuenciar (Macrogen Inc.).

### 3.3 Análisis de secuencias de ADN

Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando las herramientas <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, Vector NTI 11.0 (Invitrogen) e IS Finder (<https://www-is.biotoul.fr/>).

Con la herramienta *on line* BPROM disponible en <http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm> se realizó la identificación de regiones promotoras -35 y -10 en las zonas inmediatamente *upstream* a *cfiA*.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Detección de la presencia de *cfiA*

A partir del ADN total, obtenido por lisis térmica, de los 3 aislamientos que presentaron alto nivel de resistencia a los carbapenems (*B. fragilis* 3091, *B. fragilis* 3189 y *B. fragilis* 3409) se logró amplificar el fragmento interno de *cfiA* usando los cebadores GBI1-F y GBI2-R. En estos 3 aislamientos se había observado una franca disminución en el valor de CIM de imipenem en presencia de EDTA, lo que sugería la presencia de una metalo-carbapenemasa.

En la Figura 1 se observa el producto de amplificación obtenido.

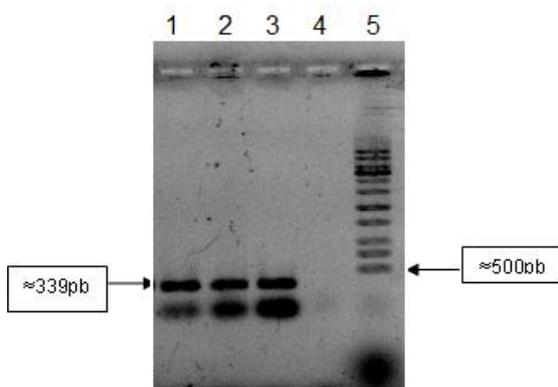


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%

Calle 1: *B. fragilis* 3091, calle 2: *B. fragilis* 3189, calle 3: *B. fragilis* 3409, calle 4: control negativo, calle 5: Marcador de peso molecular 1Kb.

Previo a la detección de *cfiA* en los 76 aislamientos no resistentes, se puso a punto la metodología de amplificación del fragmento interno de *cfiA* empleando *pooles* de muestras. Como se observa en la figura 2 se obtuvieron resultados positivos tanto en los *pooles* de MS como en los de MC.

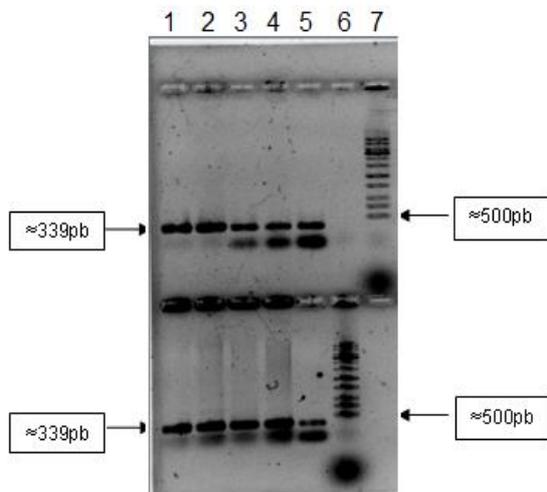


Figura.2: Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los amplicones obtenidos.

Arriba: Calle 1: MS1, calle 2: MS2, calle3: MS3, calle 4: MS4, calle 5: control (+) (*B. fragilis* 4309), calle 6: control negativo, calle 7: Marcador de peso molecular 1Kb

Abajo: Calle 1: MC1, calle 2: MC2, calle3: MC3, calle 4: MC4, calle 5: control (+) (*B. fragilis* 4309), calle 6: Marcador de peso molecular 1Kb

Para la amplificación del fragmento interno de *cfiA* en los aislamientos no resistentes se emplearon *pooles* de MS. Se obtuvo amplificación positiva en los *pooles* MSG1, MSG2 y MSG3. En el resto de las muestras analizadas el resultado de los ensayos de PCR fue negativo

Posteriormente, para identificar los aislamientos portadores de *cfiA*, se llevó a cabo la amplificación de dicho marcador en cada uno de los aislamientos que componían los *pooles* positivos. Se logró la detección del fragmento interno de *cfiA* en 4 aislamientos no resistentes a carbapenems (Tabla 3): *B. fragilis* 3010, *B. fragilis* 3527, *B. fragilis* 3116 y *B. fragilis* 3178.

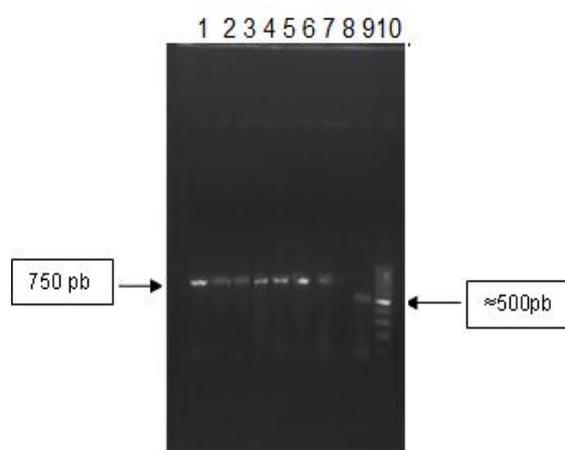
Todos los aislamientos ES a doripenem (n: 65) y ES ertapenem (n: 55) fueron negativos para *cfiA*.

Dos/58 aislamientos ES a imipenem (*B. fragilis* 3010 y *B. fragilis* 3527) y 2/18 aislamientos con SD a imipenem (*B. fragilis* 3116 y *B. fragilis* 3178) fueron positivos para *cfiA*. Si bien estos aislamientos resultaban sensibles a imipenem,

se observó una disminución de los valores de CIM de este antibiótico (de al menos 3 diluciones) en presencia de EDTA (dato no mostrado). A su vez, de estos aislamientos *cfiA* positivos, 3 presentaron SD a doripenem (*B. fragilis* 3010, *B. fragilis* 3116 y *B. fragilis* 3178) y 1 fue intermedio a doripenem (*B. fragilis* 3527). Los 4 aislamientos positivos para *cfiA* presentaron SD a ertapenem (Tabla 3). Cabe mencionar que cuando se inició el trabajo el valor de CIM de doripenem del aislamiento *B. fragilis* 3527 correspondía a la categoría intermedia (CLSI M11A7[85]). Sin embargo si se consideran los puntos de corte actuales del CLSI para esta droga (Documento M100S[88]) la CIM determinada para doripenem se corresponde con la categoría de resistente.

## 2. Identificación del alelo de *cfiA*/CfiA

Utilizando los cebadores *pcfiA*-START F y *pcfiA*-FIN R se amplificó el gen completo *cfiA* (750 pb) en los 7 aislamientos donde previamente se había detectado el fragmento interno de 339 pb: *B. fragilis* 3091 (HG), *B. fragilis* 3189 (HG), *B. fragilis* 3409 (Cba), *B. fragilis* 3527 (BA), *B. fragilis* 3010 (HG), *B. fragilis* 3116 (HG) y *B. fragilis* 3178 (HG). En la figura 3 se observan los productos de amplificación obtenidos.



**Figura.3:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Calle 1: *B. fragilis* 3091 (HG), calle 2: *B. fragilis* 3189 (HG), calle 3: *B. fragilis* 3409 (Cba.), calle 4: *B. fragilis* 3527 (BA), calle 5: *B. fragilis* 3010 (HG), calle 6: *B. fragilis* 3116 (HG), calle 7: *B. fragilis* 3178 (HG), calle 8: control negativo, calle 9: Marcador de peso molecular 500 pb, calle 10: Marcador de peso molecular 100 pb.

En concordancia con estudios previos realizados en España, USA, Brasil y Turquía, en todos los aislamientos que presentaban resistencia a imipenem ( $CIM \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ) se detectó la presencia de *cfiA* [23, 44, 78, 89]. Sin embargo, en este trabajo este marcador de resistencia se observó en algunos aislamientos categorizados como sensibles a dicho antibiótico, que presentaban valores de CIM ( $CIM = 0,25 \mu\text{g/ml}$ ) muy por debajo del punto de corte de resistencia propuesto por las normas CLSI. Este hecho ha sido observado también por Treviño y col., Snyderman y col. y Toprak y col [78, 89, 90].

El hecho de detectar la presencia de este marcador tanto en aislamientos resistentes como sensibles determinó la necesidad de identificar las variantes alélicas de *cfiA* presentes en cada uno de los aislamientos así como de investigar la presencia de elementos que promuevan la expresión de este marcador, de manera de poder comprender los diferentes perfiles de resistencia observados.

Para identificar los alelos presentes en los 7 aislamientos en estudio. los amplicones obtenidos fueron secuenciados en ambas cadenas. Las correspondientes secuencias se analizaron utilizando la herramienta BLASTn del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). No fue posible identificar en forma inequívoca los alelos de *cfiA* presentes en los aislamientos en estudio dado que cada uno de ellos presentaba identidad con varias de las secuencias depositadas en base de datos.

La secuencia de *cfiA* del aislamiento *B. fragilis* 3189 mostró 100% de identidad con las secuencias *cfiA12*, *cfiA13* y *cfiA15*, depositadas en el *GenBank*. En la

tabla 6 se muestran los alelos de *cfiA* con los cuales las secuencias obtenidas en este trabajo mostraron 99% identidad.

Tabla 6: Secuencias de *cfiA* que presentaron 99% de identidad con las secuencias de *cfiA* obtenidas en los aislamientos de *B. fragilis*.

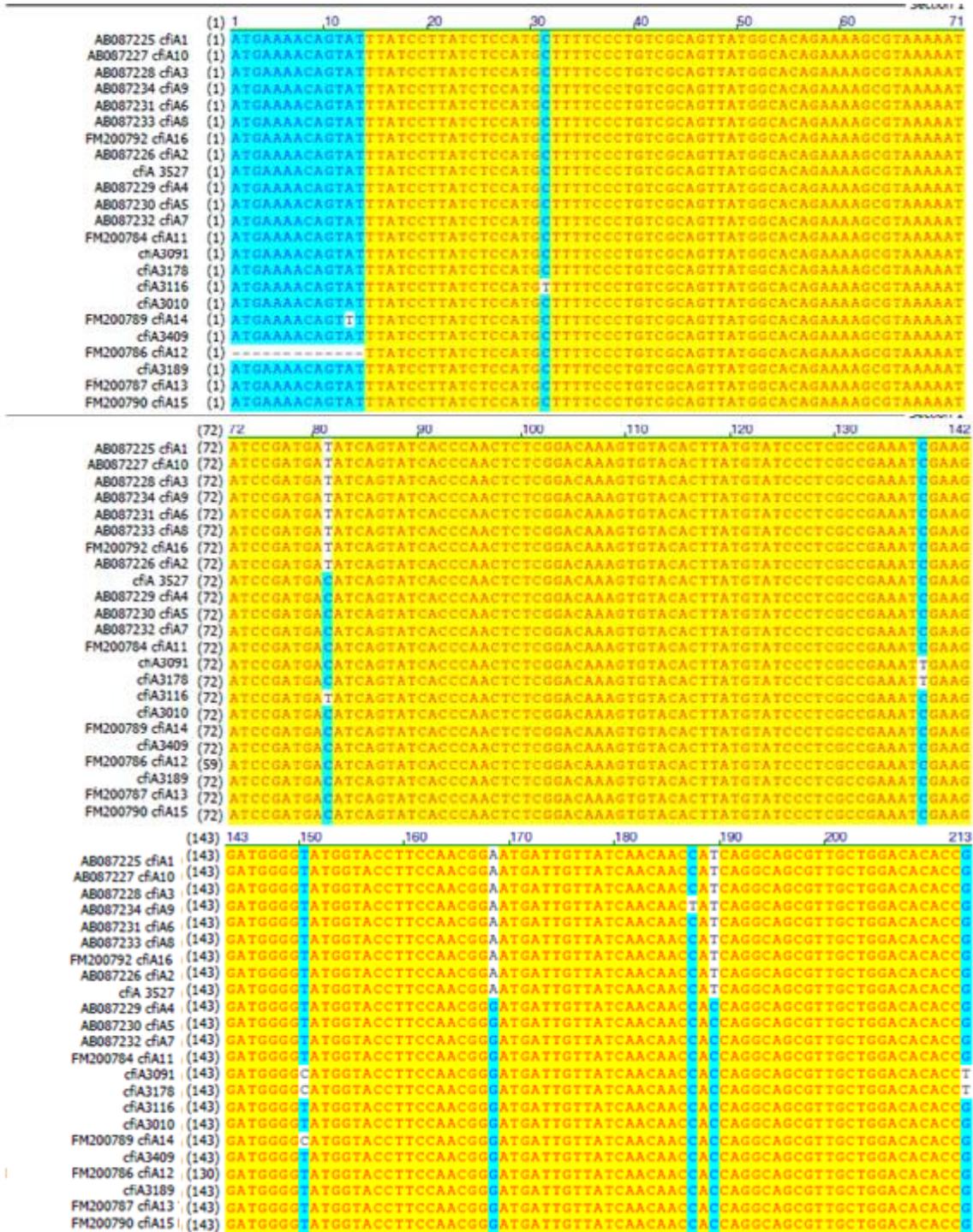
Aislamiento	Alelos de <i>cfiA</i> depositados en <i>GenBank</i>
<i>B. fragilis</i> 3010	11,12,13,14,15
<i>B. fragilis</i> 3116	4,11,13,15
<i>B. fragilis</i> 3178	4,11,13,14,15
<i>B. fragilis</i> 3527	1,2,3,6,8,9,10,16
<i>B. fragilis</i> 3091	4,11,13,14,15
<i>B. fragilis</i> 3409	11,12,13,14,15

Posteriormente se llevó a cabo un análisis de los 16 alelos de *cfiA* depositados en el *GenBank*:

*cfiA1* (AB087225), *cfiA2* (AB087226), *cfiA3* (AB087228), *cfiA4* (AB087229), *cfiA5* (AB087230), *cfiA6* (AB087231), *cfiA7* (AB087232), *cfiA8* (AB087233), *cfiA9* (AB087234), *cfiA10* (AB087227), *cfiA11* (FM200784), *cfiA12* (FM200786), *cfiA13* (FM200787), *cfiA14* (FM200789), *cfiA15* (FM200790), *cfiA16* (FM200792).

Se realizó el alineamiento de las secuencias correspondientes empleando la herramienta AlignX del Programa Vector NTI 11.0 (Invitrogen). Se incluyeron

las 7 secuencias nucleotídicas de *cfiA* obtenidas en este trabajo, para los aislamientos *B. fragilis* 3091, *B. fragilis* 3189, *B. fragilis* 3409, *B. fragilis* 3527, *B. fragilis* 3010, *B. fragilis* 3116 y *B. fragilis* 3178, y las 16 secuencias nucleotídicas depositadas en el *GenBank*. En la Figura 4 se muestran los alineamientos obtenidos.







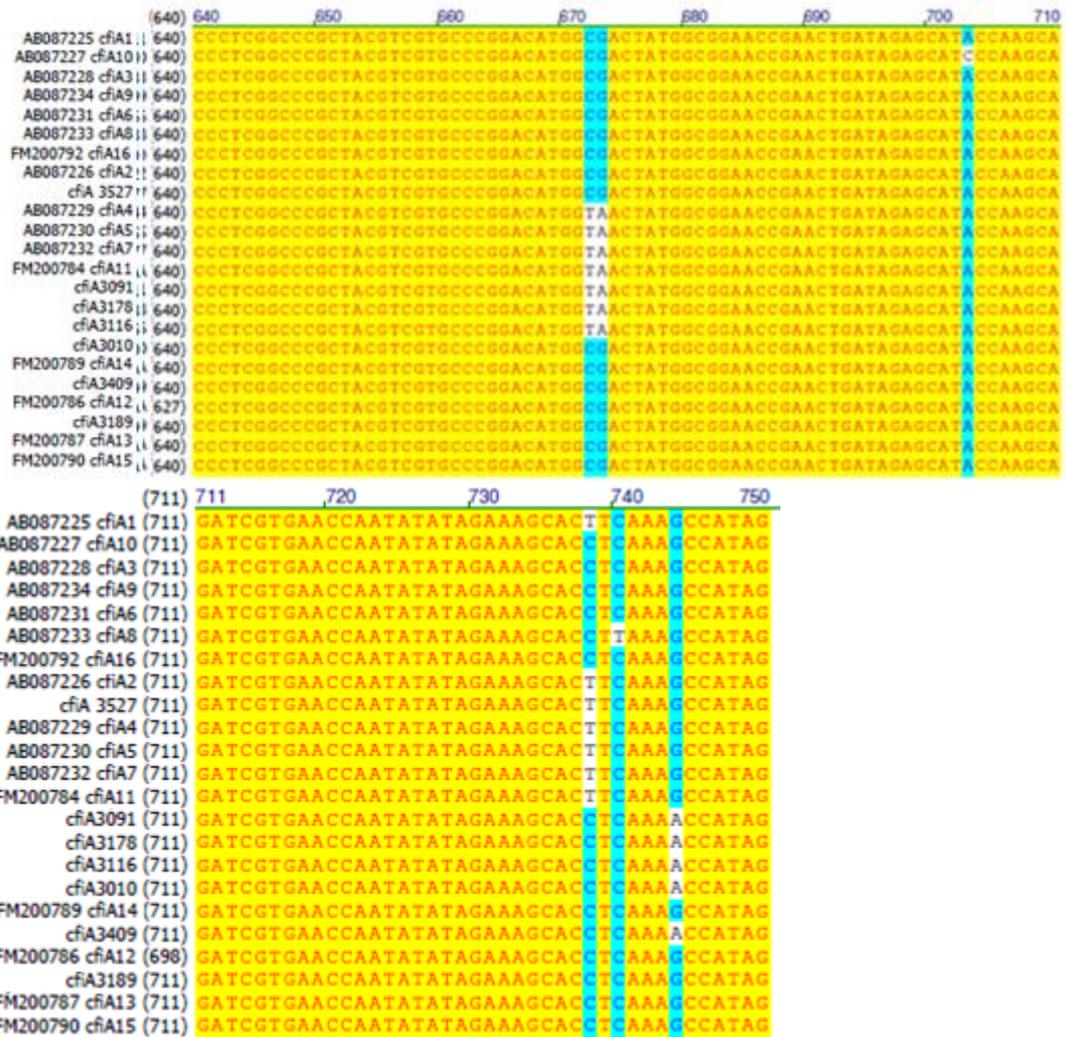


Figura 4: Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas, utilizando la herramienta AlignX (CLUSTAL W) del Programa Vector NTI 11.0 (Invitrogen).

En el alineamiento de las secuencias nucleotídicas se observa la total identidad entre los alelos *cfiA4*, *cfiA5*, *cfiA7* y *cfiA11*; entre *cfiA12*, *cfiA13* y *cfiA15*, y entre *cfiA6* y *cfiA16*.

A modo de ejemplo en la figura 5 se muestra el alineamiento de las secuencias de los alelos de *cfiA4* (AB087229), *cfiA5* (AB087230), *cfiA7* (AB087232) y *cfiA11* (FM200784).

		Section 1														
		1	10	20	30	40	50	60	70	80						
AB087229 cfiA4	(1)	ATGAAAACAGTATTTATCCTTATCTCCATGCTTTTCCCTGTCCGAGTTATGGCACAGAAAAGCGTAAAAATATCCGATGA														
AB087230 cfiA5	(1)	ATGAAAACAGTATTTATCCTTATCTCCATGCTTTTCCCTGTCCGAGTTATGGCACAGAAAAGCGTAAAAATATCCGATGA														
AB087232 cfiA7	(1)	ATGAAAACAGTATTTATCCTTATCTCCATGCTTTTCCCTGTCCGAGTTATGGCACAGAAAAGCGTAAAAATATCCGATGA														
FM200784 cfiA11	(1)	ATGAAAACAGTATTTATCCTTATCTCCATGCTTTTCCCTGTCCGAGTTATGGCACAGAAAAGCGTAAAAATATCCGATGA														
		Section 2														
		81	90	100	110	120	130	140	150	160						
AB087229 cfiA4	(81)	ATCAGTATCACCCAACTCTCGGACAAAGTGTAACCTTATGTAATCCCTCGCCGAAATCGAAGGATGGGGTATGGTACCTT														
AB087230 cfiA5	(81)	ATCAGTATCACCCAACTCTCGGACAAAGTGTAACCTTATGTAATCCCTCGCCGAAATCGAAGGATGGGGTATGGTACCTT														
AB087232 cfiA7	(81)	ATCAGTATCACCCAACTCTCGGACAAAGTGTAACCTTATGTAATCCCTCGCCGAAATCGAAGGATGGGGTATGGTACCTT														
FM200784 cfiA11	(81)	ATCAGTATCACCCAACTCTCGGACAAAGTGTAACCTTATGTAATCCCTCGCCGAAATCGAAGGATGGGGTATGGTACCTT														
		Section 3														
		161	170	180	190	200	210	220	230	240						
AB087229 cfiA4	(161)	CCAAACGGGATGATGTTATCAACAACCAACAGGCAGCGTTGCTGGACACACCGATCAATGACGCCAACCGGAAACGGCTG														
AB087230 cfiA5	(161)	CCAAACGGGATGATGTTATCAACAACCAACAGGCAGCGTTGCTGGACACACCGATCAATGACGCCAACCGGAAACGGCTG														
AB087232 cfiA7	(161)	CCAAACGGGATGATGTTATCAACAACCAACAGGCAGCGTTGCTGGACACACCGATCAATGACGCCAACCGGAAACGGCTG														
FM200784 cfiA11	(161)	CCAAACGGGATGATGTTATCAACAACCAACAGGCAGCGTTGCTGGACACACCGATCAATGACGCCAACCGGAAACGGCTG														
		Section 4														
		241	250	260	270	280	290	300	310	320						
AB087229 cfiA4	(241)	ATCAACTGGGTGACAGACTCTTTGCAATGCCAAAGTCACACCGTTATATCCCGAACCCACTGGCACGGCGATTGTATTGGCGG														
AB087230 cfiA5	(241)	ATCAACTGGGTGACAGACTCTTTGCAATGCCAAAGTCACACCGTTATATCCCGAACCCACTGGCACGGCGATTGTATTGGCGG														
AB087232 cfiA7	(241)	ATCAACTGGGTGACAGACTCTTTGCAATGCCAAAGTCACACCGTTATATCCCGAACCCACTGGCACGGCGATTGTATTGGCGG														
FM200784 cfiA11	(241)	ATCAACTGGGTGACAGACTCTTTGCAATGCCAAAGTCACACCGTTATATCCCGAACCCACTGGCACGGCGATTGTATTGGCGG														
		Section 5														
		321	330	340	350	360	370	380	390	400						
AB087229 cfiA4	(321)	ACTGGGTTACTGCAAAAAGAAAGGTGTCCAATCATAACCGCAACAGATGACGATAGACCTCGCCAAAGGAAAAAGGATTGC														
AB087230 cfiA5	(321)	ACTGGGTTACTGCAAAAAGAAAGGTGTCCAATCATAACCGCAACAGATGACGATAGACCTCGCCAAAGGAAAAAGGATTGC														
AB087232 cfiA7	(321)	ACTGGGTTACTGCAAAAAGAAAGGTGTCCAATCATAACCGCAACAGATGACGATAGACCTCGCCAAAGGAAAAAGGATTGC														
FM200784 cfiA11	(321)	ACTGGGTTACTGCAAAAAGAAAGGTGTCCAATCATAACCGCAACAGATGACGATAGACCTCGCCAAAGGAAAAAGGATTGC														
		Section 6														
		401	410	420	430	440	450	460	470	480						
AB087229 cfiA4	(401)	CCGTACCCGGAACATGGATTCAACCGATTCACTGACCGTCACTGGACGGCATGCCTCTCCAATGCTATTATTAGGAGGC														
AB087230 cfiA5	(401)	CCGTACCCGGAACATGGATTCAACCGATTCACTGACCGTCACTGGACGGCATGCCTCTCCAATGCTATTATTAGGAGGC														
AB087232 cfiA7	(401)	CCGTACCCGGAACATGGATTCAACCGATTCACTGACCGTCACTGGACGGCATGCCTCTCCAATGCTATTATTAGGAGGC														
FM200784 cfiA11	(401)	CCGTACCCGGAACATGGATTCAACCGATTCACTGACCGTCACTGGACGGCATGCCTCTCCAATGCTATTATTAGGAGGC														
		Section 7														
		481	490	500	510	520	530	540	550	560						
AB087229 cfiA4	(481)	GGGCATGCGACCCGACAATATCGTGGTTGGCTGGCCGACAGAGAATATCCTTTTGGCGGATGATGCTTAAAGACAAACCA														
AB087230 cfiA5	(481)	GGGCATGCGACCCGACAATATCGTGGTTGGCTGGCCGACAGAGAATATCCTTTTGGCGGATGATGCTTAAAGACAAACCA														
AB087232 cfiA7	(481)	GGGCATGCGACCCGACAATATCGTGGTTGGCTGGCCGACAGAGAATATCCTTTTGGCGGATGATGCTTAAAGACAAACCA														
FM200784 cfiA11	(481)	GGGCATGCGACCCGACAATATCGTGGTTGGCTGGCCGACAGAGAATATCCTTTTGGCGGATGATGCTTAAAGACAAACCA														
		Section 8														
		561	570	580	590	600	610	620	630	640						
AB087229 cfiA4	(561)	GACGACAAGCATCGGCAACATCTCGGACGGGACGTTGACGGCATGGCCGAAAACTCTCGATAAAGGTAAAAAGCCAAAGTTCC														
AB087230 cfiA5	(561)	GACGACAAGCATCGGCAACATCTCGGACGGGACGTTGACGGCATGGCCGAAAACTCTCGATAAAGGTAAAAAGCCAAAGTTCC														
AB087232 cfiA7	(561)	GACGACAAGCATCGGCAACATCTCGGACGGGACGTTGACGGCATGGCCGAAAACTCTCGATAAAGGTAAAAAGCCAAAGTTCC														
FM200784 cfiA11	(561)	GACGACAAGCATCGGCAACATCTCGGACGGGACGTTGACGGCATGGCCGAAAACTCTCGATAAAGGTAAAAAGCCAAAGTTCC														
		Section 9														
		641	650	660	670	680	690	700	710	720						
AB087229 cfiA4	(641)	CCTCGGCCCGCTACGTCGTGCCCGGACATGGTAACTATGGCGAACCGAACTGATAGAGCATAACCAAGCAGATCGTGAAC														
AB087230 cfiA5	(641)	CCTCGGCCCGCTACGTCGTGCCCGGACATGGTAACTATGGCGAACCGAACTGATAGAGCATAACCAAGCAGATCGTGAAC														
AB087232 cfiA7	(641)	CCTCGGCCCGCTACGTCGTGCCCGGACATGGTAACTATGGCGAACCGAACTGATAGAGCATAACCAAGCAGATCGTGAAC														
FM200784 cfiA11	(641)	CCTCGGCCCGCTACGTCGTGCCCGGACATGGTAACTATGGCGAACCGAACTGATAGAGCATAACCAAGCAGATCGTGAAC														
		Section 10														
		721	730	740	750											
AB087229 cfiA4	(721)	CAATATATAGAAAACACTTCAAAGCCATAG														
AB087230 cfiA5	(721)	CAATATATAGAAAACACTTCAAAGCCATAG														
AB087232 cfiA7	(721)	CAATATATAGAAAACACTTCAAAGCCATAG														
FM200784 cfiA11	(721)	CAATATATAGAAAACACTTCAAAGCCATAG														

Figura 5: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los alelos 4, 5, 7 y 11 de *cfiA*

A continuación se muestran los dendrogramas correspondientes a los 16 alelos depositados en *GenBank*, y a las secuencias obtenidas en el presente trabajo (Figuras 6 y 7).

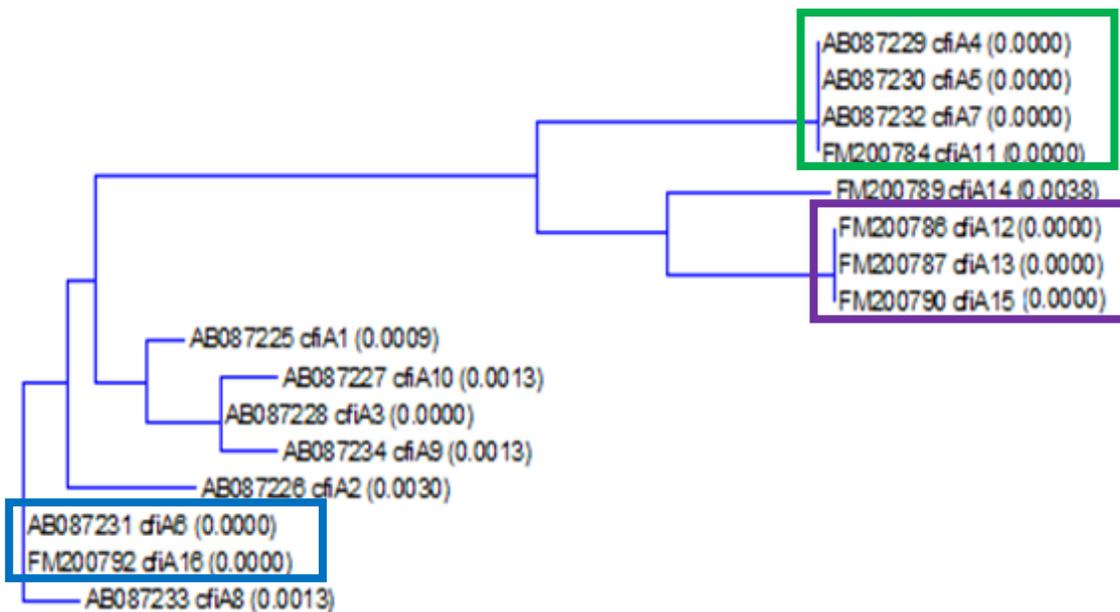


Figura 6: Dendrograma correspondiente a los alelos depositados en GenBank.

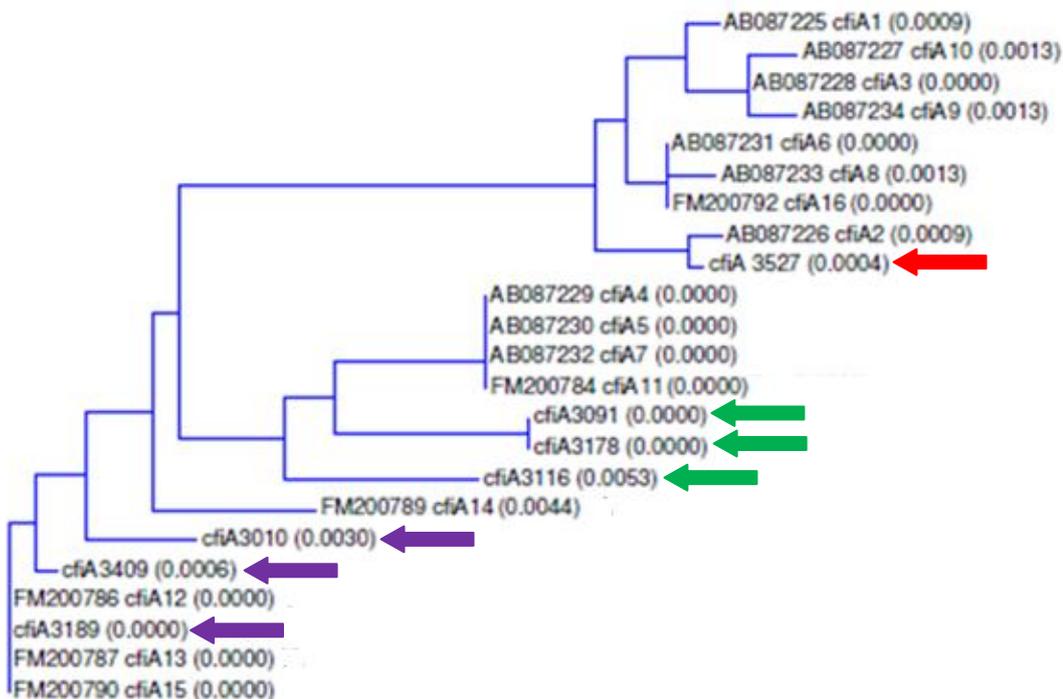


Figura 7: Dendrograma correspondiente a las secuencias nucleotídicas de los 16 alelos de *cfiA* del *GenBank* y las obtenidas en el presente trabajo. Con flechas se indican las secuencias obtenidas en el presente trabajo.

En base a los resultados obtenidos del análisis *in silico* se propone realizar la cura de base de datos para *cfiA* de la siguiente manera:

- Denominar a todos aquellos alelos que presenten 100% de identidad nucleotídica entre sí con el número correspondiente a la primer secuencia completa depositada en la base de datos. De esta forma se consideraría como ***cfiA4*** a los actuales alelos *cfiA4*, *cfiA5*, *cfiA7* y *cfiA11*; como ***cfiA13*** a los actuales alelos *cfiA12*, *cfiA13* y *cfiA15* y como ***cfiA6*** a los actuales alelos *cfiA6* y *cfiA16*. Tal como se muestra en la figura 8.

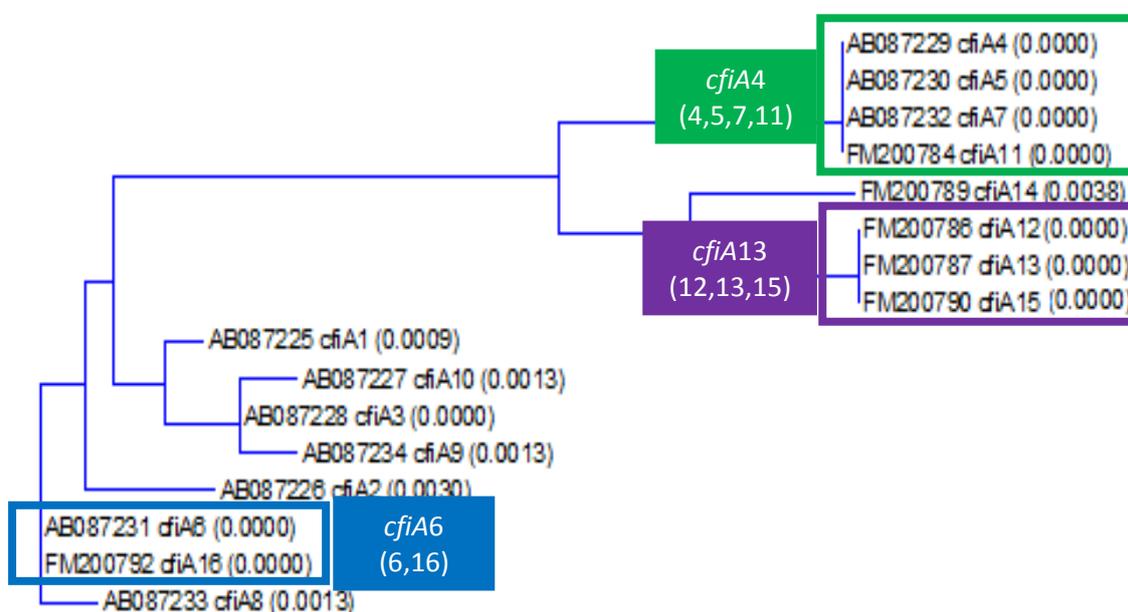


Figura 8: Dendrograma correspondiente a las secuencias nucleotídicas de los 16 alelos de *cfiA* depositados en el *GenBank*.

Como resultado de las modificaciones propuestas, a continuación se muestra el alineamiento de los **alelos curados** de *cfiA* depositados en el *GenBank* y de las secuencias obtenidas para los aislamientos del presente trabajo, y el correspondiente dendrograma (Figuras 9 y 10).







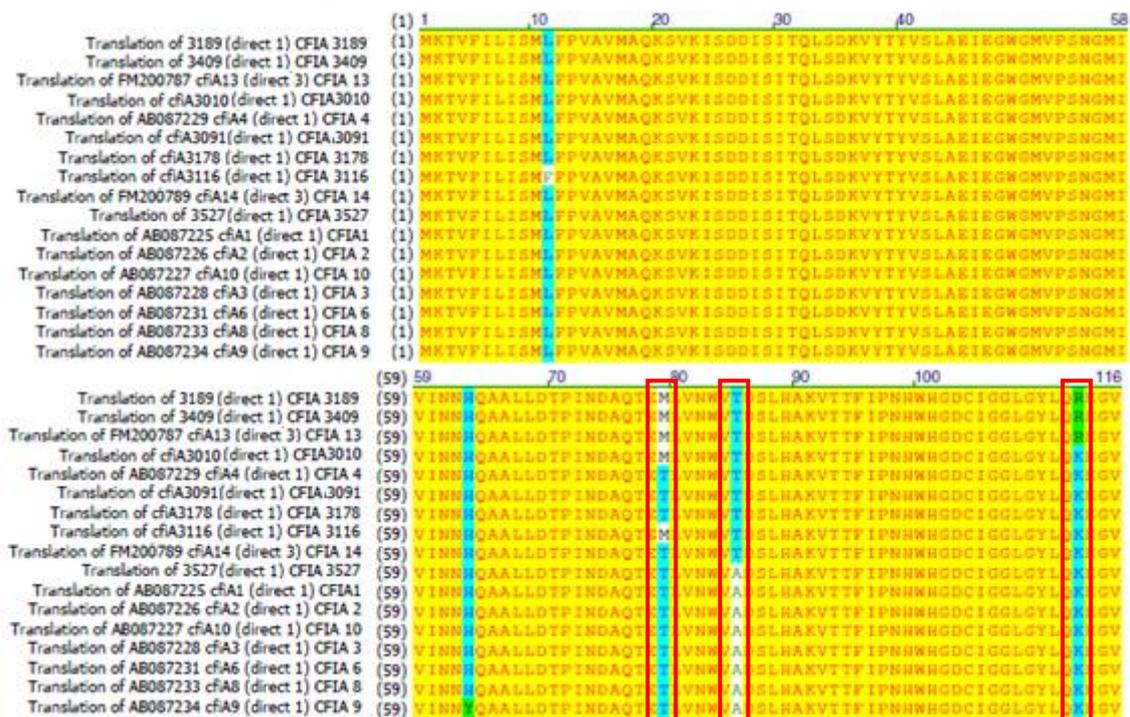
Figura 9: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los alelos curados de *cfiA* y las obtenidas en el presente trabajo.



Figura 10: Dendrograma correspondiente a las secuencias nucleotídicas de los alelos curados de *cfiA* y las obtenidas en el presente trabajo.

Esta propuesta fue presentada en el último Congreso de la American Society for Microbiology, Microbe 2016, y se encuentra en etapa de redacción el correspondiente manuscrito. Consideramos que sería necesario curar la base de datos de manera de simplificar la identificación de los alelos de *cfiA*.

Empleando el Programa Vector NTI 11.0 (Invitrogen) se realizó la traducción a proteína de las 7 secuencias nucleotídicas de *cfiA* obtenidas en el presente trabajo, y de los alelos curados provenientes del *GenBank*. A continuación se muestra el alineamiento de estas secuencias aminoacídicas y su correspondiente dendrograma (Figuras 11 y 12). Las variantes alélicas *cfiA1*, *cfiA2*, *cfiA3* y *cfiA 6* presentaron la misma secuencia aminoacídica.





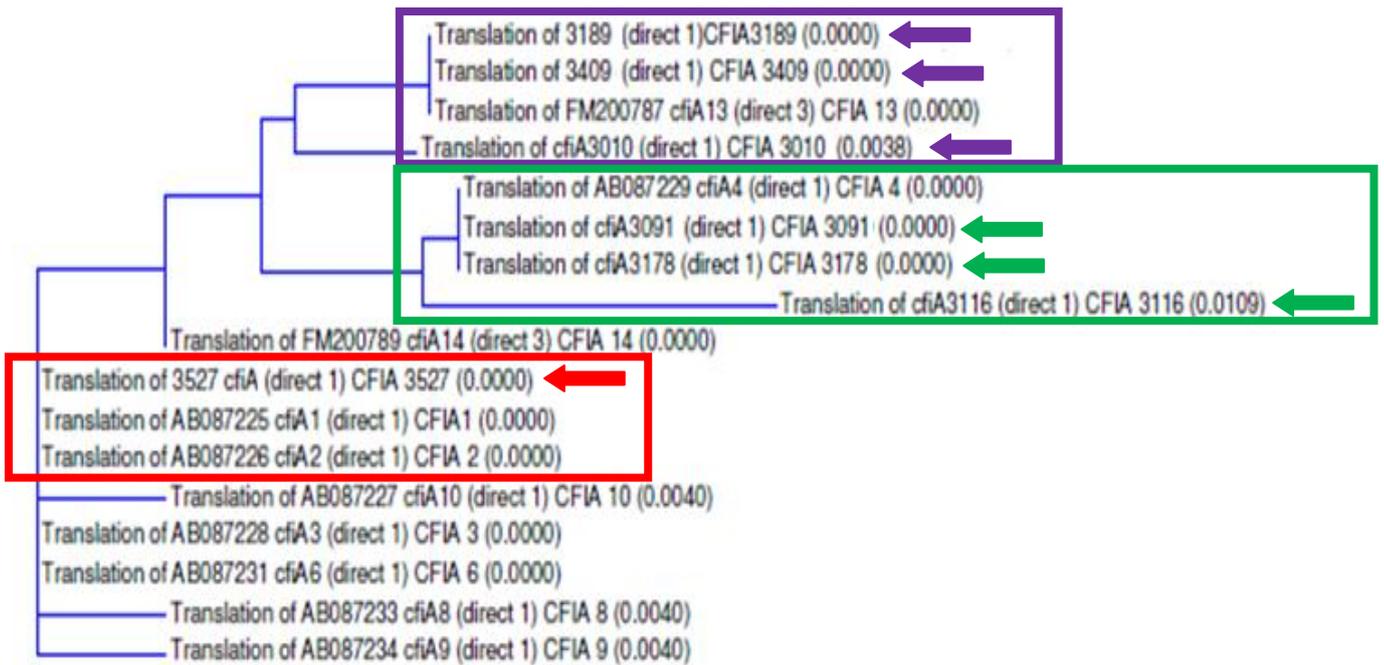


Figura 12: Dendrograma de las secuencias aminoacídicas de CfiA depositadas en el *GenBank* y las obtenidas en el presente trabajo.

En la tabla 7 se detallan las sustituciones nucleotídicas y aminoacídicas correspondientes a los alelos identificados en este trabajo, en comparación con los alelos depositados en base de datos con los cuales presentaban 99% de identidad nucleotídica.

Tabla 7: Sustituciones nucleotídicas en los alelos obtenidos en el presente trabajo y sus variantes aminoacídicas.

Aislamiento Alelo con mayor semejanza (Nro Acceso GenBank)	<i>cfiA</i>		CfiA		
	Posición	Nucleótido	Codón <sup>1</sup>	Aminoácido	
		Aislamiento / Alelo con mayor semejanza		Aislamiento / Alelo con mayor semejanza	
<i>B. fragilis</i> 3091/ <i>cfiA4</i> (AB087229.1)	138	T / C	ATT / ATC	46	I: Ile / I: Ile
	150	C / T	GGC / GGT	50	G: Gly / G: Gly
	213	T / G	CCT / CCG	71	P: Pro / P: Pro
	396	G / A	GGG / GGA	132	G: Gly / G: Gly
	441	C / T	AGC / AGT	147	S: Ser / S: Ser
	738	C / T	AAc / ACT		T: Thr / T: Thr
	744	A / G	AAA / AAG	248	K: Lys / K: Lys
<i>B. fragilis</i> 3409/ <i>cfiA13</i> (FM200787.1)	744	A / G	AAA / AAG	248	K: Lys / K: Lys
<i>B. fragilis</i> 3527/ <i>cfiA2</i> AB087225	81	C / T	GAC / GAT	27	D; Asp / D: Asp
<i>B. fragilis</i> 3010/ <i>cfiA13</i> (FM200787.1)	338	A / G	AAG / AGG	113	K: Lys / R: Arg
	350	G / A	CGA / CAA	117	R: Arg / Q: Gln
	396	A / G	GGA / GGG	127	G: Gly / G: Gly
	744	A / G	AAA / AAG	248	K: Lys / K: Lys
<i>B. fragilis</i> 3116/ <i>cfiA4</i> (AB087229.1)	31	T / C	TTT / CTT	11	F: Phe / L: Leu
	81	T / C	GAT / GAC	17	D; Asp / D: Asp
	236	T / C	ATG / ACG	79	M: Met / T: Thr
	350	G / A	CGA / CAA	117	R: Arg / Q: Gln
	441	C / T	AGC / AGT	147	S: Ser / S: Ser
	442	T / C	TTG / CTG	148	L: Leu / L: Leu
	738	C / T	AAc / ACT		T: Thr / T: Thr
	744	A / G	AAA / AAG	248	K: Lys / K: Lys
<i>B. fragilis</i> 3178/ <i>cfiA4</i> (AB087229.1)	138	T / C	ATT / ATC	46	I: Ile / I: Ile
	150	C / T	GGC / GGT	50	G: Gly / G: Gly
	213	T / G	CCT / CCG	71	P: Pro / P: Pro
	396	G / A	GGG / GGA	132	G: Gly / G: Gly
	441	C / T	AGC / AGT	147	S: Ser / S: Ser
	738	C / T	ACC / ACT		T: Thr / T: Thr
	744	A / G	AAA / AAG	248	K: Lys / K: Lys

<sup>1</sup>Se señalan las sustituciones de nucleótidos del codón en letra roja. Las filas sombreadas indican cambios aminoacídicos

Como se observa en la tabla 7 no todas las sustituciones nucleotídicas detectadas significaron un cambio de aminoácido a nivel de la proteína. Sin embargo para los aislamientos *B. fragilis* 3010 y *B. fragilis* 3116 se observaron mutaciones puntuales que produjeron cambios aminoacídicos en las posiciones

117 de CfiA de *B. fragilis* 3010 y posiciones 11 y 117 de CfiA en *B. fragilis* 3116. En la tabla 8 se muestran los alelos identificados en el presente trabajo.

Tabla 8. Variantes de *cfiA*/CfiA identificadas en el presente trabajo

Aislamiento	<i>cfiA</i>	Mutación Posición	CfiA	Mutación posición
<i>B. fragilis</i> 3091	<i>cfiA4</i>		CfiA4	
<i>B. fragilis</i> 3189	<i>cfiA13</i>		CfiA13	
<i>B. fragilis</i> 3409	<i>cfiA13</i>		CfiA13	
<i>B. fragilis</i> 3527	<i>cfiA2</i>		CfiA2	
<i>B. fragilis</i> 3010	<i>cfiA13</i>	G350A	Variante nueva	R117Q
<i>B. fragilis</i> 3116	<i>cfiA4</i>	T31C G350A	Variante nueva	F11L R117Q
<i>B. fragilis</i> 3178	<i>cfiA4</i>		CfiA4	

CfiA13 fue identificada en 2 de los aislamientos resistentes a imipenem, este marcador fue inicialmente descrito por Garcia y col en el *B. fragilis* MN32 [91]. Asimismo en el restante aislamiento resistente se identificó CfiA4 el cual había sido descrito inicialmente por Kato y col. en el año 2003 [87].

En los aislamientos sensibles se identificaron CfiA2, CfiA4, y 2 nuevos alelos (variantes de CfiA4 y CfiA13), no identificados previamente, cuyos números están pendientes de asignación.

García y col. sugirieron que las secuencias de los genes *cfiA* codifican variantes proteicas que pueden caracterizarse por los residuos en las posiciones 79, 85, 113, 188 y 225 [91] (Figura 11). En concordancia con sus

observaciones el polimorfismo MTRAD presente en CfiA13, se asoció con el fenotipo resistente: *B. fragilis* 3189 y *B. fragilis* 3409. Sin embargo, el polimorfismo TTKTN descrito CfiA4, estuvo presente tanto en *B. fragilis* 3091 resistente como en *B. fragilis* 3178 no resistente. Los aislamientos sensibles *B. fragilis* 3116 y *B. fragilis* 3010 presentaron los polimorfismos MTKTN (variante de TTKTN de CfiA4) y MTKAD (variante de MTRAD de CfiA13), respectivamente. En conclusión, al igual que García y col., observamos que la ocurrencia de un polimorfismo en particular no necesariamente se asoció sólo con un fenotipo resistente.

En consecuencia, como no se observó relación entre la presencia de distintas variantes alélicas y la resistencia observada en los microorganismos, se procedió al análisis del entorno genético de *cfiA* para intentar determinar la presencia de elementos que contribuyan a modificar su expresión.

### **3. Estudio del entorno genético de *cfiA***

A continuación se muestran los resultados de los estudios realizados para determinar el entorno genético de *cfiA*, empleando las diferentes metodologías detalladas en Materiales y Métodos: amplificación por PCR con cebadores generales, propuesta por Kato y col, amplificación de IS. empleando cebadores específicos, y PCR inversa.

En la Tabla 3 del Anexo I se muestran los cebadores empleados en el estudio del entorno genético, su secuencia nucleotídica (5´-3´), su temperatura de apareamiento (TM) y su origen. En las Tablas 4 (a, b, c, d, e, f y g) del Anexo I

se muestran su ubicación relativa a *cfiA* y el tamaño del amplicón obtenido, en cada caso.

➤ **Estudio del entorno genético de *cfiA* en los aislamientos sensibles a imipenem:**

❖ ***B. fragilis* 3010 y *B. fragilis* 3116:** En ambos casos, en la amplificación por PCR utilizando los cebadores generales G-F y E-R (Kato y col.) se obtuvieron amplicones de aproximadamente 400 pb lo cual indicaría la ausencia de IS *upstream* a *cfiA*. En concordancia, las amplificaciones para IS1186, IS21 e IS942 empleando cebadores específicos (Tabla 4a, 4b, Anexo I), fueron negativas.

❖ ***B. fragilis* 3178:** en la amplificación por PCR utilizando los cebadores generales G-F y E-R (Kato y col.) se obtuvo un amplicón de aproximadamente 400 pb. A su vez, se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 700 pb con los cebadores específicos para IS21. Sin embargo, cuando se combinaron los cebadores específicos para IS21 con los generales de Kato (IS21F en combinación con E-R) no se obtuvieron amplicones. Esto indicaría que IS21 está presente en *B. fragilis* 3178 pero no flanqueando el gen *cfiA*, por lo que su influencia sobre la expresión de este marcador de resistencia sería nula. La presencia de IS21 ha sido reportada frecuentemente en *B. fragilis*, incluso como responsable de la expresión de *cepA*.

No se obtuvieron amplicones para IS1186 ni IS942, mientras que para IS4351 se obtuvo un amplicón que no correspondía con el tamaño esperado (Tabla 4d, Anexo I).

❖ ***B. fragilis* 3527**: Del mismo modo que en el resto de los aislamientos sensibles a imipenem, en la amplificación utilizando los cebadores generales G-F y E-R (Kato y col.) se obtuvo un amplicón de aproximadamente 400 pb lo cual indicaría la ausencia de IS *upstream a cfiA*. (Tabla 4f, Anexo I). Sin embargo, en el análisis de la secuencia correspondiente a este fragmento se detectó que 200/300 pb presentaban 99% de identidad con una secuencia parcial del IS1186 (Nro. de acceso X72300). Asimismo, para corroborar si la IS1186 se encontraba asociada a *cfiA* se realizó la amplificación por PCR con los cebadores IS1186-F y E-R. En este ensayo no pudo amplificarse la secuencia completa de la IS1186, lo cual presenta concordancia con la amplificación empleando con cebadores generales donde el fragmento obtenido era de aproximadamente 400 pb.

No se obtuvieron amplicones para IS21 ni IS942, empleando cebadores específicos (Tabla 4f, Anexo I).

Se realizó la predicción de los promotores bacterianos -10 y -35 *in silico* utilizando la herramienta *on line* BROM (<http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>). Al analizar la secuencia de 100 pb *upstream a cfiA* de *B. fragilis* 3527 se pudieron identificar ambas secuencias promotoras -10 y -35 (Figuras 13 y 14). **Las secuencias -10 y -35 fueron localizados en la región**

**upstream a *cfiA* que presentaba 99% de identidad con la secuencia parcial de IS1186.**

La IS1186 ha sido descrita en *B. fragilis* en asociación a *cfiA*, aportando los promotores necesarios para su expresión [51]. La presencia de ambos promotores en *B. fragilis* 3527 podría explicar los valores de CIM observados para doripenem (Tabla 3). Como se mencionó previamente el valor de CIM de doripenem del aislamiento correspondía a la categoría intermedia según el documento M11A7 del CLSI [85]. Sin embargo, si se consideran los puntos de corte actuales del CLSI para esta droga (Documento M100S [88]) la CIM determinada para doripenem se corresponde con la categoría de resistente.

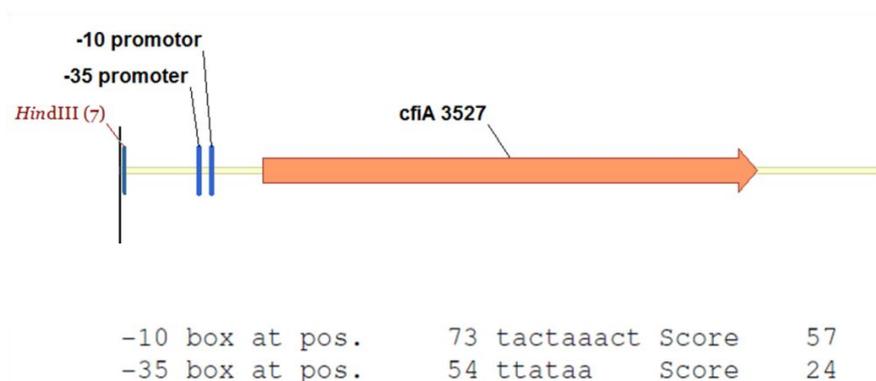


Figura 13: Esquema de las secuencias promotoras de *cfiA* halladas mediante la herramienta *online* BPROM (<http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>) en el aislamiento *B. fragilis* 3527

	HindIII									
1	TCGCCAAGCT	TTGCCTGCCA	TTATGAAAGG	AGATATAGAG	GGGCTTGCGG	CTGTGGCCGG	ATAATGCTTA	GAGATCATAA	AAGAAAGAAA	AACAAACAGG
101	ATATAGACGG	CACACGACCT	TATATAAGAG	AGTATCATTA	CTAAACTTT	CCACTATCGG	AAAAACAACC	ATAAGATATA	GATGTTAGTT	TGAATACAGC
201	AAATAAAAAG	AAATAAATGA	AAACAGTATT	TATCCTTATC	TCCATGCTTT	TCCTGTGCGC	AGTTATGGCA	CAGAAAAGCG	TAAAAATATC	CGATGACATC
301	AGTATCACCC	AACCTCTCGGA	CAAAGTGATC	ACTTATGTAT	CCCTCGCCGA	AATCGAAGGA	TGGGGTATGG	TACCTTCCAA	CGGAATGATT	GTTATCAACA
401	ACCATCAGGC	AGCGTTGCTG	GACACACCGA	TCAATGACGC	ACAAACGGAA	ACGCTGGTCA	ACTGGGTAGC	GGACTCTTTG	CATGCCAAAG	TCACCACGTT
501	TATCCGGAAC	CACTGGCAGG	GCGATTGTAT	TGGCGGACTG	GTTTACCTGC	AAAAGAAAGG	TGTCCAATCA	TATGCAAACC	AGATGACGAT	AGACCTCGCC
601	AGGAAAAAAG	GGTTGCCCGT	ACCGGAACAT	GGATTCACCG	ATTCAGTGAC	CGTCAGCTTG	GACGGCATGC	CTCTCCAATG	TTATTAITTA	GGAGGCGGAC
701	ATGCGACCGA	CAATATCGTG	GTTTGGCTGC	CGACAGAGAA	TATCCTTTTT	GGCGGATGTA	TGCTTAAAGN	CACACACRGG	CGCAACGAT	CGGGCAACATC
801	TCGGACCGGG	ACGTGACGGC	ATGGCCGAAA	ACTCTCGATA	AGGTAAAAGC	CAAGTTCGCC	TCGGCCCGCT	ACGTGCTGCC	CGGACATGGC	GACTATGSCG
901	GAACCGAACT	GATAGAGCAT	ACCAAGCAGA	TGCTGAACCA	ATATATAGAA	AGCACTTCAA	AGCCATAGCC	CGAATTGTAG	GCATCTACCC	GGTATTCCAT

Figura 14: Con rectángulos rojo y verde se muestran las secuencias promotoras -35 y -10, respectivamente *upstream* a *cfiA* en el aislamiento *B. fragilis* 3527. *cfiA* se encuentra remarcado en celeste.

Arpin y col., entre otros, han demostrado que la expresión de *cfiA* requiere de secuencias de inserción inmediatamente *upstream* a *cfiA* [83]. A su vez, otros autores como Sóni y col., han propuesto que las cepas de *B. fragilis* portadoras de *cfiA* silente pueden convertirse espontáneamente en cepas con altos niveles de resistencia lo cual ocurriría con una frecuencia de  $10^{-7}$  por célula, por generación [66, 92].

➤ **Estudio del entorno genético de *cfiA* en los aislamientos resistentes a carbapenems:**

❖ ***B. fragilis* 3409:** En la amplificación utilizando los cebadores generales G-F y E-R (Kato y col.) se obtuvieron dos productos de aproximadamente 470 pb y 1500 pb. Asimismo, se llevó a cabo la detección de las IS942, IS614, IS1186, IS4351 e IS21 utilizando cebadores específicos (Tabla 3 y 4 g, Anexo I). No se obtuvieron amplicones para IS1186 ni IS21 y los tamaños obtenidos

para IS942 e IS4351 no fueron los esperados. Se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 1500 pb con los cebadores p614-12F y cfiA3R. La secuenciación de dicho fragmento permitió obtener 1434 nucleótidos con 99% de identidad con la secuencia depositada con el Nro. de acceso AY682395.1 correspondiente con la **IS612B**. Al analizar dicha secuencia con la herramienta *on line* ISFinder Blast (<https://www-is.biotoul.fr/>), se pudo identificar que la IS612B pertenece familia IS 1380 y grupo IS942 decriptas en *B. fragilis*. De igual forma, con esta herramienta bioinformática se detectó que la secuencia IS612B es sinónima a la IS614C. En la figura 15 se muestran los alineamientos entre estos dos elementos de inserción y la secuencia *upstream* a *cfiA* hallada en *B. fragilis* 3409.



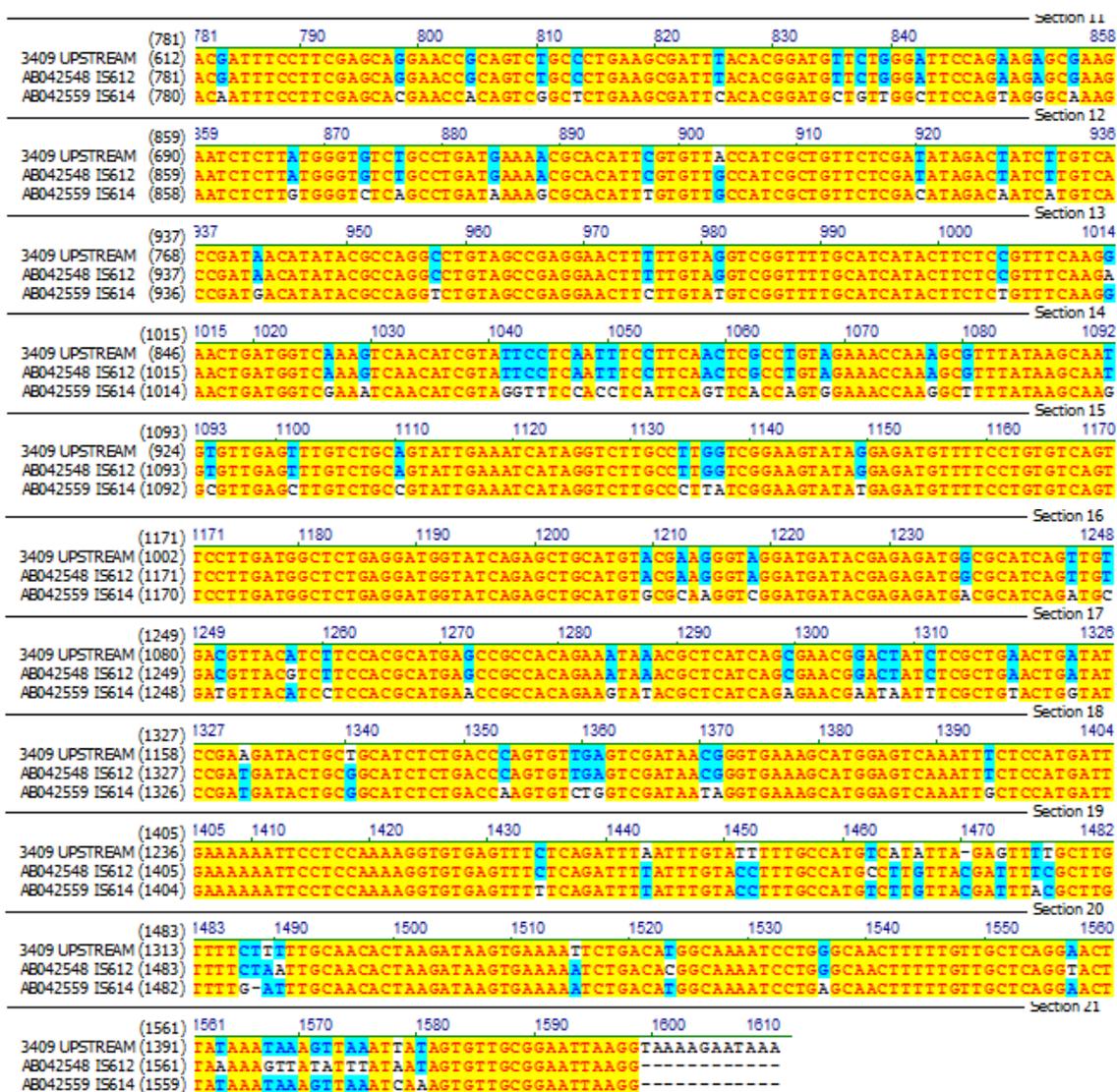


Figura 15: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de IS612B, IS614C depositadas en el GenBank y la secuencia *upstream* a *cfiA* hallada en *B. fragilis* 3409

Al utilizar la herramienta *on line* BPROM (<http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>), se pudieron identificar en la región inmediatamente adyacente al inicio de *cfiA* de *B. fragilis* 3409 las secuencias promotoras -10 y -35 necesarias para la expresión del gen codificante de CfiA (Figuras 16 y 17).

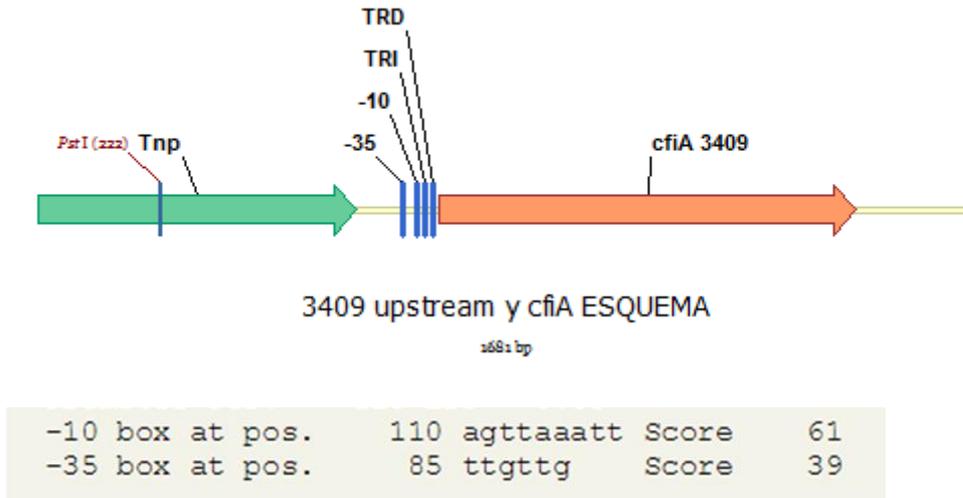


Figura 16: Esquema de las secuencias promotoras de *cfiA* identificadas con la herramienta *on line* BROM (<http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>) en el aislamiento *B. fragilis* 3409.

1	GCACATTCGT	GTTACCATCG	CTGTTCTCGA	TATAGACTAT	CTTGTCACCG	ATAACATATA	CGCCAGGCCT	GTAGCCGAGG	AACITTTTGT	AGGTCGGTIT
	CGTGTAAAGCA	CAATGGTAGC	GACAAGASCT	ATATCTGATA	GAACAGTGGC	TATTGTATAT	GCGGTCCGGA	CATCGGCTCC	TTGAAAAACA	TCCAGCCAAA
101	TGCATCATA	TTCTCCGTTT	CAAGGAAGCT	ATGGTCAAAG	TCAACATCGI	ATTCCTCAAT	TTCTTCAAC	TGCGCTGTAG	AAACCAAAGC	GTTTATAAGC
	ACGTAGTATG	AAGAGGCCAA	GTTCCCTTAC	TACCAGTTTC	AGTTGTAGCA	TAAGGAGTTA	AAGGAAGTTG	AGCCGGACATC	TTTGGTTTTG	CAAAATTCG
			PstI							
201	AATGTGTGA	GTTTGTCTGC	AGTATTGAAA	TCATAGGCTT	TGCCITGGTC	GGAAGTATAG	GAGATGTTT	CCTGTGTGAG	TTCTTGTATG	GCCTGTAGGA
	TTACACAAC	CAAACAGACG	TCATAACTTT	AGTATCCAGA	ACGGAAACCAG	CCTTCATATC	CTCTACAAAA	GGACACAGTC	AAGGAACTAC	CGAGACTCCT
301	TGGTATCAGA	GCTGCATGTA	GGAAGGGTAG	GATGATACGA	GAGATGGCGC	ATCAGTTGTG	ACGTTACATC	TTCCACGCAT	GAGCCGCGAC	AGAAATAAAC
	ACCATAGTCT	CGACGTACAT	GCTTCCCAIC	CTACTATGCT	CTCTACCCGC	TAGTCAACAC	TGCAATGTAG	AAGGTGGGTA	CTCCGGCGTG	TCITTTATTG
401	GCTCATCAGC	GAACGGACTA	TCTCGCTGAA	CTGATATCCG	AAGTACTGTC	TGCATCTCTG	ACCCAGTGT	GAGTCGATAA	CGGGTGAAAG	CATGGAGTCA
	CGAGTAGTGC	CTTGCTGAT	AGAGCGACTT	GACTATAGCC	TTCTATGAGC	ACGTAGAGAC	TGGGTACAAA	CTCAGCTATT	GCCCACTTTC	GTACCTCAST
501	AATTTCTCCA	TGATTGAAAA	AATTCCTCCA	AAAGGTGTGA	GTTTCTCAGA	TTTAATTTGT	ATTTTGGCCA	TTTCATATTA	GAGTTTGTCT	TGTTTCTTT
	TTAAAGAGST	ACTAACTTTT	TTAAGGAGGT	TTCCACACT	CAAAGAGTCT	AAATTAACA	TAAAAACGGT	AAGTATAAT	CTCAAAACGA	ACAAAAGAAA
601	TTGCAACACT	AAGATAAGTG	AAAATTGTGA	CATGGCAAAA	TCCTGGGCAA	TTTTTTGTG	CTCAGGAACT	TATAAATAA	GTTAAATTA	AGTGTGGCG
	AACGTTGTGA	TTCTATTAC	TTTTAAGACT	GTACCGTTTT	AGGACCCGTT	AAAAACAAC	GAGTCCTTGA	ATATTTT	CAATTTAAT	TCAATACGCC
701	AATTAAGTAA	AAATTAATAA	TGAAAACAG	TATTTATCCT	TATCTCCATG	CTTTTCCGTT	TCCGAGTTAT	GGCACAAGAA	AGCTTAATAA	TATCCGATGA
	TTAATTC	TTTCTAATTT	ACTTTTTGTC	ATAAATAGGA	ATAGAGGTAC	GAAAAGGGAC	AGCGTCAATA	COGTGCTTT	TCGCATTTTT	ATAGGCTACT
801	CATCAGTATC	ALCCAACCTCT	CGGACAAAGT	GTACACTTAT	GTATCCCTCG	CGGAAATCGA	AGGATGGGGT	ATGGTACCTT	CCAACGGGAT	GATTGTATC
	GTAGTACATG	TGGGTTGAGA	GCTGTITTC	CATGTGAATA	CATAGGGAC	GSCITTAGCT	TCCTACCCCA	TACCATGGAA	GGTGGCCCTA	CTAACATAG
901	AACAACCCAC	AGGCAGCGTT	GCTGGACACA	CCGATCAATG	ACGCACAAC	GGAAATGCTG	GTCAACTGGG	TGACAGACTC	TTTGATGCC	AAAGTCACCA
	TTGTTGGTGG	TCCGTCCCAA	CGACCTGTGT	GGCTAGTTAC	TGCGTGTITG	CCTTACGCAC	CAGTTGACCC	ACTGTCTGAG	AAACGTACGG	TTTCACTGGT
1001	CGTTTTATCC	GAACCACTGG	CACGGCGATT	GTATTGGCGG	ACTGGGTTAC	CTGCAAAGGA	AAGGTGTCCA	ATCATAACGG	AACCAGATGA	CGATAGACCT
	GCAAATAGGG	CTTGGTGACC	GTGCCGCTAA	CATAACCCGC	TGACCCCAATG	GACGTTTTCT	TTCCACAGGT	TAGTATGCGC	TTGGTCTACT	GCTATCTGGA
1101	CGCCARGGAA	AAAGGGTTGC	CCGTACCGGA	ACATGGATTG	ACCGATTAC	TGACCGTCAG	CTTGGACGGC	ATCCCTCTCC	AATGCTATTA	TTTAGGAGGC
	GCGGTTCTCT	TTTTCCCAACG	GGCATGGCCT	TGTACCTAAG	TGGCTAAGTG	ACTGGCAGTC	GAACCTGCGG	TACGGAGAGG	TTACGATAAT	AAATCCTCCG
1201	GGGCATGCGA	CGGACAATAT	CGTGGTTTTG	CTGCCGACAG	AGAATATCCT	TTTTGGCGGA	TGTATGCTTA	AAGACAACCA	GGCGACAAGC	ATCGGCAACA
	CCCGTACGCT	GGCTGTTATA	GCACCAARCC	GACGGCTGTC	TCTTATAGGA	AAAACCGCCT	ACATACGAAT	TTCTGTTGGT	CCGCTGTTGC	TAGCCGTTGT
1301	TCTCGGACGC	AGACGTGACG	GCATGGCCGA	AAACTCTCGA	TAAGGTAAAA	GCCAAAGTCC	CCTCGGCCCG	CTACGTCGTG	CCCGGACATG	GCGCATATGG
	AGAGCCCTGG	TCTGCACCTG	CGTACCAGCT	TTTGAAGAGCT	ATTCATTTTT	CGGTTCAAGG	GGAGCCGGGC	GATGCAGCAC	GGGCTGTAC	CGCTGATACC
1401	CGGAACCGAA	CTGATAGAGC	ATACCAAGCA	GATCGTGAAC	CAATATATAG	AAAGCACTTC	AAAACCATAG	CCCGAATTTG	AGGCATCTAC	CCGGTATTCT
	GCCTTGGCTT	GACTATCTCG	TATGGTTCTG	CTAGCACTTG	GTTATATATC	TTTCGTGGAG	TTTTGGTATC	GGGCTTAACA	TCCGTAGATG	GGCCATAAGA
1501	ATGAACGAAG	AGGCAGAGAC	TTTTATCTCG	TCCACAGAT	GTAACGCCGG	CCACAARCGA	GACATAAAAA	TATCAATTGA	ACAACACAAC	AGATCCTTGT
	TACTTCTTTC	TCCGCTCTTG	AAAATAGAGC	AGGTGTCTTA	CATTGCGCGG	GGTGTITGCT	CTGTATTTTT	ATAGTTAACT	TGTTGTGTTG	TCTAGGAACA

Figura 17: Secuencias del entorno genético de *cfiA* en *B. fragilis* 3409. Con los cuadros rojo y verde se señalan las secuencias promotoras -35 y -10 de *cfiA*, respectivamente. El gen *cfiA* se marca entre corchetes amarillos, mientras que entre corchetes azules se señala el gen de la transposasa del IS612B. Entre corchetes rosa la secuencia IRR (Terminal Inverted Repeat Right) y entre corchetes violeta la secuencia DR (Directed repeated Sequence) de la IS612B.

El elemento IS942, descrito por Rasmussen y col. en 1991, fue encontrado en la región inmediatamente *upstream* a *cfiA* en cepas de *B. fragilis* resistentes a carbapenems. En el aislamiento en estudio, *B. fragilis* 3409, se encontró IS612B asociado a *cfiA*, la cual pertenece al grupo IS942. En concordancia con los reportes previos esta IS sería responsable de la expresión de este marcador de resistencia [93].

❖ ***B. fragilis* 3091:** En la amplificación por PCR utilizando los cebadores generales G-F y E-R (Kato y col.) se obtuvo solo un fragmento de aproximadamente 500 pb. No se logró amplificar las IS942, IS1186 ni IS4351 (Tabla 4c, Anexo I). Se logró obtener un fragmento aproximadamente 1000 pb utilizando los cebadores específicos IS21-F y E-R cuya secuencia presentó 99% de identidad con el gen codificante de la transposasa B (***tnpB***) de IS21 (Nro. de acceso AF303352) en el *GenBank*. Esta ha sido *B. fragilis* resistente a carbapenems.

Al utilizar la herramienta *on line* BPROM (<http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>) se pudieron identificar las secuencias promotoras -10 y -35 en la región adyacente al inicio de *cfiA*. Del mismo modo al analizar la secuencia con la herramienta *on line* ISFinder Blast (<https://www-is.biotoul.fr/>) se detectó que la secuencia *tnpB* presenta identidad con el elemento **ISBf1**, de la familia IS21, pudiéndose identificar la IRR de dicha IS flanqueando el marco de lectura de la *tnpB* (Figuras 18 y 19).

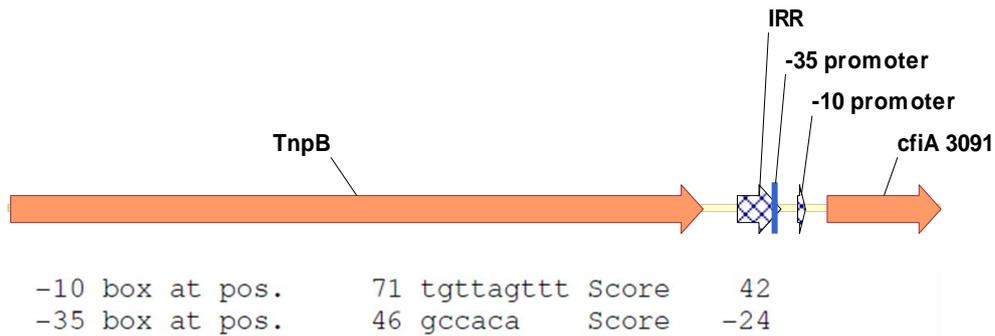


Figura 18: Esquema de las secuencias promotoras de *cfiA* identificadas con la herramienta *in line* BPROM (<http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>) y la IRR mediante IsFinder(<https://www-is.biotoul.fr/>) en el aislamiento *B. fragilis* 3091

1	ATGAAATCTT	CCATGGCTAT	GATAAAACAT	AAAAAGGAGC	TGTTGAATA	TGCACGGCAC	CTGAAACTAC	CGAACTTGGC	AGAACATGTG	GGTGTGATAC
101	TTGATGAAGC	ACAGGAGAAG	CAACTGACCT	ATTGCGAGTT	CCTGGCGAAT	TGTCTTGCCA	GGAAATCCA	GGCAGAGAA	AGGAAAAGCT	ACCTGACACG
201	GTTGAAACTC	TCCGGACTCC	CGGCCAAATA	CGATCTGGAC	CTGTACGACT	ATGACAGGGC	GGAGGAATG	GATAACAGGA	GGCTGGCGGA	ACTCGGTGAG
301	CTGGTATGGG	TGAACAGGCG	ATACAATCTT	CTCCTGGTAG	GCCCTTCGGG	AACCGGCAAG	ACCTTTATAG	CGCGCGGACT	CGTGTATGAA	GCCGTAAAAG
401	CGGGATACGA	AGCATATCTG	ATGACACTGG	AGGAGCTGCT	CACATGCTTG	AAAACGAAAG	AGGTCTCCGC	ACATGCGATG	AAAACATACA	AGCGGATCAT
501	GAAGGCCCGG	CTGCTGGCCA	TAGACGATGC	CACACTGTTG	CCTTTGAAAA	GAGAAGAAGC	CGTGTGCTG	TTCAACTGG	TCAATGACTT	CCAGGAAAGG
601	ACATCACTCA	TCATCACGGC	AAACAAGGCA	CTCACCCGTT	GGCTGGAAAC	ATTGGAGGAT	GAAGCGGTCA	CAGCCGCTT	GCTTGACAGG	CTGCTCTACT
701	GCTGCGAGAT	TATCAGSCTC	GGAGGAACAA	GCTATCGCAT	GCAAAACAGG	AAAACAATTT	TTAGCRACCA	ARACCGGAT	ATAGSCAGGT	AAAAGAGTT
801	AGGAAAGTGT	AAGCACTCTC	GATGCTGGAG	TGGATATATC	TAAATTAACC	AAAAAGTGGG	CGCACAAAT	TGCGTCCGAC	CAACCAT	AAGATATAGA
901	TGTTAGTTTG	TATACAGCAA	ATAAAAAGAA	TATATGAAA	ACAGTATTTA	TCCTTATCTC	CATGCTTTTC	CCTGTCCBAG	TTATGGCACA	GAAAAGCGTA
1001	AAAAATCCG	ATGACATCAG	TATCACCCAA	CCTCGGACA	AAGTGTACAC	TTATGTATCC	TCCC			

Figura 19: Secuencias del entorno genético de *cfiA* en *B. fragilis* 3091. Con los cuadros rojo y verde se señalan las secuencias promotoras -35 y -10 de *cfiA*, respectivamente. El extremo 5' del gen *cfiA* se marca con corchete amarillo, mientras que con corchete azul se señala el 3' del gen de la transposasa *tnpB*, de la ISBf1.

ISBf1, perteneciente a la familia IS21, sería responsable de la expresión de *cfiA* en *B. fragilis* 3091.

❖ ***B. fragilis* 3189:** En la amplificación por PCR utilizando los cebadores generales G-F y E-R (Kato y col.) no se obtuvieron productos de amplificación. En la amplificación utilizando cebadores específicos para las IS1186 e IS21 no

se obtuvieron resultados positivos, y en la amplificación de IS942, IS4351 e IS614 no se obtuvieron amplicones del tamaño esperado (Tabla 4e, Anexo I). Se procedió al estudio del entorno genético mediante PCR inversa (Tabla 4e, Anexo I). Con la técnica de PCR inversa se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 1850 pb empleando el cebador pcfiA3 R en combinación con pcfiADS F. La secuenciación de dicho fragmento con el primer pcfiA3 R permitió identificar, con 86% de identidad, el gen codificante de la TnpA de la **IS613** (Nro. de acceso AB646744.1), utilizando la herramienta *on line* BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Al analizar la secuencia con la herramienta *on line* IS Finder Blast (<https://www-is.biotoul.fr/>) se detectó que dicha secuencia además presentaba identidad con ISBf12, familia IS1380, grupo IS942 y se pudo evidenciar que la transposasa del elemento ISBf12 presenta 96% de similitud con IS613 (Figuras 20 y 21).

Asimismo al utilizar la herramienta *on line* BPROM (<http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>) se pudieron identificar las secuencias promotoras -10 y -35 en la región adyacente al inicio de *cfiA*.

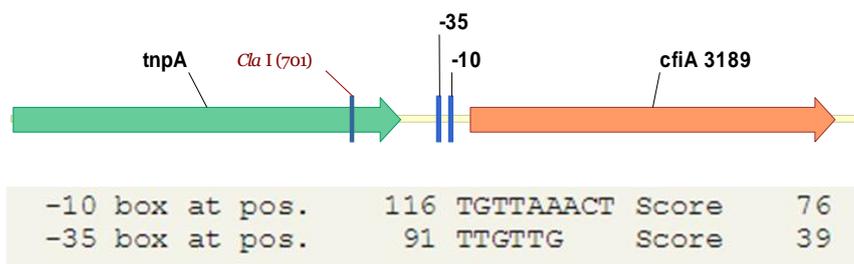


Figura 20: Esquema de las secuencias promotoras de *cfiA* identificadas con la herramienta *on line* BPROM (<http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>) en el aislamiento *B. fragilis* 3189

1	NNCCNIGAAAT ATCTCGGNNN TTNICGTCAT AANTNCCGTA TGGTCAAGTA TGGCAATGCC CGAACGCNGT AGTTTCCGTC TGATCGAGCA GATCGCCTTT NNGGNACTTA TAGAGCCNNN AANAGCAGTA ITANAGGCAT ACCAGTTTCAT ACCGTTACGG GCTTGCNCA TCAAAGGCAG ACTAGCTCGT CTAGCGGAAA
101	GGTTGCCACG ACCAGNTATA ATNCTTTCAA NGNTTTCGAG CGCTCCGTC A CCGCGCCGAG CAGACGGATA GGCATCTCCA ACAGCTCTTT CCCCATCTCC CCAACGGTGC TGTCTNATAI TANAGAAGTT NCNAAAGCTC GCGAGGCCAGT GGGGCGGCTC GTCGCTCTAT CCGTAGAGGT TGTGAGAAA GGGGTAGAGG
201	ACAAATGCTC CGATCATTTC GGCAGGCACC CGGTTGCGGC TGATCGTCAC GGCCTGCTCC ACCATCGAAA GGGTAAACGG CTTAGCGCCA TATTTATAGA TGTTACGCAG GCTAGTGAAG CCGTCCGTTG GCCAACGCCG ACTAGCAGTC CCGACGGAGG TGGTAGCTTT CCGATTTCGC GAATCGCGGT ATAAATAICT
301	TATCCGAGAA ACTTCTTGTA TGTAGGCTTT GCATCATACT TCTGGTCTC TATGAACTGA TGGTCMAAT CTACATCATA CTCACCGTCC TCTTTCAGTT ATAGGCTCTT TGAAGAACAT ACATCCGAAA CGTAGTATGA AGAGCCAGAG ATACTTGACT ACCAGTTTTA GATGTAGTAT GAGTGGCAGG AGAAAGTCAA
401	GACCAATTGT CAACAGACAA TTTAGAAGTA GCGTGTGAG CGTGTCTGCC GTATTGAAAT CGTAGTCTT ACCCGTATCT GATGTGTATG AAATGTGTT CTGTCACACA GTTGTCTGTT AAATCTTCAT CGCACAACTC GCACAGACGG CATAACTTTA GCATCAAGAA TGGGCATAGA CTACACATAC TTTACACAAG
501	TTGCGTCAGT TCCTTTATCG CTCTGAGGAT AGTGTGAGAG CTACAAGTGC GAAGTGTGCG ATGAAGTGAG AGATGGTTCA TCAAATGAGT AGTGACATCC AACGCAGTCA AGGAAATAGC GAGACTCCTA TCACAGTCTC GATGTTACG CTTACAGACC TACTTCACTC TCTACCAAGT AGTTTACTCA TCAGTGTAGG
601	TCAATACATG AGCCACCACA GAAATAACA CTCATAAGTG AACGGATGAT TTCGCTATAT TGATAACCAT ACTGTTTGTCT TCTTAGACCC AATGTAGAA AGTTATGTAC TCGSTGGTGT CTTTATTGT GAGTATTCAC TTGCTACTA AAGCGATATA ACTATTGGTA TGACAACGA AGAATCTGGG TTACTATTAA
701	CGATTATAGA AGACAATGTG GAGTCAAATT GTCCTATGAT TGAAAATATT CCTCCAAAAG GAGTGAGTTC CTCAGATTTT ATTGTACTT TTGCCATG GCTAATATCT TCTGTTACAC CTCAGTTTTA CGAGGTACTA ACTTTTATAA GGAGGTTTTT CTCACCTAAA GAGTCTAAA TAAACATGAA AACGGTAGG
801	AACGTTAGAA TTTACTTGT TTTATTTGCA AACTAAGAT AGGTGAAATT TCTGACATGA CAAAATCCTG AGTAACT AT TGTTC CAG GATATTATA TTGCAATCTT AATGAACAA AAATAAACGT TGTGATTCTA TCCACTTTAA AGACTGTACT GTTTTAGGAC TCATIGA TA ACAAC GTC CTATAATAT
901	ATATGTTAA ACTAAGTGT TCGGGAATTA AGGARGAATA ATGAAAAC AGTATTTATC CTTATCTCCA TGCCTTTCC TGTGGCAGTT ATGGCACAGA TATACAAAT TGAATTCACA ACGCCTTAAT TCCTTCTTAT TTTACTTTTG TCATAAATAG GAATAGAGGT ACGAAAAGGG ACAGCGTCAA TACCGTGTCT

Figura 21: Secuencias del entorno genético de *cfiA* en *B. fragilis* 3189. Con los cuadros rojo y verde se señalan las secuencias promotoras -35 y -10 de *cfiA*, respectivamente. El extremo 5' del gen de *cfiA* se marca con corchete amarillo, mientras que con corchete azul se señala el extremo 3' del gen de la transposasa *tnpA*, de la IS*Bf12*

Soki y col. en una publicación del año 2006 encontraron distintos elementos de inserción inmediatamente *upstream* a *cfiA* en *B. fragilis* resistentes a meropenem e imipenem. Entre otros, describieron la presencia de IS613, IS614*B*, IS4351 [66]. Si bien en *B. fragilis* 3189 se detectó la presencia de una IS que presentó un 86% de identidad con IS613, las secuencias promotoras -10 y -35 pudieron ser identificadas de manera completa. Estas, podrían ser responsables del fenotipo de resistencia observado.

Por su parte, la secuenciación del producto de PCR inversa empleando *pciA3DS F* (Tabla 4e del Anexo I), correspondiente a la región *downstream* a *cfiA*, mostró un 98% de identidad con *sugE* (Nro. de acceso AB646744.1). El gen *sugE* codifica para una pequeña proteína putativa de resistencia a multidrogas (*putative small multidrug resistant protein*). [94]

En el presente trabajo se observa que la presencia de IS o al menos de los elementos promotores -10 y -35 sería necesaria para que los microorganismos portadores de *cfiA* resulten fenotípicamente resistentes a carbapanems. Su ausencia determina un comportamiento fenotípico variable según los diferentes carbapanems. Tal como se observa en este trabajo, y lo informan otros autores, imipenem sería peor sustrato para la enzima, respecto a doripenem y ertapenem.

La inhibición con EDTA evidenció la presencia de la metalo-enzima en los aislamientos resistentes a carbapanems e incluso resultó útil en los aislamientos sensibles (dato no mostrado). Algunos autores, como Bogaerts y col., reportaron un 87% de sensibilidad en la detección de metalo-enzimas empleando tiras de E-test con la combinación meropenem+EDTA, contra un 27% de sensibilidad usando la combinación imipenem+EDTA.[95].

En los 7 aislamientos analizados en este trabajo hemos encontramos las variantes CfiA13, CfiA 4 en los que presentaban resistencia a imipenem, y CfiA 2, CfiA 4 y dos nuevas variantes (de CfiA4 y CfiA13) en los sensibles Si bien sería necesario caracterizar cinéticamente las diferentes variantes de CfiA, la presencia/ausencia de elementos promotores *usptream* al gen codificante sería responsable de la resistencia observada en los microorganismos en estudio, tal como se reporta ampliamente en la literatura.

*B. fragilis* ha sido el microorganismo donde mayoritariamente se ha descrito *cfiA* y la resistencia a carbapanems mediada por este marcador de resistencia ha sido detectada en tanto en aislamientos clínicos como en heces. Los laboratorios deben estar alertados para implementar metodologías que

rápidamente permitan el diagnóstico de cepas con resistencias emergentes, ya que la ganancia de resistencia en cepas sensibles puede ocurrir rápidamente debido a la transferencia de los elementos móviles.

## CONCLUSIONES

- La resistencia a carbapenems resulta infrecuente en los aislamientos de *B. fragilis*, incluso aplicando las actualizaciones recientemente introducidas por el CLSI.
- El gen *cfiA* fue detectado en todos los aislamientos de *B. fragilis* resistentes a imipenem, en los cuales, a su vez, se había detectado la presencia de una metalo-enzima por el ensayo de inhibición con EDTA
- *cfiA* estuvo presente en 4/76 aislamientos de *B. fragilis* sensibles a imipenem.
- En base a los resultados obtenidos del análisis *in silico* de las secuencias de *cfiA* depositadas en el *GenBank* se propuso realizar la cura de base de datos denominando como ***cfiA4*** a los actuales alelos *cfiA4*, *cfiA5*, *cfiA7* y *cfiA11*; como ***cfiA13*** a los actuales alelos *cfiA12*, *cfiA13* y *cfiA15* y como ***cfiA6*** a los actuales alelos *cfiA6* y *cfiA16*.
- Las variantes identificadas fueron: CfiA13 se halló en 2/3 aislamientos resistentes y 1 sensible a imipenem; CfiA 4 se encontró en 1 aislamiento resistente y 1 sensible a imipenem; CfiA 2 se detectó en 1 aislamiento sensible. Por último, en 2 aislamientos sensibles a imipenem se identificaron 2 variantes nuevas, relacionadas a CfiA 4 y CfiA 13.
- En los aislamientos de *B. fragilis* resistentes a carbapenems se hallaron las siguientes IS:
  - En *B. fragilis* 3091 se identificó la *ISBf1*, de la familia *IS21*, asociada al gen codificante de CfiA4;
  - En *B. fragilis* 3409 se halló la *IS612B*, de la familia *IS1380*, grupo *IS942*, asociada al gen codificante de CfiA13.

- En *B. fragilis* 3189 se halló una secuencia que presentó 86% de identidad con IS613, asociada a CfiA13. IS613 presenta homología con IS*Bf*12 de la familia IS 1380, grupo IS942.
- En ningún aislamiento sensible a imipenem se logró identificar IS. Sólo en 1 de ellos, *B. fragilis* 3527, se identificaron las secuencias promotoras -10 y -35 en la región adyacente a *cfiA*. Este aislamiento sería categorizado como resistente a doripenem según los puntos de corte actuales del CLSI A11A7.

## ANEXO I

Tabla 1: Aislamientos bacterianos incluidos en los *pooles* de MS1, MS2, MS3, MS4

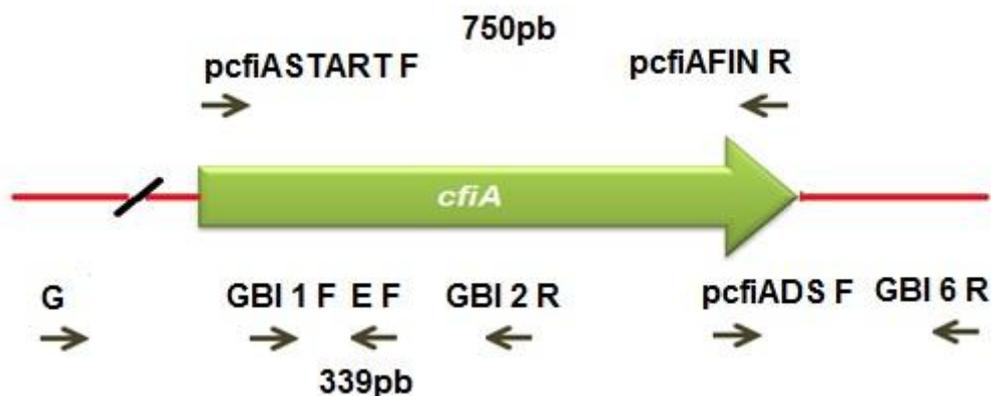
Mezcla de Sobrenadantes (MS)			
MS1	MS2	MS3	MS4
Aislamiento	Aislamiento	Aislamiento	Aislamiento
Bf 3409	Bf 3409	Bf 3409	Bf 3409
Bf 3189	Bf 3654	Bf 3449	Bf 3598
Bf 3091	Bf 3584	Bf 3350	Bf 3460
Bf 3527	Bf 3010	Bf 3601	Bf 3455
Bf 3178	Bf 3589	Bf 3653	Bf 3452
Bf 3603	Bf 3590	Bf 3543	Bf 3447
Bf 3116	Bf 3469	Bf 3579	Bf 3586
	Bf 3176	Bf 3593	
	Bf 3592	Bf 3596	
	Bf 3465	Bf 3597	

Bf: *Bacteroides fragilis*

Tabla 2: Aislamientos bacterianos incluidos en los *pooles* de MC1, MC2, MC3, MC4

Mezcla de Colonia (MC)			
MC1	MC2	MC3	MC4
Aislamiento	Aislamiento	Aislamiento	Aislamiento
Bf 3409	Bf 3409	Bf 3409	Bf 3409
Bf 3189	Bf 3614	Bf 3603	Bf 3010
Bf 3091	Bf 3527	Bf 3116	Bf 3589
	Bf 3178	Bf 3654	Bf 3590
	Bf 3192	Bf 3584	Bf 3469

Bf: *Bacteroides fragilis*



Ubicación relativa de los cebadores mencionados en la tabla 3

Tabla 3: Oligonucleótidos cebadores empleados en el estudio.

Cebadores	Secuencia 5'-3'	TM	Autores
→ GBI1 F	CCC AAC TCT CGG ACA AAA GTG	62	Kato y col.
GBI2 R ←	AGT GAA TCG GTG AAT CCA TG	58	Kato y col.
GBI6 R ←	AAA GCA TCC GGC AAT CGT TA	58	Kato y col.
→ G F	CGC CAA GCT TTG CCT GCC ATT AT	70	Kato y col.
E R←	CTT CGA ATT CGG CGA GGG ATA CAT AA	76	Kato y col.
→ IS942 F	TCC TCA ATA CAT GAG CCG C	58	Gutacker y col.
<i>cfiA</i> 3 R←	GGT TGT TGA TAA CAA TCA TCC C	62	Gutacker y col.
→ IS1186 F	GAG AAT CAA GCT TCT CGC C	58	Podglajen y col.
IS1186 R←	CCC CGA ATT CGC CTT TGC CCG TA	74	Podglajen y col.
→ IS4351 F	AAC CGA GGA TCC AAG GTA TGC AAT TTCT	80	Podglajen y col.
IS4351 R←	GTA TCC AAG CTT TTT ACG AGG TCG ATT	76	Podglajen y col.
→ IS21 F	GCT GGT TGA ATA TGC ACG GC	62	Este trabajo
IS21 R←	CGT GCC TAT ATC CGT GTT TTG GT	68	Este trabajo
→ p614-12 F	CCT TAC CCC ACA ATG CGA CTT GAG	74	Este trabajo
p614-12 R←	AAG TTG CTC AGG ATT TTG CCA TG	66	Este trabajo
p3457 R←	CTG TGC CAT AAC TGC GAC AGG GAA	74	Este trabajo
→ <i>pcfiA</i> -START F	ATG AAA ACA GTA TTT ATC CTT ATC T	62	Este trabajo
→ <i>pcfiA</i> ADS F	CAT ACC AAG CAG ATC GTG AAC C	66	Este trabajo
<i>pcfiA</i> -FIN R←	CTA TGG TTT TGA GGT GCT TTC TA	64	Este trabajo

Tabla 4: Combinaciones de cebadores utilizados en el estudio del entorno, tamaño del amplicón y ubicación relativa a *cfiA*



Tabla 4a: En *B. fragilis* 3010

<i>upstream</i>	<i>cfiA</i> Bf 3010	<i>downstream</i>	Amplicón (pb)
	→ GBI1 F	GBI6 R ←	-
→ G F	E R←		400
→ IS942 F	<i>cfiA3</i> R←		-
→ IS1186 F IS1186 R←			-
→ IS21 F IS21 R←			-

-: negativo

Tabla 4b: En *B. fragilis* 3116

<i>upstream</i>	<i>cfiA</i> Bf 3116	<i>downstream</i>	Amplicón (pb)
	→ GBI1 F	GBI6 R ←	-
→ G F	E R←		400
→ IS942 F	<i>cfiA3</i> R←		-
→ IS1186 F IS1186 R←			-
→ IS21 F IS21 R←			-

-: negativo



Tabla 4c: En *B. fragilis* 3091

<i>upstream</i>	<i>cfIA</i> Bf 3091	<i>downstream</i>	Amplicón (pb)
	→ GBI1 F	GBI6 R ←	-
→ G F	E R←		500
→ IS942 F	cfiA3 R←		-
→ IS1186 F IS1186 R←			-
→ IS4351 F IS4351 R←			-
→ IS21 F	E R←		1000

-: negativo

Tabla 4d: En *B. fragilis* 3178

<i>upstream</i>	<i>cfIA</i> Bf 3178	<i>downstream</i>	Amplicón (pb)
	→ GBI1 F	GBI6 R ←	-
→ G F	E R←		400
→ IS942 F	cfiA3 R←		-
→ IS1186 F IS1186 R←			-
→ IS4351 F IS4351 R←			300
→ IS21 F IS21 R←			700
→ pIS21 F	E R←		-
→ IS4351 F	E R←		-

-: negativo



Tabla 4e: En *B. fragilis* 3189

<i>upstream</i>	<i>cfIA</i> Bf 3189	<i>downstream</i>	Amplicón (pb)
	→ GBI1 F	GBI6 R ←	1000
→ G F	E R←		-
→ IS942 F	cfiA3 R←		540
→ IS1186 F IS1186 R←			-
→ IS4351 F IS4351 R←			350
→ IS21 F IS21 R←			-
→ p614-12 F	cfiA3 R←		950
	pcfiA3 R← <b>PCR Inversa</b> → pciADS F		1850

-: negativo

Tabla 4f: En *B. fragilis* 3527

<i>upstream</i>	<i>cfIA</i> Bf 3527	<i>downstream</i>	Amplicón (pb)
	→ GBI1 F	GBI6 R ←	900
→ G F	E R←		400
→ IS942 F	cfiA3 R←		-
→ IS1186 F IS1186 R←			-
→ IS1186 F	E R←		-
→ IS1186 F	p3457		-
→ IS21 F IS21 R←			-

-: negativo



Tabla 4g: En *B. fragilis* 3409

<i>upstream</i>	<i>cfiA</i> Bf 3409	<i>downstream</i>	Amplicón (pb)
	→ GBI1 F	GBI6 R ←	1000
→ G F	E R←		1500 y 470
→ IS942 F	cfiA3 R←		540
→ IS1186 F IS1186 R ←			-
→ IS4351 F IS4351 R ←			350
→ IS21 F IS21 R ←			-
→ p614-12 F	cfiA3 R ←		1500

-: negativo

## BIBLIOGRAFÍA

1. Murray, P.R., et al., *Bacteriology*, in *Manual of Clinical Microbiology*, E.J. Baron and P.R. Murray, Editors. 1995, ASM PRESS: Washington , D.C.
2. Mandell, G.L., R.G. Douglas, and J.E. Bennett, *Enfermedades Bacterianas, in Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica*.1991, Editorial Médica Panamericana S.A.: Buenos Aires.
3. Jousimies Somer, H.R.S., P.; Citron, D.M.; Baron, E.J.; Wexler, H.M.; Finegold, S.M., *Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th ed. ed 2002, Belmont: Star Publishing Company.
4. Shah, H.N. and M.D. Collins., *Proposal to restrict the genus Bacteroides (Castellani and Chalmers) to Bacteroides fragilis and closely related species*. Int. J. Syst. Bacteriol. , 1989. **39**: p. 85-87.
5. Könönen, E., G. Conrads, and E. Nagy, *Bacteroides, Porphyromonas, Prevotellas, Fusobacterium and other anaerobic gram-negative rods*, in *Manual of Clinical Microbiology*, J.H. Jorgensen and M.A. Pfaller, Editors. 2015, ASM PRESS: Washington DC.
6. Aldridge, K.E. and C.V. Sanders, *Susceptibility trending of blood isolates of the Bacteroides fragilis group over a 12-year period to clindamycin, ampicillin-sulbactam, ceftioxin, imipenem, and metronidazole*. Anaerobe, 2002. **8**(6): p. 301-5.
7. Katsandri, A., et al., *Two cases of infections due to multidrug-resistant Bacteroides fragilis group strains*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(9): p. 3465-7.
8. Lassmann, B., et al., *Reemergence of anaerobic bacteremia*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(7): p. 895-900.
9. Mathisen, G.E. and J.P. Johnson, *Brain abscess*. Clin Infect Dis, 1997. **25**(4): p. 763-79; quiz 780-1.
10. Wexler, H.M., *Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(4): p. 593-621.
11. Moncrief, J.S., et al., *The enterotoxin of Bacteroides fragilis is a metalloprotease*. Infect Immun, 1995. **63**(1): p. 175-81.
12. Schmidt, H. and M. Hensel, *Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(1): p. 14-56.
13. Akpinar, M., et al., *Evaluation of the prevalence of enterotoxigenic Bacteroides fragilis and the distribution bft gene subtypes in patients with diarrhea*. Anaerobe, 2010. **16**(5): p. 505-9.
14. Durmaz, B., M. Dalgalar, and R. Durmaz, *Prevalence of enterotoxigenic Bacteroides fragilis in patients with diarrhea: a controlled study*. Anaerobe, 2005. **11**(6): p. 318-21.
15. Gorbach, S.L., *Antibiotic treatment of anaerobic infections*. Clin Infect Dis, 1994. **18 Suppl 4**: p. S305-10.
16. Zahar, J.R., et al., *Incidence and clinical significance of anaerobic bacteraemia in cancer patients: a 6-year retrospective study*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(9): p. 724-9.
17. Nguyen, M.H., et al., *Antimicrobial resistance and clinical outcome of Bacteroides bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial*. Clin Infect Dis, 2000. **30**(6): p. 870-6.
18. Stein, G.E. and E.J. Goldstein, *Review of the in vitro activity and potential clinical efficacy of levofloxacin in the treatment of anaerobic infections*. Anaerobe, 2003. **9**(2): p. 75-81.

19. Legaria, M.C., et al., *Primer consenso argentino para el estudio de la sensibilidad in vitro a los antimicrobianos de las bacterias anaerobias de importancia clínica en humanos*. Rev Argent Microbiol, 2011. **43**: p. 51-66.
20. Litterio, M., H. Bianchini, and G. Carloni, *Actividad in vitro de 10 antimicrobianos frente a bacterias anaerobias. Estudio multicentrico 1999-2002*. Rev Argent Microbiol, 2004. **36**.
21. Fernandez-Canigia, L., et al., *First national survey of antibiotic susceptibility of the Bacteroides fragilis group: emerging resistance to carbapenems in Argentina*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(3): p. 1309-14.
22. Marchand-Austin, A., et al., *Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of anaerobic bacteria in Ontario, 2010-2011*. Anaerobe, 2014. **28**.
23. Snyderman, D.R., et al., *Update on resistance of Bacteroides fragilis group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009*. Anaerobe, 2011. **17**.
24. Aldridge, K.E. and C.V. Sanders, *Susceptibility trending of blood isolates of the Bacteroides fragilis group over a 12-year period to clindamycin, ampicillin-sulbactam, cefoxitin, imipenem, and metronidazole*. Anaerobe, 2002. **8**.
25. Sherwood, J.E., et al., *Multi-drug resistant Bacteroides fragilis recovered from blood and severe leg wounds caused by an improvised explosive device (IED) in Afghanistan*. Anaerobe, 2011. **17**.
26. Galvão, B.P., R.L. Meggersee, and V.R. Abratt, *Antibiotic resistance and adhesion potential of Bacteroides fragilis clinical isolates from Cape Town, South Africa*. Anaerobe 2011. **17**.
27. Livermore, D.M., *beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance*. Clin Microbiol Rev, 1995. **8**(4): p. 557-84.
28. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(6): p. 1211-33.
29. Ambler, R.P., et al., *A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases*. Biochem J, 1991. **276 ( Pt 1)**: p. 269-70.
30. Bush, K. and G.A. Jacoby, *Updated functional classification of beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(3): p. 969-76.
31. Olsson, B., K. Dornbusch, and C.E. Nord, *Factors contributing to resistance to beta-lactam antibiotics in Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother, 1979. **15**(2): p. 263-8.
32. Cuchural, G.J., Jr., et al., *Cefoxitin inactivation by Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother, 1983. **24**(6): p. 936-40.
33. Yotsuji, A., et al., *Properties of novel beta-lactamase produced by Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother, 1983. **24**(6): p. 925-9.
34. Rogers, M.B., A.C. Parker, and C.J. Smith, *Cloning and characterization of the endogenous cephalosporinase gene, cepA, from Bacteroides fragilis reveals a new subgroup of Ambler class A beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(11): p. 2391-400.
35. Rogers, M., et al., *Insertional Activation of cepA Leads to High-Level 3-Lactamase Expression in Bacteroides fragilis Clinical Isolates*. Journal of Bacteriology, 1994. **Vol. 176**(No. 14).
36. Parker, A.C. and C.J. Smith, *Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A beta-lactamase responsible for cefoxitin resistance in Bacteroides species*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(5): p. 1028-36.
37. García, N., et al., *Genetic determinants for cfxA expression in Bacteroides strains isolated from human infections*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008. **62**.
38. Cuchural, G., M. Malamy, and F. Tally, *P-Lactamase-Mediated Imipenem Resistance in Bacteroides fragilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1986. **Vol. 30**(No. 5).

39. Thompson, J. and M. Malmay, *Sequencing the Gene for an Imipenem-Cefoxitin-Hydrolyzing Enzyme (CfiA) from Bacteroides fragilis TAL2480 Reveals Strong Similarity between CfiA and Bacillus cereus ,B-Lactamase II*. Journal of Bacteriology, 1990. **Vol. 172**(No. 5).
40. Rasmussen, B.A., Y. Gluzman, and F.P. Tally, *Escherichia coli chromosomal mutations that permit direct cloning of the Bacteroides fragilis metallo-beta-lactamase gene, ccrA*. Mol Microbiol, 1991. **5**(5): p. 1211-9.
41. Hurlbut, S., G. Cuchural, and F. Tally, *Imipenem Resistance in Bacteroides distasonis Mediated by a Novel 1-Lactamase*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1990. **Vol. 34**(No. 1).
42. Khushi, T., et al., *Production of metal dependent beta-lactamases by clinical strains of Bacteroides fragilis isolated before 1987*. J Antimicrob Chemother, 1996. **37**(2): p. 345-50.
43. Edwards, R., C.V. Hawkyard, and P.S. Hashmi, *Biological assay for the detection of metallo-beta-lactamases in Bacteroides fragilis*. Br J Biomed Sci, 1998. **55**(3): p. 169-71.
44. Boente, R.F., et al., *Detection of resistance genes and susceptibility patterns in Bacteroides and Parabacteroides strains*. Anaerobe, 2010. **16**: p. 190-194.
45. Gutacker, M., C. Valsangiacomo, and J.C. Piffaretti, *Identification of two genetic groups in Bacteroides fragilis by multilocus enzyme electrophoresis: distribution of antibiotic resistance (cfiA, cepA) and enterotoxin (bft) encoding genes*. Microbiology, 2000. **146 ( Pt 5)**: p. 1241-54.
46. Podglajen, I., et al., *Genotypic Identification of Two Groups within the Species Bacteroides fragilis by Ribotyping and by Analysis of PCR-Generated Fragment Patterns and Insertion Sequence Content*. Journal of Bacteriology, 1995. **Vol. 177**( No. 18).
47. Ferreira, L.Q., et al., *Association between the cfxA gene and transposon Tn4555 in Bacteroides distasonis strains and other Bacteroides species*. Curr Microbiol, 2007. **54**(5): p. 348-53.
48. Madinier, I., et al., *Cloning and biochemical characterization of a class A beta-lactamase from Prevotella intermedia*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(8): p. 2386-9.
49. Ayala, J., et al., *Penicillin-binding proteins of Bacteroides fragilis and their role in the resistance to imipenem of clinical isolates*. Journal of Medical Microbiology, 2005. **54**.
50. Edwards, R., et al., *Prevalence and degree of expression of the carbapenemase gene (cfiA) among clinical isolates of Bacteroides fragilis in Nottingham, UK*. J Antimicrob Chemother, 1999. **43**(2): p. 273-6.
51. Podglajen, I., J. Breuil, and E. Collatz, *Insertion of a novel DNA sequence, 1S1186, upstream of the silent carbapenemase gene cfiA, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of Bacteroides fragilis*. Mol Microbiol, 1994. **12**(1): p. 105-14.
52. Paula, G.R., et al., *Determinants of resistance in Bacteroides fragilis strains according to recent Brazilian profiles of antimicrobial susceptibility*. Int J Antimicrob Agents, 2004. **24**(1): p. 53-8.
53. Edwards, R. and P.N. Read, *Expression of the carbapenemase gene (cfiA) in Bacteroides fragilis*. J Antimicrob Chemother, 2000. **46**(6): p. 1009-12.
54. Trinh, S., et al., *Plasmids pIP419 and pIP421 from Bacteroides: 5-nitroimidazole resistance genes and their upstream insertion sequence elements*. Microbiology, 1995. **141 ( Pt 4)**: p. 927-35.
55. Mahillon, J. and M. Chandler, *Insertion sequences*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(3): p. 725-74.
56. Depardieu, F., et al., *Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(1): p. 79-114.
57. Lodish, et al., *Biología Celular y Molecular*, 2008, W.H.Freeman and Company: USA.

58. Walsh, T.R., et al., *Characterization of a carbapenemase-producing clinical isolate of Bacteroides fragilis in Scandinavia: genetic analysis of a unique insertion sequence*. Scand J Infect Dis, 2005. **37**(9): p. 676-9.
59. Kato, N., et al., *New Insertion Sequence Elements in the Upstream Region of cfiA in Imipenem-Resistant Bacteroides fragilis Strains*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. **47** (3): p. 979–985.
60. Lo Cascio, G., et al., *A new insertion sequence element containing a cfiA gene in the first imipenem-resistant Bacteroides fragilis strain isolated in Italy*. Journal of Antimicrobial Agents, 2009. **34**.
61. Roh, K.H., et al., *New cfiA variant and novel insertion sequence elements in carbapenem-resistant Bacteroides fragilis isolates from Korea*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010. **66**(4): p. 343-8.
62. Podglajen, I., et al., *Multiple mobile promoter regions for the rare carbapenem resistance gene of Bacteroides fragilis*. J Bacteriol, 2001. **183**(11): p. 3531-5.
63. Edwards, R. and P. Read, *Expression of the carbapenemase gen (cfiA) in Bacteroides fragilis*. Journal of Antimicrobial Agents, 2000. **46**.
64. Soki, J., et al., *Molecular characterization of imipenem-resistant, cfiA-positive Bacteroides fragilis isolates from the USA, Hungary and Kuwait*. J Med Microbiol, 2004. **53**(Pt 5): p. 413-9.
65. Pumbwe, L., et al., *Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of Bacteroides fragilis*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(2): p. 183-9.
66. Soki, J., et al., *Examination of cfiA-mediated carbapenem resistance in Bacteroides fragilis strains from a European antibiotic susceptibility survey*. Int J Antimicrob Agents, 2006. **28**(6): p. 497-502.
67. Jamal, W., G. Al Hashem, and V.O. Rotimi, *Antimicrobial resistance among anaerobes isolated from clinical specimens in Kuwait hospitals: comparative analysis of 11-year data*. Anaerobe, 2015. **31**: p. 25-30.
68. Dubreuil, L. and M.F. Odou, *Anaerobic bacteria and antibiotics: What kind of unexpected resistance could I find in my laboratory tomorrow?* Anaerobe, 2010. **16**(6): p. 555-9.
69. Boyanova, L., R. Kolarov, and I. Mitov, *Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades*. Anaerobe, 2015. **31**: p. 4-10.
70. Boente, R.F., et al., *Detection of resistance genes and susceptibility patterns in Bacteroides and Parabacteroides strains*. Anaerobe, 2010. **16**(3): p. 190-4.
71. Novak, A., et al., *Antimicrobial susceptibility of clinically isolated anaerobic bacteria in a University Hospital Centre Split, Croatia in 2013*. Anaerobe, 2015. **31**: p. 31-6.
72. Veloo, A.C. and A.J. van Winkelhoff, *Antibiotic susceptibility profiles of anaerobic pathogens in The Netherlands*. Anaerobe, 2015. **31**: p. 19-24.
73. Toprak, N.U., et al., *Susceptibility profiles and resistance genes for carbapenems (cfiA) and metronidazole (nim) among Bacteroides species in a Turkish University Hospital*. Anaerobe, 2012. **18**(1): p. 169-71.
74. Marchand-Austin, A., et al., *Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of anaerobic bacteria in Ontario, 2010-2011*. Anaerobe, 2014. **28**: p. 120-5.
75. Snyderman, D.R., et al., *Update on resistance of Bacteroides fragilis group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009*. Anaerobe, 2011. **17**(4): p. 147-51.
76. Liu, C.Y., et al., *Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and Bacteroides fragilis isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(9): p. 3161-8.
77. Snyderman, D.R., et al., *Multicenter study of in vitro susceptibility of the Bacteroides fragilis group, 1995 to 1996, with comparison of resistance trends from 1990 to 1996*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(10): p. 2417-22.

78. Treviño, M., et al., *Susceptibility trends of Bacteroides fragilis group and characterisation of carbapenemase-producing strains by automated REP-PCR and MALDI TOF*. Anaerobe, 2012. **18**.
79. Fernandez-Canigia, L., et al., *Susceptibility trends of Bacteroides fragilis group isolates from Buenos Aires, Argentina*. Rev Argent Microbiol 2007. **39**.
80. Turner, P., et al., *Simultaneous resistance to metronidazole, co-amoxiclav, and imipenem in clinical isolate of Bacteroides fragilis*. Lancet, 1995. **345**(8960): p. 1275-7.
81. Sherwood, J.E., et al., *Multi-drug resistant Bacteroides fragilis recovered from blood and severe leg wounds caused by an improvised explosive device (IED) in Afghanistan*. Anaerobe, 2011. **17**(4): p. 152-5.
82. Hartmeyer, G.N., et al., *Multidrug-resistant Bacteroides fragilis group on the rise in Europe?* J Med Microbiol, 2012. **61**(Pt 12): p. 1784-8.
83. Arpin, C., et al., *Cross-Infection Due to Imipenem-Resistant Bacteroides fragilis Associated with a Totally Implantable Venous Port*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **Vol. 40, No. 8**.
84. Soki, J., et al., *Screening of isolates from faeces for carbapenem-resistant Bacteroides strains; existence of strains with novel types of resistance mechanisms*. Int J Antimicrob Agents, 2004. **24**(5): p. 450-4.
85. Clinical and Laboratory Standards Institute, *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, 7th ed. Approved standard M11-A7*. . Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2007.
86. *Methods for General and Molecular Bacteriology* (ASM Press). **cap.14** (Seccion 14.1.2).
87. Kato, N., et al., *New insertion sequence elements in the upstream region of cfiA in imipenem-resistant Bacteroides fragilis strains*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(3): p. 979-85.
88. Clinical and Laboratory Standards Institute, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2016.
89. Ulger, T.N., et al., *Susceptibility profiles and resistance genes for carbapenems (cfiA) and metronidazole (nim) among Bacteroides species in a Turkish University Hospital*. Anaerobe, 2012. **18**.
90. Snyderman, D.R., et al., *Update and review: state-of-the-art management of cytomegalovirus infection and disease following thoracic organ transplantation*. Transplant Proc, 2011. **43**(3 Suppl): p. S1-S17.
91. Garcia, N., et al., *Gene Context and DNA rearrangements in the carbapenemase locus of division II strains of Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(6): p. 2677-8.
92. Soki, J., et al., *Prevalence of the carbapenemase gene (cfiA) among clinical and normal flora isolates of Bacteroides species in Hungary*. J Med Microbiol, 2000. **49**(5): p. 427-30.
93. Rasmussen, B.A. and E. Kovacs, *Identification and DNA sequence of a new Bacteroides fragilis insertion sequence-like element*. Plasmid, 1991. **25**(2): p. 141-4.
94. Goto, T., et al., *Complete sequence of pBFUK1, a carbapenemase-harboring mobilizable plasmid from Bacteroides fragilis, and distribution of pBFUK1-like plasmids among carbapenem-resistant B. fragilis clinical isolates*. J Antibiot (Tokyo), 2013. **66**(4): p. 239-42.
95. Bogaerts, P., et al., *Evaluation of a new meropenem-EDTA double-ended Etest strip for the detection of the cfiA metallo-beta-lactamase gene in clinical isolates of Bacteroides fragilis*. Clin Microbiol Infect, 2008. **14**(10): p. 973-7.1.